СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ. ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

DOI: 10.32786/2071-9485-2020-04-28

EFFICIENCY OF USING THE COMBINATION OF SUGARS IN THE DILUENT FOR CRYOPRESERVATION OF ROOSTERS SPERM

Y.L. Silyukova, O.I. Stanishevskaya

*All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Breeding of Agricultural Animals – branch of
the Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst,
St. Petersburg, Russia*

Received 12.08.2020

Submitted 25.11.2020

*The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science
and Higher Education, on the science project № AAAA-A18-118021590132-9.*

Summary

A new composition of the extender for cryopreservation of roosters sperm has been approved. The biological substantiation of the selection of the experimental composition of the diluent is presented. The final results on the use of the experimental breaker reflect its effectiveness and make it possible to recommend it for use in freezing male sperm for long-term storage of samples of genetic material of roosters reproductive cells in cryobanks.

Abstract

Introduction. When creating a cryobank of reproductive cells of rare and endangered chicken breeds, not only as their samples, but also as an insurance fund for sperm with possible use for industrial purposes, it is necessary to increase the fertility potential of the spermatozoa of the laid sperm. One of the ways to increase the fertility of frozen / thawed sperm is the modernization of media for cryopreservation of male sperm. **Materials and methods.** In the course of the study, cocks (n = 10) and chickens (n = 30) of the Russian White breed from the «Genetic collection of rare and endangered chicken breeds» of All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Breeding of Agricultural Animals, were used. The test component of experimental media for cryopreservation of male sperm was determined to be maltose with replacement of the fructose component by 10% and 20% of the control medium. Artificial insemination and incubation of eggs was carried out to determine the fertility of frozen / thawed male sperm. **Results and Conclusions.** In the M-LKS10 and M-LKS20 groups with the use of maltose as a component of the medium for sperm cryopreservation, a significant increase in the level of egg fertilization was noted. The maximum percentage of egg fertilization of 92.6% was obtained from the frozen sperm using the experimental composition M-LKS10, which is 17.9% higher than in the control group. **Conclusions.** The results of the presented studies demonstrate an increase in the total percentage of egg fertilization when using frozen / thawed sperm in the M-LCS10 (92.6%) and M-LCS20 (86.3%) groups compared with the LCS control group (74.7%) and long-term stability of the level of fertilization of eggs.

Key words: chickens, sperm, spermatozoa, cryopreservation, cryobank, media, saccharides, motility, fertility, artificial insemination.

Citation. Siluykova Y.L., Stanishevskaya O.I. Efficiency of using the combination of sugars in thinners for cryopreservation of roosters sperm. *Proc. of the Lower Volga Agro-University Comp.* 2020. 0(00). 280-290 (in Russian). DOI: 10.32786/2071-9485-2020-04-28

Author's contribution. All authors of this study were directly involved in the planning, execution or analysis of this study. All authors of this article have read and approved the submitted final version.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

УДК 636.4.087.8:615

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМБИНАЦИИ САХАРИДОВ

В РАЗБАВИТЕЛЕ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ СЕМЕНИ ПЕТУХОВ

Ю. Л. Силукова

О. И. Станишевская, доктор биологических наук

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения
сельскохозяйственных животных - филиал Федерального государственного
бюджетного научного учреждения Федеральный научный
центр животноводства – ВИЖ им. Л. К. Эрнста, г. Санкт Петербург*

Дата поступления в редакцию 12.08.2020

Дата принятия к печати 25.11.2020

**Работа проведена в рамках выполнения научных исследований Министерства науки и
высшего образования РФ по теме № АААА-А18-118021590132-9**

Актуальность. При создании криобанка репродуктивных клеток редких и исчезающих пород кур не только как их образцов, но и как страховой фонд семени с возможным использованием в производственных целях необходимо повысить потенциал фертильности сперматозоидов закладываемого семени. Одним из направлений повышения фертильности заморожено/оттаянного семени является модернизация сред для криоконсервации семени петухов. **Материалы и методы.** В ходе исследования использованы петухи (n=10) и куры (n=30) русской белой породы «Генетической коллекции редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ. Испытуемым компонентом экспериментальных сред для криоконсервации семени петухов определен состав среды с замещением компонента фруктозы на мальтозу в процентном соотношении 10 % и 20 % от контрольной среды. Проведено искусственное осеменение и инкубирование яиц для определения фертильности заморожено/оттаянного семени петухов. **Результаты и выводы.** В группах М-ЛКС10 и М-ЛКС20 с использованием мальтозы в качестве компонента среды для криоконсервации семени отмечено существенное повышение уровня оплодотворенности яиц. Максимальный процент оплодотворенности яиц 92,6 % был получен от семени, замороженного с использованием экспериментального состава М-ЛКС10, что на 17,9 % выше, чем в контрольной группе. **Выводы.** Результаты представленных исследований демонстрируют повышение общего процента оплодотворенности яиц при использовании заморожено/оттаянного семени у групп М-ЛКС10 (92,6 %) и М-ЛКС20 (86,3 %) по сравнению с группой ЛКС-контроль (74,7 %) и продолжительную стабильность уровня оплодотворенности яиц.

Ключевые слова: сперма петухов, сперматозоиды, криоконсервация спермы петухов, криобанки, искусственное осеменение птицы.

Цитирование. Силукова Ю. Л., Станишевская О. И. Эффективность использования комбинации сахаридов в разбавителе для криоконсервации семени петухов. *Известия НВ АУК*. 2020. 4(60). 280-290. DOI: 10.32786/2071-9485-2020-04-28

Авторский вклад. Все авторы настоящего исследования принимали непосредственное участие в планировании, выполнении или анализе данного исследования. Все авторы настоящей статьи ознакомились и одобрили представленный окончательный вариант.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение. Криоконсервация семени является важным, широко используемым методом длительного хранения репродуктивных клеток самцов. Однако эффективность этого метода в птицеводстве не столь высока по сравнению с другими отраслями животноводства, где данный метод практически применяется для генетического улучшения пород. Поиск новых эффективных концепций и протоколов в криоконсервации семени петухов позволит создавать криобанки генетического материала не только как образцов редких и исчезающих пород, но и как рабочие резервно-страховые хранилища репродуктивных клеток [5, 15]. Криоконсервация вызывает много неблагоприятных изменений в сперматозоидах, которые могут привести к повреждению клеток и снизить

качество спермы, а также вызывать тотальную гибель клеток. А именно: происходят частично необратимые повреждения морфологических структур клетки, нарушения структуры органелл, изменения ряда биохимических процессов и ее надмембранной структуры – плотный углеводный слой (гликокаликса) [22]. Все перечисленные изменения сперматозоида и его эпигенетические модификации, связанные с метилированием ДНК, модификация гистонов, клеточных параметров, включая целостность мембраны, стабильность ДНК, активность митохондрий, являются основными причинами снижения подвижности и фертильности сперматозоидов в процессе замораживания-оттаивания [6].

Сохранение функциональной способности сперматозоидов семени птиц после размораживания зависит от многих факторов. К ним относятся видовая принадлежность, породные особенности, композиционный состав среды для замораживания (различающийся компонентами и криопротекторами), используемые процедуры уравнивания (balancing) спермы, также протоколы замораживания и оттаивания. Также общепризнанно, что одним из критериев успешной криоконсервации сперматозоидов является стартовое качество свежей спермы [21].

Для получения высоких результатов заморожено/оттаянного семени петухов необходимо предотвратить повреждения, вызываемые кристаллизацией воды во время замораживания семени. Образование внутриклеточных кристаллов льда, особенно трехвекторная форма кристаллизации [4, 11], является одной из весомых причин гибели клеток, а его предотвращение способствует выживанию клеток. Кроме того, исследователи разрабатывают пути повышения фертильности заморожено/оттаянного семени не только через протоколы замораживания и оттаивания (fast/slow), но и за счет подбора оптимальных сред для криоконсервации семени. В основном действие компонентов можно определить по следующим направлениям: антиоксиданты – нейтрализуют воздействие накопленного активного кислорода на клетки (l-carnitine, эллаговая кислота, аминокислоты цистеамин, эрготионеин, серин, каталаза) [9, 19, 20, 25]; энергетические компоненты (сахариды) – поддерживают функциональность спермиев за счет облегчения доступности их питания [23] и усиливают конструкцию гликокаликса [22]. Дегидратационная функция групп компонентов позволяет оптимизировать внутриклеточное осмотическое давление (сахариды, гиалуроновая кислота) [17]. Есть еще много различных вариантов составления композиций среды для криоконсервации семени, которые требуют изучения их эффективности. Протокол криоконсервации репродуктивных клеток подразумевает обязательное применение агентов-криопротекторов, различающихся по своему действию на эндо- и экзоцеллюлярные [7, 14], также используются криопротекторы комбинированного действия. Как правило, используются комбинации криопротекторов как непосредственно при создании криопротекторных сред, так и в сочетании с внешними криоагентами – глицерином, диметилсульфоксидом, диметилацетамидом [8, 10].

В большинстве случаев для замораживания семени петухов в качестве среды используются коммерческие среды Lake's (1978), Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) [10] и ВНИИГРЖ (Патент №2482816, 2013) для разбавления нативного семени, с добавлением необходимых компонентов. По многочисленным литературным данным, различное сочетание невосстанавливающих и восстанавливающих сахаров может обеспечить лучшую защиту семени в процессе замораживания/оттаивания [12]. На различных видах животных изучены сочетания фруктозы, галактозы, глюкозы, ксилозы (моносахариды), лактозы, трегалозы, мальтозы, сахарозы (дисахариды). Растительные полисахариды обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, способствуют жизнеспособности клеток [24]. Исходя из ли-

тературных данных была выбрана мальтоза, как дисахарид растительного происхождения, в качестве компонента среды для криоконсервации при проведения собственных исследований. Мальтоза в данном перечне практически не изучена в составе разбавителя для семени петухов, но ее потенциальное положительное действие на других видах животных показано [13, 18].

Задачей эксперимента было сравнить эффективность различных концентраций испытуемого компонента мальтозы на основе стандартного разбавителя LKS [3] для замораживания семени петухов возраста 44-46 недель жизни и уровень оплодотворенности яиц при осеменении кур заморожено/оттаянным семенем с использованием экспериментальных разбавителей для криоконсервации семени петухов.

Материалы и методы. *Содержание поголовья и оценка семени петухов.*

В опыте использовано поголовье петухов породы русская белая ($\delta n=10$), в возрасте 44-46 недель жизни, содержащихся в индивидуальных клетках. Экспериментальное поголовье содержалось в соответствии с условиями, принятыми в «Генетической коллекции редких и исчезающих пород кур» ВНИИГРЖ.

Сперму собирали квалифицированные специалисты, попадание загрязнений в эякуляты было исключено или сведено до минимума. Сперму получали два раза в неделю путем абдоминального массажа (Buttows & Quinn) в стеклянные пенициллиновые флаконы объемом 10 мл. Каждый полученный эякулят оценивался индивидуально макроскопически (объем эякулята, консистенция, запах, цвет семени) и микроскопически, использовали такие характеристики, как концентрация сперматозоидов (млрд/мл) (Accuread Photometer, IMV Technologies, UK), их подвижность (%) и степень агглюцинации (%) (Микромед MS-12, Россия). Дней сбора и замораживания спермы – 4. Всего оценено 40 эякулятов. Эякуляты объединяли для устранения индивидуальной изменчивости и делили на 3 части, в соответствии с планом эксперимента.

Состав среды для криоконсервации семени петухов. В состав среды ЛКС-контроль [3], экспериментальных М-ЛКС10 и М-ЛКС20 для замораживания семени петухов на 100 мл дистиллированной воды включены следующие компоненты:

Таблица 1 – Состав среды для криоконсервации семени петухов

Table 1 – Composition of the medium for cryopreservation semen of roosters

Наименование компонента / Component name	ЛКС-контроль / LKS-control		М-ЛКС10 / M-LKS10		М-ЛКС20 / M-LKS20	
	масса, г / weight, g	кол-во вещества / amount of sub- stance	масса, г / weight, g	кол-во вещества/ amount of substance	масса, г / weight, g	кол-во вещества/ amount of substance
глутамат натрия / monosodium glutamate	1,92	114 mM	1,92	114 mM	1,92	114 mM
фруктоза / fructose	0,8	44 mM	0,72	40 mM	0,64	36 mM
мальтоза / maltose	-	-	0,166	4,8 mM	0,326	9,5 mM
ацетат калия / potassium acetate	0,5 г	51 mM	0,5	51 mM	0,5	51 mM
поливинилпирролидон / polyvinylpyrrolidone	0,3	8,3 μ M	0,3	8,3 μ M	0,3	8,3 μ M
протамин сульфат / pro- tamine sulfate	0,032	3,27 μ M	0,032	3,27 μ M	0,032	3,27 μ M

Замораживание и оттаивание семени. Разбавленное семя было поставлено на эквilibрацию при температуре 5 °C на 40 минут. После охлаждения добавляли диметилацетамид (DMA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) в конечной концентрации 6 %. Затем семя вновь экспонировалось при температуре 5 °C в течение 1 минуты. Замораживание проводили в гранулах путем накапывания семени на поверхность азота из пипетки Пастера; стартовую температуру охлаждения семени в пипетке Пастера контролировали с помощью термopары (THERM 2420, ANLBORN, Germany), и она составляла -15 ... -20 °C. Скорость достижения гранулы поверхности азота составляла ~ 1,4 шт./с. Оттаивание проводили с помощью щелевого оттаивателя (разработка ВНИИ-ГРЖ, 1989) при температуре 60 °C.

Оценка заморожено/оттаянного семени. Анализ общей подвижности сперматозоидов после оттаивания проводился с помощью системы Axio Imager (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany, x200). Каждый образец оценивался дважды. Во внимание были приняты средние значения.

Искусственное осеменение. В эксперименте были использованы виргинные куры породы русская белая (n=30) в возрасте 48-50 недель жизни, по 10 кур в каждой экспериментальной группе. Куры осеменялись интравагинально по схеме: 2 дня подряд, затем через каждые два дня; доза осеменения составляла 0,04-0,07 мл, количество сперматозоидов с прогрессивным движением было не менее 70-80 млн в каждой дозе осеменения. Осеменение проводили после 14.00 часов. Всего осеменяли 5 дней. Сбор яиц осуществляли через день после 1-го дня осеменения в течение 11 дней. Яйца (n=239) инкубировали в течение 6 дней.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных использовались программные приложения Excel 2013 (Microsoft, США) и Statistica 7.0 (StatSoft, США). Данные были представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение. Различия между выборками оценивали по методу Стьюдента, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. *Оценка нативного и заморожено/оттаянного семени.* Индивидуальная оценка нативного семени по макроскопическим параметрам качества показала пригодность в соответствии с ГОСТ 27267-87 «Сперма петухов и индюков неразбавленная свежеполученная» [2]. Лимиты показателя прогрессивной подвижности свежеполученного семени составляли от 80 % до 85 % (таблица 2) сперматозоидов с прямолинейно поступательным движением. Объем индивидуальных эякулятов в различные дни варьировал от 0,3 мл до 1,1 мл; концентрация сперматозоидов составляла не менее 3,1 млрд/мл и агглюцинация сперматозоидов составляла на более 10 %.

Оценка прогрессивной подвижности заморожено/оттаянного семени между контролем и экспериментальными группами достоверно не различалась, лимиты показателя прогрессивной подвижности составили от 45 % до 50 % в зависимости от дня получения и замораживания семени.

Оплодотворенность яиц. Для оценки различий в функциональном состоянии заморожено/оттаянного семени между контролем и испытуемыми средами было использовано искусственное осеменение кур с последующей инкубацией яиц. Показатели оплодотворенности яиц (таблица 2) различались в зависимости от используемого состава разбавителя для криоконсервации семени петухов. В группах М-ЛКС10 и М-ЛКС20 с использованием мальтозы в качестве компонента среды для криоконсервации семени отмечено существенное повышение уровня оплодотворенности яиц. Максимальный процент оплодотворенности яиц 92,6 % был получен от семени, замороженного с использованием экспериментального состава М-ЛКС10, что на 17,9 % выше, чем в

контрольной группе. Но следует отметить, что при визуальной микроскопической оценке заморожено/оттаянного семени между контрольной и экспериментальными группами различий по показателю активности и процентом сперматозоидов с прямолинейно поступательным движением выявлено не было.

Таблица 2 – Оплодотворенность яиц в зависимости от состава разбавителя, использованного для криоконсервации семени петухов (за 11 дней сбора яиц)

Table 2 – Fertility of eggs depending on the composition of the diluent used for cryopreservation semen of roosters (for 11 days of eggs collection)

Группа / Group	п, эяку- лятов / n, ejaculate	Лимиты пока- зателя прогрес- сивной по- движности на- тивного семе- ни, % / Limits of the native semen progressive mo- tility indicator, %	п, доз осемене- ния / n, insemina- tion doses	Лимиты показате- ля прогрессивной подвижности за- морожено / отта- янного семени, % / Frozen/thawed semen progressive motility indicator limits, %	Проинку- бировано яиц, шт. / Incubated eggs, pcs.	Оплодо- творен- ность яиц, % / Fertility of eggs, %
ЛКС-контроль / LKS-control	40	80-85	110	40-50	83	74,7
М-ЛКС10 / M-LKS10		80-85	110	40-50	81	92,6
М-ЛКС20 / M-LKS20		80-85	110	40-50	75	86,3

Рисунок 1 – Кривая показателя оплодотворенности яиц в экспериментальных и контрольной группах за каждый день сбора. Последний день осеменения – 6. (Группа М-ЛКС10 яиц n=81; группа М-ЛКС20 яиц n=75; группа ЛКС-контроль яиц n=83)

Figure 1 – Curve of the fertility rate of eggs in the experimental and control groups for each day of collection. The last day of insemination is 6. (Group M-LKS10 eggs n = 81; group M-LKS20 eggs n = 75; group LKS control eggs n = 83)

Оплодотворенность яиц более 85 % сохранялась непрерывно в группе М-ЛКС10

с 4 по 11 день сбора яиц, в группе М-ЛКС20 с 4 по 10 день и в контрольной группе ЛКС-контроль устойчивого значения не наблюдалось и лишь на 5, 7, 9 и 10-й день значения оплодотворенности яиц превышали 85 % (рисунок 1).

Обсуждение. Анализ литературных источников показал, что мальтоза не применялась в качестве компонента среды для криоконсервации семени петухов. По данным, представленным по другим видам животных, мальтоза показывала разную степень эффективности. Мальтоза при добавлении ее в разбавитель для нативного семени петухов не включается в углеводный обмен сперматозоидов [16], что позволяет предположить ее роль в усилении гликокаликса, который является прогрессивной эволюционной клеточной структурой, обеспечивающей возможность специфических клеточных приспособлений к определенному температурному, химическому и другим паратипическим воздействиям [1].

В нашем эксперименте не ставилась задача исследовать клеточные механизмы влияния состава экспериментальных сред на жизнеспособность сперматозоидов, но некоторые гипотезы могут быть предложены. Мальтоза и фруктоза в составе представленных опытных сред (М-ЛКС10 и М-ЛКС20) в сочетании по протоколу замораживания с диметилацетамидом, по своему воздействию на защитные свойства клетки при низкотемпературном воздействии представляют комбинацию трех криопротекторов проникающего и непроникающего действия. Фруктоза как незначительная молекулярная единица свободно проникает в плазму клетки и функционирует и как энергетическая структура, и как компонент, снижающий осмотическую нагрузку на мембрану клетки в процессе замораживания/оттаивания. Мальтоза, по нашему предположению, фиксируется на надмембранной оболочке (гликокаликсе) клетки, тем самым создавая более прочный углеводный каркас, защищающий клетку от холодовых ударов и предупреждает его разрушение. Вся эта система компонентов позволяет максимально снизить негативное воздействие криоконсервации на сперматозоиды и поддерживать их функциональность в половом тракте курицы после оттаивания, так как целостность гликокаликса является критическим для взаимодействия с гаметам курицы [22]. Эта гипотеза подтверждается результатами наших исследований.

Выводы. Результаты представленных исследований демонстрируют повышение общего процента оплодотворенности яиц при использовании заморожено/оттаянного семени у групп М-ЛКС10 (92,6 %) и М-ЛКС20 (86,3 %) по сравнению с группой ЛКС-контроль (74,7 %) и продолжительную стабильность уровня оплодотворенности яиц. Это позволит в дальнейшем сократить кратность осеменений.

Таким образом, впервые продемонстрировано применение дисахарида мальтоза в качестве компонента среды для криоконсервации семени петухов на основе специализированной среды для криоконсервации семени петухов LKS.

Библиографический список

1. Образование гликокаликса, создание термоизоляционных покровов организма: справочник. https://spravochnick.ru/biologiya/obrazovanie_glikokaliksa_sozdanie_thermoizolyacionnyh_pokrovov_organizma/#sozdanie-teploizolyacionnyh-pokrovov-organizma (дата обращения 31.07.2020).
2. Сперма петухов и индюков неразбавленная свежеполученная: ГОСТ 27267-2017. Технические требования и методы испытаний. Введ. 20.06.17. М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 2017. 7 с.
3. Целютин К. В., Тур Б. К. Искусственное осеменение и криоконсервация спермы сельско-

хозяйственной птицы (петухи, индюки, гусаки, селезни). Санкт-Петербург-Пушкин, 2013. 88 с.

4. Askarianzadeh Z., Sharafi M., Torshizi M. A. K. Sperm quality characteristics and fertilization capacity after cryopreservation of rooster semen in extender exposed to a magnetic field // *Animal Reproduction Science*. 2018. № 198. P. 37-46.

5. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources / A. Thélie [et al.] // *Poultry Science*. –2018. № 98. P. 447-455.

6. Cryopreservation of rooster semen: Evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm / M. Salehi [et al.] // *Theriogenology*. 2020. № 142. P. 15-25.

7. Cryopreservation of turkey spermatozoa without permeant cryoprotectants / A. Gloria [et al.] // *Animal Reproduction Science*. 2019. № 211. P. 106-218.

8. Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm / F. Mosca [et al.] // *Data Brief*. 2016. № 9. P. 1118-1121.

9. Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm / P. Thananurak [et al.] // *Poultry Science*. 2020. № 99(2). P. 1185-1198.

10. Dimetilacetamida associada ou não ao glicerol para criopreservação de sêmen ovino. [Dimethylacetamide associated or not to glycerol for criopreservation of sheep semen] / G.F.O. Menezes [et al.] // *Ciência Anim Brasileir*. 2018. № 19(e-48026).

11. Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization / J. Huebinger [et al.] // *Biophysical Journal*. 2016. № 110. P. 840-849.

12. Disaccharide combinations and the expression of enolase3 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform in sturgeon sperm cryopreservation / M. D. Xi [et al.] // *Reproduction Domestic Animals*. 2018. № 53(2). P. 472-483.

13. Disaccharide supplementation of extenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon / K. Golshahi [et al.] // *Aquaculture*. 2018. № 486. P. 261-265.

14. Donoghue A. M., Wishart G. J. Storage of poultry semen // *Animal Reproduction Science*. 2000. № 62. P. 213-232.

15. Finding an Effective Freezing Protocol for Turkey Semen: Benefits of Ficoll as Non-Permeant Cryoprotectant and 1:4 as Dilution Rate / M. Di Iorio [et al.] // *Animals*. 2020. № 10(3). P. 421.

16. Harris C. C., Wilcox F. H. The Carbohydrate Metabolism of Chicken Semen // *Poultry Science*. 1962. № 41(2). P. 409-416.

17. Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster / S. Lotfi [et al.] // *Animal Reproduction Science*. 2017. № 184. P. 204-210.

18. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing / C. Yildiz [et al.] // *Theriogenology*. 2000. № 54(40). P. 579-585.

19. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm / A. Fattah [et al.] // *Cryobiology*. 2017. № 74. P. 148-153.

20. Lycopene-loaded nanoliposomes improve the performance of a modified Beltsville extender broiler breeder roosters / A. Najafi [et al.] // *Animal Reproduction Science*. 2018. № 195. P. 168-175.

21. Partyka A., Łukaszewicz E., Nizański W. Flow cytometric assessment of fresh and frozen-thawed Canada goose (*Branta canadensis*) semen // *Theriogenology*. 2011. № 76(5). P. 843-850.

22. Peláez J., Long J. A. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: II. In vitro storage of Turkey semen and mobility phenotype affects the carbohydrate component of sperm membrane glycoconjugates // *Journal Andrology*. 2008. № 29(4). P. 431-439.

23. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms in contrast to raffinose / P. Thananurak [et al.] // *Poultry Science*. 2019. № 98(9). P. 4161-4171.

24. The Anti-Oxidant and Antitumor Properties of Plant Polysaccharides / R. Jiao [et al.] // *The American Journal of Chinese Medicine*. 2016. № 44(3). P. 463-488.

25. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality / M. R. Amini [et al.] // Cryobiology. 2015. № 70(3). P. 226-232.

Conclusions. The results of the presented studies demonstrate an increase in the total percentage of egg fertilization when using frozen / thawed semen in the M-LKS10 (92.6%) and M-LKS20 (86.3%) groups compared with the LKS-control group (74.7%) and long-term stability of the level of fertilization of eggs. This will further reduce the frequency of inseminations.

Thus, for the first time, the use of maltose disaccharide as a component of a medium for cryopreservation roosters' semen was demonstrated based on a specialized medium for cryopreservation roosters' semen LKS.

References

1. Obrazovanie glikokaliksa, sozdanie termoizolyacionnyh pokrovov organizma: spravochnik. https://spravochnik.ru/biologiya/obrazovanie_glikokaliksa_sozdanie_termoizolyacionnyh_pokrovov_organizma/#sozdanie-teploizolyacionnyh-pokrovov-organizma (data obrascheniya 31.07.2020).
2. Sperma petuhov i indyukov nerazbavlenaya svezhepoluchennaya: GOST 27267-2017. Tehnicheskie trebovaniya i metody ispytaniy. Vved. 20.06.17. M.: Gosstandart Rossii: Izd-vo standartov, 2017. 7 s.
3. Celyutin K. V., Tur B. K. Iskustvennoe osemenenie i krikonservaciya spermy sel'sko-hozyajstvennoj pticy (petuhi, indyuki, gusaki, selezni). Sankt-Peterburg-Pushkin, 2013. 88 s.
4. Askarianzadeh Z., Sharafi M., Torshizi M. A. K. Sperm quality characteristics and fertilization capacity after cryopreservation of rooster semen in extender exposed to a magnetic field // Animal Reproduction Science. 2018. № 198. P. 37-46.
5. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources / A. Thlie [et al.] // Poultry Science. 2018. № 98. P. 447-455.
6. Cryopreservation of rooster semen: Evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm / M. Salehi [et al.] // Theriogenology. 2020. № 142. P. 15-25.
7. Cryopreservation of turkey spermatozoa without permeant cryoprotectants / A. Gloria [et al.] // Animal Reproduction Science. 2019. № 211. P. 106-218.
8. Data on the positive synergic action of dimethylacetamide and trehalose on quality of cryopreserved chicken sperm / F. Mosca [et al.] // Data Brief. 2016. № 9. P. 1118-1121.
9. Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm / P. Thananurak [et al.] // Poultry Science. 2020. № 99(2). P. 1185-1198.
10. Dimetilacetamida associada ou no ao glicerol para criopreservao de smen ovino. [Dimethylacetamide associated or not to glycerol for criopreservation of sheep semen] / G.F.O. Menezes [et al.] // Cincia Anim Brasileir. 2018. № 19(e-48026).
11. Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization / J. Huebinger [et al.] // Biophysical Journal. 2016. № 110. P. 840-849.
12. Disaccharide combinations and the expression of enolase3 and plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform in sturgeon sperm cryopreservation / M. D. Xi [et al.] // Reproduction Domestic Animals. 2018. № 53(2). P. 472-483.
13. Disaccharide supplementation of extenders is an effective means of improving the cryopreservation of semen in sturgeon / K. Golshahi [et al.] // Aquaculture. 2018. № 486. P. 261-265.
14. Donoghue A. M., Wishart G. J. Storage of poultry semen // Animal Reproduction Science. 2000. № 62. P. 213-232.
15. Finding an Effective Freezing Protocol for Turkey Semen: Benefits of Ficoll as Non-Permeant Cryoprotectant and 1:4 as Dilution Rate / M. Di Iorio [et al.] // Animals. 2020. № 10(3). P. 421.
16. Harris C. C., Wilcox F. H. The Carbohydrate Metabolism of Chicken Semen // Poultry

Science. 1962. № 41(2). P. 409-416.

17. Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster / S. Lotfi [et al.] // *Animal Reproduction Science*. 2017. № 184. P. 204-210.

18. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing / C. Yildiz [et al.] // *Theriogenology*. 2000. № 54(40). P. 579-585.

19. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm / A. Fattah [et al.] // *Cryobiology*. 2017. № 74. P. 148-153.

20. Lycopene-loaded nanoliposomes improve the performance of a modified Beltsville extender broiler breeder roosters / A. Najafi [et al.] // *Animal Reproduction Science*. 2018. № 195. P. 168-175.

21. Partyka A., Łukaszewicz E., Niżański W. Flow cytometric assessment of fresh and frozen-thawed Canada goose (*Branta canadensis*) semen // *Theriogenology*. 2011. № 76(5). P. 843-850.

22. Peláez J., Long J. A. Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: II. In vitro storage of Turkey semen and mobility phenotype affects the carbohydrate component of sperm membrane glycoconjugates // *Journal Andrology*. 2008. № 29(4). P. 431-439.

23. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms in contrast to raffinose / P. Thananurak [et al.] // *Poultry Science*. 2019. № 98(9). P. 4161-4171.

24. The Anti-Oxidant and Antitumor Properties of Plant Polysaccharides / R. Jiao [et al.] // *The American Journal of Chinese Medicine*. 2016. № 44(3). P. 463-488.

25. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality / M. R. Amini [et al.] // *Cryobiology*. 2015. № 70(3). P. 226-232.

Информация об авторах:

Siluykova Yulia Leonidovna, junior researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Saint-Petersburg, Russia (196601, Saint-Petersburg, Pushkin, Moskovskoye sh., 55A).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1905-63730>. E-mail: svadim33@mail.ru

Stanishevskaya Olga Igorevna, Leading Researcher, Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Saint-Petersburg, Russia (196601, Saint-Petersburg, Pushkin, Moskovskoye sh., 55A)

Doctor of Biology Sciences,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9504-3916> E-mail: olgastan@list.ru

Информация об авторах:

Силукова Юлия Леонидовна, младший научный сотрудник Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (196601, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1905-63730>. E-mail: svadim33@mail.ru

Станишевская Ольга Игоревна, главный научный сотрудник, зав. отделом генетики, разведения и сохранения сельскохозяйственных птиц Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (196601, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, д. 55а), доктор биологических наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9504-3916> E-mail: olgastan@list.ru