

Изучение влияния уровня экспрессии генов аквапоринов на качество семени быков голштинской породы

О. Ю. Баркова[✉], Д. А. Старикова, И. В. Чистякова

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

[✉]E-mail: barkoffws@list.ru

Аннотация. Цель исследования – оценка влияния генов-кандидатов, кодирующих аквапорины (*AQP*): *AQP3*, *AQP7* и *AQP11*, ассоциированных с показателями качества спермы быков, для дальнейшего использования их как транскрипционных биомаркеров. **Методы.** При помощи количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR) оценили экспрессию выбранных генов нативных и замороженно-оттаянных сперматозоидов 7 быков голштинской породы и провели анализ корреляционных связей между уровнем экспрессии изучаемых генов со значимыми для выживаемости и оплодотворения показателями качества спермы. Оценены такие биохимические показатели нативных и деконсервированных сперматозоидов быков, как подвижность, морфология клеток, целостность мембран, жизнеспособность, мембранный потенциал митохондрий, уровень генерации активных форм кислорода (АФК). **Научная новизна** исследования заключается в том, что впервые в нашей стране оценена связь уровня экспрессии генов *AQP3*, *AQP7* и *AQP11* с показателями качества спермы быков голштинской породы. **Результаты.** Ген *AQP11* может быть рекомендован как надежный транскрипционный биомаркер, поскольку имел высокую положительную корреляционную связь с содержанием живых ($0,821, p = 0,0145$), нормальных ($0,750, p = 0,0384$) клеток и отрицательную корреляцию с содержанием дефективных ($-0,679, p = 0,0735$), мертвых клеток ($-0,821, p = 0,0145$) и содержанием АФК ($-0,821, p = 0,0145$) в замороженно-оттаянной и нативной сперме. Транскрипт гена *AQP7* замороженно-оттаянной спермы имел среднюю отрицательную корреляцию с показателями содержания мертвых сперматозоидов ($-0,727, p = 0,0545$) и дефектов акросомы ($-0,667, p = 0,0735$) на близком к достоверному уровню. Транскрипт гена *AQP3* имел достоверную положительную корреляцию с содержанием мертвых клеток ($0,786, p = 0,0251$) замороженно-оттаянной спермы и отрицательную корреляцию с содержанием дефективных, мертвых клеток и содержанием АФК в замороженно-оттаянной и нативной сперме.

Ключевые слова: сперматозоиды, быки, оплодотворяющая способность, качество семени, криоконсервация, среды, РНК, транскрипты, биомаркеры криорезистентности, митохондрии, аквапорины

Благодарности. Исследование выполнено в рамках работ по гранту Российского научного фонда № 22-76-10041.

Для цитирования: Баркова О. Ю., Старикова Д. А., Чистякова И. В. Изучение влияния уровня экспрессии генов аквапоринов на качество семени быков голштинской породы // Аграрный вестник Урала. 2024. Т. 24, № 05. С. 637–648. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-05-637-648>.

Дата поступления статьи: 22.08.2023, **дата рецензирования:** 15.04.2024, **дата принятия:** 27.04.2024.

Study of the expression level influence of aquaporin genes on the quality of semen of Holstein bulls

O. Yu. Barkova[✉], D. A. Starikova, I. V. Chistyakova

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – a Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Saint Petersburg, Russia

[✉]E-mail: barkoffws@list.ru

Abstract. The aim of the study is to assess the influence of candidate genes encoding aquaporins (*AQPs*): *AQP3*, *AQP7* and *AQP11*, associated with indicators of bull semen quality, for their further use as transcriptional biomarkers. **Methods.** Using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), we assessed the expression of selected genes in native and frozen-thawed sperm of 7 Holstein bulls and analyzed the correlations between the expression level of the studied genes with indicators of sperm quality that are significant for survival and fertilization. The following biochemical parameters of native and deconserved bull spermatozoa were assessed: motility, cell morphology, membrane integrity, viability, mitochondrial membrane potential, level of generation of reactive oxygen species (ROS). **The scientific novelty of the study** lies in the fact that for the first time in our country the relationship between the expression level of the *AQP3*, *AQP7* and *AQP11* genes and the quality of sperm of Holstein bulls was assessed. **Results.** The *AQP11* gene can be recommended as a reliable transcriptional biomarker, since it had a high positive correlation with the content of living ($0.821, p = 0.0145$), normal ($0.750, p = 0.0384$) cells, and a negative correlation with the content of defective ($-0.679, p = 0.0735$), dead cells ($-0.821, p = 0.0145$) and ROS content ($-0.821, p = 0.0145$) in frozen-thawed and native sperm. The *AQP7* gene transcript of frozen-thawed sperm had an average negative correlation with indicators of dead sperm content ($-0.727, p = 0.0545$) and acrosome defects ($-0.667, p = 0.0735$) at a level close to significant. The *AQP3* gene transcript had a significant positive correlation with the content of dead cells ($0.786, p = 0.0251$) in frozen-thawed sperm and a negative correlation with the content of defective, dead cells and ROS content in frozen-thawed and native sperm.

Keywords: spermatozoa, bulls, fertility, semen quality, cryopreservation, media, RNA, transcripts, cryoresistance biomarkers, mitochondria, aquaporins

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

For citation: Barkova O. Yu., Starikova D. A., Chistyakova I. V. Study of the expression level influence of aquaporin genes on the quality of semen of Holstein bulls. Agrarian Bulletin of the Urals. 2024; 24 (05): 637–648. <https://doi.org/10.32417/1997-4868-2024-24-05-637-648>. (In Russ.)

Date of paper submission: 22.08.2023, **date of review:** 15.04.2024, **date of acceptance:** 27.04.2024.

Постановка проблемы (Introduction)

На сегодняшний день проблема сохранности сперматозоидов при проведении процедур криоконсервации стоит достаточно остро. Быки, хряки и бараны входят в число криочувствительных видов, для которых заморозка и оттаивание несут значительные риски повреждения ДНК мужских гамет, снижения оплодотворяющей способности, и последующего замирания развития эмбрионов, полученных с использованием криоконсервированного семени [1; 2]. В последние годы омиксные технологии нашли свое применение во многих областях исследований – как фундаментальных, так и прикладных. Вспомогательные репродуктивные технологии не стали исключением: во всем мире постоянно пополняются базы данных о роли тех или иных генов, транскриптов и белков в обеспечении

криорезистентности и фертильности половых клеток. Анализ профилей транскриптов сперматозоидов и ассоциация уровня экспрессии определенных РНК с различной криорезистентностью спермы – относительно новый подход в данной сфере исследований во всем мире [2–4]. Проведено множество исследований, направленных на оптимизацию методологии долгосрочного хранения спермы, а также на поиск биомаркеров качества семени сельскохозяйственных животных и человека, в том числе обнаружены гены и белки, отвечающие за криорезистентность. Кроме того, некоторые транскрипты сперматозоидов могут транслироваться в митохондриях во время капацитации [3], и исследования показали, что различия в экспрессии транскриптов сперматозоидов могут использоваться в качестве маркеров функций сперматозоидов, включая под-

вижность, капациацию и конденсацию хроматина [3; 4]. Благодаря достижениям в области биоинформатики стало возможным выделять высококачественную РНК из мужских гамет и разрабатывать новые неинвазивные подходы для оценки криотолерантности, а также биомаркеры качества семени у животных и человека. Этот новый подход основан на анализе данных секвенирования РНК сперматозоидов (RNAseq) путем сравнения профиля мРНК после криоконсервации семени для идентификации маркерных генов, вовлеченных в механизм криотравмы. У сперматозоидов хряка, быка, жеребца и человека были обнаружены различия в профайлах матричных и микроРНК до и после криоконсервации [5–8]. Также у хряка и большой панды выявлены гены, преимущественно активирующиеся в гаметах особей с низкой криорезистентностью [9; 10]. Однако, несмотря на обнаружение корреляции некоторых транскриптов спермы с устойчивостью к заморозке-оттаиванию, причины такой связи зачастую не установлены. Также в связи с межвидовой и даже внутривидовой изменчивостью РНК-профиля подобные исследования необходимо проводить отдельно на определенных породах и популяциях. У мужских гамет различных видов животных выявлены гены и транскрипты, ответственные за устойчивость к криотравме [11], однако транскрипционные маркеры сперматозоидов быков до конца не изучены, а в нашей стране подобные исследования и вовсе ранее не проводились. Получение данных об особенностях РНК-профилей у быков с высокой и низкой криорезистентностью семени позволит в дальнейшем разрабатывать новые неинвазивные подходы для оценки устойчивости к криоконсервации, а ассоциация обнаруженных биомаркеров с определенными изменениями внутри клетки станет фундаментальной основой для совершенствования методологии и преодоления последствий криоконсервации. Целью данной работы является проведение корреляционного анализа уровня экспрессии генов аквапоринов с показателями качества спермы.

В качестве исследуемых генов нами были отобраны гены, кодирующие аквапорины (AQP): *AQP3*, *AQP7* и *AQP11*. Аквапорины (AQP) представляют собой семейство небольших интегральных белков плазматической мембраны, которые главным образом транспортируют воду в клетки. AQP делятся на три подсемейства в зависимости от их функциональности. К первой группе (ортодоксальные AQP) относятся *AQP0*, *AQP1*, *AQP2*, *AQP4*, *AQP5*, *AQP6* и *AQP8*, которые избирательно транспортируют молекулы воды. Второе подсемейство, также известное как акваглицеропорины, поскольку они способны транспортировать воду, глицерин и другие мелкие растворенные вещества, включают *AQP3*, *AQP7*, *AQP9* и *AQP10*. *AQP11* и *AQP12* принадлежат к третьей группе, также известной как

супераквапорины, представляющие собой водные каналы с более низкой гомологией в сравнении с другими AQP [12]. Функции супераквапоринов менее изучены, чем функции двух других групп AQP. Аквапорин 3 (*AQP3*) и аквапорин 7 (*AQP7*) обладают свойствами защиты от осмотических изменений путем эффективного контроля проникновения воды и глицерина в оболочку сперматозоида, также участвуют в его подвижности [13; 14]. Супераквапорин 11 облегчает движение воды, но его проницаемость для других растворенных веществ остается спорной [15]. *AQP7* и *AQP11* в сперматозоидах хряка были идентифицированы методом вестерн-блоттинга, и дальнейшее их изучение показало, что повышенное содержание *AQP11* имеет значительную корреляцию ($P < 0,05$) с целостностью мембраны сперматозоидов, текучестью и подвижностью сперматозоидов, но не коррелирует с качеством спермы в случае *AQP7*. Однако *AQP3* участвует в осмоадаптации спермы, что имеет решающее значение после естественного снижения осмотического давления, с которым сталкиваются мужские гаметы при попадании в женский репродуктивный тракт [16]. Рядом авторов изучены локализация и экспрессия генов *AQP3*, *AQP7* и *AQP11* в сперматозоидах быков и показано, что данные гены участвуют в криотолерантности сперматозоидов быков и оплодотворяющей способности [13; 14; 17].

Поскольку глицерин является наиболее распространенным проницаемым криопротекторным агентом в разбавителях для замораживания спермы быков, а проницаемость плазматической мембраны для воды и глицерина определяет устойчивость клеток к криоконсервации, участие акваглицеропоринов 3, 7 и 11 в криотолерантности сперматозоидов быков заслуживает дальнейшего изучения.

Методология и методы исследования (Methods)

Для исследования было выбрано 7 быков от 1 года до 3 лет на АО «Невское». Всего было исследовано 14 проб эякулята, из них 7 проб нативной спермы и 7 проб криоконсервированной спермы (3 пайеты). Пробы свежего эякулята отбирали в утренние часы во время плановых заборов, проводимых в АО «Невское». Объем каждой пробы нативной спермы составлял 1000–1500 мкл, концентрация варьировалась от 0,7 до 1,65 млрд клеток/мл. Процедура криоконсервации спермы, проводимая на АО «Невское», заключалась в следующем: смешанный с разбавителем OptiXcell (IMV technologies, Франция) в соотношении 1 : 1 эякулят быков (27 °C) охлаждали до 18–22 °C, после чего проводили итоговое разбавление, фасовку и эквilibрацию (экспозиция при 4 °C в течение 3–4 часов). Замораживание сперматозоидов производили в условиях –145 °C в течение 7,5 минуты и хранили при –196 °C в жидком азоте (IMV Technologies, Франция). Концентрация клеток в пайете достигала $4...9 \times 10^6$ клеток/мл.

Подвижность и концентрация половых клеток свежего эякулята была оценена на АО «Невское» с использованием камеры Маклера (Sefi Medical Instrument, Италия). Для работы со сперматозоидами заранее готовили среду HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) следующего состава на 100 мл: NaCl – 800 мг, KCl – 40 мг, MgSO₄-ангидрат – 4,96 мг, KH₂PO₄ – 6 мг, D-Glucose – 100 мг, NaHCO₃ – 36 мг, Na₂HPO₄-ангидрат – 4,8 мг, CaCl₂ × 2H₂O – 18,56 мг, MgCl₂ · 6H₂O – 10 мг. Перед проведением экспериментов свежий эякулят разбавляли в среде HBSS, доводя до объема 500 мкл, так чтобы итоговая концентрация клеток не превышала $4 \dots 2 \times 10^6$ клеток/мл. Концентрацию клеток проверяли на фотометре SDM 1 (Minitube, Германия). Затем клетки дважды отмывали с помощью центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут и 37 °С, супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в среде HBSS. Сперматозоиды после оттаивания также отмывали центрифугированием и ресуспендировали в 1,5 мл среды HBSS. После этого полученные образцы использовали для выделения РНК, оценки морфологии клеток, анализа биохимических показателей мужских гамет.

До выделения РНК проводилась очистка образцов спермы от соматических и мертвых клеток путем градиентного центрифугирования с помощью раствора «Фиколл» [18].

Анализ морфологии сперматозоидов проводили под иммерсией на световом микроскопе Olympus Vanox-t (Япония), объектив 100х, после окрашивания мазка эякулята с помощью тест-набора «Дифф – Квик» (АБРИС+ НПФ, Россия) согласно рекомендациям производителя. На каждом суховоздушном препарате наблюдали по 200 сперматозоидов.

Анализ целостности мембран, жизнеспособности, мембранного потенциала митохондрий и уровня генерации активных форм кислорода производили с помощью проточного цитометра CytoFLEX, BeckmanCoulter (США). Скорость сбора данных проточной цитометрии была установлена на низкую скорость и максимальное разрешение. В среднем около 5000 одноклеточных событий было получено из каждого образца спермы быка. Полученные данные анализировали с помощью программы CytExpert 2.4.

Для оценки мембранного потенциала митохондрий клетки сперматозоидов окрашивали флуоресцентным липофильным карбоцианиновым красителем JC-1. В 500 мкл образца вносили 2 мкл 2 мкМ JC-1. Инкубировали образцы в темноте при 37 °С в течение 30 минут. Далее добавляли 1000 мкл среды, ресуспендировали, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут, осадок разбавляли в 500 мкл среды HBSS до измерения на проточном цитометре. JC-1 возбуждали лазером с длиной волны 488 нм. JC-1 при высоких ΔΨm об-

разует J-агрегаты, излучающие оранжево-красную флуоресценцию с максимумом при 595 нм (сигнал эмиссии регистрируется при 610/630 нм). При низких ΔΨm JC-1 остается в мономерной форме, испуская зеленую флуоресценцию с максимумом при 530 нм (сигнал эмиссии регистрируется при 532/555 нм). Конечная ΔΨm клетки является соотношением красной и зеленой флуоресценции (числовое значение для анализа).

Оценка жизнеспособности и целостности клеточных мембран нативных и деконсервированных сперматозоидов проводилась с помощью окрашивания интеркалирующими красителями: пропидия йодидом, контрастным красителем для ядер и хромосом, окрашивающим мертвые клетки, и SYBR Green I, специфичным к двухцепочечной ДНК. К 500 мкл спермы добавляли 0,3 мкл 1 мкМ SYBR Green I. Инкубировали образцы в темноте при 37 °С в течение 10 минут. Затем добавляли 2 мкл 2,4 мкМ пропидия йодида и инкубировали клетки далее еще 5 минут при тех же условиях. SYBR Green I связывается с ДНК, полученный комплекс поглощает голубой свет ($\lambda_{\max} = 497$ нм) и испускает зеленый ($\lambda_{\max} = 520$ нм). Длина волны возбуждения флуоресценции пропидия йодида составляет 535 нм. Пропидия йодид испускает красную флуоресценцию с максимумом при 617 нм.

Оценка уровня генерации активных форм кислорода в нативных и деконсервированных сперматозоидах проводилась путем окраски спермы красителем H2DCFDA (2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат). В 300 мкл образца вносили 10 мкл 2 мкМ H2DCFDA. Клетки инкубировали 25 минут при 37 °С в темноте. Затем оценивали флуоресценцию в зеленой области спектра (максимум поглощения при 511 нм, максимум флуоресценции при 533 нм).

Выделение РНК из нативной и деконсервированной спермы предварительно отмытой средой HBSS и реагентом «Фиколл» проводили с помощью набора для выделения ExtractRNA (Евроген, Россия), тщательно следуя указаниям производителя. Полученные образцы РНК обрабатывали термолabileй ДНКазой EM 100 (Биолабмикс) в соответствии с рекомендацией производителя. Концентрация РНК, измеренная с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000, определялась в диапазоне от 500 до 1000 нг/мл.

Дизайн олигонуклеотидов-праймеров для анализа экспрессии последовательности генов-кандидатов, влияющих на качество спермы, проводили на основании информации баз данных сети Интернет (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov> и www.ensembl.org) при помощи компьютерной программы PRIMER_3 (www.genome.wi.mit.edu).

Таблица 1
Последовательность олигонуклеотидов-праймеров генов-кандидатов, ассоциированных с качеством спермы

Название гена	Последовательность прямого праймера и температура отжига, °C	Последовательность обратного праймера и температура отжига, °C	Размер продукта, пар нуклеотидов
<i>SLC2A5 (GLUT5)</i> (референсный)	TGACCTACCACCAACCCTGA 60.10	CATGCCTGTGGCTACCAGAA 60.04	194
<i>GAPDH</i> (референсный)	CCGCAAGGAGAACTCAAGGT 59.96	CGGCCCAAGCAAAAATTGGA 59.97	163
<i>AQP3</i>	CTGACCACATCTCTCTGCC 59.82	GCCGATCATGAGCTGGTACA 59.90	112
<i>AQP7</i>	AGGCAACTGGGAGCATAAGG 59.74	GTTCTTCCCCAGCCACTC 60.00	153
<i>AQP11</i>	TTCTGTCATGCTGAGAACAGATTTT 59.23	AGGAATCACAGTACTAG-TAGCAAGC 60.16	135

Table 1
Sequence of primer oligonucleotides of candidate genes associated with sperm quality

Gene	Forward primer sequence and annealing temperature, °C	Reverse primer sequence and annealing temperature, °C	Product size, base pairs
<i>SLC2A5 (GLUT5)</i> (reference)	TGACCTACCACCAACCCTGA 60.10	CATGCCTGTGGCTACCAGAA 60.04	194
<i>GAPDH</i> (reference)	CCGCAAGGAGAACTCAAGGT 59.96	CGGCCCAAGCAAAAATTGGA 59.97	163
<i>AQP3</i>	CTGACCACATCTCTCTGCC 59.82	GCCGATCATGAGCTGGTACA 59.90	112
<i>AQP7</i>	AGGCAACTGGGAGCATAAGG 59.74	GTTCTTCCCCAGCCACTC 60.00	153
<i>AQP11</i>	TTCTGTCATGCTGAGAACAGATTTT 59.23	AGGAATCACAGTACTAG-TAGCAAGC 60.16	135

Синтез односторонней кДНК проводили при помощи обратной транскриптазы Mint (Евроген) следуя указаниям производителя. Реакцию проводили в объеме 20 мкл. В пробирку добавляли следующие компоненты: 1–2 мкг тотальной РНК; по 2 мкл специфического праймера (10 мкМ); 10 мкл воды для ПЦР. Смесь прогревали 2 минуты при 70 °C и переносили образцы в лед. После чего добавляли 8 мкл предварительно подготовленной смеси: 4 мкл 5x MINT буфера, 2 мкл смеси dNTPs, 2 мкл DTT (20 мМ). В перемешанную смесь добавляли 2 мкл MINT-ревертазы, и инкубировали 2 часа при 42 °C.

Анализ экспрессии РНК, полученных из нативной и замороженно-оттаянной спермы быков, проводили с помощью олигонуклеотидов-праймеров (таблица 2). Полученную смесь односторонней кДНК использовали для амплификации с использованием 5x реакционной смеси qPCRMix-HS SYBR (Евроген), предназначенной для ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green I в соответствии с рекомендациями производителя. Компоненты реакции смешали в следующей последовательности: стерильная вода до 25 мкл; qPCRMix-HS SYBR 5 мкл 1X, ПЦР праймер по 0,4 мкМ, ДНК-матрица (1 мкл на реакцию). Реакции проводили на амплификаторе в реальном времени CFX96 Touch (Bio-Rad, США) в следующем режиме: амплифика-

ция кДНК и детекция сигнала (40 циклов): 95 °C – 5 минут; 95 °C – 15 секунд; 59 °C – 15 секунд; 72 °C – 20 секунд (этап сбора данных). Реакции ПЦР в реальном времени для каждого образца проводили в трех повторностях. Для последующих расчетов использовали среднее арифметическое значение. Расчет изменений экспрессии отдельных молекул микроРНК выполняли методом 2dCt (delta Cycle threshold) [19].

Статистическую значимость разницы исследуемых параметров между группами оценивали с помощью методов непараметрического анализа путем вычисления критерия χ^2 , *t*-критерия Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA по методам Краскала – Уоллиса и Холма – Шидака. Анализ ранговой корреляции был проведен при помощи критерия Спирмена. Анализ данных по биохимическим показателям, показателям качества спермы и ПЦР осуществляли с помощью программ Excel 10.0, SigmaPlot 14.

Результаты (Results)

В качестве исследуемых генов нами были отобраны гены, кодирующие аквапорины (AQP): AQP3, AQP7 и AQP11. В качестве референсных генов (домашнего хозяйства) были отобраны *SLC2A5 (GLUT5)* и *GAPDH* (таблица 1)

Таблица 2

Показатели концентрации и подвижности нативной и замороженно-оттаянной спермы

Биология и биотехнологии

Номер быка	Концентрация сперматозоидов		Подвижность сперматозоидов		Норма для нативной спермы по ГОСТ 23745-2014		Норма подвижности для замороженной спермы по ГОСТ 26030-2015, %, не менее
	Нативная, млрд клеток/см ³	Замороженно-оттаянная, млн клеток/см ³	Нативная сперма (камера Маклера), %	Замороженно-оттаянная камера Маклера, %	Концентрация, млрд/см ³	Подвижность, %, не менее	
1	1,0	5	80	80	0,8	70	40
2	1,5	9	80	75	0,8	70	40
3	1,19	4	70	70	0,8	70	40
4	1,65	5*	75*	70*	0,8	70	40
5	0,8	8	75	65	0,8	70	40
6	1,5	5	80	80	0,8	70	40
7	0,8	5,7	70	70	0,8	70	40

Примечание. * $p \leq 0,01$.

Table 2

Indicators of concentration and motility of native and frozen-thawed sperm

Bull number	Spermatozoa concentration		Sperm motility		The norm for native sperm according to GOST 23745-2014		Motility rate for frozen sperm according to GOST 26030-2015, %, not less than
	Native, billion cells/cm ³	Frozen-thawed, million cells/cm ³	Native sperm (Makler's chamber), %	Frozen-thawed (Makler's chamber), %	Concentration, billion/cm ³	Motility, %, not less	
1	1.0	5	80	80	0,8	70	40
2	1.5	9	80	75	0,8	70	40
3	1.19	4	70	70	0,8	70	40
4	1.65	5*	75*	70*	0,8	70	40
5	0.8	8	75	65	0,8	70	40
6	1.5	5	80	80	0,8	70	40
7	0.8	5.7	70	70	0,8	70	40

Note. * $p \leq 0.01$.

Половые клетки нативной и деконсервированной спермы были оценены по следующим показателям:

- 1) подвижность;
- 2) морфологические дефекты: акросомы, головы, шеи, хвоста, наличие сперматозоидов с петлевыми хвостами, с цитоплазматической каплей;
- 3) целостность мембран;
- 4) жизнеспособность;
- 5) мембранный потенциал митохондрий;
- 6) уровень содержания активных форм кислорода.

В таблице 2 представлены средние показатели общей подвижности сперматозоидов нативной и деконсервированной спермы. Показатели подвижности гамет нативной спермы равны или превышают (от 70 % до 80 %) норму по ГОСТ 23745-2014, замороженно-оттаянных сперматозоидов (от 65 % до 80 %) соответствуют таковым для гамет замороженной спермы в соответствии с ГОСТ 26030-

2015 – не менее 40 %. Важно отметить, что после криоконсервации изменилось качество спермы в сторону ее ухудшения (снижение уровня клеток с нормальной морфологией).

При сравнительной оценке количества сперматозоидов с нормальной морфологией в нативной и деконсервированной сперме быков выявлено, что имеется тенденция к уменьшению доли сперматозоидов с нормальной морфологией после криоконсервации. Отмечено, что доля деконсервированных морфологически нормальных мужских гамет достоверно ниже доли аналогичных нативных сперматозоидов у быков № 4, № 5 и № 6. Однако у быка № 2 обнаружен противоположный эффект, представленный достоверным увеличением доли нормальных гамет после криоконсервации в сравнении с нативными клетками (таблица 3).

Был проведен статистический анализ различий показателей жизнеспособности половых клеток по трем окраскам JC-1, H2DCFDA, SYBR Green I/про-

пидия йодид в нативной и декриоконсервированной сперме. Статистически достоверные различия были получены по показателю содержания живых и мертвых клеток, окрашенных SYBR Green I/пропидия йодид (таблица 4).

Метод ПЦР в реальном времени позволил наблюдать процесс накопления кДНК в процессе реакции. Чем больше количество кДНК в образце,

тем раньше наблюдается начало роста сигнала флуоресценции и тем меньше пороговый цикл. В нашем случае выход на пороговый цикл исследуемых генов начинался с 20 цикла амплификации и заканчивался до 35 цикла. Первыми на «плато» выходил ген AQP11, последним – AQP3 декриоконсервированной спермы (рис. 1).

Таблица 3
Дефективные формы сперматозоидов в нативной и криоконсервированной сперме быков
($n = 200$ клеток)

№ быка	Состояние	Дефекты сперматозоидов, $M \pm SEM$						Количество нормальных клеток, $X \pm m$
		Акросома	Головка	Шейка	Хвост	Хвост петлеvidный	Капля	
1	Натив	6,5 ± 2,1	3,5 ± 1,5	5 ± 2	11,5 ± 5,5	0,0 ^c	0,0	173,5 ± 10,5
	Крио	3,5 ± 1,5	3 ± 2	1,5 ± 1,50	11,0 ± 1,0	10 ± 1,0 ^d	0,5 ± 0,50	179 ± 1,5
2	Натив	15,5 ± 0,5	11,5 ± 2,5	2,5 ± 0,50,0	15,0 ± 5,0	0,0	2,5 ± 2,50,0	153,5 ± 4,5 ^e
	Крио	3,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1,0	185,5 ± 0,5 ^f
3	Натив	0,0	0,0	0,5 ± 0,50	1,5 ± 0,5	2,0 ± 1,0	0,0	195,0 ± 1,0
	Крио	3,6 ± 1,4	13,4 ± 5,2	10 ± 2,7	15,4 ± 6,7	8,0 ± 2,8	0,4 ± 0,24	149,6 ± 20,3
4	Натив	0,5 ± 0,5	2,5 ± 1,5	6 ± 1	1,5 ± 0,5	1,5 ± 1,5	0,5 ± 0,50	187,5 ± 0,5 ^g
	Крио	0,8 ± 0,6	11,6 ± 2,9	2,4 ± 0,9	14,4 ± 3,7	6,8 ± 2,2	0,6 ± 0,40,0	163,6 ± 6,3
5	Натив	0,5 ± 0,5	5,0 ± 2,0	1,0	7 ± 2,0	5,0 ± 1,0	0,0	181,5 ± 5,5
	Крио	2,4 ± 0,9	26,0 ± 11,5	7,6 ± 3,4	15,8 ± 2,3	7,2 ± 1,5	0,2 ± 0,20,0	137,8 ± 13,6
6	Натив	0,5 ± 0,5	5,0 ± 3,0	8 ± 1,0	3,5 ± 0,5 ^a	1,0 ± 1,0	0,0	182,0 ± 4,0 ^h
	Крио	3,2 ± 3,2	26,2 ± 6,9	7,6 ± 2,1	24,6 ± 3,1 ^b	2,6 ± 1,1	0,0	135,8 ± 5,4 ⁱ
7	Натив	1,0	11,5 ± 6,5	1,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	0,0	180,0 ± 6,0
	Крио	2,6 ± 1,6	4,6 ± 1,7	2,8 ± 1,7	8,4 ± 1,8	4,0 ± 2,2	0,6 ± 0,4	177,0 ± 5,4

Примечание. Натив – нативные сперматозоиды, крио – заморожено-оттаянные сперматозоиды. Достоверные различия по критерию Стьюдента: ^{a,b,ef,gh,i} $P < 0,01$, ^{cd} $P < 0,001$.

Table 3
Spermatozoa defective forms of in native and cryopreserved bull semen ($n = 200$ cells)

No. of bull	Sperm condition	Sperm defects, $M \pm SEM$						Number of normal cells, $X \pm m$
		Acrosome	Sperm head	Sperm neck	Sperm tail	Looped tail	Drop	
1	Native	6.5 ± 2.1	3.5 ± 1.5	5.0 ± 2.0	11.5 ± 5.5	0.0 ^c	0.0	173.5 ± 10.5
	Cryo	3.5 ± 1.5	3.0 ± 2.0	1.5 ± 1.5	11.0 ± 1.0	10.0 ± 1.0 ^d	0.5 ± 0.5	179 ± 1.5
2	Native	15.5 ± 0.5	11.5 ± 2.5	2.5 ± 0.5	15.0 ± 5.0	0.0	2.5 ± 2.5	153.5 ± 4.5 ^e
	Cryo	3.5 ± 0.5	2.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5	4.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1.0	185.5 ± 0.5 ^f
3	Native	0.0	0.0	0.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5	2.0 ± 1.0	0.0	195 ± 1
	Cryo	3.6 ± 1.4	13.4 ± 5.2	10 ± 2.7	15.4 ± 6.7	8.0 ± 2.8	0.4 ± 0.2	149.6 ± 20.3
4	Native	0.5 ± 0.5	2.5 ± 1.5	6.0 ± 1.0	1.5 ± 0.5	1.5 ± 1.5	0.5 ± 0.5	187.5 ± 0.5 ^g
	Cryo	0.8 ± 0.6	11.6 ± 2.9	2.4 ± 0.9	14.4 ± 3.7	6.8 ± 2.2	0.6 ± 0.4	163.6 ± 6.3
5	Native	0.5 ± 0.5	5.0 ± 2.0	1.0	7.0 ± 2.0	5.0 ± 1.0	0.0	181.5 ± 5.5
	Cryo	2.4 ± 0.9	26.0 ± 11.5	7.6 ± 3.4	15.8 ± 2.3	7.2 ± 1.5	0.2 ± 0.2	137.8 ± 13.6
6	Native	0.5 ± 0.5	5.0 ± 3.0	8.0 ± 1.0	3.5 ± 0.5 ^a	1.0 ± 1.0	0.0	182.0 ± 4.0 ^h
	Cryo	3.2 ± 3.2	26.2 ± 6.9	7.6 ± 2.1	24.6 ± 3.1 ^b	2.6 ± 1.1	0.0	135.8 ± 5.4 ⁱ
7	Native	1.0	11.5 ± 6.5	1.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5	2.5 ± 0.5	0.0	180.0 ± 6.0
	Cryo	2.6 ± 1.6	4.6 ± 1.7	2.8 ± 1.7	8.4 ± 1.8	4.0 ± 2.2	0.6 ± 0.4	177.0 ± 5.45

Note. Native – native spermatozoa, cryo – frozen-thawed spermatozoa. Significant differences by Student's *t*-test: ^{a,b,ef,gh,i} $P < 0.01$; ^{cd} $P < 0.001$.

Таблица 4

Статистическое различие показателей сперматозоидов в нативной и криоконсервированной сперме

Биология и биотехнологии

Краситель	Показатель	N	Среднее значение ± ошибка среднего	Стандартное отклонение	P	
JC-1	Низкая степень поляризации митохондриальных мембран	Натив	7	4396,57 ± 945,65	2501,97	0,293
		Крио	7	3017,00 ± 825,42	2183,85	
	Средняя степень поляризации митохондриальных мембран	Натив	7	1722,27 ± 613,72	1623,76	0,725
		Крио	7	2086,42 ± 804,89	2129,54	
	Высокая степень поляризации митохондриальных мембран	Натив	7	1057,14 ± 652,23	1725,65	0,449
		Крио	7	1818,42 ± 722,86	1912,53	
H2DCFDA	Содержание АФК FITC	Натив	6	1514,17 ± 3613,34	8850,83	0,161
		Крио	7	8611,00 ± 890,03	2354,79	
SYBR	Содержание живых клеток	Натив	7	3714,85 ± 934,30	2471,92	0,004
		Крио	7	7960,14 ± 708,64	1874,87	
	Содержание мертвых клеток	Натив	7	3323,42 ± 741,08	1960,71	0,043
		Крио	7	5614,86 ± 688,58	1821,81	

Примечание. Жирным шрифтом отмечено достоверно значимое различие показателей сперматозоидов в нативной и криоконсервированной сперме быков.

Table 4

Statistical difference between sperm counts in native and cryopreserved semen

Dye	Index	N	Mean value ± mean error	Standard deviation	P	
JC-1	Low degree of mitochondrial membranes polarization	Native	7	4396.57 ± 945.65	2501.97	0.293
		Cryo	7	3017.00 ± 825.42	2183.85	
	Average degree of mitochondrial membranes polarization	Native	7	1722.286 ± 613.72	1623.76	0.725
		Cryo	7	2086.42 ± 804.89	2129.54	
	High degree of mitochondrial membranes polarization	Native	7	1057.14 ± 652.23	1725.65	0.449
		Cryo	7	1818.42 ± 722.86	1912.53	
H2DCFDA	AFO content	Native	6	15140.167 ± 3613.34	8850.83	0.161
		Cryo	7	8611.0 ± 890.03	2354.79	
SYBR	Living cells content	Native	7	3714.85 ± 934.30	2471.92	0.004
		Cryo	7	7960.143 ± 708.64	1874.87	
	Dead cells content	Native	7	3323.42 ± 741.08	1960.71	0.043
		Cryo	7	5614.857 ± 688.58	1821.81	

Note. Significant difference in sperm parameters in native and cryopreserved bull sperm are indicated in bold.

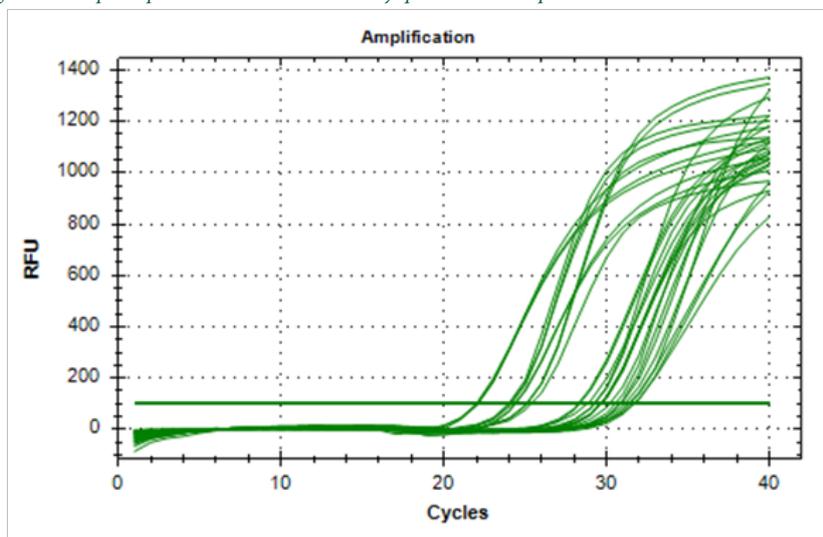


Рис. 1. График накопления ПЦР продукта по исследуемым генам у быка № 1
Fig. 1. PCR product accumulation graph of the studied genes in bull No. 1

Анализ корреляционных связей уровня относительной экспрессии исследуемых генов с некоторыми показателями качества спермы быков

Показатель сперматозоидов	Состояние спермы	AQP3		AQP 7		AQP 11	
		R, Spearman	p-value	R, Spearman	p-value	R, Spearman	p-value
Подвижность	Натив	-0,037	0,905	0,0772	0,843	-0,0772	0,843
	Крио	-0,579	0,150	-0,109	0,781	-0,579	0,150
Дефективные клетки	Натив	0,571	0,150	0,035	0,905	-0,071	0,843
	Крио	0,371	0,497	0,143	0,720	-0,679	0,0735
Нормальные клетки	Натив	-0,571	0,150	-0,035	0,905	0,0714	0,843
	Крио	-0,371	0,497	0,371	0,497	0,750	0,0384
Дефекты акросомы	Натив	0,519	0,181	0,148	0,720	0,000	0,968
	Крио	0,0857	0,919	-0,667	0,0735	-0,811	0,0145
Мертвые клетки SYBR/PI	Натив	-0,179	0,660	0,464	0,255	-0,821	0,0145
	Крио	0,786	0,0251	-0,727	0,0545	-0,818	0,0145
Живые клетки SYBR/PI	Натив	0,179	0,660	-0,464	0,255	0,821	0,0145
	Крио	0,200	0,602	-0,543	0,297	0,309	0,438
Средняя степень поляризации митохондриальных мембран n (%) (JC-1)	Натив	-0,143	0,720	0,000	0,968	0,0714	0,843
	Крио	0,107	0,781	0,107	0,781	0,321	0,438
Содержание АФК (интенсивность свечения) – mean FITC (DFC)*	Натив	-0,657	0,175	-0,257	0,658	0,257	0,658
	Крио	0,393	0,341	-0,393	0,341	-0,821	0,0145

Примечание. Жирным шрифтом отмечены достоверные уровни корреляции с показателями спермы быков.

Table 5
Analysis of correlations between the level of relative expression of the studied genes and some indicators of bull sperm quality

Index spermatozoa	Sperm condition	AQP3		AQP 7		AQP 11	
		R, Spearman	p-value	R, Spearman	p-value	R, Spearman	p-value
Mobility	Native	-0.037	0.905	0.0772	0.843	-0.0772	0.843
	Cryo	-0.579	0.150	-0.109	0.781	-0.579	0.150
Defective cell	Native	0.571	0.150	0.035	0.905	-0.071	0.843
	Cryo	0.371	0.497	0.143	0.720	-0.679	0.0735
Normal cells	Native	-0.571	0.150	-0.035	0.905	0.0714	0.843
	Cryo	-0.371	0.497	0.371	0.497	0.750	0.0384
Acrosome defects	Native	0.519	0.181	0.148	0.720	0.000	0.968
	Cryo	0.0857	0.919	-0.667	0.0735	-0.811	0.0145
Dead cells SYBR/PI	Native	-0.179	0.660	0.464	0.255	-0.821	0.0145
	Cryo	0.786	0.0251	-0.727	0.0545	-0.818	0.0145
Live cells SYBR/PI	Native	0.179	0.660	-0.464	0.255	0.821	0.0145
	Cryo	0.200	0.602	-0.543	0.297	0.309	0.438
Average degree of polarization of mitochondrial membranes n (%) (JC-1)	Native	-0.143	0.720	0.000	0.968	0.0714	0.843
	Cryo	0.107	0.781	0.107	0.781	0.321	0.438
AFO content (glow intensity) – mean FITC (DFC)*	Native	-0.657	0.175	-0.257	0.658	0.257	0.658
	Cryo	0.393	0.341	-0.393	0.341	-0.821	0.0145

Note. Significant levels of correlation with bull sperm parameters are indicated in bold.

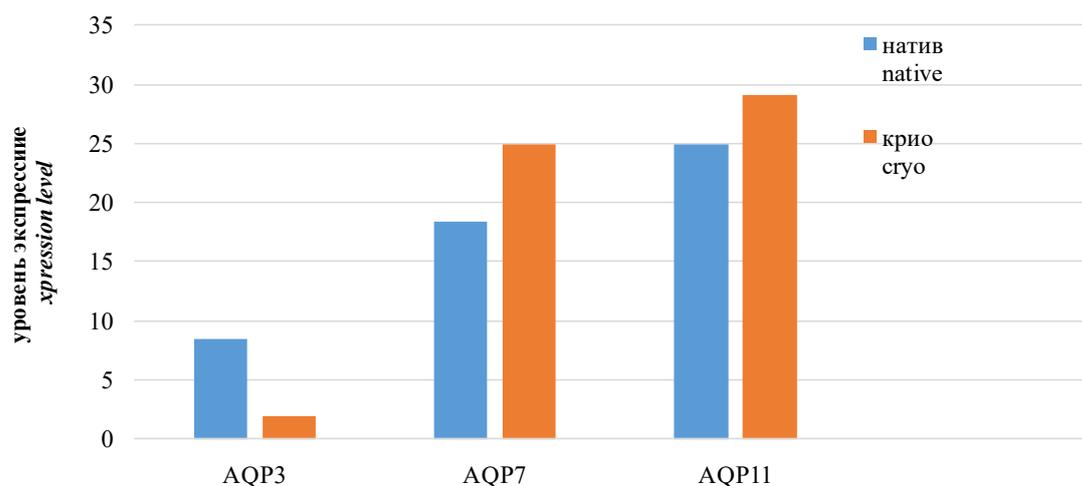


Рис. 2. Различия уровней экспрессии генов – кандидатов нативных и декриоконсервированных сперматозоидов
Fig. 2. Differences in expression levels of candidate genes in native and decryocconserved spermatozoa

Результаты исследования показали, что экспрессия вышеуказанных генов была преимущественно выше в замороженно-оттаянной сперме. Статистически достоверных различий уровней экспрессии изучаемых генов в нативной и декриоконсервированной сперме не наблюдалось: *AQP11* ($p = 0,07$); *AQP3* ($p = 0,08$); *AQP7* ($p = 0,1$) (рис. 2).

Анализ корреляционных связей выявил некоторые зависимости между уровнем экспрессии молекул и значимыми показателями качества спермы у исследуемых генов. Среди трех генов, кодирующих аквапорины, наибольшую корреляционную связь по большинству показателей качества сперматозоидов проявил ген *AQP11*. Он имел высокую положительную корреляцию с содержанием живых, нормальных клеток и отрицательную корреляцию с содержанием дефективных, мертвых клеток и содержанием АФК в замороженно-оттаянной и нативной сперме. Ген *AQP7* замороженно-оттаянной спермы имел среднюю отрицательную корреляцию с показателями содержания мертвых сперматозоидов и дефектов акросомы на уровне близком к достоверному. Ген *AQP3* имел достоверную положительную корреляцию с содержанием мертвых клеток замороженно-оттаянной спермы (таблица 5).

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Полученные нами данные позволяют сделать предположение, что наиболее перспективным для использования в качестве транскрипционного маркера является ген *AQP11*, поскольку он имел положительную корреляционную связь с несколькими показателями, характеризующими жизнеспособность сперматозоидов, и в то же время *AQP11* обла-

дал отрицательной корреляцией с показателями, характеризующими низкое качество сперматозоидов.

Отчасти наши данные подтверждаются исследованием, проведенным на быках [17], где относительное количество *AQP11* было значительно ($P < 0,05$) выше как в нативных, так и замороженно-оттаянных сперматозоидах из бычьих эякулятов с высокой устойчивостью к криоконсервации по сравнению со сперматозоидами с более низкой криорезистентностью, а также предыдущими исследованиями, где выявлена достоверная связь между относительным уровнем *AQP3* и *AQP11* и криотолерантностью сперматозоидов в сперме жеребца [20] и хряка [16].

Гены *AQP3* и *AQP7* требуют дополнительных исследований с увеличением выборки быков, поскольку транскрипты этих генов имели меньше корреляционных связей с показателями качества сперматозоидов и транскрипт гена *AQP3* имел положительную связь с содержанием мертвых клеток, несмотря на то что *AQP7* и *AQP11* имели противоположный результат в данной работе, а предыдущие исследования зарубежных авторов указывают, что основная роль *AQP3*, *AQP7* и *AQP11* связана с жизнеспособностью, осмоадаптацией и активацией подвижности сперматозоидов после эякуляции [13; 16; 21].

Результаты исследования могут быть использованы для дальнейшей работы по созданию транскрипционных биомаркеров, позволяющих отбирать семя от быков-производителей с более высоким оплодотворяющим и криорезистентным потенциалом.

Библиографический список (References)

1. Grötter L. G., Cattaneo L., Marini P. E., Kjelland M. E., Ferré L. B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*. 2019; 54 (4): 30681204. DOI: 10.1111/rda.13409.

2. Khan M. Z., Sathanawongs A., Zhang Y. Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021; 8: 33718466. DOI: 10.3389/fvets.2021.609180.
3. Aliakbari F., Eshghifar N., Mirfakhraie R., Pourghorban P., Azizi F. Coding and non-coding RNAs, as male fertility and infertility biomarkers. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2021; 15 (3): 34155862. DOI: 10.22074/IJFS.2021.134602.
4. Selvaraju S., Ramya L., Parthipan S., Swathi D., Binsila B.K. Deciphering the complexity of sperm transcriptome reveals genes governing functional membrane and acrosome integrities potentially influence fertility. *Cell and Tissue Research*. 2021; 385 (1): 33783607. DOI: 10.1007/s00441-021-03443-6.
5. Qin Z., Wang W., Ali M. A., Wang Y., Zhang Y. Transcriptome-wide m6A profiling reveals mRNA post-transcriptional modification of boar sperm during cryopreservation. *BMC Genomics*. 2021; 22 (1): 34344298. DOI: 10.1186/s12864-021-07904-8.
6. Shangguan A., Zhou H., Sun W., Ding R., Li X. Cryopreservation Induces Alterations of miRNA and mRNA Fragment Profiles of Bull Sperm. *Frontiers in Genetics*. 2020; 11: 32431726. DOI: 10.3389/fgene.2020.00419.
7. Kadivar A., Shams Esfandabadi N., Dehghani Nazhvani E., Shirazi A., Ahmadi E. Effects of cryopreservation on stallion sperm protamine messenger RNAs. *Reproduction in Domestic Animals*. 2020; 55 (3): 31885108. DOI: 10.1111/rda.13615.
8. Faraji S., Rashki Ghaleno L., Sharafi M., Hezavechi M., Totonchi M., et al. Gene Expression Alteration of Sperm-Associated Antigens in Human Cryopreserved Sperm. *Biopreservation and Biobanking*. 2021; 19 (6): 34009011. DOI: 10.1089/bio.2020.0165.
9. Ran M. X., Zhou Y. M., Liang K., Wang W. C., Zhang Y. Comparative analysis of microRNA and mRNA profiles of sperm with different freeze tolerance capacities in boar (*Sus scrofa*) and giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Biomolecules*. 2019; 9 (9): 31480517. DOI: 10.3390/biom9090432.
10. Fraser L., Brym P., Pareek C.S., Mogielnicka-Brzozowska M., Paukszto Ł. et al. Transcriptome analysis of boar spermatozoa with different freezability using RNA-Seq. *Theriogenology*. 2020; 142: 31711689. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.001.
11. Peris-Frau P., Soler A. J., Iniesta-Cuerda M., et al. Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21 (8): 32316334. DOI: 10.3390/ijms21082781.
12. Kordowitzki P., Kranc W., Bryl R., Kempisty B., Skowronska A., Skowronski M. T. The relevance of Aquaporins for the physiology, pathology, and aging of the female reproductive system in mammals. *Cells*. 2020; 9 (12): 33271827. DOI: 10.3390/cells9122570.
13. Fujii T., Hirayama H., Fukuda S., Kageyama S., Naito A., Yoshino H., Moriyasu S., Yamazaki T., Sakamoto K., Hayakawa H. Expression and localization of aquaporins 3 and 7 in bull spermatozoa and their relevance to sperm motility after cryopreservation. *Journal of Reproduction and Development*. 2018; 64: 29798965. DOI: 10.1262/jrd.2017-166.
14. Prieto-Martínez N., Morató R., Muiño R., Hidalgo C. O., Rodríguez-Gil J. E., Bonet S., Yeste M. Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa: Identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reproduction, Fertility and Development*. 2017; 29: 27221122. DOI: 10.1071/RD16077.
15. Calamita G., Delporte C. Involvement of aquaglyceroporins in energy metabolism in health and disease. *Biochimie*. 2021; 188: 33689852. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.03.001.
16. Prieto-Martínez N., Vilagran I., Morató R., Rivera Del Álamo M. M., Rodríguez-Gil J. E., Bonet S., Yeste M. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures. *Andrology*. 2017; 5 (6): 28941027. DOI: 10.1111/andr.12410.
17. Morató R., Prieto-Martínez N., Muiño R., Hidalgo C. O., Rodríguez-Gil J. E., Bonet S., Yeste M. Aquaporin 11 is related to cryotolerance and fertilising ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 2018; 30: 29365310. DOI: 10.1071/RD17340.
18. Highland H. N., Rishika A. S., Almira S. S., Kanthi P. B. Ficoll-400 density gradient method as an effective sperm preparation technique for assisted reproductive techniques. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2016; 9 (3): 27803588. DOI: 10.4103/0974-1208.192070.
19. Harshitha R., Arunraj D. R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 2021; 49 (5): 34132460. DOI: 10.1002/bmb.21552.
20. Bonilla-Correal S., Noto F., Garcia-Bonavila E., Rodríguez-Gil J. E., Yeste M., Miro J. First evidence for the presence of aquaporins in stallion sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 2017; 4: 29052325. DOI: 10.1111/rda.13059.

21. Delgado-Bermúdez A., Recuero S., Llavanera M., Mateo-Otero Y., Sandu A., Barranco I., Ribas-Maynou J., Yeste M. Aquaporins are essential to maintain motility and membrane lipid architecture during mammalian sperm capacitation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021; 9: 34540822. DOI: 10.3389/fcell.2021.656438.

Об авторах:

Ольга Юрьевна Баркова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Санкт-Петербург, Россия; ORCID 0000-0002-0963-905X, AuthorID 733323. *E-mail: barkoffws@list.ru*

Дарья Андреевна Старикова, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Санкт-Петербург, Россия; ORCID 0000-0001-5324-4090, AuthorID 693374. *E-mail: live8avis@mail.ru*

Ирэна Валерьевна Чистякова, кандидат биологических наук, научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения животных – филиал Федерального исследовательского центра животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста, Санкт-Петербург, Россия; ORCID 0000-0001-7229-5766, AuthorID 921353. *E-mail: itjeren7@gmail.com*

Authors' information:

Olga Yu. Barkova, candidate of biological sciences, senior researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Saint Petersburg, Russia; ORCID 0000-0002-0963-905X, AuthorID 733323. *E-mail: barkoffws@list.ru*

Darya A. Starikova, candidate of biological sciences, researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Saint Petersburg, Russia; ORCID 0000-0001-5324-4090, AuthorID 693374. *E-mail: live8avis@mail.ru*

Irena V. Chistyakova, candidate of biological sciences, researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding, Branch of the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, Saint Petersburg, Russia; ORCID 0000-0001-7229-5766, AuthorID 921353. *E-mail: itjeren7@gmail.com*