

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И.  
Скрябина»



**Международная научно-практическая конференция  
«Перспективы развития ветеринарного акушерства,  
гинекологии и биотехники репродукции животных»  
12-13 октября 2023 г. Москва**

## **СОХРАНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ДОМАШНИХ ПТИЦ IN VITRO: ОТ ИСТОКОВ К СОВРЕМЕННЫМ ДОСТИЖЕНИЯМ**

докладчик

**Силукова Юлия Леонидовна**

**ВНИИГРЖ**

Москва

2023

ГЗ 121052600357-8 (0445-2012-0012)





# ИСТОРИЧЕСКАЯ СПРАВКА

1907-1922 г.г.

Директор Центральной опытно-селекционной станции домашних животных, Москва, Россия.  
ИВАНОВ Е.И.\*

ON THE USE OF ARTIFICIAL INSEMINATION FOR ZOOTECHNICAL PURPOSES IN RUSSIA.

By E. I. IVANOFF,

Director of the Central Experimental Breeding Station for Domestic Animals, Moscow, Russia.

ONE of the greatest problems of Russia's present economic policy is the restoration and development of farming, and in particular, cattle-farming. The war and revolution have, together with other things, destroyed enormous numbers of cattle, horses, pigs, etc., and thoroughly undermined the meat industry, as well as the sources of supply of working animals. A decrease of 50 % below the former numbers of horses is the common state of things. The preservation of cattle-farms and studs is seldom met with, and the number of stock-producing animals is at least ten times less than formerly. The terrible drought threatens to bring into this sphere of national wealth even greater destruction. At the same time there can be no doubt that without the restoration and maintenance on a definite level of stud and cattle-farming, Russia cannot return to full economic activity. The present-day state of things demands that every effort be made, every possibility found and utilised, for increasing the number of domestic animals and for improving the methods of breeding and the breeds themselves.

\*Ivanoff, E. (1922). On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *The Journal of Agricultural Science*, 12(3), 244-256. doi:10.1017/S002185960000530X

1930 г.

Ishikawa H.  
The life duration of cock spermatozoa outside the body



REPORT OF PROCEEDINGS

OF THE

4th WORLD'S POULTRY CONGRESS

at the Crystal Palace,  
LONDON, ENGLAND :

JULY 22-30,

1930



Organised by the Ministry of Agriculture and Fisheries in conjunction with the Department of Agriculture for Scotland and the Ministry of Agriculture for Northern Ireland.

LONDON :  
PUBLISHED BY HIS MAJESTY'S STATIONERY OFFICE.  
To be purchased directly from H.M. STATIONERY OFFICE at the following addresses:  
Admiralty House, Whitehall, London, W.C.2; 106, Cannon Street, London, E.C.4;  
York Street, Manchester; 1, St. Andrew's Crescent, Cardiff;  
15, Donegal Square West, Dublin; 1, or through any bookseller.  
1931.

1935 г., 1937 г.

Burrows, W. H., & Quinn, J. P.  
A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey.

A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl

A REVIEW of the literature has revealed several methods of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. None of these, however, seem quite adequate for obtaining supplies of undiluted spermatozoa in the amounts necessary for extensive work in the field of artificial insemination, fertility, and associated studies.

The method presented in this paper consists of a manual elicitation of an ejaculatory response which is undoubtedly reflex in nature. Repeated responses can be obtained in a short period of time. Relatively large amounts of semen can be collected easily and the bird can be held in the best position for obtaining clean samples.

The method is best handled by two operators. One operator holds the bird by its thighs in a head-downward position. The abdomen is toward the second operator, the legs are spread slightly and the abdomen otherwise well exposed. The second operator then massages the keel and the soft part of the abdomen above the gizzard and below the pelvic bones. The massage is usually most effective if applied with sudden jerky motions of the hand.

The operator soon learns the exact type of stimulation to which the bird most readily re-

sponds and the bird can be held in the best position for obtaining clean samples.

To ascertain whether gonads would have a mess of the method, i pons. Seven of these getically as did the these capons were not not autopsied to verify were stimulated and capons, with a reactio tory movements. In tl the hen, the cloaca is thrust and the tail is

ment is apparently important to the ejection of semen. With his left hand, the operator holds a small (25 cc. to 60 cc.) beaker under the vent in such a position that the extruded copulatory organs may strike over its edge, but is careful that the hand does not interfere with the movements of the tail. The technic is apparently effective in all breeds of domestic fowl. In various experiments, the authors have used White Leghorn, Blue Andalusian, Rhode Island Red, Su dotte, and birds from 157 cocks handled, on to respond and these

The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey

W. H. BURROWS AND J. P. QUINN

National Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland

(Received for publication, July 9, 1936)

A NUMBER of methods for obtaining semen from the fowl have been described. Because of the peculiar genital anatomy of birds, the process of obtaining semen from them presents a somewhat different problem than that encountered in the mammal.

Ivanov (1913) obtained spermatozoa for experimental purposes by killing cocks, opening the abdomen and squeezing the semen from the vas deferens. Payne (1914), Craft, McElroy and Penquite (1926) and Jull and Quinn (1931) obtained spermatozoa by mating a cock to a hen and immediately securing the fluid from the cloaca of the hen; Payne, and Craft and his co-workers using a spoon and Jull and Quinn, a pipette. Amantea (1922) and Dunn (1927) placed a dish between "the two respondents." Ishikawa (1930) used an artificial cloaca consisting of an animal membrane held on a wire frame. The arti-

caught in a small beaker held beneath the vent. This last-mentioned method has the advantage of giving the operator control over the time of collections, independent of the bird's desire to mate, and of allowing the collection of relatively large samples of semen. It also has some annoying disadvantages. The stimulation to the ejaculatory response also at times stimulates defecation, especially during the early training of the bird. Also reports show that some difficulty may be experienced in learning the technic. This paper presents the results of the efforts to overcome these disadvantages.

ANATOMICAL

Contrary to popular belief, the rooster has a copulatory organ of appreciable dimensions. The so-called rudimentary copulatory organ is but the apex of the functional copulatory organ. The entire organ



# Burrows W. H. & Quinn J. P., 1937

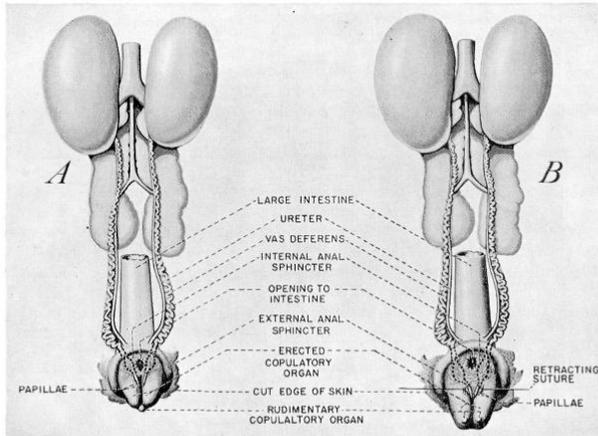


FIG. 1. The genital organs of the male fowl and the turkey. The bulbous ducts are shown between the *vasa deferentia* and the papillae by dotted lines.

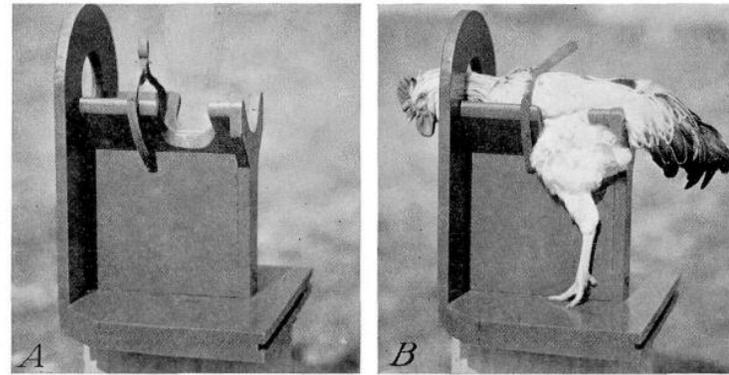


FIG. 2. A useful holder for birds when semen is to be collected by a single individual.



FIG. 3. Showing the actual stimulation of the fowl. The operator's left hand is used here only to expose the field for the camera.

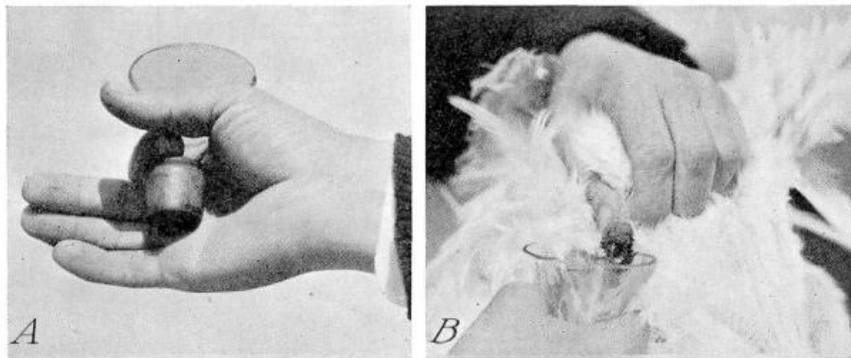


FIG. 4. (A) Shows the container and the manner of holding so that the fingers are free for stimulation purposes. (B) Shows the placement of the left thumb and forefinger in holding the copulatory organ exposed.

## SUMMARY

The posterior-most portions of the genital apparatus of the male fowl and the male turkey have been described in some detail and illustrated.

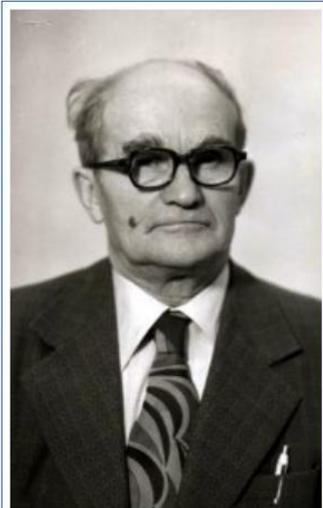
Modifications of the previously published method for obtaining spermatozoa from the fowl are described. These make possible greater ease of stimulation, less soiling of material obtained and the ability to milk semen from the ducts of fowls which

cannot be stimulated to an ejaculatory response, and from male turkeys, which are very difficult to stimulate.

Some figures on collections are given which show that the method is satisfactory for both practical and experimental use.



# Курбатов А.И. (ВНИИГРЖ) 60-е годы XX века



Курбатов А. И.  
(1912-1987)

1. Разработка новых высокоэффективных сред для разбавления семени петухов и др. сельскохозяйственных птиц
2. Разработка принципиально новых способов криоконсервации спермы самцов птиц, позволяющих сохранять генофонд исчезающих пород и видов, использовать заморожено-оттаянную сперму самцов с высокой племенной ценностью и при этом сохранять её высокую оплодотворяющую способность.
3. профессор А.Д. Курбатов, канд. биол. наук Б.К. Тур, канд. с.х. наук Л.Е. Нарубина и канд. биол. наук М.С. Воронина удостоены премии Правительства (диплом № 19032) «За разработку и внедрение в производство эффективной комплексной технологии искусственного осеменения птиц»





## Особенности строения репродуктивных клеток самцов сельскохозяйственных птиц

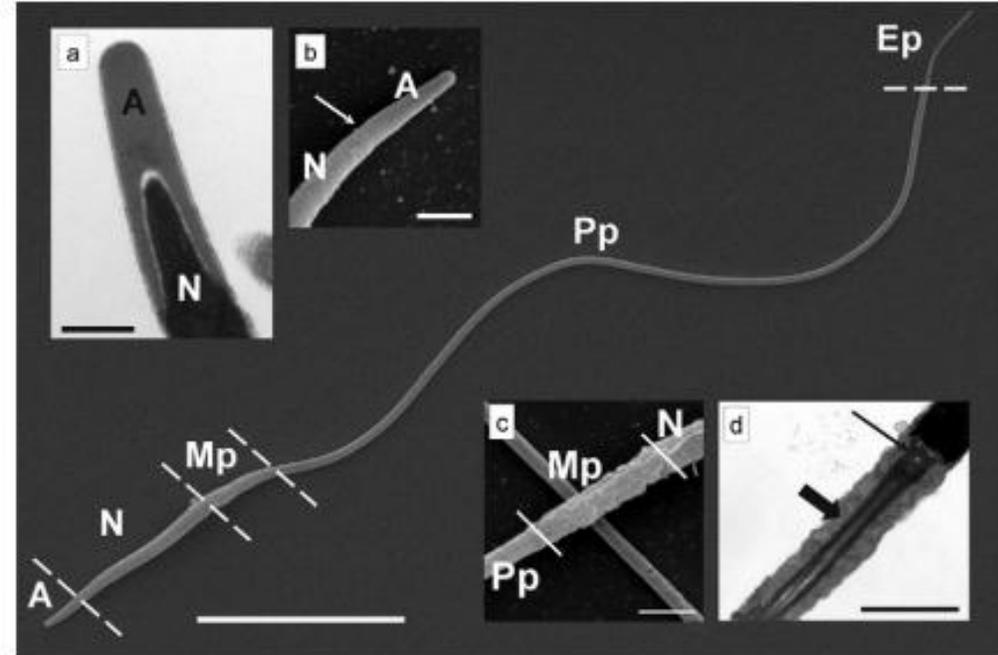
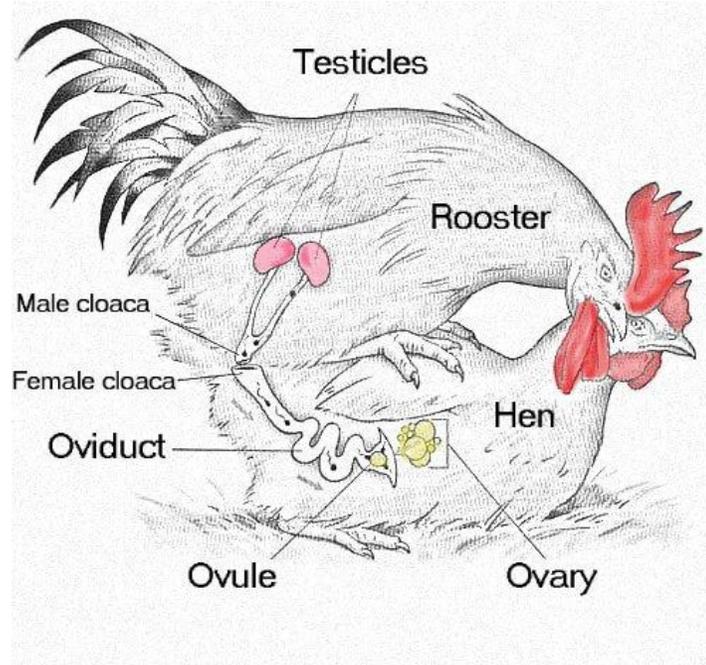


Рисунок 5. SEM of a normal emu sperm illustrating the chief structural components, namely the head composed of the acrosome (A) and nucleus (N), the midpiece (Mp), principal piece (Pp) and endpiece (Ep). Bar 10 m. Inset (a). Section through the acrosome (A) covering the tapered tip of the nucleus (N). TEM. Bar 1 m. Inset (b). The conical acrosome (A) reveals a smooth surface and a discrete junction (j) with the nucleus (N). SEM. Bar 1 m. Inset (c). SEM of the midpiece (Mp) illustrating the mitochondrial sheath, nucleus (N) and principal piece (Pp). Bar 1 m. Inset (d). TEM of the midpiece showing the mitochondrial sheath arranged around the proximal ( ) and distal ( ) centrioles. The distal centriole runs the full length of the midpiece. Bar 1 m. (Du Plessis, L., & Soley, J. T., 2011)



## Особенности строения репродуктивных клеток самцов сельскохозяйственных птиц

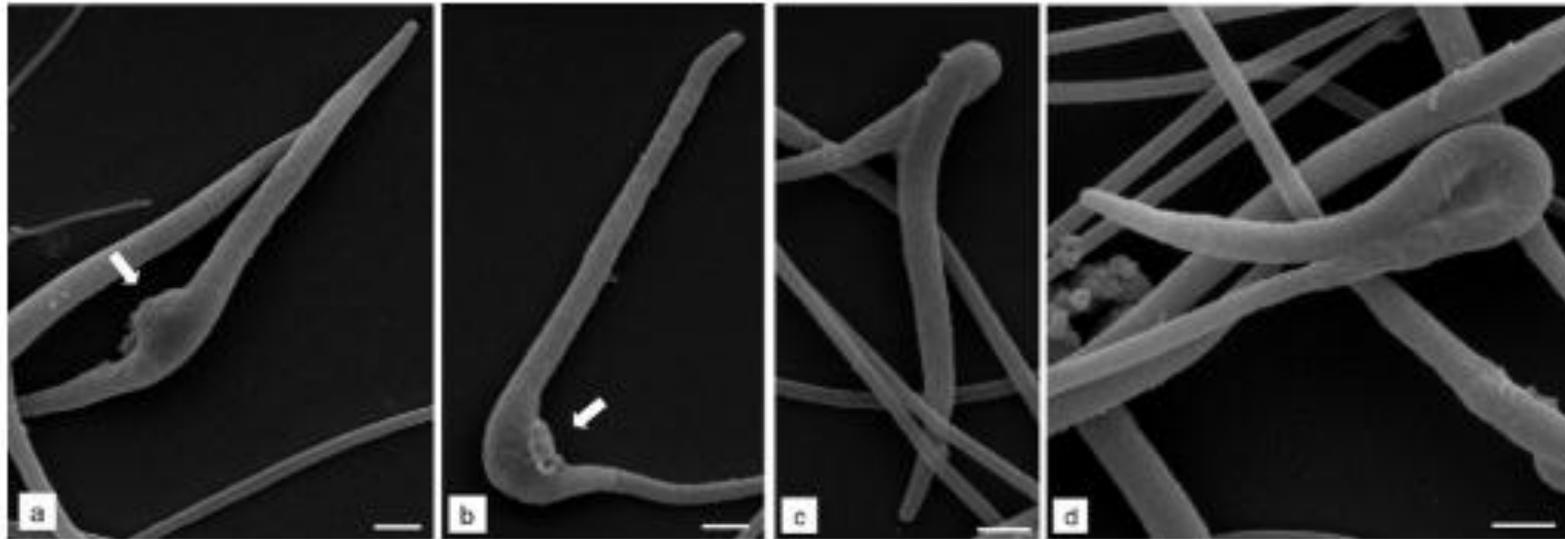


Рисунок 6. A series of scanning electron micrographs illustrating various forms of head bending including (a) a gentle bend, (b) a 90° bend, (c) kinking or twisting of the head near the base and (d) a looped head bend. Note how the attached cytoplasmic droplet ( $\leftarrow$ ) in (a) and (b) determines the direction of the head bend. The plasmalemma appears to enclose the bent portion of the head in the looped form of the defect seen in (d). Bar 1  $\mu$ m (Du Plessis, L., & Soley, J. T., 2011)



## Особенности строения репродуктивных клеток самцов сельскохозяйственных птиц

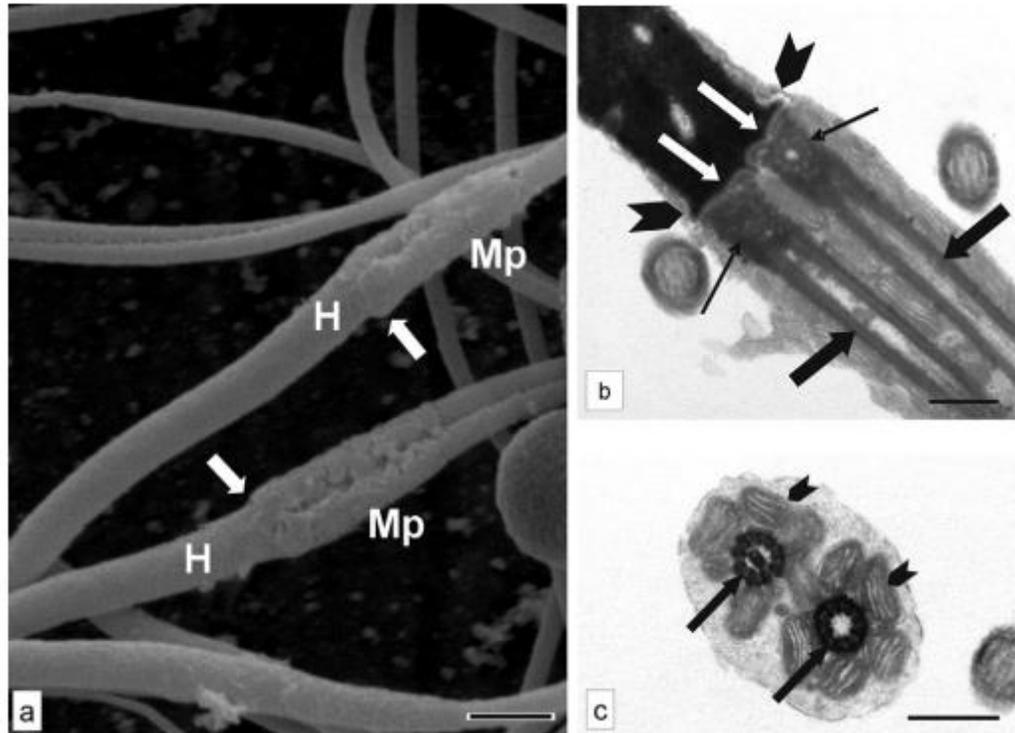


Рисунок 7. Disjointed sperm. (a) SEM. Note the parallel positioning of the base of the head (→) and the completely reflected midpiece (→). The head base and midpiece appear to be attached by the plasmalemma. Acrosome (A), principal piece (Pp). Bar 1 μm. (b) TEM of a presumptive disjointed sperm with similar parallel positioning of the base of the head (N) and the mid (Pp). Bar 1 μm. (c) TEM of a presumptive disjointed sperm with similar parallel positioning of the base of the head (N) and the mid (Pp). (Du Plessis, L., & Soley, J. T., 2011)



# ОЦЕНКА СЕМЕНИ ДЛЯ ИСКУССТВЕННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ

## Макроскопическая оценка эякулята

- **Объем эякулята** – прямой метод измерения с помощью градуированной пипетки. Минимальное принимаемое значение для объема эякулята петуха 0,1 мл и выше.
- **Цвет эякулята** – прозрачность эякулята показывает низкое количество клеток в семени, допустимый показатель цвета от молочного до молочно-сливочного оттенка. Следует избегать посторонних включений: крови, мочевых солей, помета и других.
- **pH эякулята** определяются с помощью тест полосок (при малых объемах семени) или pH-метра. Нормальным показателем pH для семени петуха является нейтральная реакция  $pH=7,0$ . Незначительные отклонение в стороны кислотности замедляет движение, при слабощелочной реакции скорость движения возрастает и снижается функциональная полноценность.





# Первоначальная микроскопическая оценка

- **Оценка наличия агглютинации сперматозоидов** Прикрепление подвижных сперматозоидов друг к другу головка-головка, жгутик-жгутик или головка-жгутик считается агглютинацией сперматозоидов. Степень агглютинации оценивается по количеству склеенных сперматозоидов. Наличие агглютинации указывает на снижение количества активных сперматозоидов, что является показанием к пересчёту дозы осеменения при использовании семени в искусственном осеменении.
- **Оценка общей подвижности.** Оценку подвижности сперматозоидов в эякуляте следует проводить сразу после разведения спермы подходящей средой в соотношении 1:1. Определение подвижности осуществляется немедленно после приготовления влажного препарата и остановки «течения» препарата. Исследование подвижности проводят в полях зрения, удаленных от края препарата





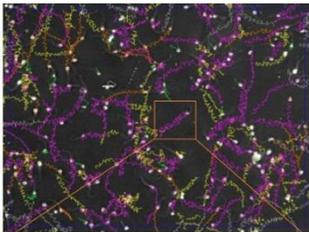
# Определение подвижности сперматозоидов

## Критерии подвижности сперматозоидов:

Оценка подвижности сперматозоидов проводится по критериям:

- подвижные с прогрессивным движением *PR progressive motility* (двигающиеся линейно или по кругу с большим радиусом);
- подвижные с непрогрессивным движением *NP non-progressive motility* (все другие виды движения с отсутствием прогрессии)
- неподвижные сперматозоиды *IM immotility* (отсутствие движения).

Использование компьютерного анализа спермы *CASA (Computer Aided Sperm Analysis)* существенно повышает эффективность оценки, сокращает затраты времени, устраняет влияние «человеческого фактора».



VCL = 313.2  $\mu\text{m/s}$  LIN = 21% ALH = 14.6  $\mu\text{m}$   
VAP = 91.2  $\mu\text{m/s}$  STR = 73% BCF = 19.3 Hz  
VSL = 66.7  $\mu\text{m/s}$  WOB = 29% D = 1.56

**Применение компьютерных технологий позволяет накапливать и сопоставлять информацию без ограничения**





# Классификация методов оценки семени петухов

- 1** Определение жизнеспособности сперматозоидов
- 2** Оценка целостности ДНК
- 3** Определение целостности акросомы
- 4** Определение митохондриальной функции



# Определение жизнеспособности сперматозоидов

Для оценки жизнеспособности может применяться ряд известных методов, из которых наиболее распространенными являются тесты, основанные на определении целостности мембран при окрашивании сперматозоидов эозин-нигрозином (L.Vjørndahl, 2003) или с помощью метода гипоосмотического набухания.

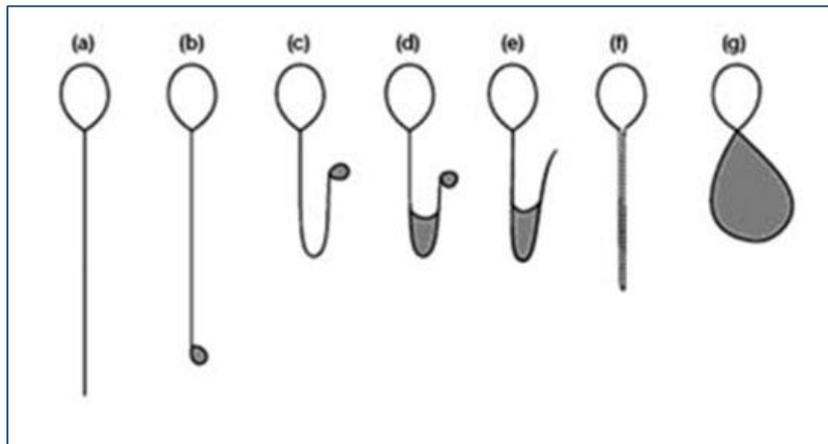
- Жизнеспособность сперматозоидов отражает количество (%) интактных спермиев с неповрежденными мембранами. Этот показатель определяется по способности мембраны клетки исключать введение витального красителя (эозин-негрозинового) в спермий и проникновение в его ядро. При механическом повреждении или разрушении, желтый эозин способен окрашивать сперматозоид. Если мембрана является интактной, краситель не обеспечивает окрашивания.



# 1 Определение жизнеспособности сперматозоидов

**Тест на гипоосмотическое набухание (HOS)** направлен на оценку функциональной целостности плазменной мембраны по ее способности сохранять равновесное состояние между клеткой сперматозоида и окружающей средой. В основе теста лежит принцип, заключающийся в том, что при гипоосмотическом стрессе возникает приток жидкости, приводящий к скручиванию в спираль и раздувания или набухания хвоста нормального сперматозоида.

У мертвого сперматозоида наблюдается неконтролируемое разбухание до степени разрыва мембраны, приводящее к выпрямлению хвоста.

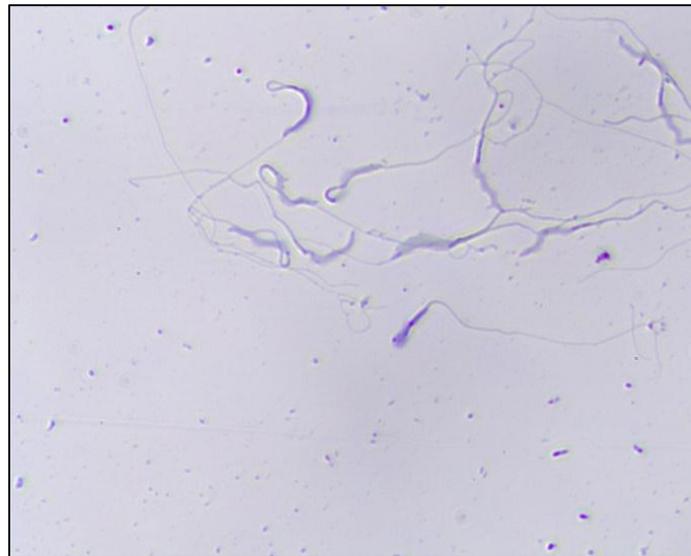
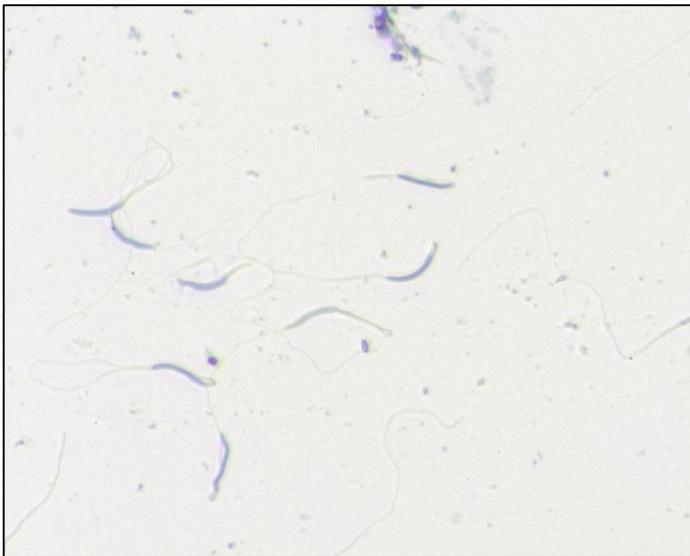


1. Набухшие сперматозоиды идентифицируют по изменению формы клетки, по скручиванию жгутика.
2. Живые клетки различают по признакам набухания жгутика сперматозоида; подсчитывают все формы набухания жгутика как живые сперматозоиды.

# ОЦЕНКА ЦЕЛОСТНОСТИ ДНК

## ОКРАШИВАНИЕ TOLUIDINE BLUE

- Для проведения окрашивания заморожено/оттаянное семя размораживали при температуре 60°C, разводили в соотношении 1:100. Протокол Toluidine Blue (ТБ) выполняли, как описано Kim et al. (2013). Мазки сушили на воздухе, фиксировали свежеприготовленным 96% этанолом-ацетоном (1: 1) при 4 ° С в течение 30 минут и снова сушили на воздухе при комнатной температуре в течение 30 минут. После этого проводили гидролиз 0,1 н. HCl при 4°C в течение 5 минут и трижды промывали дистиллированной водой (по 2 минуты каждый раз). Окрашивание 0,05% ТБ применяли в течение 20 мин при комнатной температуре. Окрашивающий буфер состоял из 50% цитрат-фосфатного буфера Макилвейна (рН 3,5).
- Предметные стекла кратковременно промывали дистиллированной водой и слегка промокали фильтровальной бумагой. Всего было подсчитано 200 сперматозоидов с использованием фазово-контрастного оптического микроскопа (Motic BA410E, China, 2019, negative contrast) увеличение x40. Сперматозоиды с хорошей целостностью хроматина окрашены в голубой цвет, сперматозоиды с повреждением - в темно-синий.



**Рисунок 1. Оценка целостности хроматина сперматозоидов.**

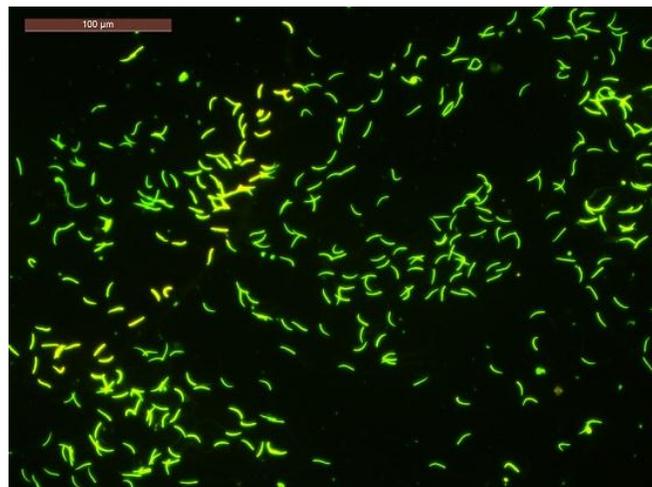
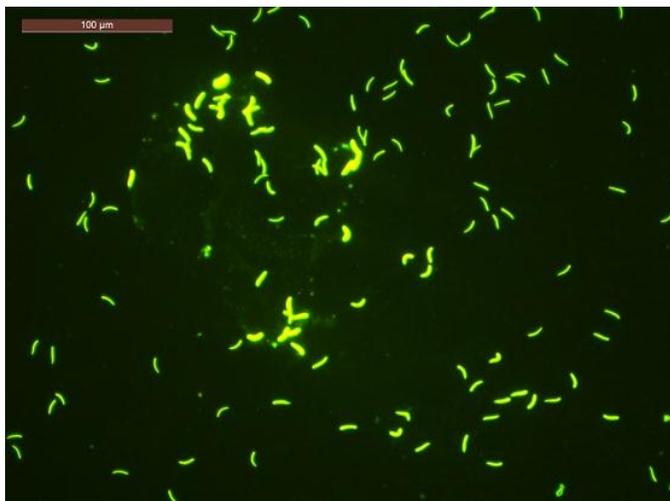
Средний показатель целостности хроматина по результатам окрашивания Toluidine blue составил  $28,8 \pm 2,6\%$  поврежденных клеток со следующими лимитами 17,8% и 40,5%.



## Оценка целостности ДНК

### ОКРАШИВАНИЕ ACRIDINE ORANGE

- При использовании проточного цитометра 375 000 клеток разводили в 50 мкл буфера TNE (10 мМ трис-HCL, 0,15 М NaCl, 1 мМ динатрия ЭДТА, pH = 7,4) и 100 мкл раствора кислого детергента (0,08 М HCl, 0,15 М NaCl, 0,1% (об./об.) Triton X-100, pH = 1,2). Через 30 с инкубации образцы окрашивали добавлением 300 мкл раствора акридинового оранжевого (6 мкг/мл в 0,1 М лимонной кислоте, 0,2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 мМ ЭДТА, 0,15 М NaCl, pH = 6,0), а через 3–5 мин инкубации при 37 °С.
- Зеленый цвет указывает на присутствие двухцепочечной ДНК, а красный — на присутствие одноцепочечной ДНК, поэтому при обнаружении зеленого цвета считали денатурацию структуры хроматина.



**Рисунок 2. Оценка целостности хроматина заморожено/оттаянных сперматозоидов.**



# 3 Определение целостности акросомы

## ОКРАШИВАНИЕ ROSE BENGAL / COOMASSIE BRILLIANT BLUE

Раствор для однократного окрашивания, содержащего 1 % (вес/объем) бенгальской розы, 1 % (вес/объем) быстрого зеленого FCF и 40 % этанола в цитратно-фосфатном буфере McIlvaine (FG-RB; Поуп и др., 1991). Окрашивающий раствор (5 мкл) добавляли к 5 мкл разбавленной спермы ( $10 \times 10^6$  сперматозоидов/мл) на предварительно нагретом предметном стекле (37 °C) и через 70 с этой смесью смазывали другое предметное стекло. Затем мазки высушивали на воздухе и исследовали не менее 100 сперматозоидов с помощью светлопольной микроскопии (1000-кратное увеличение). Интактные акросомы окрашивались в пурпурно-синий цвет и имели коническую форму, в то время как отсутствующие или прореагировавшие акросомы выглядели как тупые и бесцветные края (подобно сбрасыванию акросомного колпачка, ранее описанному Ahammad et al. (2013).

## ОКРАШИВАНИЕ GREEN STAINING (FG-RB)

Агглютинин *Pisum sativum*, конъюгированный с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC-PSA), использовали в качестве теста для подтверждения результатов FG-RB в соответствии с протоколом, описанным Hamilton et al. (2016). Вкратце, аликвоту 15 мкл разбавленной спермы (примерно 200 000 сперматозоидов) инкубировали с 12,5 мкл FITC-PSA (100 мкг/мл) и 0,5 мкл JC-1 (153 мкМ в ДМСО) в течение 5 мин при 37 °C. . Аликвоту (10 мкл) этой смеси наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и немедленно оценивали с помощью эпифлуоресцентной микроскопии (микроскоп Olympus BX-60 с комбинацией фильтров возбуждения и эмиссии при 488/650 нм, оснащенный Zeiss AxioCam HRc). Затем акросомный статус 100 сперматозоидов (с использованием JC-1 в качестве контрастного красителя) был охарактеризован как интактный или прореагировавший (яркая флуоресценция или отсутствие флуоресценции соответственно) при 1000-кратном увеличении.

3

## Определение целостности акросомы

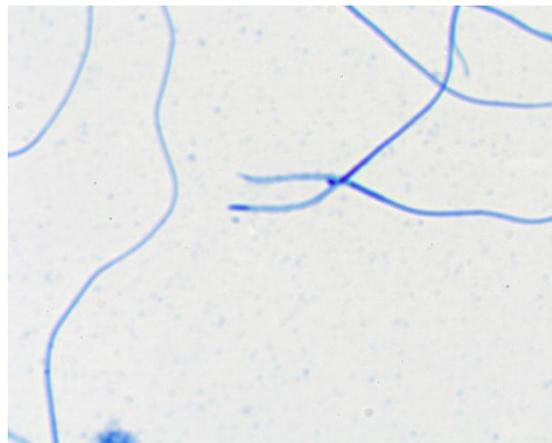
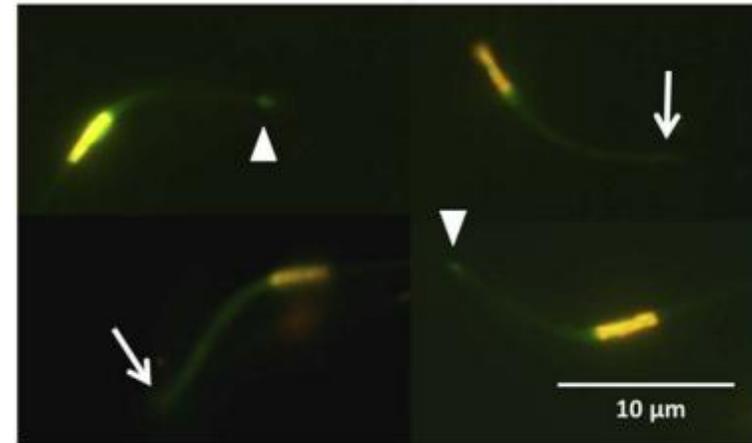
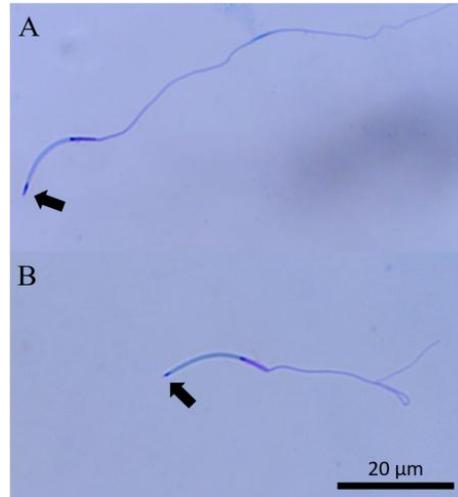


Рисунок 3. ROSE BENGAL/ COOMASSIE для определения целостности акросомы; (A) Интактные акросомы окрашиваются в пурпурно-синий цвет и имеют коническую форму, а (B) отсутствующие или прореагировавшие акросомы имеют тупые и бесцветные края



## Определение митохондриальной функции

### ОКРАШИВАНИЕ 3'3 DIAMINOBENZIDINE (DAB)

- Митохондриальную активность сперматозоидов анализировали с использованием анализа 3'3-диаминобензида (DAB). Вкратце, сперму разводили (1:1) в растворе DAB с концентрацией 1 мг/мл в PBS и инкубировали на водяной бане при 37 °С в течение 1 часа в темноте. Затем готовили мазки (10 мкл) на предметных стеклах микроскопа и сушили на воздухе. Предметные стекла фиксировали в 10% формальдегиде в течение 10 мин, промывали и снова сушили на воздухе. С помощью фазово-контрастного оптического микроскопа (увеличение в 1000 раз) было подсчитано не менее 100 сперматозоидов, и клетки были классифицированы по четырем категориям: все митохондрии активны (окрашено 100% средней части — DAB I), большинство митохондрий активно (более 50% средней части - DAB II), большинство митохондрий неактивны (окрашено менее 50% средней части - DAB III) и все митохондрии неактивны (отсутствие окрашивания средней части - DAB IV).

### ОКРАШИВАНИЕ JC-1

- Для выявления изменений митохондриального мембранного потенциала сперматозоидов (ММП) аликвоту разбавленной спермы (приблизительно 200 000 сперматозоидов) окрашивали 0,5 мкл JC-1 (153 мкМ в ДМСО) в течение 5 мин при 37 °С. Затем аликвоту 10 мкл этой смеси наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и немедленно оценивали с помощью эпифлуоресцентной микроскопии. Затем сперматозоиды (n = 200) на предметном стекле были классифицированы как имеющие более высокую и меньшую ММП (красно-оранжевая и зеленая флуоресценция соответственно) при 1000-кратном увеличении.

## 4

## Определение митохондриальной функции

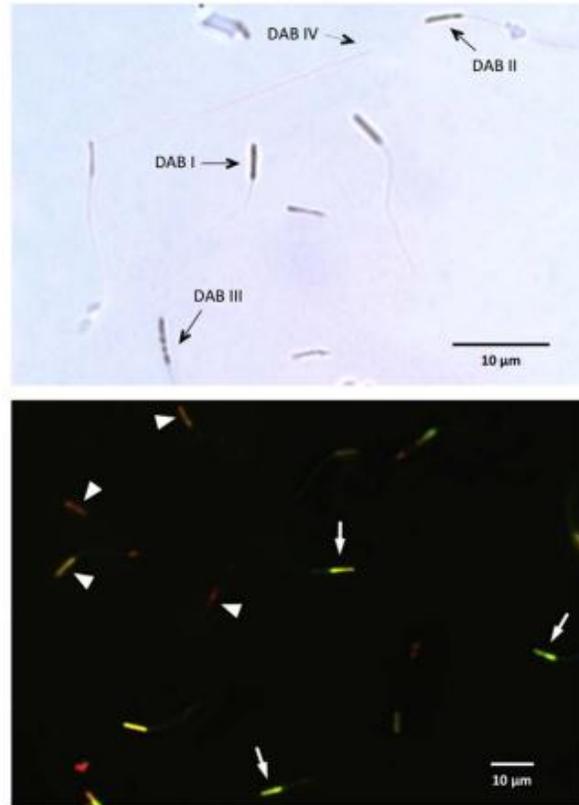


Рисунок 4.

3'-диаминобензидина (DAB) при оценке функции митохондрий в сперматозоидах петуха. (A) Регрессионный анализ высокой митохондриальной функции в сперматозоидах петуха, обнаруженной с помощью DAB ( $R^2 = 0,98$ ;  $P < 0,0001$ ;  $y = 0,1397 + 138x - 0,0044 \times 2$ ) и флуоресцентного окрашивания карбоцианином (JC 1– $R^2 = 0,98$ ;  $P < 0,0001$ ;  $y = 0,0727 + 1,3125x + 0,0032 \times 2$ ). Коэффициент внутрикласовой корреляции (ICC) между DAB и JC-1 составил 0,97 ( $P < 0,0001$ ). (B) Микрофотографии митохондриальной активности сперматозоидов петуха, оцененной с помощью DAB, где DAB I, II, III и IV обозначают сперматозоиды со 100%, более 50%, менее 50% и 0% активных митохондрий соответственно. (C) Микрофотографии потенциала митохондриальной мембраны сперматозоидов (MMP) в сперматозоидах петуха, оцененного JC 1, где высокий и низкий MMP характеризуются красно-оранжевой (стрелки) и зеленой (стрелки) флуоресценцией соответственно. Увеличение 1000х.



# МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПТИЦ

- Криоконсервация (сохранение генофонда *in vitro*, внедрение протоколов криоконсервации в племенные промышленные программы и т.п.)
- Лиофилизация (сухое хранение) - сублимационная сушка разрабатывается в качестве альтернативной технологии для сохранения генных ресурсов, чтобы обеспечить простое сохранение и транспортировку спермы при температуре 4 °С.



# МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПТИЦ ЛИОФИЛИЗАЦИЯ



Рисунок 8. Лиофильная сушилка лабораторная TFD-8501, ilShinbiobase Co.Ltd, Корея

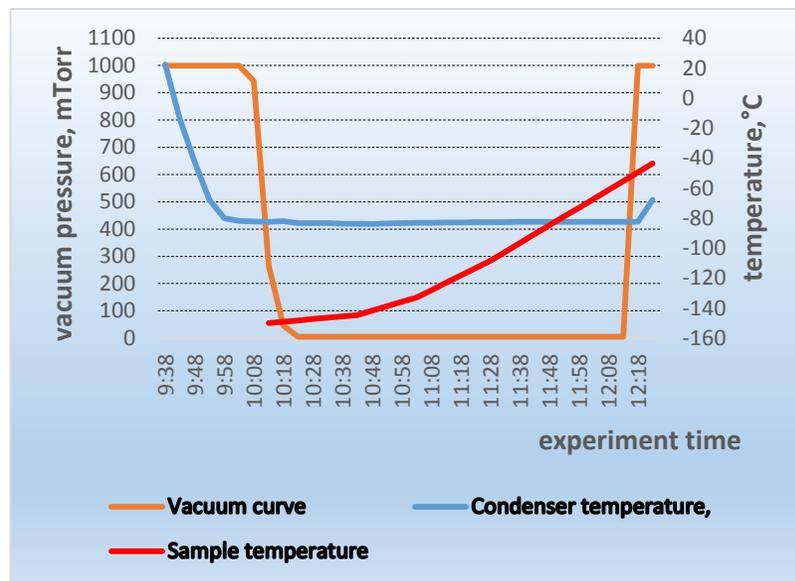


Рисунок 9. Dynamics of barothermal parameters for 2 h of freeze-drying rooster semen.

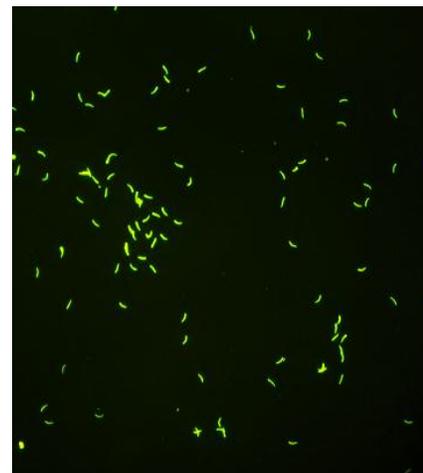


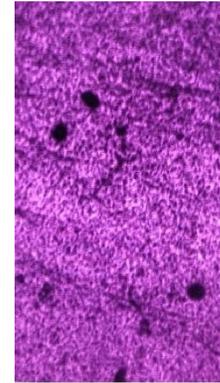
Рисунок 10. Freeze-dried sample of rooster semen after 2 h of drying. A - a sample of lyophilized semen; B - assessment of membrane integrity of the lyophilized spermatozoa (eosin-nigrosine); C - assessment of the chromatin integrity of the lyophilized spermatozoa (acridine orange).





# МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПТИЦ ЛИОФИЛИЗАЦИЯ

Рисунок 10. Evaluation of the results of an experimental protocol for lyophilization of rooster semen *in vivo*: A - fertilized egg obtained using rehydrated semen; B - points of interaction of rehydrated spermatozoa with perivitelline membrane of egg yolk after artificial insemination of virgin hens.



Cryobiology 104 (2022) 102–106

Contents lists available at ScienceDirect

Cryobiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cry](http://www.elsevier.com/locate/cry)

**A successful protocol for achieving anhydrobiosis of *Gallus Gallus Domesticus* spermatozoa while maintaining their fertility *IN VIVO***

Olga Stanishevskaya<sup>a,c</sup>, Yulia Silyukova<sup>a,c</sup>, Nikolay Pleshakov<sup>a,c</sup>, Anton Kurochkin<sup>a,c</sup>, Elena Fedorova<sup>a,c</sup>, Anton A. Radaev<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Saint-Petersburg, Russia  
<sup>b</sup> Chromas Core Facility, St. Petersburg University Research Park 2/A, Gromoshevo Highway, St. Petersburg, 195004, Russia  
<sup>c</sup> Department of Genetics, Breeding and Gene Pool Preservation Poultry, Mstkovskaya St, 22A, Pushkin, Saint-Petersburg, 198021, Russia

**ARTICLE INFO**

**Keywords:** Freeze-drying; Semen; Fertility; Media; Rehydration

**ABSTRACT**

Lyophilization of avian semen is a new method for gene pool preservation. The goal of this study was to develop a protocol for the lyophilization of rooster semen with preserved fertility. Red Rhode Island rooster spermatozoa (n = 20) were assessed by volume, motility, and concentration of spermatozoa. They were pooled and diluted 1:1 with a medium LCM-T20 containing trehalose (9.5 mM), exposed at 5 °C for 40 min and centrifuged, and then the supernatant was removed. Media LCM-T with trehalose (1.75 M) was added and exposed for 10 min. The semen was frozen in a thin layer in glass vials. Samples were lyophilized for 2 h at -180 °C. The water content of the samples after lyophilization was 6.1 ± 0.5% (CV 20%). The sample was rehydrated with a medium LCM-GAS containing hyaluronic acid (40mg/100 mL media). The total motility of the spermatozoa was 1.0 ± 0.3%. From artificial insemination of virgin hens (n = 12) with rehydrated semen, one fertilized egg was obtained from eight laid eggs. All samples of perivitelline membranes of the obtained eggs had points of interaction with the spermatozoa (7–37 pcs/cm<sup>2</sup>), which confirmed the presence of viable rehydrated spermatozoa in the genital tract of the hen. To create a dry biobank for poultry, the first protocol for lyophilization of rooster semen was developed to ensure sperm fertility *in vivo*.

**Freeze-drying technology is widely used to remove water from various biological objects without damaging them, which makes them easy to preserve for a long time and recover by simply adding water. These objects are: antibiotics, bacteria, serums, vaccines, diagnostic drugs, protein and biotechnological products, cells and tissues, as well as chemicals. The product to be dried is frozen at atmospheric pressure. Then, at the initial stage of drying, called primary drying, up to 95% of the water (in the form of ice) is removed by freeze-drying; in a second step, called secondary drying, it is removed by desorption.**

**Sperm lyophilization, rather than cryopreservation, is a new, simple method for storing genetic resources [1]. Over the past few decades, numerous attempts have been made to lyophilize the semen of various species of animals, including laboratory, wild, and domestic animals with differing efficiency (e.g. rabbits [2], mice [3], boars [4], and rams [5]). It should be noted that the researchers did not apply semen freezing protocols that are commonly used to maintain the functional integrity of frozen/thawed mammalian spermatozoa. The researchers used technologies designed to preserve only DNA [2,3,6–12].**

**The use of such a protocol does not allow spermatozoa to be obtained after rehydration with a preserved kinematic apparatus. Most researchers are guided by the dogma that spermatozoa will not survive the freeze-drying process and that only DNA remains relatively intact. Research on semen lyophilization is conducted with the goal of its subsequent use in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technology [8,13]. From our point of view, the creation of protocols for freezing male gametes with the goal of subsequent lyophilization, considering the physiological and biochemical parameters of the semen and the animal species, will preserve the functional usefulness of spermatozoa.**

**Summarizing the results of published studies, we concluded the following: there is no biologically substantiated protocol for lyophilization, which at the stage of freezing allows reproductive cells of the males of various animal species to maintain their functional usefulness. Lyophilized spermatozoa retain the integrity of their DNA but lose the ability to move, and their use in reproductive technologies is possible**

**animals**

MDPI

Article

**Effects of Saccharides Supplementation in the Extender of Cryopreserved Rooster (*Gallus domesticus*) Semen on the Fertility of Frozen/Thawed Spermatozoa**

Olga Stanishevskaya, Yulia Silyukova<sup>\*</sup>, Nikolai Pleshakov, Anton Kurochkin, Elena Fedorova, Zoya P. Oksana Pernek, Anna Prituzhalova and Inessa Mefstakh

Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Russian Research Institute Animal Genetics and Breeding, 196025 Saint Petersburg, Russia; olgatan@list.ru (O.S.); klaus-900@kurochkin.anton.66@gmail.com (A.K.); oia2005@yandex.ru (E.F.); zoya-spb@yandex.ru (Z.P.); oksanidov@yandex.ru (O.P.); nikolai.kin@list.ru (N.P.); mefist@yandex.ru (I.M.)  
<sup>\*</sup> Correspondence: svadim33@mail.ru

**Simple Summary:** This study was devoted to the task of developing new balance cryopreservation of rooster semen, which is of key importance for maintaining the fertility of spermatozoa after thawing. Trehalose in the medium increases the stability of viable spermatozoa under various physical influences and is capable of forming a stable vitreous cells during low-temperature stress, which maximally neutralizes the damage and metal in a dehydrated state. Also, the role of trehalose is to stabilize phospholipids during prevent disruption of the bilayer structure of cell membranes. The developed LCM-T10 media provided significantly higher rates of egg fertilization (82–86%) compared to the L1 medium (79%, p < 0.05). The fertility of eggs on the 5th day from the last insemination in a group had the best indicators of 100% versus 86% in the control, with 55% versus 20% in the 10th day. When using test media, high results of egg fertilization were achieved: functionality of frozen/thawed spermatozoa in the genital tract of the chicken was pro-

check for updates

Citation: Stanishevskaya, O.; Silyukova, Y.; Pleshakov, N.; Kurochkin, A.; Fedorova, E.; Fedorova, Z.; Pernek, O.

**molecules**

MDPI

Article

**Role of Mono- and Disaccharide Combination in Cryoprotective Medium for Rooster Semen to Ensure Cryoresistance of Spermatozoa**

Olga Stanishevskaya, Yulia Silyukova<sup>\*</sup>, Nikolai Pleshakov and Anton Kurochkin

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Pushkin, Moskovskoe Shosse, 55a, 196025 St. Petersburg, Russia; olgatan@list.ru (O.S.); klaus-900@list.ru (N.P.); kurochkin.anton.66@gmail.com (A.K.)  
<sup>\*</sup> Correspondence: svadim33@mail.ru

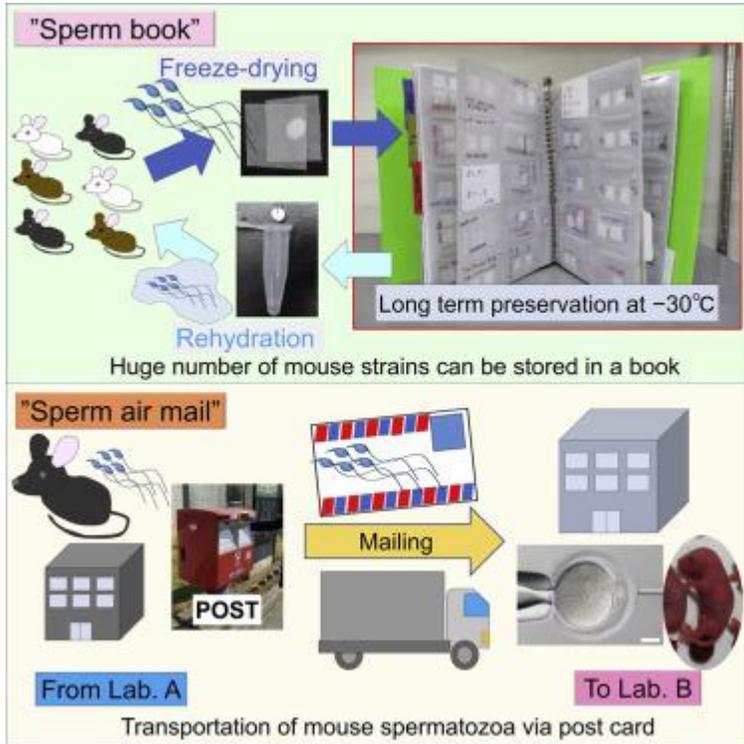
**Abstract:** The combination of saccharides in the composition of a cryopreservation medium may represent a promising method for the preservation of the reproductive cells of male birds. In the current study, cryoprotective media with a combined composition of mono- and di-saccharides were developed. The degree of penetration of reducing saccharide molecules (maltose—Mal20 medium) and non-reducing disaccharide molecules (trehalose—Treh20 medium) from the cryoprotective medium into the cytosol of rooster spermatozoa was studied. LCM control media without disaccharides were used as the control. The number of maltose molecules penetrating from the outside into the cytosol of the spermatozoon was 1.06 × 10<sup>4</sup>, and the number of trehalose molecules was 3.98 × 10<sup>4</sup>. Using a combination of maltose and fructose, the progressive motility of frozen/thawed semen and the fertility rates of eggs were significantly higher (p < 0.05) 40.2% and 68.5%, respectively) than when using a combination of trehalose and fructose in a cryoprotective diluent (33.4% and 62.4%, respectively). A higher rate of chromatin integrity at the level of 92.4% was obtained when using Treh20 versus 74.5%

check for updates

Citation: Stanishevskaya, O.; Silyukova, Y.; Pleshakov, N.



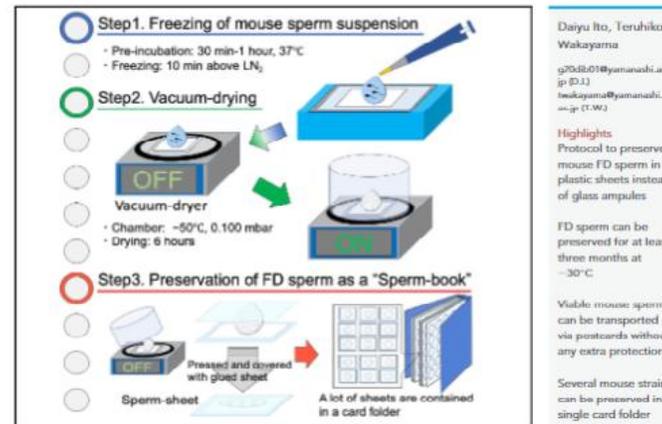
# МЕТОДЫ СОХРАНЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ ПТИЦ ЛИОФИЛИЗАЦИЯ



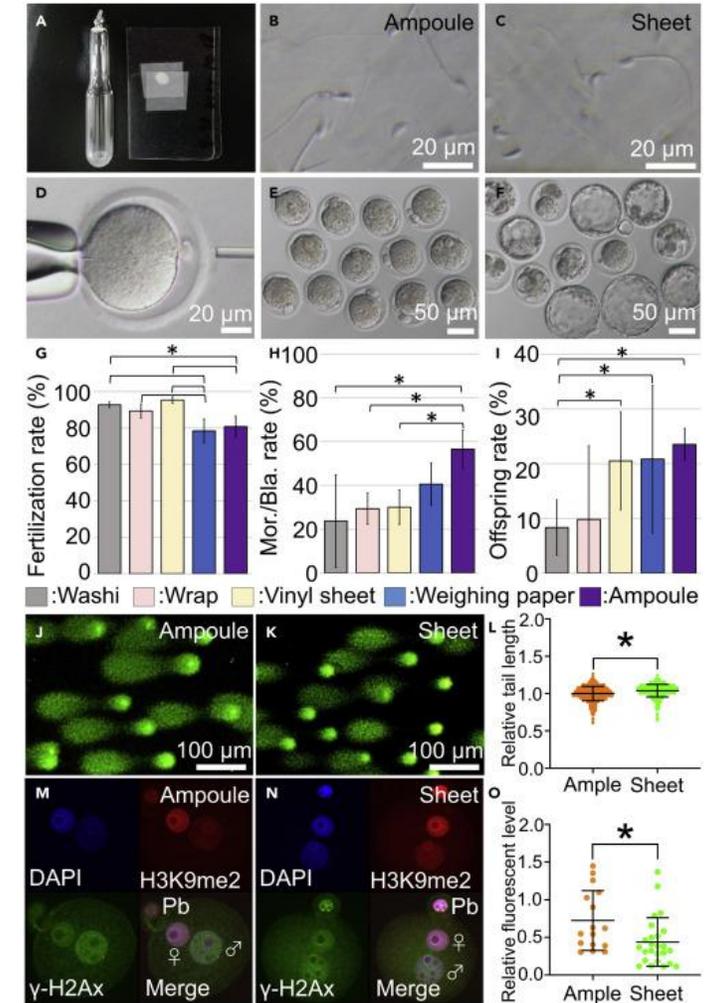
## STAR Protocols



**Protocol**  
Protocol to preserve mouse freeze-dried spermatozoa in the thin plastic sheets



The preservation of mammalian freeze-dried (FD) spermatozoa is commonly performed using small glass ampoules; however, they are bulky and breakable. In this study, we present a protocol to prepare and preserve mouse FD sperm using thin plastic sheets. This approach allows storing thousands of mouse strains in a card folder. We can also send the FD sperm domestically using a postcard without any extra equipment.



Daiyu Ito, Teruhiko Wakayama  
[Protocol to preserve mouse freeze-dried spermatozoa in the thin plastic sheets](#) **DEC 2021**

**СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !**