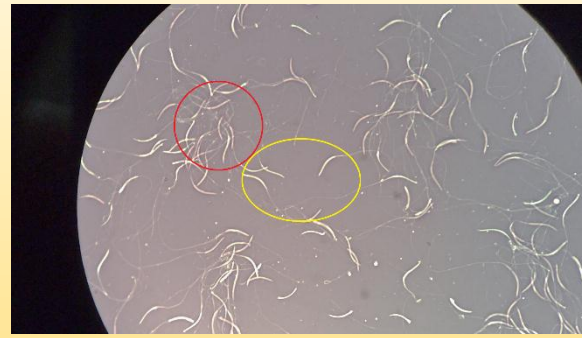


Проблемы криоконсервации гамет *Gallus gallus domesticus* при сохранении биоразнообразия сельскохозяйственных птиц

Зав. лабораторией генетики, разведения и сохранения генетических
ресурсов сельскохозяйственных птиц ВНИИГРЖ

olgastan@list.ru

ГЗ №121052600357-8 (0445-2021-0012)

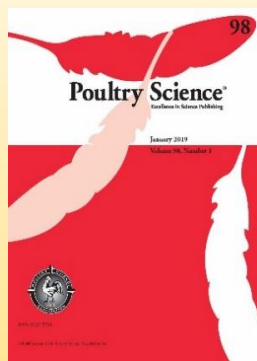


Криоконсервация – эффективный путь сохранения репродуктивных клеток различных видов сельскохозяйственных животных, включая птиц.

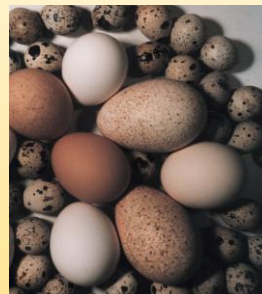


Метод сохранения *in vitro* через поддержание в криогенных условиях репродуктивных клеток или тканей сельскохозяйственных птиц в основном направлен на восстановление исчезнувших пород/популяций, на поддержание генетического разнообразия в популяциях, подверженных генетическому дрейфу.

- **предотвращение исчезновения пород** из-за экстремального генетического состояния, такого как малая численность породы/популяции, высокая частота встречаемости генетических дефектов в результате интенсивной селекции и генетического дрейфа
- **источник генетически разнообразной и специализированной ДНК.** Сохраняемые материалы используются для исследований генетического разнообразия, исследований по геномным ассоциациям, исследований функции генов и других видов исследований
- генетические банки могут предоставлять образцы от разных поколений, что способствует **повышению точности геномной селекции** (при условии, что информация будет каталогизирована с учетом фенотипа и генотипа, проведена геномная паспортизация закладываемых образцов)
- преимуществом сохранения генетического разнообразия *in vitro* в криобанках является **экономическая составляющая**
- деятельность генетического банка должна заключаться не только в получении и сохранении резервного биологического материала, но и в активном сотрудничестве с коллекциями в живом разведении для **расширения генетического разнообразия при сохранении *ex situ in vivo*.**



**Semen
Cryopreservation for
Ex Situ Management
of Genetic Diversity in
Chicken: Creation of
the French Avian
Cryobank**

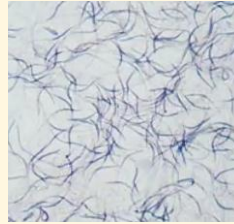


**Avian Genetic
Resources at Risk:
An Assessment
and Proposal for
Conservation of
Genetic Stocks in
the USA and
Canada**



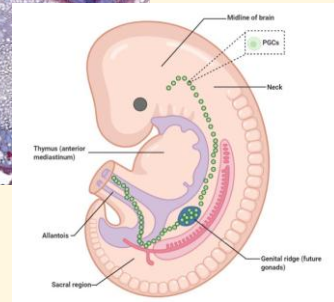
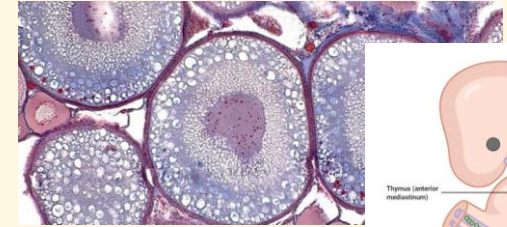
- **Криоконсервация семени**

(Целютин, Тур, 2013; Thélie et al., 2019)



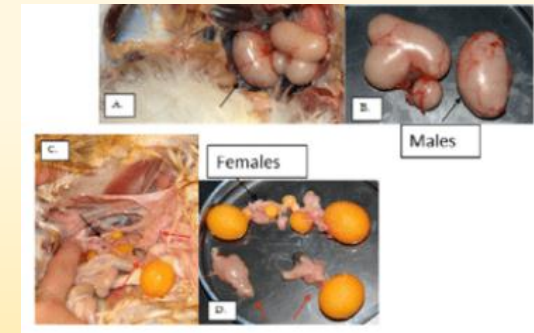
- **Криоконсервация первичных половых клеток (PGC)**

([Brzezińska](#) et al, 2011)



- **Криоконсервация гонад неонатальных цыплят для последующей аллотрансплантации цыплятам-реципиентам**

(Liu et al., 2012; Liptoi et al, 2020)



- **Лиофильная сушка семени**

- **Интраовариальная криоконсервация эмбриональных гамет**

Криоконсервация семени птиц – плюсы:

- Менее затратный способ сохранения генетического разнообразия по сравнению с методом сохранения *in vivo*
- Разработаны многочисленные технологии замораживания семени (в гранулах, в пайетах, на фторопластовой пластине, в тонком слое) и оттаивания (в водяной бане, на металлической пластине), включая «медленные» и «быстрые протоколы»
- Практически единственный на сегодняшний день «работающий» метод сохранения генофонда *in vitro*.

Существующие на сегодняшний день методы сохранения только репродуктивных клеток самцов птиц (спермиев) позволяют восстанавливать исчезающие породы/популяции только за счет поглотительного скрещивания; происходит потеря материнской наследственности, включая митохондриальный геном (Fulton, 2006). Проблема усугубляется и по причине того, что гетерогаметным полом у птиц является женский.

Процесс криоконсервации запускает не только процессы повреждения мембран на, но и химикофизические процессы - изменение структуры белков сперматозоидов, липидов и сахаров бислоев мембран, что приводит к сублетальному замерзанию и запуску процессов криокапацитации, образованию активных форм кислорода и (Pini et al., 2018), что выражается в снижении подвижности спермиев и различных морфологических нарушениях. Сперматозоиды птиц особенно чувствительны, поскольку имеют значительно меньший, по сравнению со сперматозоидами млекопитающих, объем цитоплазмы и высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот в составе мембранных липидов.

Генетическое разнообразие сохраняемого материала снижается на различных стадиях постсингамии по причине выбытия особей с пониженной криорезистентностью репродуктивных клеток.

Использование криоконсервированного семени от смешанных эякулятов из криобанков может приводить к увеличению степени инбридинга в популяции, поскольку генетический вклад каждого самца неодинаков в связи с эффектом избирательности оплодотворения (Pleshanov et al., 2018, 2019).

Значительная межпородная и индивидуальная изменчивость криоустойчивости сперматозоидов; коэффициент вариации (C_v) может достигать 23–25 % (Pleshanov et al., 2018; Stanishevskaya, Pleshanov, 2018).

При использовании замороженооттаянных сперматозоидов снижается не только показатель их фертильности, но и жизнеспособность эмбрионов.

Одной из основных причин ранней эмбриональной смертности является повреждение ДНК, вызвавшее функциональные повреждения ядерных структур сперматозоида (Watson, 2000; Liptói, Hidas, 2006).

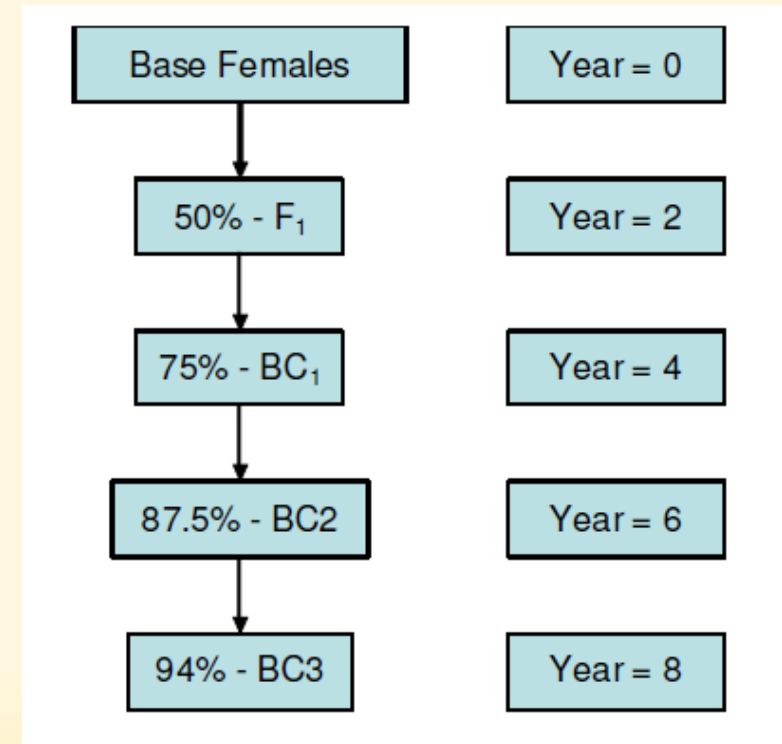
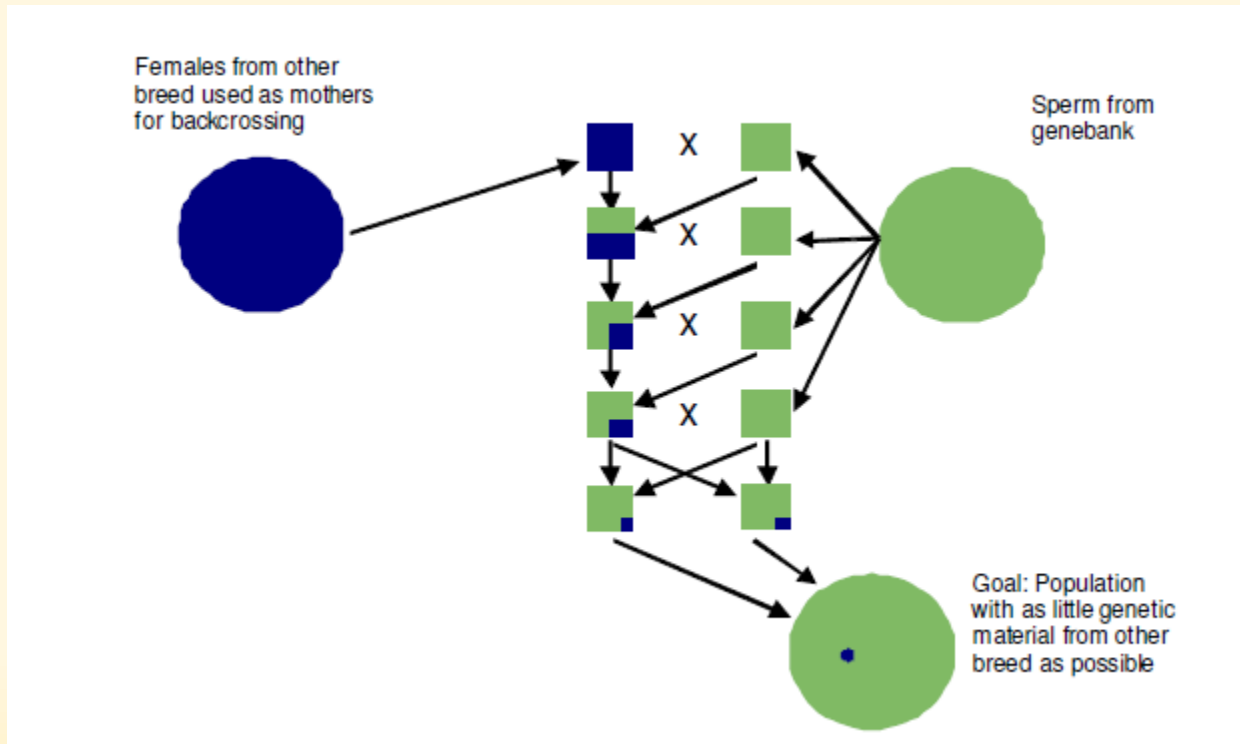


Рисунок . Демонстрация восстановления популяции с помощью криоконсервированной спермы*

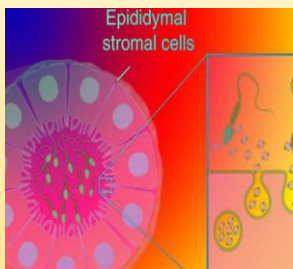
Рисунок . Стандартный план обратного скрещивания для восстановления породы*

* <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1404e/a1404e00.pdf>

Эпигенетические изменения в сперматозоидах



- Обнаружен механизм эпигенетического влияния **стресса самцов** на сперматозоиды и развитие эмбриона. В ответ на хронический стресс во внеклеточных везикулах эпителиальных клеток придатка яичка изменялся состав микроРНК и белков, эти структуры в свою очередь влияли на микро-РНК сперматозоидов. Такое воздействие развивалось в течение продолжительного периода после стресса и влияло на **развитие нервной системы и реакцию на стресс у потомства** (Jennifer Chan et al. / Nature Communications, 2020).
- Эпигенетические изменения в процессе замораживания/оттаивания семени включают метилирование ДНК и модификации гистонов в сперматозоидах, которые могут изменить функциональное состояние хроматина и привести к активации или подавлению экспрессии генов.
- Установлено, что **клеточные эпигенетические модификации** являются основными причинами, лежащими в основе снижения подвижности и фертильности сперматозоидов петухов в процессе **замораживания/оттаивания**. Экспериментально доказано, что состав криопротекторной среды может не оказывать влияния на процесс метилирования ДНК сперматозоида, но при этом приводит к значительному изменению степени ацетилирования гистона H3K9 и метилирования H3K4 (Masoumeh Salehi et al, 2020; Beck D. et al, 2021).
- Доказано **трансгенеративное наследование** эпигенетического кода (M. Bednarczyk, A. et al. 2021).



Необходимо изучение влияния протоколов замораживания/оттаивания семени птиц на трансгенеративное эпигенетическое наследование репродуктивных признаков.

Пути решения проблемы повышения фертильности заморожено/оттаянного семени :

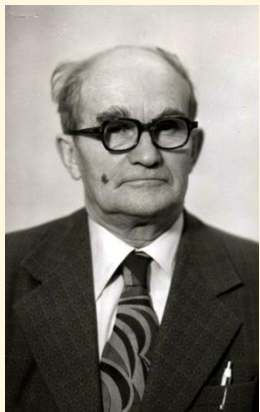
Необходимо глубокое изучение физиолого-биохимических процессов, протекающих в семени при его замораживании/оттаивании, роли различных веществ в сохранении функциональной полноценности сперматозоидов (липидные фракции мембран - гликолипиды, фосфолипиды, стерины; холестерин и соотношение холестерин/фосфолипиды; аминокислотный профиль семенной плазмы; содержание микроэлементов и др.).

Понимание взаимосвязи между морфологическими характеристиками сперматозоидов и структурно-функциональными и эпигенетическими особенностями их генома.

Разработка принципиально новых сред для замораживания семени с использованием комбинаций проникающих и непроникающих криопротекторов эндо- и экзоцеллюлярного действия, в том числе сахаридов, антифризных гликопротеинов (АФГП) и антифризных протеинов (АФП) природного происхождения, обнаруженных в крови и тканях пойкилотермных организмов, живущих в морозных средах (насекомые, морские рыбы).

Разработка новых режимов замораживания/оттаивания семени с учетом видовых, породных и индивидуальных биологических особенностей семени.

Исследования ВНИИГРЖ в области сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц методами *in vitro*



Под руководством доктора с.-х. наук, профессора **А. Д. Курбатова** в 70-е годы XX века начаты исследования по разработке 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.

Основные разработки:

- **Т.Г. Мавродина** «Способы замораживания и использования спермы гусаков для искусственного осеменения», а.с. № 965429, 1982 г.
- **Б.И. Иванов, И.И. Попов, Б.К. Тур, Г.Б. Розановский** «Способ обработки спермы», а.с. № 1119689, 1984 г.
- Б.И. Иванов, А.Д. Курбатов, И.И. Попов «Способ замораживания спермы птиц», а.с. № 1136806, 1985 г.
- **Л.Е. Нарубина** «Разработка способов длительного хранения спермы петухов и их использование при воспроизводстве птицы», дисс. на соискание уч. степ. докт. с.-х. наук, 1988 г.
- **К.В.Целютин, Б.К.Тур, Л.Е. Нарубина, Т.Г. Мавродина** книга «Теория и практика криоконсервации спермы сельскохозяйственной птицы (петухи, индюки, гусаки, селезни)», 2009 г.

Исследования ВНИИГРЖ в области сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц методами *in vitro*

Впервые разработаны практические рекомендации:

- замораживание спермы во флаконах с использованием разработанного сотрудниками лаборатории криостата (а.с. № 656621, 1978; а.с. № 994874, 1980 г.);
- замораживание индивидуальных эякулятов или большого количества смешанной спермы способом прямого накапывания в жидкий азот в виде мелких гранул (а.с. № 1343587, 1987 г.; а.с. № 1515443, 1989 г.);
- криоконсервация спермы кур яичного и мясного направления продуктивности с использованием разбавителя ЛКС -1 (а.с. № 1130339, 1984 г.);
- использование разбавителя «Ю» для спермы селезней (а.с. № 1298974, 1986 г.).
- 1998 году эффективность использования разработанных в лаборатории способов
- криоконсервации спермы птиц была подтверждена во Франции совместными исследованиями сотрудников ВНИИГРЖ (канд. биол. наук К.В. Целютин) и института INRA (Франция). Сравнительные испытания способов криоконсервации спермы птиц, разработанных российскими и французскими учёными, показали, что способ криоконсервации спермы петухов в гранулах с криопротектором деметилацетомидом, разработанный во ВНИИГРЖ, обеспечивает оплодотворенность яиц после осеменения кур деконсервированной спермой на уровне от 84,7 до 92,7 %; а использование деконсервированной спермы, замороженной по методике французских исследователей – только 53,7 - 63,9 % (Poultry Science, 1999).

Во ВНИИГРЖ в 70-х годах XX века основана и до настоящего времени поддерживается «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», включающая на сегодняшний день 32 породы и популяции отечественного и иностранного происхождения мясо-яичного, яично-мясного, яичного, спортивного, декоративного направления использования. На базе коллекции организован одноименный ЦКП.




Russian White

Чешская золотистая

Czech Golden

Характеристики: Порода, выведенная в 1933 году на основе голландской породы кур голландского происхождения. В начале 1930-х годов в СССР из Голландии ввозили голландских кур и голландских яиц. В 1933 году в СССР была создана порода кур голландского происхождения. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году.



Hamburg Silver Spangled

Гамбургская серебристо-пятнистая (карли)

Характеристики: Порода кур голландского происхождения. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году.



Leghorn Partridge

Характеристики: Порода кур голландского происхождения. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году.



Orloff Mite Fleur

Орловская ситцевая

Характеристики: Порода кур голландского происхождения. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году.



Rhode Island Red

Род-Айленд красный

Характеристики: Порода кур голландского происхождения. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году.



Poland White crested Blak

Голландская белохохлая

Характеристики: Порода кур голландского происхождения. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году.



Silkie White

Характеристики: Порода кур голландского происхождения. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году. Порода кур голландского происхождения была выведена в Голландии в 1933 году.

Впервые создан и пополняется каталогизированный криобанк семени петухов генофондных пород ВНИИГРЖ

(электронный каталог включает 39 пород и популяций, 14,5 тыс. доз семени)



№ кластера	Состав кластера	Дата закладки	Размещение в хранилище	Качество нативной		Качество замороз./оттаян.		Количество доз, ед.	Текущий остаток, ед.	Изято доз		
				концентрация, млрд/млЗ	% общей подвижности	концентрация, млрд/млЗ	% общей подвижности			Дата	ФИО, цель	Количество, ед.
1	X1660	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,7-3,3	90	1,5	40	77	77			
	X1805											
2	X1765	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,2-2,8	85	1,4	50	84	84			
	B9166											
3	X1447	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,7-3,3	85	1,5	30	127	127			
	X1759											
4	X1546	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,7-3,3	85	1,5	50	99	99			
	X1551											
5	X1539	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,7-3,3	85	1,5	50	99	99			
	B9154											
6	X1991	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	3,5	90	1,8	40	108	108			
	X1660											
7	X1805	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,0-2,5	80	1	40	60	60			
	X1738											
	X1765											
8	X1998	сентябрь, 2019	Инвентаризационный номер пакет 19/001	2,5-2,7	90	1,2	20	61	61			
	X1998											
ИТОГО ЗАЛОЖЕНО									658			

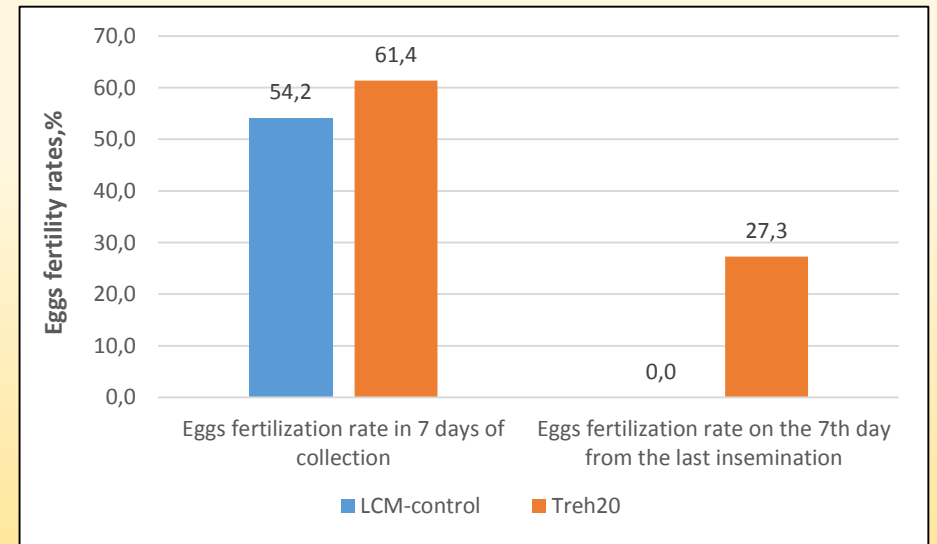
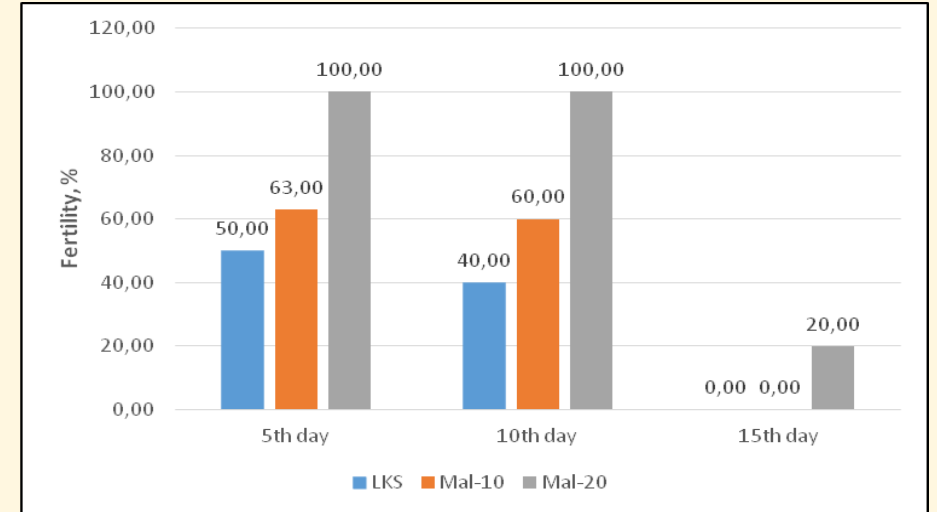
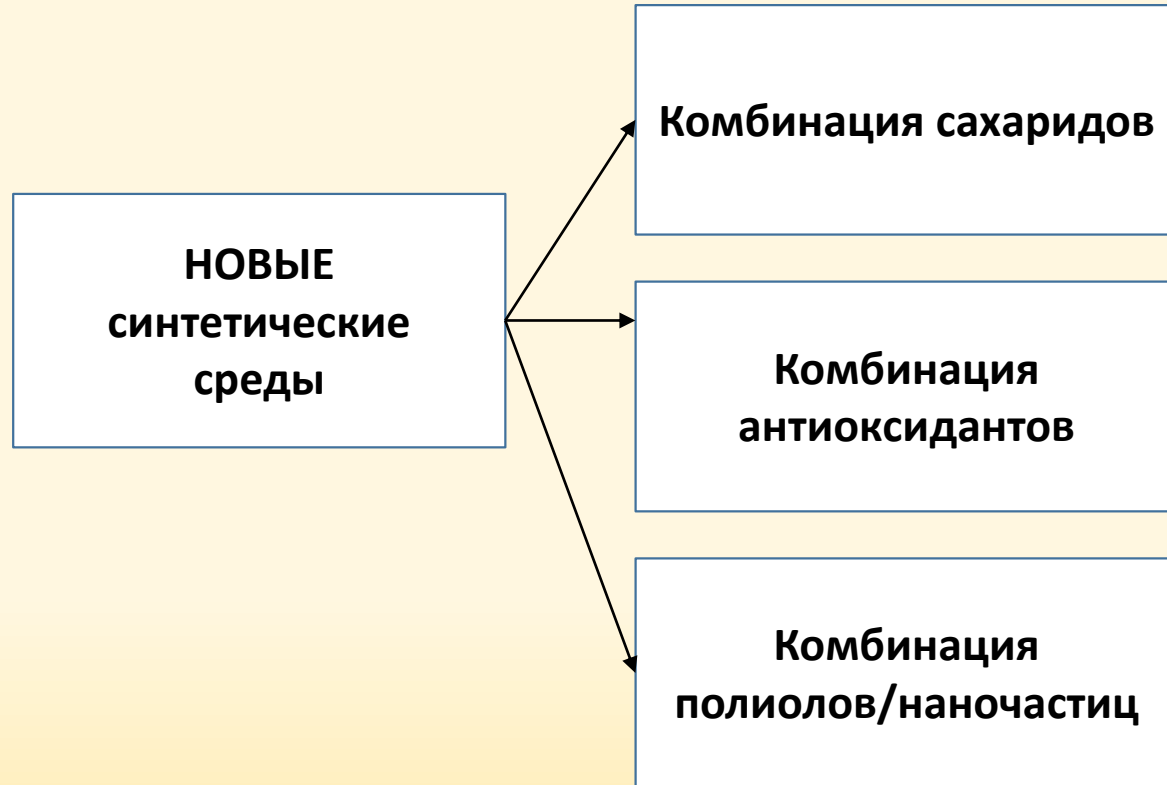
Исследования ВНИИГРЖ в области сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц методами *in vitro* в настоящее время



Сотрудники отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ продолжают исследования по криоконсервации семени птиц в следующих направлениях:

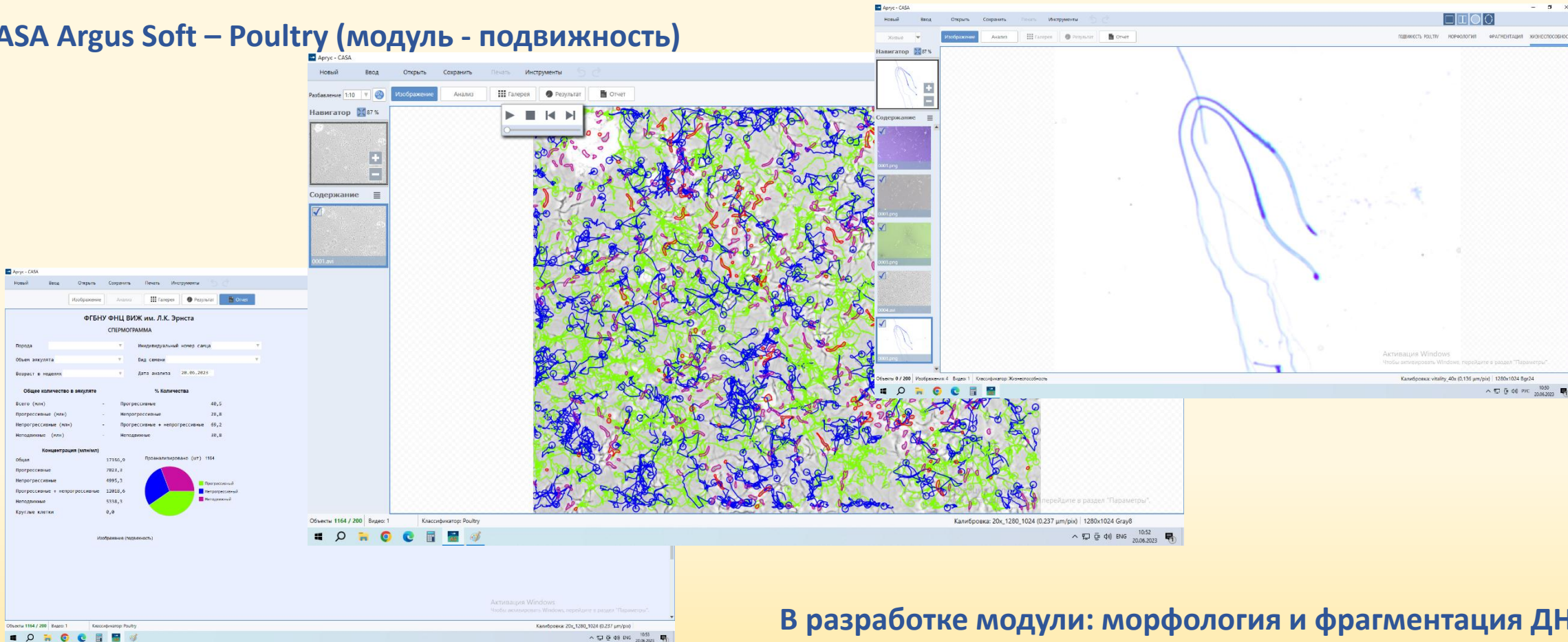
- **разработка методов оценки и отбора самцов по криоустойчивости их семени с целью создания криобанка; исследования по генетической обусловленности криоустойчивости семени;**
- **создание новых составов сред для криоконсервации семени самцов с.-х. птиц, обеспечивающих высокий уровень сохранности мембран сперматозоидов и их органоидов, хроматина, кинетического аппарата и, как следствие, фертильности;**
- **совершенствование биотехнологии криоконсервации индивидуальных эякулятов с целью получения высокой оплодотворенности яиц для сохранению генофонда самцов с.-х. птиц;**
- **совершенствование методов оценки функциональной полноценности сперматозоидов *in vitro*;**
- **разработка методов сублимационной сушки семени птиц для сохранения генофонда в виде «сухого биобанка»;**
- **создание криобанка семени с.-х. птиц 40 пород и популяций**

СИНТЕТИЧЕСКИЕ СРЕДЫ ДЛЯ ЗАМОРАЖИВАНИЯ СЕМЕНИ ПЕТУХОВ



Разработка и использование программных продуктов по оценке качественных показателей сельскохозяйственных птиц

CASA Argus Soft – Poultry (модуль - подвижность)



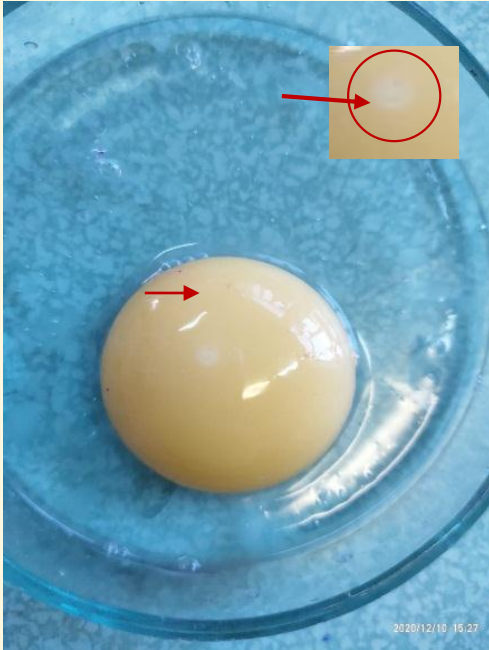
The screenshot displays the CASA Argus Soft Poultry software interface. The main window shows a large image of a feather with numerous colored tracks (blue, green, red, purple) overlaid, indicating movement or analysis points. The interface includes a menu bar at the top with options like 'Новый', 'Ввод', 'Открыть', 'Сохранить', 'Печать', and 'Инструменты'. Below the menu is a toolbar with icons for 'Изображение', 'Анализ', 'Галерея', 'Результат', and 'Отчет'. On the left side, there is a 'Навигатор' (Navigator) panel showing a zoomed-in view of the feather and a 'Содержание' (Content) panel with a list of items. A detailed analysis panel is visible on the left, titled 'ФГЕНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста СПЕРМОГРАММА'. This panel contains various input fields and a table of results.

Общее количество в эякуляте		% Количества	
Всего (млн)	-	Прогрессивные	40,5
Прогрессивные (млн)	-	Непрогрессивные	28,8
Непрогрессивные (млн)	-	Прогрессивные + непрогрессивные	69,2
Неподвижные (млн)	-	Неподвижные	28,8

Below the table, there is a section for 'Концентрация (мл/мл)' with a pie chart and a 'Круглые клетки' section. The bottom of the interface shows a status bar with 'Объекты 1164 / 200', 'Видео 1', 'Классификатор: Poultry', and 'Калибровка: 20x_1280_1024 (0.237 μm/pix) | 1280x1024 8gr24'. The system tray at the bottom right shows the date and time: '10:52 20.06.2023'.

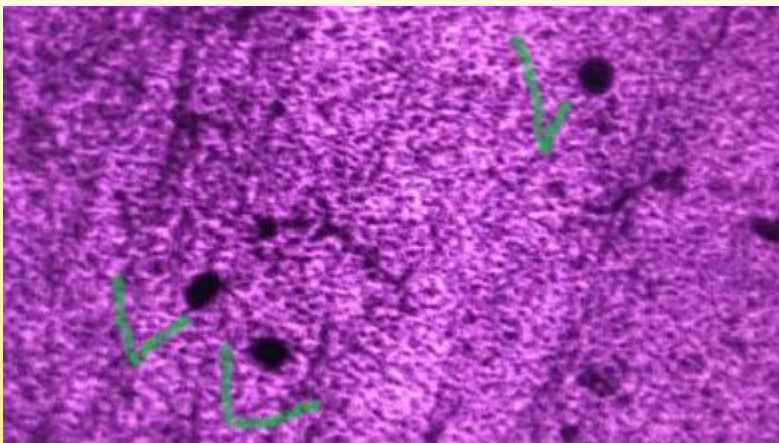
В разработке модули: морфология и фрагментация ДНК

Впервые разработан протокол первичной лиофильной сушки семени петухов, обеспечивающий сохранность морфологии сперматозоидов и их фертильность (с использованием лиофильной сушилки TFD-8501, ilShinbiobase Co., Ltd, Корея) и его регидратации.



Практические результаты от использования протокола лиофилизации семени петухов. Определение функциональной полноценности регидратированного семени петухов *in vivo*

Оплодотворенное яйцо – эмбрион (стадия 4-5 по Hamburger&Hamilton, 1951), полученное при использовании регидратированного семени при искусственном осеменении виргинных кур (n=9)



Микроскопический препарат вителлиновой мембраны желтка яиц после взаимодействия со сперматозоидами регидратированного семени (точки взаимодействия)

все без исключения образцы (n=8) имели точки взаимодействия сперматозоидов с вителлиновой мембраной желтка яиц, количество точек взаимодействия составляло от 7 до 37 шт./см²

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

Olga Stanishevskaya^{a,c}, Yulia Silyukova^{b,c,*}, Nikolay Pleshonov^{a,c}, Anton Kurochkin^{a,c}, Elena Fedorova^{b,c}, Anton A. Radaev^b

^a Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the LK Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, 198504, Russia
^b Chroma Care Facility, St. Petersburg University Research Park 2/5, Oranienbaum Highway, St. Petersburg, 198504, Russia
^c Department of Genetics, Breeding and Gene Pool Preservation Poultry, Moskovskoe Sh., 55A, Pushkin, Saint-Petersburg, 196601.

ARTICLE INFO

Keywords:
 Freeze-drying
 Roosters
 Semen
 Fertility
 Media
 Rehydration

ABSTRACT

Lyophilization of avian semen is a new method for gene pool preservation of rooster semen with preserved motility and concentration. A medium LCM-T20 containing trehalose (9.5 mM), exogenous superoxide dismutase, and catalase was used. The supernatant was removed. Media LCM-T with trehalose (1.0 mM) was frozen in a thin layer in glass vials. Samples were lyophilized after lyophilization was 6.1 ± 0.5% (CV 20%), containing hyaluronic acid (40mg/100 ml, media). The total artificial insemination of virgin hens (n = 12) with rehydrated laid eggs. All samples of perivitelline membranes of the oviducts (7–37 pcs/cm²), which confirmed the presence of the hen. To create a dry biobank for poultry, the first protocol to ensure sperm fertility *in vivo*.



Influence of Technological Stages of Preparation of Rooster Semen for Short-Term and Long-Term Storage on Its Quality Characteristics

Yulia Silyukova^{a,*}, Elena Fedorova^a and Olga Stanishevskaya^a

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the LK Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moskovskoe Shosse, 55a, Pushkin, 196625 St. Petersburg, Russia
 * Correspondence: svadim33@mail.ru

Abstract: There is a problem of declining quality of rooster semen in the “native semen–equilibrium–long-term and long-term storage (cryopreservation)” cycle. The aim of this study was to determine the effects of various methods of preparing rooster semen on its qualitative characteristics, account the method of removing possible contaminants (centrifugation or filtration), and to determine the change in the composition of the cytosol of the spermatozoon of the native rooster semen after equilibration of the diluted semen and during short-term storage. In this study, semen from 22 of the Russian White breed was used. Experiment 1: semen was divided into three groups: I—was diluted with synthetic cryoprotective medium (1:1 with LCM control), II—was diluted with synthetic cryoprotective medium (1:1 with LCM control), III—was centrifuged (at 3000 rpm for 10 min). Native semen was evaluated. Experiment 2: the composition of carbohydrates and lipids of spermatozoa of native semen was evaluated during equilibration and after storage (3 days). In Experiment 1 showed an advantage in the quality of filtered semen compared to centrifuged semen: progressive motility (41.0% vs. 27.0%) and chromatin integrity (56.6% vs. 33.6%). In Experiment 2: frozen/thawed samples of filtered semen compared to centrifuged semen: progressive motility were 25.5% vs. 5.5%, respectively, and in terms of chromatin integrity—83.5% vs. 25.5%. The results of Experiment 2 showed the main component in the composition of the cytosol of the spermatozoon.



Article

Effects of Trehalose Supplementation on Lipid Composition of Rooster Spermatozoa Membranes in a Freeze/Thaw Protocol

Olga I. Stanishevskaya¹, Yulia Silyukova^{1,*}, Elena Fedorova¹, Nikolai Pleshonov¹, Anton Kurochkin¹, Vera M. Tereshina² and Elena Ianutsevich²

¹ Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the LK Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Moskovskoe Shosse, 55a, Pushkin, 196625 St. Petersburg, Russia
² Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia
 * Correspondence: svadim33@mail.ru

Simple Summary: Sperm cryopreservation is an important part of maintaining the genetic diversity of chicken breeds. However, a significant percentage of spermatozoa lose their viability and motility when frozen/thawed. Cell membranes are the most vulnerable in this process; and their cryoresistance largely depends on their lipid composition. Based on the study of the lipid composition of the plasma membranes of the spermatozoa of roosters of two breeds; a cryoprotective diluent was developed containing biocryoprotective trehalose with a concentration of 9.5 mM; which allows the optimal ratio of cell lipids and the kinetic ability of frozen/thawed spermatozoa (motility) to be maintained at a high level—52.4%.

Abstract: The plasma membrane of spermatozoa plays an important role in the formation and maintenance of many functions of spermatozoa, including during cryopreservation. As a result of chromatographic analysis, the content of lipids and fatty acids in the membranes of spermatozoa of roosters of two breeds was determined under the influence of cryoprotective media containing trehalose LCM-control (0 mM), Treh20 (9.5 mM), and Treh30 (13.4 mM). The use of the cryoprotective diluent Treh20 made it possible to maintain a dynamic balance between the synthesis and degradation



Citation: Stanishevskaya, O.I.



Animal Reproduction Science

Volume 220, September 2020, 106371



P11

Modification of cock's sperm fertility evaluation method *in vitro*

Nikolay Pleshonov, Yulia Silyukova, Olga Stanishevskaya, Elena Fedorova, Zoya Fedorova, Inessa Meftah

Send article to platform

[/10.1016/j.anireprosci.2020.106371](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106371)

Get rights and content



Article

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

Olga Stanishevskaya, Yulia Silyukova^{*}, Nikolai Pleshonov and Anton Kurochkin

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding—Branch of the LK Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, Moskovskoe Shosse, 55a, 196625 St. Petersburg, Russia;
 olgastan@list.ru (O.S.); Klaus-90@list.ru (N.P.); kurochkin.anton.66@gmail.com (A.K.)
 * 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 × 10⁴, and the number of trehalose molecules was 3.98 × 10⁴. 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% Mal20 (p < 0.05). Maltose positively affected the preservation of frozen/thawed sperm in the genital tract of hens. On the seventh day from the last insemination when using Mal20, the fertilization of eggs was 42.6% and only 27.3% when using Treh20. Despite the same molecular weight, maltose and trehalose have different physicochemical and biological properties that determine their function and effectiveness as components of cryoprotective media.





Citation: Stanishevskaya, O.; Silyukova, Y.; Pleshonov, N.; Kurochkin, A. Role of Mono- and Disaccharide Combination in Cryoprotective Medium for Rooster Semen to Ensure Cryoresistance of Spermatozoa. *Molecules* 2021, 26, 5920; <https://doi.org/10.3390/m26055920>






P49

A method of increasing the fertility of frozen/thawed rooster semen

Olga Stanishevskaya , Yulia Silyukova , Nikolay Pleshanov, Anton Kurochkin, Elena Fedorova, Zoya Fedorova, Oksana Perinek, Inessa Meftah, Anatoliy Vahrameev

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite


<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106409>

[Get rights and content](#)





P17

The use of maltose as a component of the medium for cryopreservation of roosters semen

Yulia Silyukova , Olga Stanishevskaya, Nikolay Pleshanov, Anton Kurochkin

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106377>




СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2020, том 55, № 6, с. 1148-1158

UDK 636.5:591.15:611.013.11:57.04

doi: 10.15389/agrobiology.2020.6.1148rus

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМБИНАЦИЙ САХАРИДОВ В СРЕДАХ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СПЕРМЫ ПЕТУХОВ*

Ю.Л. СИЛЮКОВА , О.И. СТАНИШЕВСКАЯ, Н.В. ПЛЕШАНОВ, А.А. КУРОЧКИН

Различные комбинации сахаридов могут обеспечить эффективную защиту семени во время цикла замораживания/оттаивания. До настоящего времени дисахарид мальтоза не использовался в качестве компонента среды для криоконсервации семени петухов. Поскольку мальтоза не участвует в углеводном обмене сперматозоидов, есть предположение о ее роли в укреплении структуры гликокаликса. В представленной работе впервые доказана эффективность использования мальтозы в сочетании с фруктозой в составе разбавителя для повышения оплодотворяющей способности заморожено-оттаявшего семени петухов. Целью работы было определение оптимальной концентрации мальтозы в составе разбавителя для замораживания семени петухов в возрасте 44-50 нед и установление сроков сохранения функциональной полноценности заморожено-оттаявшего семени в половых путях курицы. Эксперимент проводился в ЦКП «Генетическая коллегия редких и исчезающих пород кур» (ВНИИГРЖ) на курах (*Gallus gallus* L.) породы русская дая ($\sigma^7 = 10$, $\phi^7 = 30$) в возрасте 44-50 нед. Сперму получали методом абдоминального массажа. Оценивали три варианта сред для криоконсервации семени с различным соотношением сахаридов: Mal-10 (фруктоза 0,72 %, мальтоза 0,166 %), Mal-326 % и ЛКС-контроль (Ленинградская криозащитная среда). Замороженные образцы семени охлаждали с 18 до 5 °С в течение 1 мин. Гранулы замораживали, накапывая семя в жидкий азот в течение 30 сут. Гранулы размораживали в питательную среду с помощью визуализирующей системы CASA (computer-assisted sperm analysis). Семена отбирали у виргинных кур в возрасте 46-50 нед ($n = 239$). Кур осеменяли интравагинально разовыми суточными порциями семени: в течение первых 2 сут по одному осеменению в сутки. Яйца для инкубации собирали ежедневно в течение 9 сут. Яйца ($n = 239$) инкубировали 6 сут для оценки в каждой экспериментальной группе на 5-е, 10-е и 15-е сутки после последнего осеменения. Вителлиновой мембраной осеменения оценивали оплодотворенность по наличию бластомеров в осеменениях. Вителлиновой мембраной осеменения оценивали оплодотворенность по наличию бластомеров в осеменениях. Вителлиновой мембраной осеменения оценивали оплодотворенность по наличию бластомеров в осеменениях.

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ
Обзор / Review

Вавилонский журнал генетики и селекции. 2020;24(2):176-184
DOI 10.18699/VJ20.611

The current state of the problem of *in vitro* gene pool preservation in poultry

Y.L. Silyukova, O.I. Stanishevskaya , N.V. Dementieva

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding - Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, Russia
* e-mail: oligastan@list.ru



animals

an Open Access Journal by MDPI

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

Olga Stanishevskaya; Yulia Silyukova; Nikolai Pleshanov; Anton Kurochkin; Elena Fedorova; Zoya Fedorova; Oksana Perinek; Anna Prituzhalova; Inessa Meftakh

Animals 2021, Volume 11, Issue 1, 189



Коллектив лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц



**Благодарю
за внимание!**



Госзадание №121052600357-8