

УДК 636.082

Лиофилизация мужских гамет сельскохозяйственных животных и птиц: достижения, проблемы, перспективы

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

ВНИИГРЖ — филиал ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. В настоящее время самым распространенным способом для длительного хранения репродуктивных клеток сельскохозяйственных животных и птиц является технология криоконсервации, которая предполагает хранение образцов в условиях сверхнизких температур. Однако значительные затраты на сохранность образцов и их транспортировку снижают показатели экономической эффективности метода. Лиофилированная сперма может храниться при положительных температурах, и не требует для этого специального оборудования. На данный момент известно, что протоколы лиофилизации позволяют сохранять целостность хроматина сперматозоидов и факторы, детерминирующие активацию ооцитов у грызунов и млекопитающих, а метод интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ) открывает возможность и перспективы использования «делиофилизованных» мужских гамет в репродуктивных технологиях. В статье представлен обзор литературы по проблеме сохранения спермы сельскохозяйственных животных в состоянии ангидробиоза. Описана история появления метода сублимационной сушки биологических образцов, проблемы предшествующих технологических этапов у разных видов сельскохозяйственных животных, резюмируются достижения и обозначаются тренды технологии лиофилизации мужских гамет животных.

Ключевые слова: лиофилизация, криоконсервация, криобанки, сперма *Gallus gallus*, сперматозоид.
Для цитирования: Курочкин А.А., Притужалова А.О., Кузьмина Т.И., Станишевская О.И. Лиофилизация мужских гамет сельскохозяйственных животных и птиц: достижения, проблемы, перспективы // Успехи наук о животных. 2025. № 1. С. 33—52. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.003

Lyophilization of male gametes of agricultural animals and birds: achievements, problems, prospects

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

All-Russian Research Institute of Genetics and Farm Animal Breeding,
Branch of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry
Saint Petersburg, Russia

Abstract. Currently, the most common method for long-term storage of reproductive cells for farm animals and birds is cryopreservation technology, which involves storing samples at ultra-low temperatures. However, significant costs for sample's preservation and their transportation reduce economic efficiency of method. Lyophilized sperm can be stored at temperatures above zero and does not require special equipment for this. It is now known that lyophilization protocols make it possible to preserve the integrity of sperm chromatin and factors that determine oocyte activation in rodents and mammals, and method of intracytoplasmic sperm injection into the oocyte (ICSI) opens up possibility and prospects for using "lyophilized" male gametes in reproductive technologies. The article provides a literature review on problem of preserving farm animal's sperm in a state of anhydrobiosis. Described history of the beginning freeze-drying method of biological samples, problems previous technological stages in different types of farm animals, summarized achievements and trends in technology of lyophilization of male animal gametes.

Keywords: lyophilization, cryopreservation, cryobanks, *Gallus gallus* sperm, spermatozoon.

For citation: Kurochkin AA, Prituzhalova AO, Kuzmina TI, Stanishevskaya OI. Lyophilization of male gametes of agricultural animals and birds: achievements, problems, prospects. Ernst Journal of Animal Science. 2025. 1: 33—52. Russian. doi: 10.25687/3034-493X.2025.2.1.003

История создания метода сублимационной сушки биологических образцов.

Одним из перспективных методов длительного сохранения репродуктивных клеток помимо криоконсервации, является лиофилизация или сублимационное высушивание. Данный метод позволяет дегидратировать влагу (воду) из замороженных суспензий (образцов) под действием вакуума, замедляя процессы жизнедеятельности клеток, переводя их в анабиотическое состояние без потери их структурной целостности и биологической активности.

Использование вакуума при низкотемпературной сушке биологических образцов впервые осуществлено Benedict and Manning в 1905 году [1]. Исследования проводили на тканях животных при помощи устройства с химическим вакуумным насосом. [2]. В 1909 году Shackell усовершенствовал метод, добавив к сушильному оборудованию механический вакуумный насос. Им было предложено замораживание образцов в смеси льда с солью с последующим поглощением влаги серной кислотой под вакуумом для высушивания крови и антисыворотки. В 1911 году в совместных исследованиях с Harris R., вышеуказанный метод использовался для сохранения вируса бешенства [3,4.], а затем в том же году Hammer для сохранения жизнеспособных бактерий. Rogers, в 1914 г., с помощью усовершенствованной аппаратуры распространил эту технологию на хранение молочнокислых микроорганизмов. В 1921 году Swift применил тот же принцип высушивания для поддержания стрептококков и пневмококков в исходном состоянии вирулентности, аналогичным образом Elser, Thomas и Steffen уже в 1935 году смогли поддерживать в жизнеспособном состоянии в течение многих лет широкий спектр микроорганизмов, включая менингококки и гонококки. В 1935 году метод был усовершенствован исследователями Flosdorf E. и Mudd S., которые лиофилизировали ткани животных, лекарства, плазму крови и антибиотики. [5,6]. В настоящее время сублимационное высушивание используют при сохранении вакцин, бактерий, вирусов, грибов (дрожжей) и спермы животных [7,8,9,10,11].

Исследования в области лиофилизации спермы животных начались около 70 лет назад. Первая работа опубликована в 1949 году Polge et al. В их экспериментах сперму петухов разбавляли раствором Рингера, содержащим глицерин. Технологические параметры лиофильной сушки, так же как и степень высушивания семени не были опубликованы. Показатели общей активности семени после регидратации составили 50%. Однако, оплодотворяющая способность спермы не была проверена, и авторы ограничились одной работой, не продолжив исследования в данной области [12].

В 1954 г. Jerome K et al. представили анализ различных методов криоконсервации и лиофилизации спермы человека. Описанные ими протоколы лиофилизации не позволили сохранить жизнеспособные клетки после регидратации [13]. Впоследствии этим же коллективом уже в 1957 году было проведено аналогичное исследование, но только на бычьей сперме. Анализ образцов показал, что все клетки после лиофилизации оказались нежизнеспособными [14].

В 1957 году советским ученым Yushchenko N.P. была доказана возможность сохранения спермы млекопитающих в высушенном состоянии. Им были получены живые клетки после регидратации [15]. В 1959 году Meryman H. T. et al. сообщили о получении образцов лиофилизированной спермы быков с 45% общей подвижности и 30% прогрессивной подвижности; искусственное осеменение дало положительные результаты [16]. В последующие годы (1960–1963) исследования продолжились и рядом авторов были также получены сперматозоиды быков с прогрессивной подвижностью после лиофилизации спермы [17]. Более поздние исследования также позволили авторам получить жизнеспособные клетки после регидратации [18,19]. Однако, данные о степени высушивания репродуктивных клеток и уровне остаточной влажности образцов отсутствуют.

Несмотря на то, что ранние исследования сублимационной сушки сперматозоидов показали в некоторой степени обнадеживающие результаты, неудачи с повторением этих экспериментов заставили исследователей по проблеме сублимационной сушки сперматозоидов взять паузу на долгое время. Все изменилось в 1998 году, когда Wakayama et al. получили здоровых мышей путем оплодотворения ооцитов лиофилизированными сперматозоидами с применением метода ИКСИ (intracytoplasmic sperm injection). Кроме того, авторы доказали, что целостность ДНК и факторы активации ооцитов у лиофилизированных сперматозоидов могут сохраняться в течение 3 месяцев при 4°C и в течение нескольких недель при комнатной температуре. Их исследование показало, что наличие неповрежденных носителей генетической информации является необходимым условием, обеспечивающим успех технологии ИКСИ и имеет решающее значение для использования лиофилизированных сперматозоидов млекопитающих [20]. Далее исследования по лиофилизации продолжились с использованием спермы лабораторных животных, в частности мышей и крыс, и начали появляться сообщения о подобных исследованиях на сельскохозяйственных животных.

Проблемы первого этапа технологии сублимационной сушки семени – замораживания – у различных видов животных. Поскольку функциональный статус лиофилизированных сперматозоидов после регидрации в огромной степени зависит от этапа замораживания, предшествующего лиофильной сушке, для получения жизнеспособных клеток необходимо максимально снизить негативное влияние целого ряда факторов, сопутствующих этому процессу (Рис. 1).



Рисунок 1. Этапы лиофилизации спермы

Существует два основных подхода к замораживанию семени: протоколы с медленным охлаждением и протоколы, основанные на витрификации. Оба этих метода нашли широкое применение при криоконсервации спермы животных. Так, например, при замораживании семени птиц методы с быстрым фазовым переходом более предпочтительны, поскольку обеспечивают высокие показатели активности заморожено/оттаянного семени и, как следствие, более высокую фертильность семени [21]. При замораживании семени быков протоколы стандартизированы и основаны на

медленном фазовом переходе, тогда как для других видов, таких как свиньи и лошади, результаты все еще очень изменчивы, и исследования в этой области продолжаются [22].

Протоколы криоконсервации семени как с применением медленного охлаждения, так и витрификации, в разной степени, но неизбежно приводят к повреждениям клетки за счет негативных воздействий больших температурных градиентов и фазового перехода вещества, во время которого образуются кристаллы льда. В результате нарушается целостность плазматических мембран сперматозоидов, акросомный и функциональный статусы митохондрий; структурным повреждениям подвергается ДНК [23, 24]. Повреждение клеток и клеточных мембран, с которым сталкиваются сперматозоиды при быстром охлаждении, связывают с образованием не только внеклеточного, но и внутриклеточного льда. Кроме того, Morris J. et al. представили доказательства того, что при высоких скоростях охлаждения повреждение сперматозоидов является результатом и осмотического дисбаланса [25]. Осмотический дисбаланс возникает в семени при добавлении и удалении криопротекторов, а также при его замораживании и оттаивании [26]. Сперматозоиды подвергаются гипертоническим воздействиям при образовании внеклеточного льда, поскольку концентрация растворенных веществ во внеклеточной незамороженной фракции увеличивается. Это приводит к обезвоживанию клеток из-за переноса воды из клетки для сохранения равновесия между внутри- и внеклеточными концентрациями растворенных веществ. Степень обезвоживания особенно высока, когда для замораживания используются низкие скорости охлаждения. При высоких скоростях охлаждения обезвоживание клеток незначительно, и их гибель вызывается, в первую очередь, образованием внутриклеточного льда [27].

Эксперимент авторов Partyka A. et al. показал, что только около 25% популяции сперматозоидов петухов в конечном итоге переживают процедуру замораживания-оттаивания [24].

Процесс замораживания семени вызывает структурные изменения в ДНК сперматозоидов, фрагментацию хроматина. Предполагается, что основными факторами, потенциально вовлеченными в повреждения на уровне молекул ДНК в процессе замораживания, являются осмотический и окислительный стрессы, возникающие в клетке на этапах пробоподготовки семени и, собственно, его замораживания [23, 28].

Одной из причин деструктивного влияния процесса замораживания на сперматозоиды является повышенная выработка клетками активных форм кислорода (АФК). АФК в сперматозоидах образуются в основном при протекании окислительно-восстановительных реакций, они необходимы для нормальной жизнедеятельности клеток. В малых концентрациях АФК способствуют капацитации сперматозоидов [29, 30], гиперактивации и целостности акросом [31]. Однако, процессы, происходящие при пробоподготовке и замораживании семени, индуцируют образование избыточных АФК в количествах, превышающих антиоксидантную емкость клеток, что оказывает повреждающее воздействие на сперматозоиды [32]. Негативное влияние свободных радикалов и перекисей включает повреждение белков, перекисное окисление липидов плазматических мембран, митохондриальную дисфункцию и повреждение целостности структуры молекул ДНК. Окислительный стресс считается основным механизмом, запускающим криоиндуцированную фрагментацию ДНК сперматозоида [33, 34, 35, 36].

Степень уязвимости репродуктивных клеток самцов всех видов животных к окислительному стрессу и их криоустойчивость в значительной степени зависят от морфологических особенностей сперматозоидов данного вида, липидного состава плазматических мембран сперматозоидов, соотношения холестерина/фосфолипиды в составе липидов и др. [37]. Плазматические мембраны сперматозоидов включают большое количество полиненасыщенных жирных кислот, за счет чего обеспечивается оптимальная

степень их текучести, необходимая для протекания акросомной реакции при взаимодействии с мембраной ооцита. С другой стороны, высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в плазматических мембранах сперматозоидов делает их очень восприимчивыми к процессу липопероксидации и уязвимыми к окислительному стрессу, что особенно проявляется у сперматозоидов птиц [38, 39].

Среды для замораживания спермы и процесс лиофилизации образцов. Среда для разбавления спермы с целью его сублимационной сушки должна представлять собой сбалансированный солевой раствор с соответствующим осмотическим давлением и pH, который легко высыхает и создает хорошую матрицу, обеспечивающую стабильность и легкую регидратацию в дальнейшем. Ни одна среда не способна поддерживать состояние биостаза сперматозоидов в условиях сверхнизких температур одинаково эффективно у всех видов животных [40]. Поэтому при разработке новых составов сред и пропорций компонентов необходимо учитывать видовые особенности сперматозоидов животных.

Olasiregui M. et al. в 2015 году, проводя сравнительный анализ степени фрагментации ДНК сперматозоидов жеребцов, продемонстрировали, что присутствие EGTA (50 мМ) обеспечивает более высокий защитный эффект в отношении ДНК сперматозоидов жеребцов, чем присутствие EDTA (50 мМ) [41].

Nakai et al. в 2007 году исследовали влияние хелатирующих агентов (EGTA, EDTA), ингибирующих активацию таких ферментов, на фрагментацию ДНК в лиофилизированных сперматозоидах хряка. Результаты подтвердили, что фрагментация ДНК в лиофилизированной сперме хряка является одной из причин снижения способности оплодотворенных ооцитов к развитию *in vitro* до стадии бластоцисты, но добавление EGTA в буфер для лиофилизации из расчета 50 мМ EGTA, улучшает эту способность по сравнению с буфером на основе EDTA или полностью без хелатирующего агента [42].

Kusakabe H. et al. в 2001 году также пришли к выводу, что сохранение сперматозоидов мышей путем лиофильной сушки с использованием в качестве разбавителя Трис-HCl буфер, содержащий EGTA (50 мМ) и NaCl (50 мМ), является эффективным средством сохранения линий мышей при низких затратах без наследственных повреждений [43].

Hara H. et al. в 2014 году показали, что модификация состава буфера EGTA (состоящий из 10 мМ Tris-HCl, 50 мМ EGTA и 50 мМ NaCl) путем полного удаления NaCl или добавления трегалозы в финальной концентрации 0,01 – 0,5 (буфер mEGTA), способствовала сохранению структуры лиофилизированного образца спермы быков и поддержанию функционального статуса сперматозоидов за счет увеличения T_g (температура стеклования максимально концентрированной замерзающей фазы) с 0 до 27,7 °C в процессе сушки [44].

Следует отметить, что дисахарид трегалоза занимает особое место, как компонент среды в технологии лиофильной сушки клеток, поскольку способствует повышению температуры фазового перехода в липидных слоях мембран и процессу стеклования. Одними из самых ранних исследований, представивших в 1992 году доказательство того, что трегалоза может стабилизировать клеточные мембраны в процессе ангидриобиоза, были Crowe J.H. et al. [45].

В настоящий момент невосстанавливающие дисахариды широко используются в качестве лиопротекторов для лиофилизации белков и липосомальных систем. Более того, дисахариды уменьшают гидратационные силы, действующие между липидными бислоями в растворе или при замораживании и сушке. Растворенные вещества могут влиять на силы гидратации либо в том случае, если они адсорбируются на границе раздела мембрана-вода, либо, когда они исключены из этой границы [46]. В отличие от типичных криопротекторных соединений, таких как глицерин, ДМСО (диметилсульфоксид) или ДМА (диметилацетамид)

и т.д., сахара могут способствовать достижению стеклообразного состояния воды при комнатной температуре, что является важным защитным свойством при стабильном хранении в высушенном состоянии [47].

Martins C. F. et al. в 2007 году продемонстрировали, что среды TCM 199 с солями Хэнкса, добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки и 0,2 М трегалозы и раствора EGTA предотвращали повреждение органелл сперматозоидов крупного рогатого скота, особенно ядер. Среда, используемая для лиофилизации, напрямую влияла на целостность хроматина, обеспечивая лучшую защиту спермы во время сублимационной сушки и при хранении [48].

Men N. T. et al. в 2013 году при добавлении трегалозы в среду для лиофилизации спермы хряков на основе EGTA установили, что ее присутствие в концентрации 15 мМ улучшает целостность структуры ДНК сперматозоидов после выхода из состояния ангидробиоза, но не оказывает влияния на их фертильность и эмбриональное развитие *in vitro* после процедуры ИКСИ [49].

Авторы Stanishevskaya et al. в 2021 году доказали возможность получения регидратированных сперматозоидов петухов, способных к функционированию и, как следствие, к самостоятельному слиянию с яйцеклеткой при искусственном осеменении кур при поэтапном добавлении в среду LCM для лиофилизации спермы трегалозы (9,5 мМ и 1,75М). Ими были сделаны первые шаги по созданию генетического сухого биобанка для домашней птицы [50].

Регидратация и подготовка лиофилизированной спермы для ИКСИ и искусственного осеменения. Регидратация или восстановление — это процесс, используемый для восстановления исходного состава лиофилизированного продукта. Лيوфилизированную сперму обычно регидратируют добавлением воды, объем которой должен быть таким же, как исходный объем суспензии сперматозоидов перед процедурой лиофилизации. После регидратации для разбавления можно использовать любой физиологический солевой раствор, при этом объем разбавления не имеет решающего значения. Перед ICSI важно промыть сперму HEPES-буферной среды, содержащей 12% ПВП, чтобы свести к минимуму введение хелатора кальция (например, EDTA или EGTA) в цитоплазму ооцита, поскольку это может помешать нормальной активации микроинъектированного ооцита [47]. Концентрация сперматозоидов в конечной регидратационной среде должна быть достаточной для облегчения отбора отдельных сперматозоидов для инъекции сперматозоидов в ооциты и достаточной для оплодотворения, если речь идет об искусственном осеменении самок [40].

Повреждение сперматозоидов в процессе лиофилизации. Замораживание и высушивание — разные стрессовые факторы. В отличие от замораживания, сушка приводит к удалению (незамерзающей) воды, обычно связанной с биомолекулами. Как правило, это более критично для биологических образцов, поскольку структура и функция биомолекул зависят от присутствия жидкой воды и взаимодействия с ней. Некоторые белки могут подвергаться необратимым изменениям в своей структуре при высушивании, что приводит к нарушению их работы после регидратации [46]. Кроме того, белки могут участвовать в реакции Майяра с восстанавливающими сахарами, особенно при низком содержании воды [51, 52]. Белки также могут быть расщеплены протеазами, происходящими из лизосом, которые потеряли целостность мембраны во время дегидратации [47].

Осмотический стресс из-за повышенной концентрации растворенных веществ и фазового перехода липидов, когда липиды в клеточной мембране превращаются из жидкой формы в гелеобразную, и слияние мембран наблюдается уже в процессе криоконсервации [28,53]. В процессе сушки наблюдается так же деформация и слияние плазматических

мембран [54]. Во время регидратации происходит лиотропный фазовый переход, когда мембраны снова превращаются из геля в жидкость. Липосомальные системы невозможно высушить без защитных мер. Липосомы и липидные бислои склонны к слиянию во время высыхания и претерпевают лиотропные фазовые изменения мембраны, что приводит к просачиванию водного содержимого через бислой [55]. Лизис клеточных мембран также может быть результатом более быстрого, потока воды обратно в клетки [46].

В клеточной среде биомолекулы гораздо более чувствительны к окислительному повреждению, поскольку АФК и связанные с ними повреждения накапливаются при сушке и последующем хранении. Более того, системы антиоксидантной защиты нарушаются при низком содержании воды, что создает возможности для реакции АФК с биомолекулами. Индуцированное свободными радикалами повреждение проявляется в виде перекисного окисления липидов и дезтерификации фосфолипидов. В результате воздействия АФК на молекулу ДНК индуцируются процессы хромосомных aberrаций, приводящие к нарушению корректной структуры хромосом [56]. Свободные радикалы способны атаковать белки в различных участках, приводя к нарушениям не только первичной, но и вторичной и третичной структуры белков, что приводит к агрегации или фрагментации, обуславливающей дальнейшую потерю функциональной активности биомолекулы [57].

Однако, ДНК и структурные белки, такие как коллаген, относительно устойчивы к повреждающим факторам и часто могут быть высушены без побочных эффектов. Ряд исследователей подтверждают данное утверждение и показывают, что процесс лиофилизации не вносит значимых изменений в целостность структуры ДНК [42, 44, 48, 58].

Хорошо известно, если сохраняется целостность структуры ядерной ДНК, сперматозоиды сохраняют способность к оплодотворению, а поскольку в процессе лиофилизации у сперматозоидов теряется подвижность, жизнеспособное потомство возможно получить с помощью ИКСИ [59]. Действительно, метод ИКСИ уже давно применяется у животных, однако в отношении птиц данная методика пока не применима ввиду особенностей строения яйцеклетки.

Ллиофилизация спермы. Исследователями Polge C. et al. в 1949 году при лиофилизации спермы птиц в течение 3 часов была выявлена общая подвижность спермы после регидратации на уровне 50%, но в статье не приведены данные об использованном протоколе лиофилизации и финальной влажности образца [12].

Авторами Stanishevskaya O. et al. в 2021 было проведено исследование, в результате которого впервые доказана возможность сохранения кинетического аппарата сперматозоидов и их фертильности после лиофилизации. По результатам искусственного осеменения виргинных кур ($n=9$) регидратированным семенем, из 8 снесенных за 1 день сбора яиц было получено 1 оплодотворенное яйцо. При этом при микроскопическом анализе вителлиновой мембраны желтка полученных яиц по методике, разработанной Bakst M. et al [60], все образцы имели точки взаимодействия сперматозоидов с вителлиновой мембраной желтка яиц ($7-37$ шт./см²), что подтверждает сохранность функциональной целостности у части сперматозоидов после лиофилизации [50].

Restrepo G. et al. в 2018 году был проведен сравнительный анализ протоколов криоконсервации спермы жеребцов, предполагающих поэтапную заморозку, витрификацию и лиофилизацию семени. Ллиофилизация спермы проходила в течение 48 часов при 150 мТорр. Авторами было показано отсутствие влияния лиофилизации на структурную целостность молекулы ДНК. Выявлен более высокий процент сперматозоидов с высокой митохондриальной активностью при лиофильной сушке ($40,26 \pm 7,79$ %) по сравнению с замораживанием ($21,82 \pm 5,38$ %) и витрификацией ($5,32 \pm 1,17$ %) ($p < 0,05$). Аналогичным образом, более высокая доля не подверженных перекисному окислению липидов и жизнеспособных сперматозоидов была обнаружена у лиофилизированного семени ($35,98 \pm$

7,01 %) по сравнению с заморожено/оттаянными ($10,34 \pm 2,69$ %) и витрифицированными ($7,07 \pm 2,00$ %) сперматозоидами ($p < 0,05$). Исследователи пришли к выводу, что витрификация приводит к большим изменениям спермы, чем лиофилизация и замораживание [61].

Olaciregui M. et al. в 2015 году при сравнительном анализе трех методов оценки фрагментации ДНК спермы жеребцов после лиофилизации выявили повреждение структуры ДНК у 14,8% клеток [41]. Oldenhof H. et al. в 2017 году изучали возможность проникновения дисахаридов через плазматическую мембрану клеток во время криоконсервации и их роль в сохранении структуры ДНК. Значения индекса фрагментации ДНК (DFI) спермы, лиофилизированной с сахарозой или трегалозой, колебались между 9–11% и 33–52% после 1 и 3 месяцев хранения, соответственно. В заключение авторы констатировали, что лиофилизация сперматозоидов с дисахаридами приводит к их поглощению во время криоконсервации, что значительно снижает деградацию хроматина при хранении в сухом виде [62].

Авторы Hara H. et al. в своем исследовании установили, что различная температура стеклования образцов оказывает разное влияние на сперматозоиды быков в процессе лиофилизации. Фрагментация ДНК в их исследовании при лиофилизации составила $6,3 \pm 0,7$ % [44]. В 2007 году исследователями Martins et al. при комплексной оценке влияния процесса лиофилизации на ультраструктуру, ДНК-фрагментацию и оплодотворяющую способность спермы быков были получены схожие результаты. Фрагментация ДНК составила 7,0%, при этом у всех клеток наблюдались повреждения мембран [48].

Авторами Nakai M. et al. в том же году оценивалось влияние хелатирующих агентов на фрагментацию ДНК лиофилизированных сперматозоидов хряков и дальнейшее развитие ооцитов после ИКСИ. Результаты показали, что фрагментация ДНК на уровне 0,7–4,1% в лиофилизированной сперме снижает способность к развитию инъецированных ооцитов [42].

В исследовании Olaciregui M. et al. в 2017 году оценивалось влияние хелатирующих агентов в сочетании с розмариновой кислотой на показатели лиофилизированной спермы хряков. Фрагментация ДНК составила 0,7–5,1%. В своей работе авторы показали, что добавление розмариновой кислоты в среду улучшает целостность ДНК сперматозоидов после процедуры лиофилизации, но не влияет на оплодотворение и последующее развитие эмбриона до стадии бластоцисты [63].

Авторы Pallazzese L. et al. в 2018 году оценивали фрагментацию ДНК в эпидидимальных лиофилизированных сперматозоидах барана и степень ее влияния на развитие эмбрионов *in vitro*. Фрагментация ДНК составила $87,8 \pm 6$, доля клеток с повреждёнными мембранами составила 99–100%. Стоит отметить, что фрагментация ДНК у эпидидимального семени значительно выше, чем у свежеполученных эякулятов [64]. Авторами Arav A. et al. в том же году была продемонстрирована высокая жизнеспособность сперматозоидов баранов после процесса лиофилизации. После одного часа при давлении в сушильной камере 80 мТорр, общая подвижность спермы составила $46,6 \pm 2,8$ % [65].

Влияние методов криоконсервации и особенностей технологического процесса лиофилизации на качественные показатели спермы и структурную целостность сперматозоидов. Подавляющее большинство авторов акцентирует внимание на целостности структуры ДНК сперматозоидов после процесса лиофилизации. Это объясняется тем, что для метода ИКСИ, как правило используемого для сублимированного семени, наличие полноценной генетической информации является решающим фактором в дальнейшем развитии эмбрионов. Как уже было сказано, в большинстве случаев лиофилизация не оказывает значимого влияния на фрагментацию ДНК. Авторы многих работ констатируют данный факт [42, 44, 48, 58].

Таблица 1. Технологические особенности процесса лиофилизации и характеристики сублимированного семени у разных видов сельскохозяйственных животных при разных методах криоконсервации

Метод криоконсервации спермы	Объем/масса образца	Хранение образцов после лиофилизации	Температура образцов (°C)	Время лиофилизации (ч)	Давление в сушильной камере (мТорр)	Общая / Прогрессивная подвижность (%)	Фрагментация ДНК (%)	Поврежденность плазматических мембран (%)	Ref.	Автор, год
Петух										
МЗ	107 мг	флаконы	-150	2	5	1±0,3 / 0	25	61	50	Stanishevskaya et al., 2021
В	2 мл	100 мл перегонная колба	-25	3	-	50	-	-	12	Polge C. et al., 1949
Жеребец										
МЗ	100 мкл	Вакуумированные флаконы	- 80	48	150	0 / 0	0,02±0,01 DFI	44,17±8,48	58	Restrepo G. et al., 2018
МЗ	150 мкл	Вакуумные пакеты	-30 ^a и 20 ^b	6 ^a и 4 ^b	60 ^a и 10 ^b	-	11–15 DFI	100	62	Oldenhof H. et al., 2017
В	150 мкл	флаконы	-	-	-	-	14,8	-	41	Olaciregui M. et al., 2015
Бык										
МЗ	15 мкл	Вакуумированные флаконы	-30	6	90	-	6,3 ± 0,7	-	44	Hara H. et al., 2014
МЗ	100 мкл	Пробирки объемом 1,5 мл, покрытые алюминиевой фольгой.	-40	12-16	262,5	0	7	100	48	Martins C. F. et al., 2007

Хряк										
МЗ	100 мкл	запаянные стеклянные ампулы (ф 8 mm x 150 mm)	-40	6	-	-	0,7–4,1	-	42	Nakai M. et al., 2007
В	150 мкл	флаконы	-68 ^а и 20 ^б	-	40 ^а и 14 ^б	-	0,7–5,1	-	63	Olaciregui M. et al., 2017
Баран										
МЗ	10 мкл	капли спермы на покровном стекле	-25	1	80	46,6± 2,8	-	-	65	Arav A. et al., 2018
МЗ	100 мкл	Вакуумиров анные ампулы	-50	24	1	-	-	100	66	Anzalone D. A. et al., 2018
МЗ	2 мл (ЭС*)	8 мл пробирки с крышками	-196	24	3,75	0 / 0	87.8 ± 6	99-100	64	Palazzese L. et al., 2018
В	150 мкл	флаконы	-68 ^а и 20 ^б	-	40 ^а и 14 ^б	-	2,9–4,4	-	67	Olaciregui M. et al., 2017

Примечание: ^а – Давление и время первичной сушки, ^б – Давление и время вторичной сушки, МЗ – протоколы криоконсервации, предполагающие поэтапное снижение температуры образцов, В – витрификация, ЭС – эпидидимальная сперма, DFI – индекс фрагментации ДНК

Проследить влияние технологических процессов лиофилизации, таких как время, давление вакуума, первичная и вторичная сушка достаточно сложно ввиду немногочисленности работ и противоречивости некоторых данных. Так, у двух групп исследователей были получены схожие данные по фрагментации ДНК у сперматозоидов быков после лиофилизации, при этом время лиофильной сушки и давление в сушильной камере значительно различалось - 6 часов и 90 мТорр у авторов Hara H. et al. [44], и 12-16 часов и 262,5 мТорр у Martins C. F. et al. [48].

У баранов Anzalone D.A. et al. и Palazzese et al. в 2018 и 2017 годах при сушке спермы в течение 24 часов и давлении в сушильной камере 1-3,75 мТорр получили разные результаты по развитию эмбрионов *in vitro* (таблица 1) [64, 66, 67].

При лиофилизации спермы хряков авторами Nakai M. et al. в 2007 году время сушки составило 6 часов, а температура образцов -40 °С [42], фрагментация ДНК сперматозоидов колебалась в пределах 0,7-4,1%. У авторов Olaciregui M. et al в 2017 году при других настройках лиофильной сушки и при поэтапном снижении вакуума и повышении температуры, фрагментации ДНК сперматозоидов хряков составила 0,7% [63].

У птиц представлено лишь две работы на данный момент по лиофилизации спермы и одна из них проведена в 1949 году, поэтому о влиянии параметров сушки и методов криоконсервации говорить пока не представляется возможным.

Использование лиофилизированного семени в репродуктивных технологиях.

Лабораторные животные. Большинство исследований по сохранению спермы в сухом виде, и оценке ее оплодотворяющей способности в дальнейшем на сегодняшний день были сосредоточены на сперматозоидах грызунов, и небольшое количество исследований было проведено на видах млекопитающих, не являющихся грызунами (Таблица 2). В большинстве работ по использованию лиофилизированной спермы используется метод интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) непосредственно в ооцит. Данная технология решает проблему почти полного снижения общей подвижности спермы после регидратации и позволяет получать от нее в дальнейшем потомство.

Первые успешные опыты на мышах были проведены учеными Wakayama et al. в 1998 году [20]. Им удалось получить жизнеспособное потомство после подсадки эмбрионов к реципиенту. В 2017 году Ito D. et al использовали лиофилизированное семя мышей, которое находилось на международной космической станции в течение 9 месяцев. Из 1317 оплодотворенных ооцитов они получили 116 зародышей, при этом доля эмбрионов на стадии дробления составила 59,5% [68]. В 2021 году авторами Wakayama et al. был предложен способ транспортировки лиофилизированного семени с использованием почтовой доставки, что может существенно упростить этот процесс, и способствовать сохранению генетических ресурсов тысяч линий мышей [69].

В работе Kamada et al. в 2018 году было показано снижение оплодотворяющей способности лиофилизированного семени мышей *in vitro* в зависимости от времени ее хранения. Так, при использовании ее на следующий день после высушивания из 275 ооцитов удалось получить 52 эмбриона, с долей эмбрионов, начавших стадию дробления – 77,8%. В случае, когда сублимированное семя хранилось год, и затем использовалось, из 1259 оплодотворенных ооцитов удалось получить 127 эмбрионов, а стадии дробления достигли только 60,2% [70]. Полученные авторами данные могут свидетельствовать о снижении оплодотворяющей способности лиофилизированной спермы с течением времени и, как следствие, ограниченным сроком ее хранения. Для определения максимальных сроков хранения лиофилизированных образцов необходимы дополнительные долгосрочные исследования.

В 2012 году Kaneko T. et al. было проведено исследование по оценке влияния длительного хранения лиофилизированных сперматозоидов мышей на их оплодотворяющую способность. Температура образцов во время хранения составила 4 °С. В результате не было получено существенных различий в развитии эмбрионов, полученных из лиофилизированных сперматозоидов мышей линии C57BL/6J, хранившихся в течение 3 лет, по сравнению со свежеполученными или лиофилизированными сперматозоидами, хранившимися в течение короткого срока [71]. Эти же исследователи в том же году использовали лиофилизированное семя крыс спустя 5 лет после высушивания. При этом из 92 оплодотворенных ооцитов они получили 10 эмбрионов [72].

Что же касается кроликов, то на сегодняшний день описано лишь одно подобное исследование. Авторы Liu J.-L. et al. в 2004 году получили один мертворожденный плод. В их исследовании лиофилизированное семя использовалось спустя 12-18 месяцев после высушивания. Из 213 оплодотворенных ооцитов стадии бластоцисты достигло лишь 24% зародышей [73].

Сельскохозяйственные животные. На сегодняшний день исследований, описывающих успешное получение жизнеспособного потомства у сельскохозяйственных животных не так много. Nakai M. et al. в 2007 году была произведена подсадка эмбрионов на стадии бластоцисты, полученных при оплодотворении лиофилизированным семенем хряков, свиней. В результате на 39 день после переноса случился выкидыш двух плодов [42]. Это единственное исследование, описывающее получение потомства при использовании лиофилизированного семени у свиней. В 2004 году исследователи Kwon I.-K. et al. при оплодотворении ооцитов свиней лиофилизированным семенем и их культивировании *in vitro* получили следующие результаты. Из 50 оплодотворенных ооцитов доля дробящихся зародышей составила 50%, стадии бластоцисты достигли 10,7%. Высушенное семя использовали после 1-6 месяцев хранения [74]. В 2017 году опубликованы результаты двух исследований Li X.-X. et al., и Olaciregui M. et al. В них доля эмбрионов свиней, дошедших до стадии бластоцисты, составила 19,6% и 40,3%, соответственно [63, 75]. Подобные результаты, как правило, получаются при оплодотворении ооцитов криоконсервированным семенем.

В 2011 году подобное исследование на лошадях, проведенное Choi Y. H. et al., позволило получить двух жеребят. Лيوфилизированное семя жеребцов использовали через 3,5 месяца после высушивания, а при культивировании и оплодотворении ооцитов *in vitro*, 38 11% достигли стадии бластоцисты [76].

При оплодотворении ооцитов коров лиофилизированной спермой быков и дальнейшем их культивировании *in vitro* Keskinetepe L. et al в 2002 году показали, что процент эмбрионов, достигших стадии бластоцисты составил 29,6%. Из 199 ооцитов 63,6% были на различных стадиях дробления. Лيوфилизированное семя использовали спустя 1-3 месяца после высушивания [77]. В исследовании авторов Martins C. et al., в 2007 году использовали высушенную сперму быков для оплодотворения ооцитов *in vitro* после 3 месяцев хранения. При этом из 180 оплодотворенных ооцитов 19,4% достигли стадии бластоцисты [48].

Исследования по использованию лиофилизированной спермы баранов в репродуктивных технологиях на данный момент, как и у быков, ограничиваются оценкой развития эмбрионов при культивировании *in vitro*. Исследования в этой области начались относительно недавно. В 2017 году Olaciregui M. et al. оценивали оплодотворяющую способность высушенной спермы баранов спустя год хранения. Из 101 ооцита 36,6% эмбрионов были на различных стадиях дробления и только 25,6% достигли стадии бластоцисты [67]. В 2018 году Anzalone D. A. et al. оценивали возможность использования

лиофилизированной спермы как альтернативного варианта сохранения вымирающих пород овец. В их исследовании из 56 оплодотворенных ооцитов лишь 10,2% достигли стадии бластоцисты [66]. В этом же году исследователи Palazzese L. et al. анализировали влияние фрагментации ДНК в эпидидимальных лиофилизированных сперматозоидах барана на нарушения в эмбриональном развитии. Культивирование зигот, оплодотворенных высушенными эпидидимальными сперматозоидами, показало, что из 277 ооцитов 22% раздробилось, и лишь 3,01% эмбрионов достигли стадии бластоцисты. При этом у эякулированного лиофилизированного семени показатели были выше и составляли 9,5% эмбрионов, достигших стадии бластоцисты из 242 оплодотворенных ооцитов [64]. Этими же авторами в 2020 году оценивалось влияние метода криоконсервации на дальнейшие показатели сублимированного семени. Было установлено, что в группе, которая сначала подвергалась витрификации из 75 оплодотворенных ооцитов 2,7% достигли стадии бластоцисты, в то время как в группе с протоколом медленного охлаждения семени доля эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, составила 7% [78].

У козлов на сегодняшний день описано лишь одно исследование по оценке оплодотворяющей способности лиофилизированного семени. В 2022 году авторы Thiangthientham P. et al. оценивали влияние лиофилизации на качество и оплодотворяющую способность спермы козла, извлеченной из различных частей придатка яичка. Сперма, извлеченная из каудального придатка яичка, пригодная для замораживания и лиофилизации, показала развитие $4,2\% \pm 3,2$ эмбрионов, достигших стадии бластоцисты [79].

Влияние методов криоконсервации на оплодотворяющую способность лиофилизированного семени. Сперматозоиды отличаются от соматических клеток механизмами протаминирования и репарации ДНК. Плотная компактизация ДНК сперматозоидов обеспечивает ее защиту от широкого спектра повреждающих факторов, которые могут вызвать фрагментацию [80]. Авторами González-Marín C. et al. было показано, что ооциты и эмбрионы на ранних стадиях развития способны восстанавливать повреждение ДНК сперматозоидов, поэтому влияние повреждения сперматозоидов на развивающийся эмбрион зависит как от повреждения хроматина сперматозоидов, так и от способности ооцита восстанавливать некоторые из этих повреждений [81].

Поскольку оценка оплодотворяющей способности лиофилизированного семени чаще всего проводится с помощью метода ИКСИ, то выбор метода криоконсервации в большинстве случаев не является основополагающим. При использовании метода ИКСИ целостность хроматина сперматозоидов играет решающую роль, а он слабо подвержен повреждениям даже после процесса криоконсервации с последующей лиофилизацией. У лабораторных животных используется в основном витрификация сперматозоидов, с данным методом удается получать жизнеспособное потомство и высокий выход эмбрионов на стадии бластоцисты. У сельскохозяйственных животных в основном же используются методы поэтапной заморозки, при которых также авторы получали высокий выход эмбрионов на стадии бластоцисты и в некоторых случаях даже жизнеспособное потомство (таблица 2) [74, 84].

Таблица 2. Применение лиофилизированной спермы в репродуктивных технологиях лабораторных и сельскохозяйственных животных

Вид животного	Определение фертильности спермы	Метод сохранения спермы	Метод криоконсервации спермы	Время хранения спермы	Количество ооцитов	Стадия дробления эмбрионов (%)	Стадия бластоцисты (%)	Исход беременности	Ссылка	Автор, год
Лабораторные животные										
Мышь	ИКСИ	Леоф.	В	1 день	275	77,8	-	52 плода	70	Kamada Y. et al., 2018
	ИКСИ	Леоф.	В	1-3 дней	151	78,1	-	12 плодов	69	Ito, D. et al., 2021
	ИКСИ	Леоф.	В	3 месяца	182	70,3	-	10 плодов	69	Ito, D. et al., 2021
	ИКСИ	Леоф.	В	9 месяцев	1317	59,5	-	73 плода	68	Wakayama S. et al., 2017
	ИКСИ	Леоф.	В	1 год	1259	60,2	-	127 плодов	70	Kamada Y. et al., 2018
Крыса	ИКСИ	Леоф.	В	2 дня	139	-	-	11 плодов (1 мертворожденный)	82	Hirabayashi M. et al., 2005
	ИКСИ	Леоф.	В	2–6 недель	203	68	20	9 плодов	83	Kaneko T. et al., 2007
	ИКСИ	Леоф.	В	5 лет	92	-	-	10 плодов	72	Kaneko T. et al., 2012
Кролик	ИКСИ	Леоф.	В	12–18 месяцев	213	-	24	1 мертворожденный плод	73	Liu J.-L. et al., 2004
Сельскохозяйственные животные										
Курица	ИО	Леоф.	МЗ	24 часа	-	-	-	1 оплодотворенное яйцо из 9 снесенных	50	Stanishevskaya et al., 2022
Лошадь	ИКСИ	Леоф.	В	3,5 месяца	38	84	11	2 жеребенка	74	Choi Y. H. et al., 2011
КРС	ИКСИ	Леоф.	МЗ	12 часов	172	41,5±3,1	14,2 ± 2,5	-	44	Hara H. et al., 2014
	ИКСИ	Леоф.	МЗ	1–3 месяцев	199	63,3	29,6	-	77	Keskintepe L. et al., 2002
	ИКСИ	Леоф.	МЗ	3 месяца	180	57,7	19,4	-	48	Martins C. F. et al., 2007
Свинья	ИКСИ	Леоф.	МЗ	-	236	-	12,6 ± 2,0	-	49	Men N. T. et al., 2013

	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1–6 месяцев	50	50,0±1,2	10,7 ± 1,5	-	75	Kwon I.-K. et al., 2004
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	-	124	-	-	Выкидыш двух плодов на 39 день после переноса эмбрионов	42	Nakai M. et al., 2007
	ИКСИ	Высуш. *	-	-	185	74,1±1,3	19,6 ± 2,4	-	75	Li X.-X. et al., 2017
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1 год	63	53,9	40,3	-	63	Olaciregui M. et al., 2017
Овца	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	-	56	32,7	10,2	-	66	Anzalone D. A. et al., 2018
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	-	242	32,2	9,5	-	64	Palazzese L. et al., 2018
	ИКСИ	Лиоф. ЭС	МЗ	-	277	22	3,01	-	64	Palazzese L. et al., 2018
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1 месяц	132	35,6	7,6	-	78	Palazzese L. et al., 2020
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1-3 месяцев	100	42	7	-	78	Palazzese L. et al., 2020
	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	1,5 года	101	15,8	2	-	78	Palazzese L. et al., 2020
	ИКСИ	Лиоф.	В	1-3 месяцев	75	25,3	2,7	-	78	Palazzese L. et al., 2020
	ИКСИ	Лиоф.	В	1 год	101	36,6	25,6	-	67	Olaciregui M. et al., 2017
Коза	ИКСИ	Лиоф.	МЗ	-	-	-	4,2 ± 3, 2	-	79	Thiangthientham P. et al., 2022

*Примечание: МЗ – протоколы криоконсервации, предполагающие поэтапное снижение температуры образцов, В – витрификация, ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, ИО – искусственное осеменение, ЭС – Эпидидимальная сперма, * высушивание за счет испарения влаги.*

Заключение. В настоящее время использование лиофилизации как метода сохранения спермы не позволяет получить высокий выход жизнеспособного потомства в сравнении с более традиционным методом – криоконсервацией, исключением являются грызуны, у которых применение данного метода показывает высокие результаты и позволяет получать потомство *in vitro*, используя сублимированное семя. В период с 1950 по 1970 годы ряду исследователей удалось получить высокие результаты при лиофилизации спермы сельскохозяйственных животных, однако повторить их в дальнейшем другим исследователям пока не удалось. На данный момент исследования носят фрагментарный характер, а разработка стандартизированных методик продолжается до сих пор.

Исследования в этой области должны быть направлены на определение оптимального состава среды для лиофилизации, защищающей сперматозоиды во время процедуры лиофилизации на всех этапах, которые должны привести к возможности адаптировать среду к характеристикам семени и соответствовать требованиям различных сельскохозяйственных видов животных.

Следует также провести исследования по улучшению состава криозащитных разбавителей для спермы, снижающих деструктивное влияние активных форм кислорода, поскольку известно, что повреждение ДНК может быть вызвано окислительным стрессом, возникающим после регидратации. Сделать это можно путем добавления природных или синтетических антиоксидантов в разбавитель для спермы. Подобный подход к составлению сред для криоконсервации спермы будет особенно актуальным для птиц, поскольку низкая концентрация цитоплазматических антиоксидантов и высокая концентрация полиненасыщенных жирных кислот делает сперму птиц более восприимчивой к свободнорадикальному окислению липидов.

При разработке протоколов лиофильной сушки спермы необходимо учитывать видовые особенности строения и биохимического состава сперматозоидов разных видов сельскохозяйственных животных. Технологические особенности лиофильной сушки должны быть также подобраны в соответствии с морфофизиологическими особенностями спермы различных видов сельскохозяйственных животных.

Следует адаптировать технологию ИКСИ для лиофилизированной спермы, чтобы повысить долю жизнеспособных эмбрионов, пригодных к дальнейшей трансплантации. Концентрировать внимание на сохранении целостности кинетического аппарата и жизнеспособности сперматозоидов необходимо у тех видов сельскохозяйственных животных, у которых ввиду физиологических особенностей, применение метода ИКСИ не представляется возможным, в частности у птиц. Совершенствование этапов технологии лиофилизации, несомненно, будет основываться на углублении познания фундаментальных механизмов ангидробиоза, использовании инновационных материалов, наночастиц различных химических элементов и техническом обеспечении аппаратурой нового поколения.

Представленный метод сохранения репродуктивных клеток самцов может стать альтернативой криоконсервации спермы, в случае разработки и апробации методики, позволяющей получать жизнеспособное потомство от лиофилизированной спермы и подтвержденной возможностью длительного хранения образцов. Для производителей, сперму которых невозможно сохранить ввиду низкой общей подвижности заморожено/оттаянного семени, данный метод может являться альтернативой.

Литература.

1. Benedict, F.G. The determination of water in foods and physiological preparations / Benedict F.G., Manning C.R. // American journal of Physiology – Legacy Content. – 1905. – Vol. – 13. – № 3. – P. 309.

2. Juan, S. R.-N. Liofilización de alimentos / Juan Sebastián Ramírez Navas. – Universidad del valle cali – Colombia. – 2007.
3. Смит, О. Влияние низких температур на живые ткани и клетки. В кн.: Применение замораживания высушивания в биологии / Под ред. Р. Харриса. – Москва. – 1956. – 432 с.
4. Охапкина, В.Ю. Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лيوфилизация / Теоретическая и прикладная экология. – 2009. – № 4. – С. 21.
5. Flosdorf, E.W. Studies with H. Pertussis: Maintenance of Cultures in Phase I / Flosdorf E.W., Kimball A. C. // Journal of Bacteriology. – 1939. – Vol. 39. – № 3. – P. 255.
6. Flosdorf, E.W. Procedure and apparatus for preservation in “lyophile” form of serum and other biological substances / Flosdorf E.W., Mudd S. // Journal of immunology. – 1935. – Vol. 29. – № 5. – P. 389.
7. Kupletskaya, M. B. Viability of lyophilized microorganisms after 50-year storage / Kupletskaya M. B., Netrusov A. I. // Microbiology. – 2011. – Vol. 80. – № 6. – P. 850.
8. Bond, C. Freeze-drying of yeast cultures / Bond C. // Methods in molecular biology. – 2007. – Vol. 368. – P. 99.
9. Kawamura, S. Freeze-Drying of Yeasts / Kawamura S., Murakami Y., Miyamoto Y., Kimura K. // Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. – 1995. – P. 31.
10. Bunse, T. The preservation of fungal cultures by lyophilization / Bunse T., Steigleder G. K. // Mycoses. – 2009. – Vol. 34. – № 3-4. – P. 173.
11. Olaciregui, M. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? / Olaciregui M., Gil L. // Reproduction in domestic Animals. – 2016. – Vol. 52. – P. 248.
12. Polge, C. Revival of Spermatozoa after Vitriification and Dehydration at Low Temperatures / Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. // Nature. – 1949. – Vol. 164. – № 4172. – P. 666.
13. Sherman, J. K. Freezing and freeze-drying of human spermatozoa / Sherman J. K., Jerome K. // Fertility and sterility. – 1954. – Vol. 5. – № 4. – P. 357.
14. Sherman, J. K. Freezing and freeze-drying of bull spermatozoa / Sherman J. K. // American journal of physiology-legacy content. – 1957. – Vol. 190. – № 2. – P. 281.
15. Yushchenko, NP. Proof of the possibility of preserving mammalian spermatozoa in a dried state / Yushchenko NP. // Proc Lenin Acad Agr Sci. – 1957. – Vol. 22. – P. 37.
16. Meryman, H. T. Survival of Spermatozoa Following Drying / Meryman H. T., Kafig E. // Nature. – 1959. – Vol. 184. – № 4684. – P. 470.
17. Saacke, R. G. Freeze-drying of Bovine Spermatozoa / Saacke R. G., Almquist J. O. // Nature. – 1961. – Vol 192. – № 4806. – P. 995.
18. Meryman, H. T. Special article freeze-drying of bovine spermatozoa / Meryman H. T., Kafig E. // Journal of reproduction and fertility. – 1963. – Vol 5. – № 1. – P. 87
19. Larson, E.V. Freeze-drying of spermatozoa / Larson E.V., Graham E.F. // Developments in biological standardization. – 1976. – Vol 36. – P. 343.
20. Wakayama, T. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa / Wakayama T., Yanagimachi R. // Nature biotechnology. – 1998. – Vol 16. – № 7. – P. 639.
21. Tselutin, K. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa / Tselutin K., Seigneurin F., Blesbois E. // Poultry science. – 1999. – Vol. 78. – № 4. – P. 586.
22. Curry, MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock / Curry MR. // Reviews of reproduction. – 2000. – Vol. 5. – № 1. – P. 46.
23. Gliozzi, T. M. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation / Gliozzi T. M., Zaniboni L., Cerolini S. // Theriogenology. – 2011. – Vol. 75. – № 9. – P. 1613.
24. Partyka, A. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry / Partyka A., Niżański W., Łukaszewicz E. // Theriogenology. – 2010. – Vol. 74. – № 6. – P. 1019.
25. Morris, J. G. Freezing injury: The special case of the sperm cell / Morris J. G., Acton E., Murray B. J., Fonseca F. // Cryobiology. – 2012. – Vol. 64. – № 2. – P. 71.
26. Pegg, D.E. Principles of cryopreservation / Pegg D.E. // In: Wolkers W.F., Oldenhof H., Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, 3rd edn, Methods in Molecular Biology 1257, 2015. – P. 3–19.
27. Sieme, H. Sperm Membrane Behaviour during cooling and cryopreservation / Sieme H., Oldenhof H., Wolkers W. // Reproduction in domestic animals. – 2015. – Vol 50. – № 3. – P. 20.

28. Fraser, L. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing / Fraser L., Strzeżek J. // *Animal reproduction science*. – 2007. – Vol. 99. – № 3-4. – P. 317.
29. Aitken, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage / Aitken R. J. // *Molecular reproduction and development*. – 2017. – Vol. 84. – № 10. – P. 1039.
30. Ford, C. Regulation of sperm function by reactive oxygen species / Ford C. // *Human reproduction update*. – 2004. – Vol. 10. – № 5. – P. 387.
31. Pons-Rejraji, H. Rôles des dérivés actifs de l'oxygène (DAO) sur les spermatozoïdes humains et infertilité masculine / Pons-Rejraji H., Sion B., Saez F., Brugnion F., Janny L., Grizard G. // *Gynécologie obstétrique & Fertilité*. – 2009. – Vol. 37. – №6. – P. 529.
32. Kowalczyk, A. Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process / Kowalczyk A., Czerniawska Piątkowska E. // *Andrology*. – 2021. – Vol. 9. – № 4. – P. 1275.
33. Kläver, R. Routine cryopreservation of spermatozoa is safe — Evidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes / Kläver R., Bleiziffer A., Redmann K., Mallidis C., Kliesch S., Gromoll J. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2012. – Vol. 29. – № 9. – P. 943.
34. Aitken, R.J. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line / Aitken R.J., De Lullis G.N., McLachlan R.I. // *International journal of andrology*. – 2008. – Vol 32. – № 1. – P. 46.
35. Agarwal, A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction / Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. // *Fertility and sterility*. – 2003. – Vol 79. – № 4. – P. 829.
36. Thomson, L.K. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis / Thomson L.K., Fleming S.D., Aitken R.J., De Lullis G.N., Zieschang J.A., Clark A.M. // *Human reproduction*. – 2009. – Vol. 24. – № 9. – P. 2061.
37. Плешанов Н. В. Кривоустойчивость спермы петухов в зависимости от содержания в ней липидов / Плешанов Н. В., Станишевская О. И., Силукова Ю.Л. // *Генетика и разведение животных*. – 2017. – № 3. – С. 34.
38. Surai, P. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen / Surai P., Fujihara N., Speake B., Brillard J., Wishart G., Sparks N. // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2001. – Vol. 17. – № 7. – P. 1024.
39. Partyka, A. Supplementation of Avian Semen Extenders with Antioxidants to Improve Semen Quality—Is It an Effective Strategy? / Partyka A., Niżański W. // *Antioxidants*. – 2021. – Vol. 10. – № 12.
40. Gil, L. Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm / Gil L., Olaciregui M., Luño V., Malo C., González N., Martínez F. // *Reproduction in domestic animals*. – 2014. – Vol 49. – № 4. – P. 72.
41. Olaciregui, M. Freeze dried stallion spermatozoa: Evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays / Olaciregui M., Luño V., Martí J. I., Aramayona J., Gil L. // *Andrologia*. – 2015. – Vol. 48. – № 9. – P. 988.
42. Nakai, M. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection / Nakai M., Kashiwazaki N., Takizawa A., Maedomari N., Ozawa M., Noguchi J., Kaneko H., Shino M., Kikuchi K. // *Zygote*. – 2007. – Vol 15. – № 1. – P. 15.
43. Kusakabe, H. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa / Kusakabe H., Szczygiel M. A., Whittingham D. G., Yanagimachi R. // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2001. – Vol. 98. – № 24. – P. 13501.
44. Hara, H. Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa / Hara H., Tagiri M., Hwang I. S., Takahashi M., Hirabayasi M. // *Cryobiology*. – 2014. – Vol. 68. – № 3. – P. 354.
45. Crowe, J. H. Anhydrobiosis / Crowe J. H., Hoekstra F. A., Crowe L. M. // *Annual review of physiology*. – 1992. – Vol. 54. – № 1. – P. 579.
46. Wolfe, J. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane– solute–water systems / Wolfe J., Bryant G. // *Cryobiology*. – 1999. – Vol 39. – № 2. – P. 103.

47. Wolkers, W. F., Oldenhof, H. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. - Methods in Molecular Biology, Springer, New York, 2021 – 742 p.
48. Martins, C. F. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm / Martins C. F., Báo S. N., Dode M. N., Correa G. A., Rumpf R. // Theriogenology. 2007. – Vol. 67. – № 8. – P. 1307.
49. Men, N. T. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection / Men N. T., Kikuchi K., Nakai M., Fukuda A., Tanihara F., Noguchi J., Kaneko H., Linh V. N., Nguyen B.X., Nagai T., Tajima A. // Theriogenology. – 2013. – Vol 80. – № 9. – P. 1033.
50. Stanishevskaya, O. A successful protocol for achieving anhydrobiosis of Gallus Gallus Domesticus spermatozoa while maintaining their fertility IN VIVO / Stanishevskaya O., Silyukova Y., Pleshanov N., Kurochkin A., Fedorova E., Radaev A. // Cryobiology. – 2022. – Vol. 104. – P. 102.
51. Usui, T. Cytotoxicity and oxidative stress induced by the glyceraldehyde-related maillard reaction products for HL-60 cells / Usui T., Shizuuchi S., Watanabe H., Hayase F. // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2004. – Vol 68. – № 2. – P. 333.
52. Edeas, M. Maillard Reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants / Edeas M., Attaf D., Mailfert A.-S., Nasu M., Joubet R. // Pathologie Biologie. – 2010. – Vol. 58. – № 3. – P. 220.
53. Drobnis, E. Z. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model / Drobnis E. Z., Crowe L. M., Berger T., Anchordoguy T. J., Overstreet J. W., Crowe J. H. // Journal of experimental zoology. – 1993. – Vol 265. – № 4. – P. 432.
54. Van Winden, E. C. Freeze-Drying of Liposomes: Theory and Practice / Van Winden E. C. // Methods in enzymology. – 2003. – Vol. 367. – P. 99-110.
55. Crowe, J. H. Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water / Crowe J. H., Spargo B. J., Crowe L. M. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1987. – Vol. 84. – № 6. – P. 1537.
56. França, M. B. Oxidative stress and its effects during dehydration / França M. B., Panek A. D., Eleutherio E. C. A. // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. – 2007. – Vol. 146. – № 4. – P. 621.
57. Карбышев, М.С. Биохимия оксидативного стресса: учеб. метод. пособие / Карбышев М.С., Абдулаев Ш.П. – Москва: ФГБОУ ВО РНИМУ, 2018. – 60 с.
58. Kusakabe, H. Chromosomal integrity and DNA damage in freeze-dried spermatozoa / Kusakabe H. // Reproductive medicine and biology. – 2011. – Vol. 10. – № 4. – P. 199.
59. Kusakabe, H. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa / Kusakabe H., Szczygiel M. A., Whittingham D. G., Yanagimachi R. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2001. – Vol. 98. – № 24. – P. 13501.
60. Bakst, M. R. The inner perivitelline layer sperm hole assay: Use of filter paper rings for the isolation of the perivitelline layer overlying the germinal disc and new observations on its morphology / Bakst M. R., Eastridge J., Malecki I. A. // The journal of applied poultry research. 2014. – Vol. 23. – № 1. – P. 121.
61. Restrepo, G. Freezing, vitrification and freeze-drying of equine spermatozoa: impact on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation and DNA integrity / Restrepo G., Varela E., Duque J. E., Gómez J. E., Rojas M. // Journal of Equine Veterinary Science. – 2018. – Vol. 72. – P. 8.
62. Oldenhof, H. Freezing-induced uptake of disaccharides for preservation of chromatin in freeze-dried stallion sperm during accelerated aging / Oldenhof H., Zhang, M., Narten K., Bigalk J., Sydykov B., Wolkers W. F., Sieme H. // Biology of reproduction. – 2017. – Vol. 97. – № 6. – P. 892.
63. Olaciregui, M. Chelating agents in combination with rosmarinic acid for boar sperm freeze-drying / Olaciregui M., Luño V., González N., Domingo P., Blas I., Gil L. // Reproductive Biology. – 2017. – Vol. 17. – № 3. – P. 193.
64. Palazzese, L. DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development / Palazzese L., Gosálvez J., Anzalone D. A., Loi P., Saragusty J. // Journal of reproduction and development. – 2018. – Vol. 64. – № 5. – P. 393.
65. Arav, A. High post-thaw survival of ram sperm after partial freeze-drying / Arav A., Idda A., Nieddu S. M., Natan Y., Ledda S. // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2018. – Vol. 35. – № 7. – P. 1149.

66. Anzalone, D. A. Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species / Anzalone D. A., Palazzese L., Iuso D., Martino G., Loi P. // *Animal reproduction science*. – 2018. – Vol. 190. – P. 85.
67. Olaciregui, M. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa / Olaciregui M., Luño V., Domingo P., González N., Gil L. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – № 1.
68. Wakayama, S. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months / Wakayama S., Tada M., Osada I., Nagamatsu A., Kamimura S., Nagatomo H., Mizutani E., Ishino F., Yano S., Wakayama, T. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 23. – P. 5988.
69. Ito, D. Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards / Ito D., Wakayama S., Emura R., Ooga M., Wakayama T. // *iScience*. – 2021. – Vol. 24. – № 8.
70. Kamada, Y. Assessing the tolerance to room temperature and viability of freeze-dried mice spermatozoa over long-term storage at room temperature under vacuum / Kamada Y., Wakayama S., Shibasaki I., Ito D., Kamimura S., Ooga M., Wakayama T. // *Scientific Reports*. – 2018. Vol. 8. – № 1.
71. Kaneko, T. Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa / Kaneko T., Serikawa T. // *Cryobiology*. – 2012. – Vol. 64. – № 3. – P. 211.
72. Kaneko, T. Successful Long-Term Preservation of Rat Sperm by Freeze-Drying / Kaneko, T., Serikawa, T. // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 4.
73. Liu, J.-L. Freeze-Dried Sperm Fertilization Leads to Full-Term Development in Rabbits / Liu J.-L., Kusakabe H., Chang C.-C., Suzuki H., Schmidt D. W., Julian M., Pfeffer R., Bormann C.L, Tian X.C., Yanagimachi R., Yang X. // *Biology of reproduction*. – 2004. – Vol. 70. – № 6. – P. 1776.
74. Kwon, I.-K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa / Kwon I.-K., Park K.-E., Niwa K. // *Biology of reproduction*. – 2004. – Vol. 71. – №5. – P. 1430.
75. Li, X.-X. Tauroursodeoxycholic acid enhances the development of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes and evaporatively dried spermatozoa / Li X.-X., Diao Y.-F., Wei H.-J., Wang S.-Y., Cao X.-Y., Zhang Y.-F., Tong C., Li D.-L., Kim M.K., Xu, B. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol 7. – № 1.
76. Choi, Y. H. Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse / Choi Y. H., Varner D. D., Love C. C., Hartman D. L., Hinrichs K. // *Reproduction*. – 2011. – Vol. 142. – № 4. – P. 529.
77. Keskinetepe, L. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa / Keskinetepe L., Pacholczyk G., Machnicka A., Norris K., Curuk M. A., Khan I., Brackett B. G. // *Biology of Reproduction*. – 2002. – Vol. 67. – № 2. – P. 409.
78. Palazzese, L. Whole genome integrity and enhanced developmental potential in ram freeze-dried spermatozoa at mild sub-zero temperature / Palazzese L., Anzalone D. A., Turri F., Faieta M., Donnadio A., Pizzi F., Pittia P., Matsukawa K., Loi P. // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol 10. – № 1.
79. Thiangthientham, P. Effects of freeze-drying on the quality and fertilising ability of goat sperm recovered from different parts of the epididymis / Thiangthientham P., Kallayanathum W., Anakkul N., Suwimonteerabutr J., Santiviparat S., Techakumphu M., Loi P., Tharasanit T. // *Theriogenology*. – 2023. – Vol. 195. – № 1. – P. 31.
80. González-Marín, C. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells / González-Marín C., Gosálvez J., Roy R. // *International journal of molecular sciences*. – 2012. – Vol. 13. – № 12. – P. 14026.
81. Patrick, J., Comizzoli P., Elliott G. Dry preservation of spermatozoa: considerations for different Species / Patrick, J., Comizzoli, P., Elliott, G. // *Biopreservation and biobanking*. – 2017. – Vol. 15. – № 2. – P. 158.
82. Hirabayashi, M. Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads / Hirabayashi M., Kato M., Ito J., Hochi S. // *Zygote*. – 2005. – Vol. 13. – № 1. – P. 79.
83. Kaneko, T. Offspring derived from oocytes injected with rat sperm, frozen or freeze-dried without cryoprotection / Kaneko T., Kimura S., Nakagata N. // *Theriogenology*. – 2007. – Vol. 68. – № 7. – P. 1017.
84. Rajska, I. Freeze Drying as a Method of Long-Term Conservation of Mammalian Semen – A Review / Rajska I. // *Annals of Animal Science*. – 2021. – Vol. 21. – № 4.