

Влияние технологических этапов и состава сред для криоконсервации спермы на показатели заморожено-оттаянного семени петухов

Антон Алексеевич Курочкин, Ольга Игоревна Станишевская, Юлия Леонидовна Силукова, Николай Вячеславович Плешанов

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

Аннотация: Криоконсервация спермы самцов является наиболее распространенным методом для сохранения генетического материала птиц. Тем не менее, данный метод пока не нашел применения в промышленном птицеводстве ввиду отсутствия стандартизированных протоколов криоконсервации и недостаточно высоких и стабильных показателей общей подвижности заморожено-оттаянного семени. Согласно литературным данным, лучшие показатели качества спермы после криоконсервации удается получить, используя метод витрификации и диметилацетамид в качестве криопротектора. Целью данного исследования было усовершенствовать метод замораживания семени петухов в тонком слое за счет центрифугирования образцов в процессе пробоподготовки (при 95, 214 и 381 г в течение 10 или 15 мин) и использования различных синтетических сред для криоконсервации. Наилучшие показатели заморожено-оттаянного семени были получены у образцов, центрифугированных при 214 г в течение 15 мин, с использованием экспериментальных сред с частичным замещением фруктозы (использованной в контрольной среде) трегалозой в концентрации 13,4 мМ. Общая подвижность сперматозоидов в данной группе составила 29,19%, прогрессивная – 12,18%, что выше показателей контрольной группы на 20,88 и 8,82% соответственно. Полученные данные показывают возможность получения высоких показателей заморожено-оттаянной спермы петухов, используя метод витрификации с центрифугированием образцов (214 г в течение 15 мин) и со вводом трегалозы в концентрации 13,4 мМ в состав сред для криоконсервации.

Ключевые слова: криоконсервация, сперма петухов, витрификация, центрифугирование, трегалоза.

Для цитирования: Курочкин, А.А. Влияние технологических этапов и состава сред для криоконсервации спермы на показатели заморожено-оттаянного семени петухов / А.А. Курочкин, О.И. Станишевская, Ю.Л. Силукова, Н.В. Плешанов // Птицеводство. – 2023. – №10. – С. 15-21.

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-10-15-21

Введение. Криоконсервация спермы самцов – общепризнанный метод сохранения генетического разнообразия сельскохозяйственных птиц. На сегодняшний день разработано множество протоколов замораживания семени сельскохозяйственных птиц с использованием криопротекторов различного принципа действия (глицерин, диметилацетамид (ДМА), трегалоза и др.), предполагающих или витрификацию, или поэтапное снижение температуры в процессе криоконсервации [1, 2]. Наиболее

высокие показатели фертильности спермы достигаются при использовании ДМА в качестве криопротектора, применяемого в протоколе замораживания в виде гранул [3]. Криоконсервация семени в тонком слое, на стенках пенициллиновых флаконов – один из способов витрификации, который также перспективен для использования в протоколе лиофильной сушки спермы как один из этапов [4, 5].

Для повышения уровня фертильности спермы сельскохозяйственных животных используются

методы ее предварительной обработки для удаления повреждающих агентов, присутствующих в эякуляте, а также отбора морфологически нормальных подвижных сперматозоидов. Кроме жизнеспособных мужских гамет, в эякуляте содержится семенная плазма, незрелые и мертвые сперматозоиды, клеточный дебрис, а также лейкоциты. Считается, что эти составляющие повышают уровень генерации активных форм кислорода, вызывая снижение жизнеспособности и функционального





статуса спермы при использовании свежеполученных эякулятов или после цикла криоконсервации [6]. За счет использования центрифугирования можно осадить клетки и заменить супернатант синтетическими средами для криоконсервации или физиологическими растворами. Несмотря на то, что данный тип клеток чувствителен к механическим силам, возникающим при центрифугировании [6,7], в литературе встречаются противоречивые данные для разных видов сельскохозяйственных животных. Так, согласно исследованию на сперме жеребцов [8], после 24 ч хранения общая подвижность охлажденного семени была выше в центрифугированных образцах, чем в нецентрифугированных (79,3 против 76,5%). Через 48 ч центрифугированные образцы обладали более высокой общей (68,1 против 62,9%), и прогрессивной (24,7 против 22,7%) подвижностью сперматозоидов. На долю живых сперматозоидов центрифугирование достоверно влияния не оказывало. В другой работе на жеребцах общая подвижность семени из образцов заморожено-оттаянной спермы, подвергнутых центрифугированию в процессе пробоподготовки, достоверно не различалась между экспериментальными группами с разными режимами центрифугирования; по показателям свежеполученных эякулятов экспериментальные группы также достоверно не отличались от контрольных образцов [9]. У спермы хряков отмечалась аналогичная тенденция при хранении охлажденной спермы, подвергнувшейся центрифугированию [10].

При оценке оплодотворяющей способности центрифугированно-

го семени жеребцов и быков было установлено, что фертильность нативной спермы и заморожено-оттаянного семени жеребцов не снижалась у образцов, центрифугированных при 310 г в течение 3,5 мин, однако, при исследовании эякулятов быков фертильность спермы у центрифугированных образцов (270 г, 3 мин) была значительно снижена [11]. У петухов также наблюдали снижение оплодотворяющей способности спермы после центрифугирования (76,54±8,54%) в сравнении с контролем (84,88±3,10%) [12].

Таким образом, структурные и функциональные повреждения сперматозоидов в процессе центрифугирования являются видоспецифичными и могут приводить к снижению уровня их фертильности [13]. Разработка протоколов центрифугирования с учетом видовой принадлежности животных будет способствовать сохранению жизнеспособности сперматозоидов в процессе криоконсервации. Центрифугирование образцов семени с удалением надосадочной жидкости для последующей криоконсервации позволит минимизировать возможные загрязнения семени, полученные в процессе его отбора в полевых условиях, а также позволит снизить в образцах семени содержание воды, образующей при замерзании кристаллы льда, несмотря на использование криопротекторных сред, которые, в свою очередь, способны вызывать необратимые структурные нарушения в сперматозоидах. Необходимо проведение дополнительных исследований по определению оптимальных режимов центрифугирования семени с целью сохранения морфо-

функциональной полноценности сперматозоидов в протоколе витрификации [10].

Цель исследования – определить оптимальные условия центрифугирования семени петухов с удалением надосадочной жидкости как технологического этапа криоконсервации в тонком слое путем определения жизнеспособности и качественных показателей нативной и заморожено-оттаянной спермы петухов.

Материал и методика исследований. Экспериментальное поголовье и получение спермы.

В исследовании использовались петухи породы царскосельская (n=10) в возрасте 52-56 недель жизни из БПК «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ. Свежеполученные эякуляты оценивались в трех повторностях по таким параметрам как объем (мл), концентрация (млрд./мл), общая и прогрессивная подвижность сперматозоидов (CASA, ArgusSoft Poultry, Санкт-Петербург). Качественные показатели семени, используемого в исследовании, соответствовали ГОСТ 27267-2017. Полученные эякуляты объединяли и делили на аликвоты в соответствии с экспериментальными средами. В качестве контроля использовалась среда ЛКС-1 (Ленинградская криозащитная среда, разработка ВНИИГРЖ, авт. свидетельство № 1130339; табл. 1) [14]. В состав экспериментальных сред входил криопротекторный агент – дисахарид трегалоза, частично замещающий фруктозу [15,16].

Криоконсервация спермы.

После добавления к сперме разбавителей в соотношении 1:1 семя помещали в холодильную камеру (t=5°C) для эквilibрации



Таблица 1. Состав контрольной и экспериментальных сред для криоконсервации спермы петухов

Состав среды	ЛКС-1	T20	T30
Глутамат натрия, г	1,92 (114 мМ)	1,92 (114 мМ)	1,92 (114 мМ)
Фруктоза, г	0,8 (44 мМ)	0,64 (36 мМ)	0,56 (31 мМ)
Ацетат калия, г	0,5 (5 мМ)	0,5 (5 мМ)	0,5 (5 мМ)
Поливинилпирролидон, г	0,3 (8,3 мМ)	0,3 (8,3 мМ)	0,3 (8,3 мМ)
Протамина сульфат, г	0,032 (3,27 мМ)	0,032 (3,27 мМ)	0,032 (3,27 мМ)
Трегалоza, г	-	0,326 (9,5 мМ)	0,459 (13,4 мМ)
Дистиллированная вода, мл	100	100	100

на 40 мин. После этого образец семени объемом 0,5 мл центрифугировали на скоростной центрифуге LX-165T2R (Haier Biomedical) при 5°C в 6 режимах центрифугирования (1000 об./мин (95 г), 10 мин и 15 мин; 1500 об./мин (214 г), 10 мин и 15 мин; 2000 об./мин (381 г), 10 мин и 15 мин). Удаляли надосадочную жидкость. Полученные образцы разливали в пенициллиновые флаконы и распределяли равномерно по стенкам. Далее флаконы помещали в специальный штатив и вращали в парах азота ($t=-80^{\circ}\text{C}$) в течение 1 мин для равномерного распределения семени по стенкам и затем опускали в жидкий азот. Оттаивание образцов осуществляли в водяной бане при 60°C в течение 6-8 сек.

Анализ состояния плазматической мембраны сперматозоидов. Состояние плазматической мембраны сперматозоидов петухов определяли с помощью проточного цитофлуориметра Cytoflex (Beckman Coulter, Inc.) используя флуорохром пропидия йодид (PI). Проникая через поврежденную плазматическую мембрану, он попадает в клетку и связывается с нуклеиновыми кислотами. Перед исследованием суспензию клеток дважды промывали двухкомпонентным разбавителем для спермы петухов ВНИИГРЖ (патент RU 2482816, 2013). Образцы семени были доведены до концен-

трации сперматозоидов 3×10^6 /мл. Конечная концентрация PI составила 1 мМ.

Оценка мембранного потенциала митохондрий. Для окрашивания митохондрий в живых клетках использовали тетраметилродамин (TMRE). Краситель, проникая через плазматическую мембрану клеток, селективно накапливается в активных митохондриях благодаря трансмембранному потенциалу, который поддерживается интактными митохондриями. Деполяризация митохондрий вследствие запуска процессов апоптоза, некроза или других факторов характеризуется уменьшением мембранного потенциала, что снижает интенсивность флуоресценции. К образцам семени с концентрацией сперматозоидов 3×10^6 /мл добавляли 1 мкл TMRE (конечная концентрация 1 мкМ) и помещали в темное место на 20 мин ($t=25^{\circ}\text{C}$). Спустя 20 мин производилась двойная отмывка образцов от остатков флуорохрома (1200 об./мин в течение 7 мин), после чего образцы оценивались на проточном цитометре.

Статистика. Для статистической обработки данных использовали программные приложения Microsoft Excel 2021 и Statistica 7.0. Данные в работе представлены в виде средних значений (M) и стандартных ошибок средних (SEM). Различия внутри групп на-

тивного и заморожено-оттаянного семени оценивали по t-критерию Стьюдента и считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Первым этапом нашего исследования было определение влияния центрифугирования на показатели свежеполученных эякулятов. Доля сперматозоидов с поврежденной плазматической мембраной в центрифугированных нативных эякулятах находилась в пределах от $15,87 \pm 0,26$ до $22,69 \pm 1,88\%$; достоверная разница была установлена только между двумя группами, и выраженной взаимосвязи с режимами центрифугирования выявлено не было. Общая подвижность сперматозоидов имела большие различия между группами и находилась в пределах от $66,90 \pm 8,27$ до $80,26 \pm 5,97$. Снижение общей подвижности наблюдалось с увеличением центробежного ускорения и времени центрифугирования (табл. 2). Учитывая полученные данные, а также объем удаленной надосадочной жидкости, были выбраны два режима центрифугирования (214 г и 381 г, 15 мин) для дальнейшей криоконсервации образцов.

Экспериментальные среды для криоконсервации спермы петухов были изготовлены на основе контрольной среды путем замены части моносахаридов трегалозой разной

Таблица 2. Влияние режимов центрифугирования на показатели свежеполученных эякулятов (разбавитель ЛКС-1)

g [*]	Время центрифугирования (мин)	Объем удаленной над. жидкости (мл)	Концентрация сперматозоидов (млрд./мл)	Доля клеток с поврежденной мембраной, %	Доля целевой популяции клеток от всех событий, %	ОП [*] до центрифугирования, %	ОП после центрифугирования, %	ПП [*] до центрифугирования, %	ПП после центрифугирования, %
95	10	0,057±0,007	4,447±0,396	15,87±0,26 ^a	89,30±7,14	88,59±3,18	78,59±0,45	69,90±0,84	53,61±4,22
	15	0,087±0,007		22,69±1,88 ^b	78,70±4,58		80,26±5,97		58,68±10,57
214	10	0,130±0,015		21,30±4,12	75,93±1,68		74,48±5,50		51,52±5,69
	15	0,180±0,030		19,76±2,91	76,27±1,57		73,82±1,92		55,81±2,76
381	10	0,257±0,007		19,24±5,20	77,83±2,81		73,60±4,74		44,83±8,65
	15	0,333±0,047		18,67±3,84	80,66±5,26		66,90±8,27		42,88±7,59

Таблица 3. Влияние состава сред для криоконсервации спермы петухов и режимов центрифугирования на показатели заморожено-оттаянного семени

Группа	g [*]	Время центрифугирования, (мин)	Доля клеток с поврежденной мембраной, %	Доля клеток с высоким мит. потенциалом, %	ОП [*] после криоконсервации, %	ПП [*] после криоконсервации, %
ЛКС-1	214	15	38,69±7,10	65,94±1,55 ^f	8,31±0,39 ^k	3,36±0,72 ^p
T20	214		49,15±2,47 ^c	64,09±8,27 ^g	13,72±5,60	5,99±1,54 ^q
T30	214		39,96±0,11 ^d	59,10±9,08 ^h	29,19±1,97 ^l	12,18±1,84 ^r
ЛКС-1	381		52,93±8,26	49,92±4,71 ⁱ	8,92±2,13 ^m	4,23±0,28 ^s
T20	381		33,93±0,10 ^e	46,78±11,79	2,82±0,88 ⁿ	1,36±0,23
T30	381		59,03±5,88	25,37±4,88 ^j	2,57±0,59 ^o	0,97±0,09 ^t

*ОП – общая подвижность, ПП – прогрессивная подвижность. g – относительное центробежное ускорение. Данные представлены в виде М±SEM. Латинскими буквам соответствуют разные группы, a,b, c:d, d:e, c:e, f:h, f:j, g:j, f:i, i:j, h:j, k:l, k:n, k:o, l:n, l:o, l:m, p:r, p:t, q:t, r:t, s:t – P < 0,05.



концентрации. Трегалоза представляет собой невосстанавливающий дисахарид, и при использовании в разбавителях для криоконсервации спермы снижает образование внутриклеточных кристаллов льда во время криоконсервации. Более того, трегалоза обладает антиоксидантным свойством и способна защищать сперматозоиды за счет снижения перекисного окисления липидов, которому в особенности подвержены сперматозоиды птиц [17,18], и поэтому она является перспективной составляющей сред для криоконсервации спермы птиц [19].

При использовании экспериментальных сред доля клеток с поврежденной плазматической мембраной в заморожено-оттаянных образцах находилась в пределах от 38,69±7,10 до 49,15±2,47% для 214 g и от 33,93±0,10 до 59,03±5,88% – для 381 g.

Стоит отметить, что после воздействия на сперматозоиды перед криоконсервацией угловым ускорением 381 g в течение 15 мин общая и прогрессивная подвижность сперматозоидов сильно снижалась, и в контрольной группе с разбавителем ЛКС-1 были получены лучшие показатели для данного режима центрифугирования. Митохондриальный потенциал также был выше в контрольной группе, а самым низким – в группе T30 (25,37±4,88). Поскольку поддержание положительного заряженного мембранного потенциала является необходимым условием для производства АТФ митохондриями, данный показатель, в совокупности с другими, может указывать на функциональный статус сперматозоидов [20]. Полученные данные согласуются с исследованиями на других сельскохозяйственных животных,

где определяли взаимосвязь митохондриальной активности и общей подвижности сперматозоидов [19].

При воздействии 214 g в течение 15 мин наблюдалась противоположная тенденция. В экспериментальных группах было как меньше клеток с поврежденной плазматической мембраной, так и выше качественные показатели спермы. Группа T30 достоверно отличалась от других групп по общей и прогрессивной подвижности сперматозоидов. Увеличение данных показателей относительно контрольной группы составило 20,88 и 8,82% (p<0,05) соответственно (табл. 3), что говорит о положительном влиянии трегалозы в составе криопротекторной среды на морфо-генеративное функциональное состояние сперматозоидов петухов после витрификации в тонком слое и последующего оттаивания.

Выводы. Центрифугирование спермы петухов в течение 10 и 15 мин при 95-381 г, как этап пробоподготовки витрификации, не оказывает достоверного влияния на жизнеспособность и качественные характеристики нативных эякулятов. Эти же режимы негативно отражаются на показателях общей и прогрессивной подвижности семени после его замораживания и оттаивания.

Использование трегалозы в составе сред для криоконсервации спермы петухов при витрифика-

ции на стенках пенициллиновых флаконов оказывает положительное действие на общую и прогрессивную подвижность сперматозоидов. Наилучшие показатели заморожено-оттаянного семени были получены в группе Т30 (13,4 мМ трегалозы), при центрифугировании в течение 15 мин при 214 г и удалении надосадочной жидкости в количестве $0,180 \pm 0,030$ мл. Разница с контрольной группой составила 20,88% по общей подвижности сперматозоидов и 8,82% – по прогрессивной ($p < 0,05$). Од-

нако снижение жизнеспособности и качественных показателей заморожено-оттаянного семени в экспериментальных средах при угловом ускорении 314 г в течение 15 мин может говорить о наличии некоего оптимума между составом сред и технологическими этапами пробоподготовки образцов, для поиска которого требуются дополнительные исследования.

Исследование выполнено за счет Российского научно-го фонда, проект № 19-16-00009П.

Литература / References

1. Madeddu, M. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen / M. Madeddu, F. Mosca, A. Abdel Sayed, L. Zaniboni, M.G. Mangiagalli, E. Colombo, S. Cerolini // Anim. Reprod. Sci. - 2016. - V. 171. - P. 58-64. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.05.014
2. Tselutin, K. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa / K. Tselutin, F. Seigneurin, E. Blesbois // Poult. Sci. -1999. - V. 78. - No 4. - P. 586-590. doi: 10.1093/ps/78.4.586
3. Blesbois, E. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds / E. Blesbois, J. Brillard // Animal. - 2007. - V. 1. - No 10. - P. 1472-1481. doi: 10.1017/S175173110700081X
4. Stanishevskaya, O. A successful protocol for achieving anhydrobiosis of *Gallus gallus domesticus* spermatozoa while maintaining their fertility *in vivo* / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, N. Pleshanov, A. Kurochkin, E. Fedorova, A. Radaev // Cryobiology. - 2022. - V. 104. - P. 102-106. doi: 10.1016/j.cryobiol.2021.11.002
5. Ito, D. Mailing viable mouse freeze-dried spermatozoa on postcards / D. Ito, S. Wakayama, R. Emura, M. Ooga, T. Wakayama // iScience. - V. 24. - No 8. - Art. 102815. doi: 10.1016/j.isci.2021.102815
6. Sieme, H. Sperm cleanup and centrifugation processing for cryopreservation / H. Sieme, H. Oldenhof // Methods Mol. Biol. - 2015. - V. 1257. - P. 343-352. doi: 10.1007/978-1-4939-2193-5_16
7. Katkov, I. Factors affecting yield and survival of cells when suspensions are subjected to centrifugation / I. Katkov, P. Mazur // Cell Biochem. Biophys. - 1999. - V. 31. - No 3. - P. 231-245. doi: 10.1007/BF02738241
8. Sabatini, C. Effect of centrifugation and addition of catalase and/or Trolox® on motility and viability of cooled stallion spermatozoa / C. Sabatini, M. Montella, D. Panzani, F. Camillo, A. Rota // J. Equine Vet. Sci. - 2012. - V. 32. - No 8. - P. 511-512. doi: 10.1016/j.jevs.2012.06.090
9. Webb, G.W. Effect of centrifugation technique on post-storage characteristics of stallion spermatozoa / G.W. Webb, M.M. Dean // J. Equine Vet. Sci. - 2009. - V. 29. - No 9. - P. 675-680. doi: 10.1016/j.jevs.2009.07.016
10. Zhang, W. Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa / W. Zhang, K. Yi, C. Chen, X. Hou, X. Zhou // Anim. Reprod. Sci. - 2012. - V 132. - No 3-4. - P. 123-128. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.05.009
11. Pickett, B.W. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa / B.W. Pickett, J.J. Sullivan, W.W. Byers, M.M. Pace, E.E. Remmenga // Fertil. Steril. - 1975. - V. 26. - No 2. - P. 167-174. doi: 10.1016/s0015-0282(16)40938-6
12. Sexton, T.J. Effect of centrifugation and repeated washing on the fertilizing capacity of fowl / T.J. Sexton // J. Reprod. Fertil. - 1973. - V. 32. - No 1. - P. 101-104. doi: 10.1530/jrf.0.0320101
13. Neila-Montero, M. An optimized centrifugation protocol for ram sperm ensuring high sample yield, quality and fertility / M. Neila-Montero, M.F. Riesco, R. Montes-Garrido, C. Palacin-Martinez, C. Chamorro, P. de Paz, M. Alvarez, L. Anel, L. Anel-Lopez // Theriogenology. - 2022. - V. 191. - P. 179-191. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.08.006





14. Среда для низкотемпературной консервации спермы птиц / А.Д. Курбатов, Л.Е. Нарубина, Г.Б. Бубляева, Л.И. Москаленко, К.В. Целютин. – А.с. № 1130339, 22.08.1984.
15. Stanishevskaya, O. Effects of trehalose supplementation on lipid composition of rooster spermatozoa membranes in a freeze/thaw protocol / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, E. Fedorova, N. Pleshanov, A. Kurochkin, V. Tereshina, E. Ianutsevich // *Animals*. - 2023. - V. 13. - No 6. - Art. 1023. doi: 10.3390/ani13061023
16. Stanishevskaya, O. Trehalose as a stabilizer of the lipid composition of membranes and the composition of the cytosol of frozen/thawed rooster spermatozoa / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, V. Tereshina, E. Ianutsevich, N. Pleshanov, A. Kurochkin, E. Fedorova // *Agriculture*. - 2023. - V. 13. - No 7. - Art. 1387. doi: 10.3390/agriculture13071387
17. Chen, Q. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals / Q. Chen, G.G. Haddad // *J. Exp. Biol.* - 2004. - V. 207. - No 18. - P. 3125-3129. doi: 10.1242/jeb.01133
18. Surai, P.F. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen / P.F. Surai, N. Fujihara, B.K. Speake, J.-P. Brillard, G.J. Wishart, N.H.C. Sparks // *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* - 2001. - V. 17. - No 7. - P. 1024-1050. doi: 10.5713/ajas.2001.1024
19. Guo, H. Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility / H. Guo, Y. Gong, B. He, R. Zhao // *Theriogenology*. - 2017. - V. 87. - P. 276-283. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.09.005
20. Luo, S.-M. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? / S.-M. Luo, H. Schatten, Q.-Y. Sun, // *J. Genet. Genomics*. - 2013. - V. 40. - No 11. - P. 549-556. doi: 10.1016/j.jgg.2013.08.004

Сведения об авторах:

Курочкин А.А.: младший научный сотрудник лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; kurochkin.anton.66@gmail.com. **Станишевская О.И.:** доктор биологических наук, главный научный сотрудник, зав. лабораторией генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; olgastan@list.ru. **Силукова Ю.Л.:** младший научный сотрудник лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; svadim33@mail.ru. **Плешанов Н.В.:** научный сотрудник лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц; klaus-90@list.ru. Статья поступила в редакцию 03.08.2023; одобрена после рецензирования 09.09.2023; принята к публикации 22.09.2023.

Research article

Influence of Technological Stages and Cryopreservation Media Composition on the Parameters of Roosters' Frozen/Thawed Semen

Anton A. Kurochkin, Olga I. Stanishevskaya, Yulia L. Silyukova, Nikolay V. Pleshanov

All-Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding - branch of the L.K. Ernst's Federal Research Center for Animal Husbandry

Abstract. *Cryopreservation of the semen of males is the most common method for the preservation of genetic material of aves. However, this method hasn't yet found wide application in industrial poultry farming due to the lack of standardized cryopreservation protocols and low overall motility of frozen/thawed semen. According to previously published data, the best sperm parameters after cryopreservation can be obtained using vitrification and dimethylacetamide as cryoprotectant. The study presented was aimed at the improvement of one of the existing protocols of vitrification (thin-layer freezing) of roosters' semen by preliminary centrifugation of the samples (at 95, 214 and 381 g for 10 or 15 min) and use of various synthetic media for cryopreservation. The best frozen/thawed semen parameters were obtained with the use of centrifugation of the samples at 214 g for 15 min and experimental media where fructose (exclusively used in control media) was partially replaced by trehalose in concentration 13.4 mM. Total spermatozoa motility in this treatment was 29.19%, progressive motility 12.18%, higher*

in compare to control by 20.88 and 8.82%, respectively. These data evidenced the efficiency of the modifications applied to the protocol of cryopreservation (centrifugation at 214 g for 15 min and supplementation of cryopreservation media with 13.4 mM of trehalose).

Keywords: cryopreservation, roosters' semen, vitrification, centrifugation, trehalose.

For Citation: Kurochkin A.A., Stanishevskaya O.I., Silyukova Y.L., Pleshanov N.V. (2023) Influence of technological stages and cryopreservation media composition on the parameters of roosters' frozen/thawed semen. *Ptitsevodstvo*, 72(10): 15-21. (in Russ.)

doi: 10.33845/0033-3239-2023-72-10-15-21

(For references see above)

Authors:

Kurochkin A.A.: Junior Research Officer, Lab. of Genetics, Breeding, and Gene Pool Preservation of Poultry; kurochkin.anton.66@gmail.com. **Stanishevskaya O.I.:** Dr. of Biol. Sci., Head of Lab. of Genetics, Breeding, and Gene Pool Preservation of Poultry; olgastan@list.ru. **Silyukova Y.L.:** Junior Research Officer, Lab. of Genetics, Breeding, and Gene Pool Preservation of Poultry; svadim33@mail.ru. **Pleshanov N.V.:** Research Officer, Lab. of Genetics, Breeding, and Gene Pool Preservation of Poultry; klaus-90@list.ru.

Submitted 03.08.2023; revised 09.09.2023; accepted 22.09.2023.

© Курочкин А.А., Станишевская О.И., Силукова Ю.Л., Плешанов Н.В., 2023

