

for the entire lactation, animals of the 1st group (early insemination) were inferior. In recent years, due to the increase in the consumption of dairy products, the need to increase the productivity of animals has increased. One way to achieve this goal is to inseminate the heifers early. In the context of a specific production technology, it is necessary to establish the optimal, most profitable terms for the initial sexual use of heifers.

Studies have been conducted to examine the milk productivity and duration of use of heifers inseminated at 12 months of age compared to animals at a later date of insemination.

Analysis of live weight changes during growth prior only to animals of the 2nd group in the amount of milk, but differed in high fat content (3.93%). The yield on the 1st day in animals of the 1st group was lower by 0.4-0.8 kg. According to the results of the 2nd lactation, there were no differences in productivity between animals of different groups.

Analysis of data on the duration of use of dairy cows of different insemination ages showed that under the current conditions of feeding, keeping and using animals in the study farm, cows with an early insemination period (12.0 months) were used longer than others - 1.4 lactation.

The body sizes of the first calves, namely the width in the sacrum, were estimated in animals of the 1st group by 3 points, which is worse than in the first calves of other groups.

Keywords: heifers, insemination age, live weight, milk productivity, duration of productive use, width in the sacrum.

REFERENCES

1. Vasilyeva, O.K. Milk productivity and duration of productive longevity of cows with different methods of their maintenance/O. K. Vasilyeva, S. L. Safronov//Izvestia of St. Petersburg State Agrarian University. – 2020. – № 61. – S. 80-87. – DOI 10.24411/2078-1318-2020-14080. – EDN XAPTRU.
2. Kostomakhin, N. M. The practice of feeding and growing repair young in cattle breeding/N. M. Kostomakhin//Feeding farm animals and feed production. – 2013. – № 10. – S. 16-20. – EDN RBFWDB.
3. Safronov S.L., Kostomakhin NM, et al. Comparative characteristics of dairy productivity of cows of different productive longevity/S. L. Safronov, N. M. Kostomakhin, O. I. Solovyov, V. I. Ostroukhova//Zootekhnika. – 2022. – № 4. – S. 26-28. – DOI 10.25708/ZT.2022.62.46.007. –

EDN MLRPWY.

4. Safronov, S. L. Optimization of productive longevity of cows as a factor in increasing milk production/S. L. Safronov, O. A. Davydov//Izvestia of St. Petersburg State Agrarian University. – 2019. – № 57. – S. 65-71. – DOI 10.24411/2078-1318-2019-14065. – EDN EVKXHE.
5. The relationship between the duration of the service period and the milk yield of the Holsteinized black-mottled breed / I. N. Mikolaychik, O. V. Gorelik, V. V. Nenahov [et al.] // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Krasnoyarsk, 18–20 ноября 2020 года / Krasnoyarsk Science and Technology City Hall. Vol. Volume 677. – Krasnoyarsk, Russian Federation: IOP Publishing Ltd, 2021. – P. 42016. – DOI 10.1088/1755-1315/677/4/042016. – EDN CXKKFJ.

УДК 619:636.082

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2023.4.80

ПОВЫШЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЗАМОРОЖЕНО-ОТТАЯННЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПЕТУХОВ ЗА СЧЕТ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В СОСТАВЕ РАЗБАВИТЕЛЕЙ

Курочкин Антон Алексеевич, Плешанов Николай Вячеславович

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»

РЕФЕРАТ

Криоконсервацию широко используют при создании криобанков репродуктивных клеток. В отличие от сельскохозяйственных животных, качественные показатели замороженного и оттаянного семени птиц ниже, что усложняет выбор особей для сохранения их семени. В данной работе мы изучили возможность улучшить показатели спермы петухов после замораживания и оттаивания ферментативными антиоксидантами в составе разбавителей. Известно, что при витрификации половых клеток экзогенные антиоксиданты уменьшают деструктивное влияние активных форм кислорода (АФК). Это даст возможность усовершенствовать процедуру криоконсервации, уменьшив окислительный стресс, которому подвергаются сперматозоиды. Результаты подтвердили, что супероксиддисмутаза и каталаза в составе разбавителя ЛКС-1 для криоконсервации спермы петухов в дозах 75 МЕ/мл и 200 мкг/мл повышают жизнеспособность клеток на 3,65 % и 5,27 % соответственно.

Ключевые слова: петухи, криоконсервация спермы, окислительный стресс, апоптоз, антиоксиданты.

ВВЕДЕНИЕ

Криоконсервацию спермы петухов применяют для сохранения генетического материала и поддержания поголовья кур, находящихся под угрозой исчезновения, создания криобанков репродуктивных клеток редких и исчезающих пород кур. В настоящее время время основной проблемой при криоконсервации спермы птиц является снижение общей подвижности и фертильности спер-

мы и отсутствие стандартизированных протоколов криоконсервации.

Одна из причин деструктивного влияния криоконсервации на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов – повышенная выработка клетками активных форм кислорода (АФК). В основном АФК образуются при окислительно-восстановительных реакциях, они необходимы для нормальной жизнедеятельности. Однако, криоконсервация индуцирует выработку

АФК в избыточных количествах, которые оказывают повреждающее воздействие на клетки. Этому же способствует снижение активности антиоксидантных клеточных ферментов [10].

Для защиты от такого деструктивного влияния клетки вырабатывают ингибиторы окислительных процессов – антиоксиданты. Но способность сперматозоидов многих видов животных и птицы их синтезировать ограничена [13, 9]. Основными антиоксидантами в клетках являются ферменты глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза (КАТ). Супероксиддисмутаза – важнейший элемент антирадикальной защиты, ее обнаружили во всех аэробных организмах. Этот фермент на три – четыре порядка ускоряет реакцию диспропорционирования супероксидных анионов, способен взаимодействовать с пероксидом водорода и выступать в качестве прооксиданта, инициируя генерацию радикалов супероксида и гидроксила [5]. Каталаза тоже разлагает перекись, основная ее функция – преобразование молекул H_2O_2 в свободный кислород (O_2) и воду (H_2O) [3]. Исследования, проведенные со спермой сельскохозяйственных животных, показали, что антиоксиданты как ферментативной, так и не ферментативной природы повышали жизнеспособность сперматозоидов после цикла замораживания/оттаивания [11].

Некоторые протоколы криоконсервации спермы млекопитающих и птиц предполагают предварительно удалять семенную плазму [7], но это ограничивает предохраняющее действие антиоксидантных ферментов, часть которых находится именно в плазме [14]. Протективный эффект антиоксидантной системы также значительно снижался, если сперму перед замораживанием разбавляли [6]. Поэтому добавление экзогенных антиоксидантов в состав разбавителя может оказаться перспективным способом улучшить показатели замороженного и оттаявшего семени. Это особенно актуально для спермы птиц, поскольку она в большей степени подвержена оксидативному стрессу из-за особенностей биохимического состава плазматических мембран сперматозоидов [16]. Из-за низкой общей подвижности замороженного/оттаявшего семени, эякуляты некоторых производителей не могут использовать в криобанках.

Цель исследования – определить возможность повышения качественных показателей эякулятов петухов с низкой общей подвижностью ($\leq 30\%$) сперматозоидов после криоконсервации, за счет добавления в разбавитель супероксиддисмутаза и каталазы, и снижения уровня внутриклеточного пероксида водорода, вызывающего оксидативный стресс клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сперму получали от 20 петухов породы Род – Айланд красный в возрасте 52 – 56 недель из «Генетической коллекции редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ) методом абдоминального массажа по W. Burrows и J. Quinn (1937). На протяжении трех недель эякулят собирали в пенициллиновые флаконы дважды в неделю. В начале его индивидуально первично оценивали

по показателям общей и прогрессивной подвижности после цикла замораживания/оттаивания. Для дальнейшей работы отобрали 12 голов, семя которых имело общую подвижность $\leq 30\%$. Собранную сперму объединяли в один кластер и делили на шесть равных аликвот, в соответствии с экспериментальными группами. Исследовали нативную сперму (без разведения) и пять опытных образцов, отличающихся составом разбавителя. Основным разбавителем служила ЛКС-1 (Ленинградская криозащитная среда) разработанная ВНИИГРЖ [1]. На ее основе приготовили четыре экспериментальные среды, добавляя во вторую и третью группы супероксиддисмутазу в количестве 75 МЕ/мл (S 75) и 200 МЕ/мл (S 200) соответственно, а в четвертую и пятую группы – 100 мкг/мл (C 100) и 200 мкг/мл (C 200) каталазы. Первая проба (первая группа) с ЛКС-1 без добавок служила контролем. Разбавители смешивали со свежеполученным эякулятом сразу после взятия в соотношении 1:1. Использовали ферментативные антиоксиданты фирмы Sigma – Aldrich (США).

Разбавленное семя помещали на 40 мин в холодильную камеру при 5 $^{\circ}C$ для эквilibрации. Затем добавляли криопротектор N,N-диметилацетамид (Sigma – Aldrich) до конечной концентрации 6 % и вновь охлаждали 1 мин для уравнивания температуры. Замораживание производили в гранулах по методике Л.Е. Нарубиной и др. [2]. Семя, набранное в капиллярную пипетку, накапывали в жидкий азот с высоты 7,5 см от поверхности (минус 41,4 $^{\circ}C$). Положение пипетки контролировали с помощью термометра (Temperature measuring instrument THERM 2420, ANLABORN), скорость раскапывания составляла ~ 1,4 гранулы в секунду. Размораживали образцы на нагретой до 60 $^{\circ}C$ металлической пластине (ВНИИГРЖ, 1989).

Сперму анализировали на проточном цитометре Cytotflex (Beckman Coulter, Inc.). Для этого образцы дважды промывали двухкомпонентным разбавителем (ВНИИГРЖ, патент № 2482816, 2013) по 7 мин при 1500 об/мин. Чтобы исключить посторонние клетки и конгломераты, популяцию сперматозоидов отбирали на точечном графике, построенном на результатах бокового светорассеивания (SSC-A) и малоуглового светорассеивания (FSC-A). Полученные данные анализировали при помощи программного обеспечения CytExpert.

Жизнеспособность клеток оценивали при помощи набора для определения апоптотических клеток (Аннексин V, AF488/PI, Lumiprobe). Образцы семени разбавляли до концентрации 3×10^6 сперматозоидов в 1 мл, суспензию клеток дважды промывали (по 7 мин при 1500 об/мин) – сначала двухкомпонентным разбавителем ВНИИГРЖ, затем – буфером для связывания аннексина. После этого клетки ресуспендировали в буфере, отбирали по 100 мкл для окрашивания. В каждую пробу вносили по 2 мкл аннексина, инкубировали 10 мин при 25 $^{\circ}C$ и добавляли 400 мкл буфера. Перед оценкой образцов на проточном цитометре приливали второй флуорохром – PI (5 мкл/500 мкл образца). Разведения образцов и концентрации флуорохромов соответствовали

Таблица 1.

Показатели спермы петухов до и после криоконсервации с разным составом разбавителей.

Группа	Живые клетки, %	Апоптоз, %	Некроз, %	Мертвые клетки, %	Внутриклеточный H_2O_2 , %	Митохондриальный потенциал, %
Нативная сперма	73,98±1,55 ^A	3,18±0,88 ^A	6,64±1,14 ^A	16,20±1,18 ^A	35,37±2,49 ^A	76,30±8,33 ^A
Первая (контроль)	52,94±4,43 ^{BA}	2,34±0,52 ^B	19,94±1,87 ^{BA}	24,90±6,88 ^B	41,37±11 ^B	62,81±5,73 ^B
Вторая S 75	56,59±13,79 ^{CA}	0,70±0,06 ^{CA}	12,93±4,43 ^C	34,33±14,29 ^C	12,69±3,19 ^{CAB}	64,04±13,63 ^C
Третья S 200	51,49±8,69 ^{DA}	1,01±0,31 ^D	18,90±0,40 ^{DA}	19,92±0,49 ^D	10,02±3,79 ^{DAB}	52,01±16,61 ^D
Четвертая S 100	50,30±3,23 ^{EA}	2,48±0,66 ^E	23,77±0,59 ^E	20,24±1,95 ^E	13,92±6,55 ^{EAB}	72,65±5,34 ^E
Пятая S 200	58,21±7,11 ^{FA}	1,90±0,55 ^F	13,16±7 ^F	13,72±2,30 ^F	12,84±6,20 ^{FAB}	64,38±8,49 ^F

Примечание. Латинским буквам соответствуют группы: нативная сперма – А; первая – В; вторая (S75) – С; третья (S 200) – D; четвертая (С 100) – Е; пятая (С 200) – F. Несколько букв показывают достоверность различий между группами, ($p < 0,05$), показатели сравнивали с контролем и между группами.

рекомендациям производителя набора.

Внутриклеточный пероксид водорода определяли с флуорохромом 2,7-дихлорфлуоресцеина диацетат (DCFH-DA, Sigma – Aldrich, США). Образцы семени разбавляли до концентрации 3×10^6 сперматозоидов в 1 мл, к ним добавляли по 20 мкл DCFH-DA (конечная концентрация 4 мкМ/мл) и помещали в термостат на 20 мин при 25 °C. После инкубирования пробы отмывали от остатков красителя (7 мин при 1200 об/мин), вносили второй флуорохром – PI (2 мкл/1000 мкл) и оценивали образцы на проточном цитометре. По уровню флуоресценции выделяли две популяции клеток – с высоким и низким содержанием H_2O_2 .

Для окрашивания митохондрий в живых клетках использовали тетраметилродамин (TMRE, Lumiprobe, Россия). Это липофильный, положительно заряженный краситель способен проникать через плазматическую мембрану клеток и селективно накапливаться в активных митохондриях благодаря трансмембранному потенциалу, который они поддерживают в нормальном состоянии. Деполяризация митохондрий из-за запуска процессов апоптоза, некроза или других факторов, снижающих мембранный потенциал, приводят к меньшему накоплению красителя и его флуоресценции, по сравнению с интактными клетками. К разбавленным образцам семени (3×10^6 сперматозоидов в 1 мл) добавляли 1 мкл TMRE (конечная концентрация 1 мкМ/мл) и помещали в темное место на 20 мин при 25 °C. После этого пробы дважды отмывали от остатков красителя (по 7 мин при 1200 об/мин) и оценивали на проточном цитометре.

Все полученные результаты обработаны статистически, достоверность определяли по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели нативной спермы находились на высоком уровне и отвечали требованиям ГОСТа

[4]. Доля живых клеток равна 73,98 %, а мертвых и апоптотических – 19,38 %, высокий митохондриальный потенциал выявили у 76,30 % сперматозоидов. Процесс замораживания/оттаивания снизил качество спермы во всех опытных группах. Живые клетки составили 50,30 – 58,21 %. Коэффициент изменчивости этого показателя оказался 25,60 %. Вариабельность данных говорит о непосредственном влиянии ферментативных антиоксидантов на жизнеспособность сперматозоидов после криоконсервации (Таблица 1).

По сравнению с первой группой, отмечено достоверное снижение уровня перекиси водорода в сперматозоидах второй – четвертой групп, что связано с действием антиоксидантов в составе разбавителя (рис. 1) [3]. Уменьшилась также доля клеток, подверженных апоптозу. Коэффициент корреляции между числом сперматозоидов с повышенным содержанием внутриклеточного пероксида водорода и количеством апоптотических клеток ($r^2=0,57$, $p < 0,05$), подтвердил деструктивное влияние АФК на жизнеспособность спермы после цикла замораживания/оттаивания. Наши данные согласуются с результатами, полученными на других сельскохозяйственных животных. СОД в среде для криоконсервации спермы быков и баранов повышала общую подвижность, жизнеспособность, целостность акросом и митохондриальную активность клеток [12, 15]. Аналогичные работы, проводимые на сперме петухов, согласуются с нашими результатами – ферментативные антиоксиданты в среде для криоконсервации достоверно увеличили жизнеспособность сперматозоидов после оттаивания [4]. В отличие от других авторов, использовавших в своих исследованиях протоколы криоконсервации с постепенным снижением температуры (slow-протокол), мы применяли метод витрификации половых клеток.

Достоверных различий в мембранном потен-

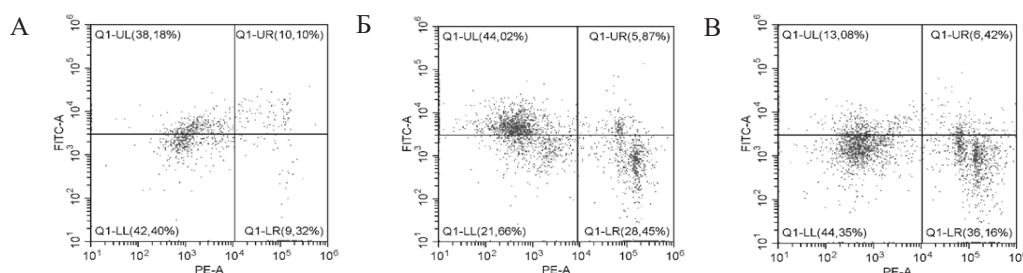


Рисунок 1. Изменение числа клеток с повышенным содержанием пероксида водорода: А – нативная сперма, Б – первая группа, В – вторая группа (S 75). Квадрант Q1- UL – клетки, положительные по флуорохрому DCFH-DA и отрицательные по PI.

циале митохондрий не выявили, но в пробах второй, четвертой и пятой групп наблюдали тенденцию к повышению этого показателя. Поскольку митохондрии играют ключевую роль в процессе апоптоза сперматозоидов, взаимосвязь между уровнем внутриклеточного пероксида водорода и апоптозом может косвенно указывать на изменения их функционального статуса. Одна из причин запуска клеточной гибели – активация каспазного каскада и экспрессия фосфатидилсерина на поверхности клетки, из-за высвобождения митохондриями цитохрома С и других апоптогенных факторов [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установили, что супероксиддисмутаза и каталаза в составе разбавителя ЛКС-1 для криоконсервации спермы петухов в дозах 75 МЕ/мл и 200 мкг/мл повышают жизнеспособность клеток на 3,65 и 5,27 % соответственно. Следовательно, экзогенные ферментативные антиоксиданты в составе разбавителя спермы петухов при криоконсервации – перспективное направление изучения способов снижения оксидативного стресса, которому подвергаются клетки.

Работа выполнена в соответствии с Государственным заданием № 121052600357 – 8.

ЛИТЕРАТУРА

1. Курбатов А. Д., Нарубина Л. Е., Бубляева Г. Б., Москаленко Л. И., Целютин К. В. Среда для низкотемпературной консервации спермы птиц. АС № 1130339, Заявл. в Гос. реестр изобретений СССР 22 августа 1984
2. Нарубина Л. Е., Курбатов А. Д., Бубляева Г. Б., Целютин К. В. Способ криоконсервации спермы петухов в виде гранул. АС № 1343587, СССР, 1987.
3. Биохимия оксидативного стресса: учебно-методическое пособие // ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Издательство XX, 2018 г., 60 с
4. ГОСТ № 32277-2013 Средства воспроизводства. Сперма. Методы испытаний физических свойств и биологического, биохимического, морфологического анализов. - Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации; Москва: Изд-во стандартов, 2016. – 16 с.
5. Amini M., Kohram H., Zare-Shahaneh A., Zhandi M., Sharideh H., Nabi M. The effects of different levels of

catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology*. 2015; 70(3): 226–232.

6. Bilodeau J., Chatterjee S., Sirard M., Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing. *Molecular reproduction and development*. 2000; 55: 282–288.

7. Campanholi S., Monteiro F., Ribeiro Dias E., Mercadante M., Paz C., Dell'Aqua J., Garcia J. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. *Theriogenology*. 2017; 89: 114–121.

8. Dwi P., Mona O., Ida S., Yulhasri. Hydrogen peroxide has adverse effects on human sperm quality parameters, induces apoptosis, and reduces survival. *Journal of human reproductive sciences*. 2021; 14(2): 121–128.

9. Khan R., Laudadio V., Tufarelli V. Semen Traits and Seminal Plasma Biochemical Parameters in White Leghorn Layer Breeders. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 47(2):190 – 195.

10. Kowalczyk A., Czerniawska Piątkowska E. Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process. *Andrology*. 2021; 9(4):1275 – 1281.

11. Leão A., Souza A., Mesquita N., Pereira L., Zangeronimo M. Antioxidant enrichment of rooster semen extenders – A systematic review. *Research in Veterinary Science*. 2021; 136: 111–118.

12. Olfati R., Daghigh H., Ashrafi I. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. *Cell and tissue banking*. 2013; 15(3). 461–470.

13. Partyka A., Lukaszewicz E., Nizanski W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*. 2012; (77):1497 – 1504.

14. Peris-Frau P., Soler A., Iniesta-Cuerda M., Martín-Maestro A., Sánchez-Ajofrán I., Medina-Chávez D., Garde J. 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): 1–22.

15. Silva S., Soares A., Batista A., Almeida F., Nunes J., Peixoto C., Guerra M. In vitro and In vivo evaluation of ram sperm frozen in Tris Egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reproduction in domestic animals*. 2011; 46(5): 874–881.

16. Surai P., Fujihara N., Speake B., Brillard J., Wishart G., Sparks N. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. *Asian Australasian journal of animal sciences*. 2001; 17(7): 1024–1050.

INCREASING THE VIABILITY OF ROOSTER SPERM DURING CRYOPRESERVATION THROUGH THE USE OF ENZYMATIC ANTIOXIDANTS

Anton Al. Kurochkin, Nikolay V. Pleshonov

All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals - branch of the Federal State Budgetary Institution "Federal Research Center for Animal Husbandry - VIZh named after Academician L.K. Ernst"

Cryopreservation of rooster semen has found wide application in creation of reproductive cell's cryobanks. Compare to

other farm animal's semen, quality of frozen/thawed bird semen are often lower. This factor makes choice of individual ejaculates for the purposes of cryopreservation more difficult. In our study, we considered the possibility of improving frozen/thawed semen performance by adding enzymatic antioxidants to diluents. It has been shown that during the vitrification of reproductive cells, the addition of exogenous enzymatic antioxidants reduces the destructive effect of reactive oxygen species, which indicates the possibility of improving method by reducing oxidative stress to cells. When added to the diluent for cryopreservation rooster's sperm LKS-1 superoxide dismutase in amount of 75 IU cell viability increased by 3,65 %, when was added catalase in amount of 200 µg/ml, cell viability increased by 5,27 %.

Key words: roosters, sperm cryopreservation, oxidative stress, apoptosis, antioxidants.

REFERENCES

1. Kurbatov A. D., Narubina L. E., Bublyayeva G. B., Moskalenko L. I., Tselyutin K. V. Medium for low-temperature preservation of bird sperm. AS No. 1130339, Registered. in State Register of Inventions of the USSR August 22, 1984
2. Narubina L. E., Kurbatov A. D., Bublyayeva G. B., Tselyutin K. V. Method of cryopreservation of rooster sperm in the form of granules. AS No. 1343587, USSR, 1987.
3. Biochemistry of oxidative stress: educational and methodological manual // Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov Ministry of Health of Russia, Moscow, Publishing House XX, 2018, 60 p.
4. GOST No. 32277-2013 Means of reproduction. Sperm. Methods for testing physical properties and biological, biochemical, morphological analyses. - Interstate. Council for Standardization, Metrology and Certification; Moscow: Standards Publishing House, 2016. - 16 p.
5. Amini M., Kohram H., Zare-Shahaneh A., Zhandi M., Sharideh H., Nabi M. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology*. 2015; 70(3): 226–232.
6. Bilodeau J., Chatterjee S., Sirard M., Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing. *Molecular reproduction and development*. 2000; 55: 282–288.
7. Campanholi S., Monteiro F., Ribeiro Dias E., Mercadante M., Paz C., Dell'Aqua J., Garcia J. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation on semen quality and in vitro fertility. *Theriogenology*. 2017; 89: 114–121.
8. Dwi P., Mona O., Ida S., Yulhasri. Hydrogen peroxide has adverse effects on human sperm quality parameters, induces apoptosis, and reduces survival. *Journal of human reproductive sciences*. 2021; 14(2): 121–128.
9. Khan R., Laudadio V., Tufarelli V. Semen Traits and Seminal Plasma Biochemical Parameters in White Leghorn Layer Breeders. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011; 47(2):190 – 195.
10. Kowalczyk A., Czerniawska Piątkowska E. Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process. *Andrology*. 2021; 9(4):1275 – 1281.
11. Leão A., Souza A., Mesquita N., Pereira L., Zangeronimo M. Antioxidant enrichment of rooster semen extenders – A systematic review. *Research in Veterinary Science*. 2021; 136: 111–118.
12. Olfati R., Daghigh H., Ashrafi I. Effects of in combination antioxidant supplementation on microscopic and oxidative parameters of freeze-thaw bull sperm. *Cell and tissue banking*. 2013; 15(3). 461–470.
13. Partyka A., Lukaszewicz E., Nizanski W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology*. 2012; (77):1497 – 1504.
14. Peris-Frau P., Soler A., Iniesta-Cuerda M., Martín-Maestro A., Sánchez-Ajofrín I., Medina-Chávez D., Garde J. 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): 1–22.
15. Silva S., Soares A., Batista A., Almeida F., Nunes J., Peixoto C., Guerra M. In vitro and In vivo evaluation of ram sperm frozen in Tris Egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reproduction in domestic animals*. 2011; 46(5): 874–881.
16. Surai P., Fujihara N., Speake B., Brillard J., Wishart G., Sparks N. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. *Asian Australasian journal of animal sciences*. 2001; 17(7): 1024–1050.

УДК 619:618.19-002:616.15:615.37

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2023.4.84

МОРФОБИОХИМИЧЕСКИЙ СТАТУС КРОВИ КОРОВ ПРИ ТЕРАПИИ СУБКЛИНИЧЕСКОГО МАСТИТА КОМПЛЕКСНОЙ МАЗЬЮ «УБЕРОСЕПТ» СОВМЕСТНО С ИММУНОМОДУЛЯТОРАМИ

Перегончий А.Р., orcid.org/0009-0001-7927-6282

Павленко О.Б. д-р.биол.наук, orcid.org/0000-0001-9086-9241

Зимников В.И. канд.ветеринар.наук, orcid.org/0000-0002-6371-7143

Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии,
Россия

РЕФЕРАТ

Исследования проводились на лактирующих больных субклиническим маститом коровах краснопёстрой голштинской и симментальской пород в возрасте от 1 до 8 лактаций. Были отобраны четыре группы животных по 10 голов в каждой. Первой группе в качестве лечения применяли комплексную мазь «Уберосепт» 1 раз в день, наружно на протяжении 5 дней. Второй группе применяли «Уберосепт» 1 раз в день, наружно на протяжении 5 дней, «Миксоферон» 3 мл внутримышечно 2 раза в день на протяжении 7 дней. Третьей группе применяли «Уберосепт» 1 раз в день, наружно на протяжении 5 дней, «Субмастин-КРС» 10 мл внутримышечно 1 раз в день на протяжении 3 дней. У всех опытных групп отбирали пробы крови для исследования морфобиохимических показателей и показателей перекисного окисления липидов, антиоксидантной защиты и эндогенной интоксикации. Пробы отбирали до