

УДК: 686.082

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.3.258

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОЗАЩИТНЫХ РАЗБАВИТЕЛЕЙ ДЛЯ СЕМЕНИ ПЕТУХОВ

**Силокова Ю.Л.\*** – мл. науч. сотр. лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц, **Станишевская О.И.** – д-р биол. н., гл. науч. сотр., зав. лабораторией генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц.

\*svadim33@mail.ru

ВНИИГРЖ – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».

**Ключевые слова:** криоконсервация, сперма, петухи, фертильность, разбавитель для семени, трегалоза.

**Key words:** cryopreservation, sperm, roosters, fertility, semen extender, trehalose.

Настоящее исследование проведено при поддержке Российского научного Фонда проект № 19-16-00009П.

Поступила: 15.06.2023

Принята к публикации: 11.09.2023

Опубликована онлайн: 29.09.2023



### РЕФЕРАТ

Сохранение и использование заморожено/оттаянных сперматозоидов петухов важно для поддержания биоразнообразия сельскохозяйственных птиц и в перспективе будет играть важную роль в селекции, что даст большую гибкость в программах разведения. Такое использование оттаянного семени целесообразно только при высоком уровне его оплодотворяющей способности. Трегалоза является перспективным природным компонентом в составе криозащитных сред для семени петухов за счет ее исключительной способности нейтрализации холодового стресса. Целью исследования было определить эффективность использования трегалозы в составе криозащитного разбавителя семени петухов на базе Ленинградской криозащитной среды (ЛКС-контроль). Представлена среда ЛКС-T20 с добавлением трегалозы в концентрации 9,5 mM. Показатели подвижности семени после размораживания (♂ красный род-айланд, n=10) в зависимости от состава среды значимо не различались. Достоверные различия ( $p < 0,05$ ) были получены по показателю оплодотворенности яиц: 86,0% при использовании среды ЛКС-T20 и 79,0% – ЛКС-контроль и по оценке состояния вителлиновой мембраны желтка яиц ( $p < 0,001$ ). Показатель оплодотворенности яиц на приемлемом для оттаянного семени уровне 50% сохранялся до 10 дня (20 день сбора яиц) от последнего осеменения при использовании среды ЛКС-T20. Функциональная полноценность оттаянных сперматозоидов сохранялась в течение 15 дней (25й день сбора яиц) от последнего осеменения при использовании разбавителя ЛКС-T20 – оплодотворенность яиц 15,0%, количество взаимодействий сперматозоидов при оценке состояния вителлиновой мембраны желтка яиц в области бластодиска составило 345,2 шт/см<sup>2</sup>. При использовании разбавителя ЛКС-контроль – функциональная способность оттаянных сперматозоидов в те же контрольные периоды отсутствовала. Полученный высокий уровень оплодотворенности яиц при включении трегалозы в состав криозащитного разбавителя в сочетании с методом замораживания семени петухов в гранулах подтверждает целесообразность внедрения разбавителя ЛКС-T20 в технологию сохранения генетического разнообразия локальных и аборигенных пород кур методами *in vitro*.

## ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Методы криоконсервации семени открывают возможности для сохранения и использования локальных и аборигенных пород, аллельного разнообразия животных способами, которые были невозможны в прошлом, когда сохранение *in vivo* было единственным доступным.

Опубликовано большое число результатов исследований по определению технологических протоколов криоконсервации семени петухов, позволяющих максимально предотвратить повреждения репродуктивных клеток и сохранить их фертильность. Проблемы, с которыми сталкиваются исследователи заключаются в совершенствовании методов и приемов криоконсервации семени петухов, отражены во многих публикациях, посвященных этой тематике [1,2]. К ним относятся: значимое снижение оплодотворяющей способности заморожено/оттаянного семени, что вызвано следующими факторами: повреждение плазматических мембран сперматозоидов, фрагментацией хроматина и снижением процента сперматозоидов с общей и прогрессивной подвижностью. Однако, в литературе есть примеры исследований с удовлетворительными показателями по проценту подвижности заморожено/оттаянных сперматозоидов, что как следствие, отражалось на фертильности семени. В зависимости от использованных протоколов криоконсервации (витрификация или поэтапное замораживание), индивидуальных различий и породной принадлежности петухов, результаты оплодотворенности яиц демонстрируют большую изменчивость и составляют от 2,0 до 85,0% [3-7]. Средний показатель оплодотворенности яиц, по литературным данным, составляет порядка 30% [8]. Результаты последних исследований Станищевской и др. [23] показали возможность достичь стабильного показателя оплодотворенности яиц, полученных при использовании оттаянного семени петухов на уровне до 65%. Основным направлением исследований является совершенствование состава среды для замораживания семени пету-

хов, что позволит предупреждать необратимые изменения клеточных структур и гибель сперматозоидов при замораживании и оттаивании [10]. По мнению Thananurak [11], сбалансированная среда для криоконсервации имеет ключевое значение для сохранения функциональной полноценности сперматозоидов после оттаивания.

Некоторые дисахариды, особенно трегалоза и сахароза, во многих исследованиях используются в составах сред для замораживания семени петухов, как криопротекторы, обладающие исключительной способностью нейтрализации холодного стресса [12,13]. Известно, что значительное количество трегалозы накапливается в микроорганизмах и противодействует температурным стрессам [14] регулирует осмотические нагрузки на клеточные оболочки. По литературным данным, трегалоза повышает стабильность и агрегация макромолекул, способна защищать сложные молекулярные единицы плазмалеммы от денатурирующих стрессов [15,16], формирует стабильную стекловидную матрицу кристаллов льда внутри клетки с чрезвычайно низкой молекулярной подвижностью во время низкотемпературного стресса, что снижает их повреждающую характеристику [17]. Дисахарид трегалоза способна стабилизировать липидные компоненты мембран, в частности переключение липидов липидного бислоя [18,19]. Свойства трегалозы были учтены при включении ее в состав криопротекторной среды, при использовании разбавителя Лейка для семени петухов [20,21] в качестве базового состава, но достичь уверенных результатов по оплодотворяющей способности оттаянного семени не удалось. Целью данного исследования было определить эффективность использования трегалозы в составе среды для криоконсервации семени петухов на основе российской разработки – Ленинградская криозащитная среда (ЛКС) [22].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHOD

Содержание поголовья кур и получение семени петухов. В эксперименте ис-

пользовано поголовье кур и петухов породы красный род-айланд (♂ n=5 ♀n=45), в возрасте 32 нед. жизни (ЦКП «Генетическая коллекция редких пород кур» ВНИИГРЖ). Экспериментальное поголовье содержалось в условиях, соответствующим требованиям стандартных операционных процедур (ВНИИГРЖ). Сперму получали 2 раза в неделю методом абдоминального массажа [23] (Burrows and Quinn 1935) в стеклянные емкости V=10 мл. Каждый полученный эякулят оценивался индивидуально по макроскопическим и первичным микроскопическим показателям в производственных условиях (микроскоп Микромед МС-12, Россия), увеличение x200. Критерии отбора семени: объем 0,2-1,2 мл; концентрация сперматозоидов  $\geq 3,1$  млрд/мл (фотометр Accuread, IMV Technologies, UK); общая подвижность 80,0-85,0% (Микромед МС-12, Россия) и агглюцинация составляла не более 10,0%. Для устранения индивидуальных различий образцы спермы объединяли и разделяли на три части в соответствии с планом эксперимента.

Процедура замораживания и оттаивания семени. Для замораживания семени использовали базовый состав криозащитной среды ЛКС (контроль) [21], состав экспериментального разбавителя ЛКС-T20 был рассчитан при частичном изменении соотношения сахаридов в базовом разбавителе: фруктоза (0,64г) / трегалоза (0,326г (9,5mM)). Образцы спермы, разведенные в соотношении 1:1, эквilibрировали от 18°C до 5°C в течение 40 минут. Вносили криопротектор диметилацетамид (DMA, Sigma Aldrich, США) 6% от общего объема. Замораживали в гранулах: набирали в пипетку Пастера небольшой объем семени и мелкими каплями погружали его в жидкий азот. Размораживание гранул производили на целевом оттаивателе при t 60°C (Авторское свидетельство ВНИИГРЖ, 1989) [21].

Оценка подвижности нативного и заморожено/оттаянного семени. Анализ параметров движения сперматозоидов с помощью системы CASA (АргусСофт,

Россия; Motic BA410E, Китай), для каждого образца в двух повторностях при увеличении x200.

Искусственное осеменение кур. Осеменение виргинных кур (32 нед. жизни, по 15 кур в каждой группе) проводили два дня подряд, доза осеменения составляла 40-70 мкл оттаянного семени (70-80 млн. подвижных сперматозоидов), а затем через 2 дня, всего 5 осеменений [23]. Режим осеменения с 14:00 до 16:00 часов. Сбор яиц для инкубации осуществляли через день после 1го осеменения ежедневно в течение 9 дней и на 15, 20, 25 день опыта. Яйца инкубировали 144 часа для оценки оплодотворенности (n=400 шт.).

Метод оценки фертильности оттаянных сперматозоидов в половых путях курицы. Для оценки оплодотворяющей способности сперматозоидов в половых путях кур использовался метод Bakst [24], предусматривающий использование вителлиновой мембраны желтка яиц. Оценку проводили на 5й, 10й, 15й день от последнего осеменения. Вкратце, желтки отделяли от белка, область бластодиска фиксировали с помощью кольца из фильтровальной бумаги и обрезали. Отделенную мембрану отмывали в охлажденном растворе NaCl (0,9%) и переносили на предметное стекло. Препарат окрашивали по протоколу: для фиксации использовали 30 мкл 10% спиртового раствора формалина на каждый препарат. Через 15-20 секунд формалин удаляли и окрашивали реагентом Шиффа ~ 30-40 мкл. Дожидались появления пурпурного оттенка (~30с) и отмывали дистиллированной водой. Сушили на воздухе 5 минут. Препараты оценивали на микроскопе Axio Imager (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) в темном поле при увеличении x200 и подсчитывали количество точек взаимодействия сперматозоидов с вителлиновой мембраной (размер оцениваемого препарата составлял 10мм<sup>x</sup>10мм).

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовали программные приложения MS Excel (США). Данные представляли в виде

M±SE. Различия между выборками оценивали по U-критерию Манна-Уитни и t-критерию Стьюдента,

**РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS**

Средний объем, полученного семени от каждого петуха составлял 0,2± 0,06 мл, концентрация сперматозоидов в эякулятах 3,11±0,78 млрд/мл, что соответствует ГОСТ 27267-2017 «Средства воспроизводства. Сперма петухов и индюков неразбавленная свежеполученная».

Использование трегалозы в среде для разбавления семени не показала значимого влияния на общую подвижность сперматозоидов после эквilibрации, и средний показатель общей подвижности нативного семени составил 85,0%. Значение показателя общей подвижности заморожено/оттаянного семени было снижено до уровня 48,0-50,0% (таблица 1), и различия также не были значимыми.

Результаты искусственного осеменения кур от использования оттаянного се-

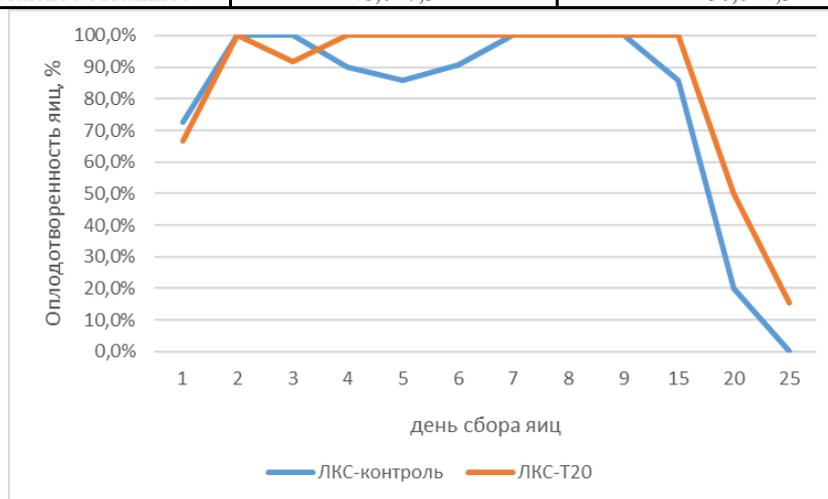
мени учитывали за каждый день сбора яиц (рис. 1). Показатели оплодотворенности яиц при использовании ЛКС-T20 значительно превышали показатели в контроле и отличались высокой стабильностью: в среднем 86,0% (ЛКС-T20), против 79,0% (ЛКС-контроль) (p <0,05).

В ходе исследования было отмечено значительное увеличение сроков функциональной полноценности сперматозоидов в половых путях кур при использовании разработанной среды ЛКС-T20. Показатель функциональной активности сперматозоидов на 10-й день от последнего осеменения (20-й день сбора яиц) оплодотворенность яиц оставалась на удовлетворительном уровне 50,0%, против 20% при использовании среды ЛКС-контроль. Для подтверждения полученных результатов по оплодотворенности яиц проведена оценка состояния вителлиновой мембраны желтка яиц на взаимодействие со сперматозоидами (табл. 2).

**Таблица 1**

**Показатели общей подвижности семени петухов (%) в зависимости от используемого разбавителя для криоконсервации.**

Семя	Общая подвижность сперматозоидов, %	
	ЛКС-контроль	ЛКС-T20
нативное	85,0±3,3	85,0±2,9
замороженое/оттаянное	48,0±7,5	50,0±4,5



*Рис. 1. Показатели оплодотворенности яиц (%) при искусственном осеменении кур заморожено/оттаянным семенем петухов, в зависимости от состава разбавителя.*

Таблица 2

Число точек взаимодействия сперматозоидов заморожено/оттаянного семени с вителлиновой мембраной яйцеклетки курицы *in vivo* в зависимости от состава разбавителя с учетом сроков их переживаемости в половых путях курицы (в каждой группе оценено по 9 яиц в каждый день сбора)

День сбора яиц от последнего осеменения	ЛКС-контроль	ЛКС-T20
	Число точек взаимодействия, шт./см <sup>2</sup>	
5-й	13,7±2,7 <sup>a</sup>	461,5±11,5 <sup>b</sup>
10-й	14,9±3,5 <sup>a</sup>	319,3±12,9 <sup>b</sup>
15-й	отсутствуют	345,2±11,1

<sup>ab</sup> p < 0,001

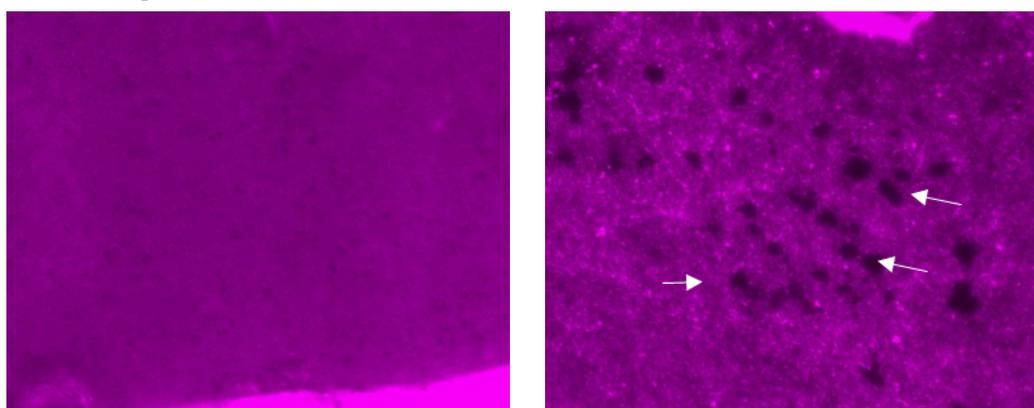


Рис. 2 – Фрагмент поля зрения микроскопического препарата вителлиновой мембраны желтка с отображением взаимодействия со сперматозоидами (стрелка) 15-й день после осеменения (25й день сбора яиц) (увеличение x200); а – ЛКС-контроль; б – ЛКС-T20

Было установлено, что функциональные характеристики оттаянных сперматозоидов и их сохранность в половом тракте кур значительно различались под влиянием состава криозащитной среды: число взаимодействий сперматозоидов с вителлиновой мембраной в расчете на 1см<sup>2</sup> на 5й день (15й день сбора яиц) от последнего осеменения составило 13,7 шт./см<sup>2</sup> (ЛКС-контроль) и 461,5 шт./см<sup>2</sup> (ЛКС-T20). Особо отмечено, что на 15й от последнего осеменения (25й день сбора яиц) при использовании среды ЛКС-контроль точки взаимодействия с вителлиновой мембраной желтка не наблюдались, а при использовании ЛКС-T20 их количество составило 345,2 шт./см<sup>2</sup> (p < 0,001).

#### ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Результаты, проведенных исследова-

ний доказали эффективность использования дисахарида трегалозы в качестве компонента криозащитного разбавителя для семени петухов. Использование трегалозы в концентрации 9,5 mM позволило получить показатель оплодотворенности яиц 86,0% против 79,0% в контроле (p < 0,05). Функциональная полноценность оттаянных сперматозоидов в половом тракте кур при использовании ЛКС-T20 сохраняется в течение 15 дней – оплодотворенность яиц 15,0%. Для сравнения: при использовании ЛКС-контроль – оплодотворенных яиц в опыте не зарегистрировано. Показатель оплодотворенности яиц на приемлемом для оттаянного семени уровне 50% сохранялся до 10-го дня (20-й день сбора яиц) от последнего осеменения при использовании среды ЛКС-

T20. Таким образом, использование трегалозы в составе криозащитного разбавителя ЛКС-T20 позволяет поддерживать функциональные характеристики оттаянных сперматозоидов в половом тракте кур в течение 2-х недель от последнего осеменения.

Полученный высокий уровень оплодотворенности яиц при использовании трегалозы в составе разбавителя для криоконсервации семени петухов в сочетании с методом криоконсервации в гранулах, подтверждает целесообразность использования трегалозы. Разрабатываемая технология сохранения репродуктивного материала на домашнем виде птиц *Gallus gallus* может, вероятно, успешно применяться и при сохранении диких видов, находящихся в зоне риска исчезновения.

#### COMPARATIVE EFFECTIVENESS OF CRYOPROTECTIVE MEDIA FOR ROOSTER SEMEN

Silyukova Y.L. – Junior Researcher, Laboratory of Genetics, Breeding and Conservation of the Genetic Resources of Farm Birds; Stanishevskaya O.I. – Dr. Habil (Biol. Sci.), Head of the laboratory of genetics, breeding and conservation of poultry genetic resources.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry

\*svadim33@mail.ru

*This research was carried out with the support of the Russian Science Foundation, project No. 19-16-00009P.*

#### ABSTRACT

The preservation and use of frozen/thawed male sperm is important for maintaining the biodiversity of poultry and will eventually play an important role in breeding, allowing greater flexibility in breeding programs. This use of thawed semen is advisable only at a high level of its fertilizing ability. Trehalose is a promising natural component in cryoprotective media for rooster semen due to its exceptional ability to neutralize cold stress. The purpose of the

study was to determine the effectiveness of using trehalose as part of a medium for cryopreservation of rooster semen based on the Russian development - Leningrad cryoprotective medium (LCM-control). The composition of the LCM-T20 experimental medium with the addition of trehalose at a concentration of 9.5 mM has been developed. The mobility indicators of thawed rooster semen (Rhode Island Red breed, ♂n=10) did not differ significantly depending on the composition of the medium. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were obtained in terms of egg fertilization: 86.0% when using the LCM-T20 medium and 79.0% using LCM-control and in assessing the state of the vitelline membrane of the egg yolk ( $p < 0.001$ ). The fertilization rate of eggs at a level acceptable for thawed semen of 50% was maintained until the 10th day (20th day of egg collection) from the last insemination when using the LKS-T20 medium. The functional usefulness of thawed sperm was maintained for 15 days (the 25th day of egg collection) from the last insemination when using the LCM-T20 media - egg fertilization was 15.0%, the average number of points of interaction of sperm with the vitelline membrane of the egg yolk was 345.2 pcs/cm<sup>2</sup>. When using the LCM-control diluent, the functional ability of thawed spermatozoa was absent during the same control periods. The achieved high level of egg fertilization when trehalose was included in the cryoprotective diluent in combination with the method of freezing rooster semen in pellets confirms the feasibility of introducing the LCM-T20 diluent into the technology for preserving the genetic diversity of local and indigenous breeds of chickens using in vitro methods.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Rakha B. A. et al. Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) // *Theriogenology*. – 2018. – Т. 122. – С. 61-67.
2. Nguyen T. M. D., Grasseau I., Blesbois E. New insights in the AMPK regulation in chicken spermatozoa: Role of direct AMPK

- activator and relationship between AMPK and PKA pathways // *Theriogenology*. – 2019. – Т. 140. – С. 1-7.
3. Long J.A. Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on post-thaw sperm function / J.A. Long, D.C. Bongalhardo, J. Pelaéz, S. Saxena, P. Settar, N.P. O'Sullivan, J.E. Fulton // *Poultry Science*. – 2010. – V. 89(5). – P. 966–973. doi:10.3382/ps.2009-00227.
4. Seigneurin F., Blesbois E. Update on semen cryopreservation methods in poultry species. / F. Seigneurin, E. Blesbois // *Proceedings of the XIIIth European Poultry Conference*. — 2010. – P. 172.
5. Blesbois E. Semen Cryopreservation for ex situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank / E. Blesbois, F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerelle, P. Rault, M. Tixier-Boichard // *Poultry Science*. – 2007. – V. 86(3). – P. 555-564. doi: 10.1093/ps/86.3.555
6. Ciftci Y., Aygun A. Poultry semen cryopreservation technologies / Y. Ciftci, A. Aygun // *World's Poultry Science Journal*. – 2018. – V. 74(4). – P. 1-11. doi:10.1017/s0043933918000673.
7. Blanco J. M. et al. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Effects of freezing and thawing rates on turkey and sandhill crane sperm cryosurvival // *Animal Reproduction Science*. – 2012. – Т. 131. – №. 1-2. – С. 1-8.
8. Fulton J.E. Avian genetic stock preservation: an industry perspective / J.E. Fulton // *Poultry Science*. – 2006. – V. 85. – P. 227–231.
9. Silyukova Yu.L. The influence membranes damage and activity of rooster's sperm on the fertilization of eggs when using cured cryopreserved sperm / Yu.L. Silyukova, N.V. Pleshanov, O.I. Stanishevskaya // *Reproduction in Domestic Animals*. — 2019. — Т. 54. — № S3. — P. 101.
10. Mosca F. Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm / F. Mosca, M. Madeddu, A.A. Sayed, L. Zaniboni, N. Iaffaldano, S. Cerolini // *Data in Brief*. – 2019. – V. 9. – P. 1118-1121. doi: 10.1016/j.dib.2016.11.059.
11. Thananurak P., Chuaychu-noo N., Vongpralub T. Freezability and fertility of Thai native chicken semen in different diluents // *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. – 2017. – Т. 47. – №. 4. – С. 551-556.
12. Sciarretta S. et al. Trehalose-induced activation of autophagy improves cardiac remodeling after myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2018. – Т. 71. – №. 18. – С. 1999-2010.
13. Seigneurin F., Blesbois E. Update on semen cryopreservation methods in poultry species // *13. European Poultry Conference (EPC 2010)*. – French Branch of World's Poultry Science Association, 2010. – Т. 66. – №. 5.
14. Attfield P. V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response // *FEBS letters*. – 1987. – Т. 225. – №. 1-2. – С. 259-263.
15. Rabbani G., Choi I. Roles of osmolytes in protein folding and aggregation in cells and their biotechnological applications // *International journal of biological macromolecules*. – 2018. – Т. 109. – С. 483-491.
16. Paventi G. et al. The Effect of Semen Cryopreservation Process on Metabolomic Profiles of Turkey Sperm as Assessed by NMR Analysis // *Biology*. – 2022. – Т. 11. – №. 5. – С. 642.
17. Rao W. et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant // *ACS applied materials & interfaces*. – 2015. – Т. 7. – №. 8. – С. 5017-5028.
18. Феофилова Е. П. и др. Трегалоза: особенности химического строения, биологические функции и практическое значение // *Микробиология*. – 2014. – Т. 83. – №. 3. – С. 271-271.
19. Jing H. et al. Lipid flip-flop and desorption from supported lipid bilayers is independent of curvature // *PLoS One*. – 2020. – Т. 15. – №. 12. – С. e0244460.
20. Mosca F. et al. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on

the quality of frozen/thawed chicken sperm // *Cryobiology*. – 2016. – Т. 73. – №. 3. – С. 343-347.

21. Целютин К.В., Тур Б.К. Искусственное осеменение и криоконсервация спермы сельскохозяйственной птицы (петухи, индюки, гусаки, селезни) / К.В. Целютин, Б.Л. Тур // СПб-Пушкин. – 2013. – с. 87.

22. Burrows W. H., Quinn J. P. A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl // *Poultry Science*. – 1935. – Т. 14. – №. 4. – С. 251-253.

23. Stanishvskaya O. Effects of saccharides supplementation in the extender of cryopreserved rooster (*Gallus domesticus*) semen on the fertility of frozen/thawed spermatozoa / O. Stanishvskaya, Y. Silyukova, N. Pleshanov, A. Kurochkin, E. Fedorova, Z. Fedorova, O. Perinek, A. Prituzhalova, I. Meftakh // *Animals*. — 2021. — Т. 11. — № 1. — P. 1-9.

24. Bakst M. The inner perivitelline layer sperm hole assay: Use of filter paper rings for the isolation of the perivitelline layer overlying the germinal disc and new observations on its morphology / M. Bakst, J. Eastridge, I. Malecki // *Journal of Applied Poultry Research*. - 2014. - V. 23. – P. 121-128. doi: 10.3382/japr.2013-00873.

#### REFERENCES

1. Rakha B. A. et al. Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) // *Theriogenology*. – 2018. – Vol. 122. – pp. 61-67.

2. Nguyen T. M. D., Grasseau I., Blesbois E. New insights in the AMPK regulation in chicken spermatozoa: Role of direct AMPK activator and relationship between AMPK and PKA pathways // *Theriogenology*. – 2019. – Vol. 140. – pp. 1-7.

3. Long J.A. Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on post-thaw sperm function / J.A. Long, D.C. Bongalhardo, J. Pelaéz, S. Saxena, P. Settar, N.P. O'Sullivan, J.E. Fulton // *Poultry Science*. – 2010. – V. 89(5). – P. 966–973. doi:10.3382/ps.2009-00227.

4. Seigneurin F., Blesbois E. Update on semen cryopreservation methods

in poultry species. / F. Seigneurin, E. Blesbois // *Proceedings of the XIIIth European Poultry Conference*. — 2010. – P. 172.

5. Blesbois E. Semen Cryopreservation for ex situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank / E. Blesbois, F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerelle, P. Rault, M. Tixier-Boichard // *Poultry Science*. – 2007. – V. 86(3). – P. 555-564. doi: 10.1093/ps/86.3.555

6. Ciftci Y., Aygun A. Poultry semen cryopreservation technologies / Y. Ciftci, A. Aygun // *World's Poultry Science Journal*. - 2018. – V. 74(4). – P. 1-11. doi:10.1017/s0043933918000673.

7. Blanco J. M. et al. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Effects of freezing and thawing rates on turkey and sandhill crane sperm cryosurvival // *Animal Reproduction Science*. – 2012. – Vol. 131. – no. 1-2. – pp. 1-8.

8. Fulton J.E. Avian genetic stock preservation: an industry perspective / J.E. Fulton // *Poultry Science*. – 2006. – V. 85. – P. 227–231.

9. Silyukova Yu.L. The influence membranes damage and activity of rooster's sperm on the fertilization of eggs when using cured cryopreserved sperm / Yu.L. Silyukova, N.V. Pleshanov, O.I. Stanishvskaya // *Reproduction in Domestic Animals*. — 2019. — Vol. 54. — No. S3. — P. 101.

10. Mosca F. Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm / F. Mosca, M. Madeddu, A.A. Sayed, L. Zaniboni, N. Iaffaldano, S. Cerolini // *Data in Brief*. – 2019. – V. 9. – P. 1118-1121. doi: 10.1016/j.dib.2016.11.059.

11. Thananurak P., Chuaychu-noo N., Vongpralub T. Freezability and fertility of Thai native chicken seeds in different diluents // *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. – 2017. – Vol. 47. – No. 4. – pp. 551-556.

12. Sciarretta S. et al. Trehalose-induced activation of autophagy improves cardiac remodeling after myocardial infarction // *Journal of the American College of Cardiol-*

- ogy. – 2018. – Vol. 71. – no. 18. – P. 1999-2010.
13. Seigneurin F., Blesbois E. Update on semen cryopreservation methods in poultry species //13. European Poultry Conference (EPC 2010). – French Branch of World's Poultry Science Association, 2010. – Vol. 66. – no. S.
14. Attfield P. V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response // FEBS letters. – 1987. – Vol. 225. – no. 1-2. – pp. 259-263.
15. Rabbani G., Choi I. Roles of osmolytes in protein folding and aggregation in cells and their biotechnological applications // International journal of biological macromolecules. – 2018. – Vol. 109. – pp. 483-491.
16. Paventi G. et al. The Effect of Semen Cryopreservation Process on Metabolomic Profiles of Turkey Sperm as Assessed by NMR Analysis //Biology. – 2022. – Vol. 11. – No. 5. – p. 642.
17. Rao W. et al. Nanoparticle-mediated intracellular delivery enables cryopreservation of human adipose-derived stem cells using trehalose as the sole cryoprotectant //ACS applied materials & interfaces. – 2015. – Vol. 7. – No. 8. – pp. 5017-5028.
18. Feofilova E. P. et al. Trehalose: features of chemical structure, biological functions and practical significance //Microbiology. – 2014. – Vol. 83. – No. 3. – pp. 271-271.
19. Jing H. et al. Lipid flip-flop and desorption from supported lipid bilayers is independent of curvature //PLoS One. – 2020. – Vol. 15. – no. 12. – p. e0244460.
20. Mosca F. et al. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm //Cryobiology. – 2016. – Vol. 73. – No. 3. – pp. 343-347.
21. Tselyutin K.V., Tur B.K. Artificial insemination and cryopreservation of sperm of poultry (roosters, turkeys, geese, drakes) / K.V. Tselyutin, B.L. Tur // St. Petersburg-Pushkin. – 2013. – S. 87.
22. Burrows W. H., Quinn J. P. A method of acquiring spermatozoa from the domestic fowl //Poultry Science. – 1935. – Vol. 14. – No. 4. – pp. 251-253.
23. Stanishevskaya O. Effects of saccharides supplementation in the extender of cryopreserved rooster (*Gallus domesticus*) semen on the fertility of frozen/thawed spermatozoa / O. Stanishevskaya, Y. Silyukova, N. Pleshanov, A. Kurochkin, E. Fedorova, Z. Fedorova, O. Perinek, A. Prituzhalova, I. Meftakh // Animals. — 2021. — Vol. 11. — No. 1. — P. 1-9.
24. Bakst M. The inner perivitelline layer sperm hole assay: Use of filter paper rings for the isolation of the perivitelline layer overlying the germinal disc and new observations on its morphology / M. Bakst, J. Eastridge, I. Malecki // Journal of Applied Poultry Research. - 2014. - V. 23. - P. 121-128. doi: 10.3382/japr.2013-00873.