


Современное состояние проблемы сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц *in vitro*

Ю.Л. Силукова, О.И. Станишевская , Н.В. Дементьева

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал Федерального научного центра животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия
 e-mail: olgastan@list.ru


Аннотация. Настоящий обзор представляет современные достижения и подходы по сохранению репродуктивных клеток животных *in vitro*, такие как криоконсервация и лиофилизация, а также эпигенетические предпосылки для получения жизнеспособных сперматозоидов и женских гамет после реконсервации. Криоконсервация – эффективный путь сохранения репродуктивных клеток различных видов сельскохозяйственных животных, включая птиц. Метод сохранения генофонда *in vitro* через поддержание в криогенных условиях клеток или тканей в основном направлен на восстановление исчезнувших пород/популяций, на поддержание генетического разнообразия в популяциях, подверженных генетическому дрейфу. Именно сочетание методов *ex situ in vivo* и *ex situ in vitro* может сформировать основу эффективной стратегии сохранения генетического разнообразия животных. Кроме того, использование криоконсервированного семени лучших представителей линии или породы позволяет ускорить прогресс селекции в промышленном птицеводстве. Несмотря на многочисленные достижения в области криобиологии половых клеток, продолжается поиск методов, обеспечивающих более эффективное восстановление жизнеспособности спермиев после криоконсервации. Механизмы, лежащие в основе влияния процедуры криоконсервации на параметры семени сельскохозяйственных птиц, полностью не изучены. В обзоре отражены результаты современных исследований в области проблематики криоконсервации женских и мужских половых клеток, эмбриональных клеток, поиска новых путей решения в области сохранения генетического разнообразия *in vitro* (разработка новых криопротекторных сред и новых технологий сохранения). Освещены молекулярно-генетические аспекты криоконсервации и механизмы влияния криоконсервации на эпигенетическое состояние клеток. Представлены данные по результатам исследований в области лиофильной сушки репродуктивных клеток самцов. Интерес к технологии лиофилизации семени как возможности более дешевого способа сохранения и транспортировки генетического материала диких и домашних животных, по сравнению с криоконсервацией, в мире стремительно растет; исследования ведутся в Японии, Израиле, Египте, Испании, Франции. Растет и интерес к использованию лиофилизированного семени в технологиях геномной инженерии. Методы лиофильной сушки разрабатываются с учетом видовой принадлежности. В обзоре предложены также организационно-правовые пути решения проблемы сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных животных, включая птиц, *in vitro*.

Ключевые слова: семя; сперматозоид; маркерные белки; криоконсервация; лиофилизация; птицеводство; сохранение генетических ресурсов; криобанк; криорезистентность.

Для цитирования: Силукова Ю.Л., Станишевская О.И., Дементьева Н.В. Современное состояние проблемы сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц *in vitro*. Вавиловский 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: olgastan@list.ru

Abstract. This review presents the current progress in and approaches to *in vitro* conservation of reproductive cells of animals, including birds, such as cryopreservation and freeze-drying, as well as epigenetic conditions for restoring viable spermatozoa and female gametes after conservation. Cryopreservation is an effective way to preserve reproductive cells of various species of animals and birds. *In vitro* gene pool conservation is aimed primarily to the restoration of extinct breeds and populations and to the support of genetic diversity in populations prone to genetic drift. It is the combination of *ex situ in vivo* and *ex situ in vitro* methods that can form the basic principles of the strategy of animal genetic diversity preservation. Also, use of cryopreserved semen allows faster breeding in industrial poultry farming. Despite numerous advances in semen cryobiology, new methods that can more efficiently restore viable semen after cryopreservation are being sought. The mechanisms underlying the effect of

cryopreservation on the semen parameters of cocks are insufficiently understood. The review reflects the results of recent research in the field of cryopreservation of female and male germ cells, embryonic cells, the search for new ways in the field of genetic diversity *in vitro* (the development of new cryoprotective media and new conservation technologies: freeze-drying). Molecular aspects of cryopreservation and the mechanisms of cryopreservation influence on the epigenetic state of cells are highlighted. Data on the results of studies in the field of male reproductive cell lyophilization are presented. The freeze-drying of reproductive cells, as a technology for cheaper access to the genetic material of wild and domestic animals, compared to cryopreservation, attracts the attention of scientists in Japan, Israel, Egypt, Spain, and France. There is growing interest in the use of lyophilized semen in genetic engineering technologies. Freeze-drying methods are developed for particular species. Organizational and legal ways of solving the problems of *in vitro* conservation of genetic resources of farm animals, including birds, are proposed. Key words: semen; spermatozoa; marker proteins; cryopreservation; freeze-drying; poultry; gene pool preservation; cryobank; cryoresistance.

For citation: Silyukova Y.L., Stanishevskaya O.I., Dementieva N.V. The current state of the problem of *in vitro* gene pool preservation in poultry. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020; 24(2):176-184. DOI 10.18699/VJ20.611

Введение

Проблема сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных животных (ГРЖ) является глобальной, и на ее решение направлены усилия мирового сообщества. Координирующую роль в области сохранения ГРЖ выполняет FAO – Продовольственная и сельскохозяйственная организация при ООН, и ее профильные подразделения (FAO, 2015).

Программы сохранения для ГРЖ решают следующие задачи: экономические (поддержание сектора животноводства, способность реагировать на экологические изменения, меняющиеся потребности рынка, меняющиеся нормативные требования, изменения в доступности импорта–экспорта); социальные и культурные; сохранение биоразнообразия; поддержание ресурсов для исследовательских или образовательных целей, генетики, геномики и адаптации к климатическим и другим изменениям окружающей среды.

Метод сохранения генофонда *ex situ in vitro* через поддержание в криогенных условиях (криобанк) клеток или тканей, которые могут быть использованы для восстановления породы/популяции, признан необходимым дополнением к методу *in vivo* (FAO, 2015). Именно сочетание методов *ex situ in vivo* и *ex situ in vitro* может сформировать основу эффективной стратегии сохранения генетического разнообразия животных.

Разработанные для сельскохозяйственных птиц методы по замораживанию репродуктивных клеток самцов можно с успехом применять для диких видов с целью сохранения генетического разнообразия: например, красная джунглевая курица (Rakhaa et al., 2016), глухарь (Kowalczyk et al., 2012), фазан (*Galliformes*) (Saint Jalme et al., 2003). В промышленных линиях птицы наблюдается значительное снижение генетического разнообразия (Muir et al., 2008), и использование криоконсервированного семени лучших представителей линии или породы в искусственном осеменении в условиях промышленного птицеводства позволяет расширить размах изменчивости и ускорить прогресс селекции.

Низкотемпературное хранение семени

Криоконсервация репродуктивных клеток самцов – важнейший и практически единственный на сегодня метод сохранения генофонда сельскохозяйственных птиц

in vitro. Для консервации семени сельскохозяйственных птиц разработаны различные протоколы, результативность которых зависит от многих условий (Целютин, Тур, 2013; Th  lie et al., 2019). До сих пор не решена проблема снижения функциональной способности семени после цикла замораживания–оттаивания и недостаточно высок уровень оплодотворяющей способности деконсервированного семени. По данным разных авторов, в зависимости от методов замораживания, индивидуальных и породных особенностей кур, оплодотворяемость яиц колеблется от 2 до 85 % (Blesbois et al., 2007; Long et al., 2010; Seigneurin, Blesbois, 2010;   ftci, Aygün, 2018), средний же уровень показателя оплодотворенности при использовании криоконсервированного семени низок, как правило, не превышает 30 % (Fulton, 2006). В некоторых из последних публикаций говорится о средней фертильности заморожено–оттаянного семени на уровне 65 % (Silyukova et al., 2019). Снижение жизнеспособности эмбрионов, полученных от использования криоконсервированного семени за счет фрагментации ДНК (Watson, 2000; Liptói, Hidas, 2006; Morris et al., 2012), ставит под сомнение экономическую целесообразность его применения для практической селекционной работы. Поэтому продолжают исследования по совершенствованию состава разбавителей для криоконсервации, подбору криопротекторов и способов замораживания (в пайетах, в гранулах), совершенствованию протоколов заморозки (low-fast) и т. д. (Thieu Ngoc Lan Phuong et al., 2014; Svoradová et al., 2017).

Большинство исследований по криоконсервации семени птиц проводится с использованием смешанных эякулятов нескольких самцов, хотя известно, что генетический вклад каждого самца неодинаков в связи с эффектом избирательности оплодотворения (Сахарова, Попов, 2001) и самцы имеют различные показатели сохранности сперматозоидов после криоконсервации (Pleshonov et al., 2018, 2019). Поэтому остаются опасения, что использование криоконсервированного семени от смешанных эякулятов из криобанков может приводить к увеличению степени инбридинга в популяции. Во избежание подобной проблемы при сохранении редких и исчезающих пород кур необходимо складывать в криобанк семя от индивидуальных эякулятов.

В России исследования в данном направлении ведутся в ФГБНУ «Федеральный научный центр животновод-

ства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста» и его филиале, Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и разведения сельскохозяйственных животных (Иолчиев и др., 2018; Mavrodina et al., 2018a, b; Pleshanov, Stanishevskaya, 2018; Stanishevskaya, Pleshanov, 2018a–c).

Используемые технологии. Во многих научных публикациях описаны различные протоколы криоконсервации семени птиц одомашненных и диких видов. Технологии различаются по типу криопротектора, по способу упаковки (пайеты, гранулы и др.), по скоростям замораживания и оттаивания (fast/slow) и по температурным режимам. Эффективность протоколов может быть оценена с помощью анализа функционального состояния семени *in vitro* (определение концентрации и подвижности сперматозоидов, морфологии, соотношения живые/мертвые) и оценки оплодотворяющей способности спермы *in vivo* при искусственном осеменении (Varadi et al., 2013; Thieu Ngoc Lan Phuong et al., 2014). Установлено, что высокие скорости замораживания–оттаивания семени птиц более предпочтительны с точки зрения повышения его выживаемости в отличие от протокола для семени млекопитающих (Shahverdi et al., 2015; Madeddu et al., 2016). Существует значительная индивидуальная, межпородная и межвидовая изменчивость по криоустойчивости семени птиц, из чего следует необходимость разработки различных стратегий криоконсервации для разных видов и пород (Blesbois et al., 2007).

Методы оценки качества семени. Криоконсервация семени очень важна для управления генетическим разнообразием птиц *ex situ*, но применение данного метода ограничено высокой вариабельностью показателей успеха. Для расчета количества сперматозоидов при формировании криобанка необходимо прогнозирование оплодотворяющей способности криоконсервированного семени. К сожалению, при определении эффективности своих разработок многие исследователи ограничиваются только оценкой подвижности сперматозоидов. Этот тест недостаточно информативен в плане прогноза оплодотворяющей способности спермы.

Более эффективный прогноз по оплодотворяющей способности семени дают методы оценки морфологических нарушений с использованием флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток, проточной цитометрии, оценки параметров подвижности спермы при помощи компьютерного анализа (CASA). Использование системы CASA позволяет оценить количество жизнеспособных и морфологически нормальных клеток (PVN), массовую подвижность (MMOT) и различные параметры движения, включая процентное содержание подвижных сперматозоидов (PMOT), и биофизические тесты – устойчивость к осмотическому стрессу (OSM), проницаемость мембран (FLUID) (Blesbois et al., 2008; Svoradová et al., 2018). Тем не менее комплекс этих тестов не отражает в полной мере функциональную полноценность спермы.

Функциональная способность оттаянного семени может быть достоверно определена *in vitro* путем анализа взаимодействия сперматозоида с внутренним слоем вителлиновой мембраны желтка куриных яиц (Robertson et al., 1997; Long et al., 2010). Оценка проводится в лабораторных условиях по количеству точек гидролиза (про-

никновения сперматозоидов) на единицу площади внутреннего перивителлинового слоя (Robertson et al., 1997). По сравнению с традиционной оценкой качества этот метод более информативен для прогнозирования оплодотворяющей способности сперматозоидов.

Сохранение женских гамет. В настоящее время не разработан способ сохранения половых клеток самок птиц. Наличие большого количества желтка в яйцеклетках птиц не позволяет применять существующие методы криоконсервации (Fulton, 2006). Это представляет серьезную проблему при сохранении породы/популяции, поскольку она не может быть полноценно сохранена без генетического вклада особей обоих полов, происходит потеря материнской наследственности, включая митохондриальный геном. Существующие на сегодняшний день методы сохранения репродуктивных клеток птиц (спермиев) позволяют восстанавливать исчезающие породы/популяции только за счет поглотительного скрещивания.

Относительно инновационная технология – трансплантация криоконсервированных клеток гонад неонатальных цыплят взрослым особям-реципиентам для репродукции донорского потомства. Метод трансплантации может способствовать сохранению исчезающих видов птиц и поддержанию их генетической изменчивости (Venesova, Trefil, 2016). Криоконсервация ткани яичника является фактически единственным эффективным способом сохранения *in vitro* женской зародышевой плазмы у птиц. Предложен метод витрификации тканей донорских яичников в пайете. Фрагменты ткани яичника от самок недельного возраста переносят на металлический стержень, затем витрифицируют в жидком азоте при использовании специальных сред. Данный метод позволяет хранить и транспортировать ткани яичника птиц. В опыте была показана успешная приживаемость трансплантата (Liu et al., 2012). Кроме того, трансплантацию яичника можно применять для исследований в области генетики и биологии развития (Song, Silversides, 2007; Liptoi et al., 2013). Поскольку этот метод включает в себя значительное хирургическое вмешательство и подразумевает использование иммунодепрессантов, то в каждодневной реализации он представляется затратным и технологически сложным.

Сохранение эмбриональных клеток. Первичные зародышевые клетки (PGC) кур могут быть выделены и культивированы *in vitro*. PGC являются ценным исходным материалом для клеточной генной инженерии, получения зародышевой плазмы и генетического сохранения видов и популяций (Kino et al., 1997). Действительно, PGC птиц могут размножаться в культуре и быть законсервированы без необратимого изменения их биологических свойств (van der Lavoie et al., 2006; Nandi et al., 2016; Tonus et al., 2016). Для криоконсервации PGC птиц применяют два основных метода: медленное замораживание (SLF) и ультрабыстрое замораживание (Vitriif) (Tonus et al., 2017). Эти клетки могут быть использованы для восстановления гонадных тканей с зародышевыми клетками донорской линии. Данная методика неприменима в настоящее время для сохранения всего эмбриона (Fulton, 2006). Оба метода требуют дальнейших исследований, но можно уже сейчас определенно сказать, что сохранение

клеток *in vitro* в будущем обеспечит основу для разработки практического банка генов и систематизированного геномного банка для птиц.

Генетика криоустойчивости репродуктивных клеток

Криоустойчивость семени является генетически обусловленным признаком (Pleshanov et al., 2019), но механизмы влияния криоконсервации на эпигенетическое состояние клеток еще не полностью исследованы. Процесс замораживания–оттаивания сперматозоидов может влиять на повреждения в генах, например, связанных с рождаемостью *SNORD116/PWSAS* и *UBE3A* (Valcarce et al., 2013).

При изучении изменений сперматозоидов кабана после криоконсервации были выявлены различия по 41 белку (Chen et al., 2014). В качестве маркерных белков, влияющих на устойчивость семени к замораживанию, были предложены SOD1, TPI1, ODF2 и АКАР3. У *Gallus gallus domesticus* для SOD1, TPI1 и ODF2 найдены гены-ортологи. Рассмотрим их подробнее. Белок, кодируемый геном SOD1 (superoxide dismutase 1), связывает ионы меди и цинка и способствует разрушению супероксидных радикалов в молекулярный кислород и перекись водорода (Bogle et al., 2017; Wu, 2019). Другой изотим этого белка находится в митохондриях, и функции его пока не изучены. Фермент TPI1 (triosephosphate isomerase 1), который состоит из двух идентичных белков, катализирует изомеризацию глицеральдегидов 3-фосфата (G3P) и дигидроксиацетонфосфата (DHAP) в гликолизе и глюконеогенезе (Chen et al., 2014).

Обнаружено, что белки HSP90 (heat shock protein 90) связаны с подвижностью сперматозоидов, количество их значительно уменьшается после замораживания–оттаивания (Huang et al., 2009).

Значительные белковые изменения в сперматозоидах человека до и после криоконсервации были выявлены Wang с коллегами (Wang et al., 2014). Белки митохондриального матрикса ACO2 (aconitase 2) и OXCT1 (3-oxoacid CoA-transferase 1), нитевидный белок ТЕКТ1 (tektin 1), который необходим для образования цилиарных и жгутиковых микротрубочек, гликолитический фермент ENO1 (enolase 1), белок промежуточных филаментов виментин и аминокислота тирозин связаны подвижностью сперматозоидов, жизнеспособностью и целостностью акросомы (Wang et al., 2014).

В результате замораживания–оттаивания было показано снижение количества антиоксидантных белков, таких как SOD1, PRDX6 (peroxiredoxin 6), TXNDC2 (thioredoxin domain containing 2), GSTM3 (glutathione S-transferase mu 3), мембранных белков CYP5R2 (cytochrome b5 reductase 2), белков зоны пеллюцида ZPBP1 и ZPBP2 (zona pellucida binding protein), акросомальных белков ACRBP (acrosin binding protein) и SPACA3 (sperm acrosome associated 3). В то же время увеличивалось количество других белков, накопление которых наблюдается при стрессовом состоянии клетки: ANX1, ANX3 и ANX4 (annexin A); кластерин (CLU clusterin), импортин-1b (KPNB1) karyopherin subunit beta 1, HIST1H4A (histone cluster 1 H4 family member a), TUBA1A (tubulin alpha 1a) и SPAG17 (sperm associated antigen 17) (Bogle et al., 2017).

Изучение влияния криоконсервации на сперматозоиды *Gallus gallus domesticus* показало увеличение на 36 белков и сокращение на 19 белков после оттаивания. Эти белки были связаны с метаболизмом сперматозоидов (Cheng et al., 2015). Такие белки, как ACRBP, FN1 (fibronectin 1), HSP90AA1 (heat shock protein 90) и VDAC2 (voltage dependent anion channel 2), служат биомаркерами, предсказывающими устойчивость спермы хряков к криоконсервации (Vilagran et al., 2015, 2016).

Во время оплодотворения сперматозоиды доставляют отцовскую мРНК в яйцеклетку и, таким образом, играют важную роль в начале развития эмбриона. В процессе замораживания транскрипты и взаимодействие мРНК–белок в сперматозоидах могут быть потеряны, что может влиять на развитие эмбриона (Valcarce et al., 2013). Ранее были выявлены корреляции между мРНК спермы и развитием эмбриона на ранних стадиях у человека и некоторых животных (Hezavehei et al., 2018). Исследования Valcarce et al. (2013) показали уменьшение экспрессии генов PRM1, PRM2, PEG1/MEST и ADD1, связанных с фертильностью спермы человека после криоконсервации. В ряде исследований наблюдали изменение транскриптов некоторых белков и микроРНК. Предпринимаются попытки объяснить некоторые эпигенетические модификации, которые могут возникнуть в сперматозоиде во время процесса замораживания (Hezavehei et al., 2018).

Криоконсервация семени – очень важный метод вспомогательной репродукции, но сам процесс замораживания–оттаивания вреден, поскольку приводит к снижению подвижности и жизнеспособности сперматозоидов, к преждевременной капацитации и, как следствие, к снижению эффективности искусственного оплодотворения. Поэтому добавление некоторых белков нормализует процесс конденсирования и ускоряет процесс оплодотворения *in vitro*. Использование, например, TrxA-FNIIx4-His6 является многообещающим биотехнологическим подходом для криоконсервации сперматозоидов барана и поддержания жизнеспособности сперматозоидов (Ledesma et al., 2019).

Кроме сохранения генетического материала в спермобанке, возможно создание криобанка эмбрионов. У крупного рогатого скота оценивали влияние ресвератрола на эмбрионы после криоконсервации. Изучено его влияние на сохранность функций митохондрий, целостность ДНК, экспрессию SIRT1 (sirtuin 1) и способность эмбрионов к развитию. Выживаемость эмбрионов значительно улучшалась, когда после оттаивания их инкубировали в среде, содержащей 0.5 мкМ ресвератрола. Кроме того, экспрессия SIRT1 и содержание бесклеточной мтДНК в среде были выше в случае эмбрионов, обработанных ресвератролом. Следует отметить, что медленное замораживание влияет на целостность и функцию митохондрий в бластоцистах (Hayashi et al., 2019). Важно улучшить условия созревания *in vitro* (IVM) для незрелых ооцитов после криоконсервации, особенно если ограниченное количество ооцитов собрано у конкретных доноров. Системы культивации со свежими ооцитами значительно ускоряют мейотическое развитие витрифицированных ооцитов и существенно увеличивают скорость образования бластоцист после партеногенетической активации и переноса ядер соматических клеток (Jia et al., 2019).

Понимание молекулярно-генетических механизмов, обуславливающих эпигенетические процессы, которые происходят в репродуктивных клетках при замораживании–оттаивании, позволит повысить результативность используемых технологий по сохранению видов/пород/популяций редких и исчезающих животных и птиц.

Лиофилизация

Сохранение спермы путем лиофилизации является инновационным методом. Преимущества лиофилизированных сперматозоидов состоят в том, что они могут храниться при температуре 4 °С в течение длительного времени, а также храниться и транспортироваться при комнатной температуре без использования жидкого азота или сухого льда в качестве охлаждающих агентов.

Ожидается, что именно лиофилизация спермы, а не криоконсервация, может стать новым простым методом сохранения генетических ресурсов и использоваться в том числе для получения трансгенных животных (Kaneko, 2012). Состояние исследований в области сублимационной сушки семени диких и домашних животных свидетельствует о возрастающем интересе к этому способу сохранения генетических ресурсов. Методы лиофилизации применительно к микроорганизмам и растительным клеткам разработаны и успешно применяются. Интерес к лиофилизации репродуктивных клеток как возможности более дешевого способа сохранения и транспортировки (в том числе в космос) генетического материала диких и домашних животных, по сравнению с криоконсервацией, в мире стремительно растет; исследования ведутся в Японии, Израиле, Египте, Испании, Франции. Методы лиофильной сушки разрабатываются с учетом видовой принадлежности. Достигнуты положительные результаты на мышах, крысах, хомяках, крупном рогатом скоте, баранах, кроликах, шимпанзе, жирафах, ягуарах и др., но говорить о решении проблемы пока преждевременно, поскольку функциональные характеристики сперматозоидов сохраняются не в полном объеме (Hopshi et al., 1994; Foote, 2002; Liu et al., 2004; Kawase et al., 2005; Li et al., 2009; Gil et al., 2014; Kaneko et al., 2014; Shahba et al., 2016; Wakayama et al., 2017; Arav et al., 2018). Основные трудности связаны с повреждениями двигательного аппарата сперматозоидов, мембран и ДНК. Что касается птиц, в том числе сельскохозяйственных, то исследования по лиофильной сушке их семени не проводились, во всяком случае не опубликованы.

Проблемы криоконсервации

Криоконсервация запускает не только процессы повреждения на механическом уровне повреждений мембран, но и химико-физические процессы денатурации белков и липидов бислоев мембран, что приводит к сублетальному замерзанию и запуску процессов криокапацитации, образования активных форм кислорода и изменения белков сперматозоидов, липидов и сахаров (Pini et al., 2018).

Общеизвестно, что устойчивость к холодовому шоку и криоустойчивость сперматозоидов различных видов сельскохозяйственных животных, в том числе сельскохозяйственных птиц, сильно различаются. Криоконсервированное семя любого вида животных имеет пониженную фертиль-

ность по сравнению со свежей спермой. Причины потери фертильности различны: восприимчивость к холодовому шоку, скорость охлаждения, состав разбавителя и осмотический стресс. Существуют также факторы, влияющие на функциональное состояние заморожено–оттаянных сперматозоидов: стабильность мембран, окислительные повреждения, целостность мембранного рецептора, структура ядра (Watson, 2000; Иолчиев и др., 2018). В процессе криоконсервации и деконсервации сперматозоиды могут получать как необратимые повреждения, выражающиеся в отсутствии подвижности и различных морфологических нарушениях, так и обратимые, связанные в основном с временным нарушением структуры и проницаемости мембран.

Есть мнение, что высокое содержание внутриклеточного протейна вместе с осмотической «усадкой» мембраны сперматозоида, вызванной образованием внеклеточного льда, приводит к внутриклеточной витрификации сперматозоидов во время охлаждения. При высоких скоростях охлаждения повреждение сперматозоидов является результатом осмотического дисбаланса, возникающего во время оттаивания, а не внутриклеточного образования льда во время замораживания. Осмотический дисбаланс возникает при высоких скоростях охлаждения из-за ограниченной диффузии кристаллизации льда во внеклеточной жидкости, т.е. количество льда, образующегося во время охлаждения, меньше, чем ожидалось от диаграммы фазового равновесия (Morris et al., 2012).

В криоустойчивости семени петухов существует значительная межпородная изменчивость, оцененная по показателю активности деконсервированных сперматозоидов; коэффициент вариации (C_v) может достигать 23–25 % (Pleshanov et al., 2018; Stanishevskaya, Pleshanov, 2018a). В исследованиях показана большая индивидуальная изменчивость активности спермы петухов в цикле замораживания–оттаивания (Плешанов и др., 2017; Pleshanov, Stanishevskaya, 2018; Stanishevskaya, Pleshanov, 2018a, b). Коэффициент вариации (C_v) активности нативной спермы составил 6.1 %, а деконсервированной – 19.5 %, что свидетельствует о широкой норме реакции сперматозоидов на влияние низких температур.

Общепринятыми параметрами отбора эякулятов для целей криоконсервации являются: объем эякулята, концентрация и подвижность сперматозоидов. Эти критерии не дают полного прогноза степени криотолерантности репродуктивных клеток, которая во многом обусловлена состоянием мембран (именно мембраны в первую очередь повреждаются в процессе замораживания–оттаивания).

Одним из способов оценки степени криоповреждения клеточных мембран спермиев является метод окрашивания с помощью красителя Sperm VitalStain (Nidac International AB, Швеция), который позволяет оценить криоповреждения за счет изменения окраски поврежденных клеток (Pleshanov, Stanishevskaya, 2018). Изучаются такие липидные фракции мембран, как гликолипиды, фосфолипиды, стерин; холестерин и соотношение холестерин/фосфолипиды и др., влияющие на состояние клеточных мембран, их проницаемость, микровязкость, текучесть и молекулярную подвижность липидов в мембране, на процесс капацитации, взаимодействие мембран яйцеклетки

и сперматозоида и на результат оплодотворения (Blesbois et al., 2005; Ahmed et al., 2014; Eubaid et al., 2015; Partyka et al., 2016; Плешанов и др., 2017).

В последних исследованиях в области криоустойчивости сперматозоидов было установлено влияние аминокислотного профиля семенной плазмы у разных пород кур на фрагментацию ДНК (Santiago-Moreno et al., 2019) и связь состава внутриклеточного протеина сперматозоида с показателями осмотического дисбаланса после размораживания (Morris et al., 2012). Результаты этих исследований раскрывают новые аспекты криобиологии сперматозоидов, что является предпосылкой к разработке новых технологий сохранения сперматозоидов, включая витрификацию и лиофилизацию.

Проблемы ранней эмбриональной смертности. Общеизвестно, что при использовании заморожено-оттаянных сперматозоидов снижается не только показатель их фертильности, но и жизнеспособность эмбрионов. Смертность эмбрионов на ранних стадиях развития может достигать 8–17% (Stanishevskaya, Pleshonov, 2018c). Данная область недостаточно изучена, так как технически трудно исследовать причины замершего развития, поскольку признаки ранней эмбриональной смерти не определяемы. Вероятно, одной из основных причин ранней эмбриональной смертности является повреждение ДНК, вызвавшее функциональные повреждения ядерных структур сперматозоида (Watson, 2000; Liptó, Hidas, 2006). Кроме того, не следует исключать влияния используемых при замораживании сперматозоидов токсичных криопротекторов эндо/экзоцеллюлярного действия и их концентрации, которые также могут быть причиной гибели эмбриона на ранней стадии развития (Mosca et al., 2019).

Таким образом, генетическое разнообразие сохраняемого материала снижается на различных стадиях постсингамии по причине выбытия особи с пониженной криорезистентностью репродуктивных клеток.

Криопротекторы. Необходимым условием успешной криоконсервации репродуктивных клеток является использование криопротекторов. Криопротекторы эндоцеллюлярного действия проникают в клетки и предупреждают образование внутриклеточного льда, но при высоких концентрациях могут оказывать повреждающее действие. Экзоцеллюлярные криопротекторы действуют вне сперматозоидов во внеклеточном пространстве и защищают клетки, обезвоживая внутриклеточное пространство и ограничивая действие осмотического шока во время оттаивания.

Глицерин, один из самых известных криопротекторов, наиболее эффективен и наименее токсичен для сперматозоидов петухов. К сожалению, он оказывает контрацептивное действие после осеменения кур и требует удаления перед осеменением. Наиболее широко используемые проникающие криопротекторы – диметилсульфоксид, диметилацетамид, диметилформамид и этиленгликоль. Образцы семени можно разморозить без дальнейшей обработки, и с этими веществами были получены высокие уровни фертильности в зависимости от скорости охлаждения и типа упаковки семени (Santiago-Moreno et al., 2011). Непроницающие криопротекторы, известные также как осмопротекторы, представляют собой низкомолекулярные гидрофильные нетоксичные молекулы, которые

помогают стабилизировать внутренние растворенные вещества при осмотическом стрессе в клетках. Эти криопротекторы часто используют в сочетании с проникающими (Benesova, Trefil, 2016; Mosca et al., 2016; Svoradová et al., 2017).

Последние исследования в области разработок криопротекторов принципиально иного действия основаны на антифризных гликопротеинах (АФГП) и антифризных протеинах (АФП), обнаруженных в крови и тканях пойкилотермических организмов, живущих в морозных средах (насекомые, морские рыбы). Полученные вещества ингибируют рост ледяных кристаллов неколлагативным образом. Использование АФП открывает перспективное направление для криоконсервации живых тканей и клеток. Сообщалось об эффективности некоторых АФП или АФГП рыб против гипотермического повреждения при сохранении ооцитов свиней и крупного рогатого скота, цельной печени крысы и модельных мембран. Для сохранения спермы были предприняты попытки разработать методы криоконсервации с добавлением АФП рыб у разных видов с различной эффективностью. Недавно обнаружено, что АФП и АФГП морских рыб улучшают результаты криоконсервации сперматозоидов буйволов (Qadeer et al., 2016).

Проводятся исследования по использованию рекомбинантных АФП на основе АФП личинок *Dendroides canadensis* (DAFP) для криоконсервации. Добавление DAFP в разбавитель защищает семя быка буйвола (*Bubalus bubalis*) на стадиях замораживания–оттаивания и повышает фертильность криоконсервированного семени (Qadeer et al., 2016).

Криобанки и их вклад в сохранение генетических ресурсов

Коллекции генетических банков имеют неопределимое значение для предотвращения 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. Хранящийся материал от животных, не несущих нежелательных и летальных мутаций, может быть использован для снижения частоты дефектов до приемлемого уровня.

Биобанки служат готовым источником генетически разнообразной и специализированной ДНК. Сохраняемые материалы используются для исследований генетического разнообразия, изучения геномных ассоциаций, функций генов и др. Важно, что со временем генетические банки могут предоставлять образцы от разных поколений, тем самым способствуя повышению точности геномной селекции. Это последнее преимущество будет легче реализовать, если каталогизировать информацию с учетом фенотипа и генотипа и провести геномную паспортизацию закладываемых образцов (Wildt, 2000; Comizzoli, 2015).

Проблемой сохранения генетического разнообразия *in vitro*, в том числе сельскохозяйственных птиц, занимаются во многих странах мира. Одним из преимуществ сохранения генетического разнообразия *in vitro* в криобанках является экономическая составляющая (Woelders,

2006; Santiago-Moreno et al., 2011; Silversides et al., 2013; FAO, 2015).

В последнее время развивается новый подход к взаимодействию между организациями, сохраняющими генофонд *ex situ in vivo* и *ex situ in vitro*. Деятельность генетического банка заключается 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*.

Генетические банки по сохранению сельскохозяйственных птиц могли бы привлечь внимание опыт Европейского союза, Европейской ассоциации животноводства (ЕААР) и FAO, которыми созданы европейские и международные консультативные форумы для обсуждения и принятия конкретных мер по сохранению генетических ресурсов во всем мире. Однако претворение этой идеи в жизнь – сложный процесс, требующий междисциплинарного сотрудничества и разработки четко определенных целей (Maga et al., 2013).

Законодательством Российской Федерации предусмотрена нормативно-правовая база (Стратегия) для сохранения редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных, растений и грибов (Распоряжение Правительства РФ от 17.02.2014 № 212-р), предполагающая сохранение в том числе *in vitro*. Что касается проблемы сохранения генетического разнообразия сельскохозяйственных животных и птиц, то Федеральный закон «О племенном животноводстве» от 03.08.1995 № 123-ФЗ не предусматривает регулирование этой формы. Необходимо разработка и принятие закона и подзаконных актов, определяющих правовой статус генетических криобанков в общей системе сохранения генетических ресурсов.

Список литературы / References

Иолчиев Б.С., Багиров В.А., Жилинский М.А., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А. Изменение биологических параметров семени сельскохозяйственной птицы при криоконсервации. С.-х. биология. 2018;6(53):1230-1237. DOI 10.15389/agrobiology.2018.6.1230rus.
[Iolchiev B.S., Bagirov V.A., Zhilinsky M.A., Volkova N.A., Zinovieva N.A. Change of biological parameters of poultry semen at cryopreservation. Sel'skhozoyaystvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2018;6(53):1230-1237. DOI 10.15389/agrobiology.2018.6.1230eng.]
Плешанов Н., Станишевская О., Силукова Ю. Оплодотворяющая способность криоконсервированной спермы петухов в зависимости от уровня холестерина в ней и его влияния на степень повреждения мембранных структур спермиев. Генетика и разведение животных. 2017;3:34-40.
[Pleshonov N., Stanishevskaya O., Silyukova Y. Fertilizing ability of the cryopreserved cock sperm depending on cholesterol levels and cholesterol impact on the degree of damaging of the membrane structures in spermatozoa. Genetika i Razvedenie Zhivotnyh = Genetics and Breeding of Animals. 2017;3:34-40. (in Russian)]
Сахарова С.А., Попов И.И. Удосконалення методів збереження генофонду курей. Птахівництво. 2001;51:135-141.
[Sakharova S.A., Popov I.I. Improvement of chicken gene pool conservation methods. Ptahivnictvo = Poultry Farming. 2001;51:135-141. (in Ukrainian)]
Целютин К.В., Тур Б.К. Искусственное осеменение и криоконсервация спермы (петухи, индюки, гусаки, селезни). СПб., 2013.

[Tselyutin K.V., Tour B.K. Artificial Insemination and Cryopreservation of Sperm (Roosters, Turkeys, Gander, Drakes). St. Petersburg, 2013. (in Russian)]
Ahmed M., Sattar A., Iqbal S., Shahzad Q., Zahid Tahir M., Hammad Fayyaz M., Ahmad M. Cholesterol loaded cyclodextrin improves sperm survival in tris-based extender with less egg yolk used in buffalo bulls semen. Thai J. Vet. Med. Suppl. 2014;44:129-130.
Arav A., Idda A., Nieddu S., Natan Y., Ledda S. High post-thaw survival of ram sperm after partial freeze-drying. J. Assist. Reprod. Genet. 2018;35(7):1149-1155. DOI 10.1007/s10815-018-1145-1.
Benesova B., Trefil P. Possibilities for preserving genetic resources in birds. World's Poult. Sci. J. 2016;72(3):628-641. DOI 10.1017/S0043933916000489.
Blesbois E., Grasseau I., Segineurin F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction. 2005;129(3):371-378. DOI 10.1530/rep.1.00454.
Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F., Mignon-Grasteau S., Saint Jalme M., Mialon-Richard M.M. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. Theriogenology. 2008;69(2):252-261. DOI 10.1016/j.theriogenology.2007.09.019.
Blesbois E., Seigneurin F., Grasseau I., Limouzin C., Besnard J., Gourichon D., Coquerelle G., Rault P., Tixier-Boichard M. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. Poult. Sci. 2007;86(3):555-564. DOI 10.1093/ps/86.3.555-564.
Bogle O.A., Kumar K., Attardo-Parrinello C., Lewis S.E., Estanyol J.M., Ballescà J.L., Oliva R. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. Andrology. 2017;5:10-22. DOI 10.1111/andr.12279.
Chen X., Zhu H., Hu C., Hao H., Zhang J., Li K., Zhao X., Qin T., Zhao K., Zhu H., Wang D. Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. Reproduction. 2014;147(3):321-330. DOI 10.1530/REP-13-0313.
Cheng C.Y., Chen P.R., Chen C.J., Wang S.H., Chen C.F., Lee Y.P., Huang S.Y. Differential protein expression in chicken spermatozoa before and after freezing-thawing treatment. Anim. Reprod. Sci. 2015;152:99-107. DOI 10.1016/anireprosci.2014.11.011.
Çiftci Y., Aygün A. Poultry semen cryopreservation technologies. World's Poult. Sci. J. 2018;74(4):699-710. DOI 10.1017/s0043933918000673.
Comizzoli P. Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. Asian J. Androl. 2015;17:640-645. DOI 10.4103/1008-682X.153849.
Eubaid H.J., Al-Haidary B.A., Tawfiq L.J. Possible role for cholesterol in human seminal fluidin relations to other semen parameters & fertility. J. Babylon Univ./Pure Appl. Sci. 2015;23(2):654-659.
FAO. 2015. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Ed. by B.D. Scherf, D. Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome, 2015. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i4787e/index.html>
Foote R. The history of artificial insemination; selected notes and tables. J. Anim. Sci. 2002;80:1-10.
Fulton J.E. Avian genetic stock preservation: an industry perspective. Poult. Sci. 2006;85:227-231.
Gil L., Olaciregui M., Luno V., Malo C., González N., Martínez F. Current status of freeze-drying technology to preserve domestic animals sperm. Reprod. Domest. Anim. 2014;49(4):72-81. DOI 10.1111/rda.12396.
Hayashi T., Kansaku K., Abe T., Ueda S., Iwata H. Effects of resveratrol treatment on mitochondria and subsequent embryonic development of bovine blastocysts cryopreserved by slow freezing. Anim. Sci. J. 2019;90(7):849-856. DOI 10.1111/asj.13219.
Hezavehei M., Sharafi M., Kouchehfahani H.M., Henkel R., Agarwal A., Esmacili V., Shahverdi A. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Re-

- prod. BioMed. Online. 2018;37(3):327-339. DOI 10.1016/j.rbmo.2018.05.012.
- Hopshi K., Yanagida K., Katayose H., Yazawa H. Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. *Zigote*. 1994;2:237-242. DOI 10.1017/S0967199400002033.
- Huang S.Y., Pribenszky C., Kuo Y.H., Teng S.H., Chen Y.H., Chung M.T., Chiu Y.F. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 2009;112:136-149. DOI 10.1016/j.anireprosci.2008.04.016.
- Jia B.Y., Xiang D.C., Zhang B., Quan G.B., Shao Q.Y., Hong Q.H., Wu G.Q. Quality of vitrified porcine immature oocytes is improved by coculture with fresh oocytes during in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 2019;86:1615-1627. DOI 10.1002/mrd.23249.
- Kaneko T. New possibilities of sperm freeze-drying. *J. Fert. in Vitro*. 2012;2:5. DOI 10.4172/2165-7491.1000e119.
- Kaneko T., Ito H., Sakamoto H., Onuma M., Inoue-Murayama M. Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. *PLoS One*. 2014;9(11):e113381. DOI 10.1371/journal.pone.0113381.g001.
- Kawase Y., Araya H., Kamada N., Jishage K., Suzuki H. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2005;72(3):568-573. DOI 10.1095/biolreprod.104.035279.
- Kino K., Pain B., Leibo S.P., Cochran M., Clark M.E., Etches R.J. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poult. Sci.* 1997;76(5):753-760. DOI 10.1093/ps/76.5.753.
- Kowalczyk A., Lukaszewicz E.T., Rzońca Z. Successful preservation of capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) semen in liquid and frozen states. *Theriogenology*. 2012;77:899-907. DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.09.015.
- Ledesma A., Zalazar L., Buchelly Imbachi F., Pastore J.I., Brown P., Eddy E.M., Hozbor F., Cesari A. Recombinant peptide reverses cryo-capacitation in ram sperm and improves in vitro fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 2019;207:61-72. DOI 10.1016/j.anireprosci.2019.05.016.
- Li M.-W., Willis B.J., Griffey S.M., Spearow J.L., Lloyd K.C. Assessment of three generations of mice derived by ICSI using freeze-dried sperm. *Zygote*. 2009;17(03):239-251. DOI 10.1017/S09671994090005292.
- Liptói K., Hidas A. Investigation of possible genetic background of early embryonic mortality in poultry. *World's Poult. Sci. J.* 2006; 62(02):326-337. DOI 10.1079/wps2005101.
- Liptói K., Horvath G., Gal J., Varadi E., Barna J. Preliminary results of the application of gonadal tissue transfer in various chicken breeds in the poultry gene conservation. *Anim. Reprod. Sci.* 2013;141(1-2): 86-89. DOI 10.1016/j.anireprosci.2013.06.016.
- Liu J., Cheng K.M., Silversides F.G. Novel needle-in-straw vitrification can effectively preserve the follicle morphology, viability, and vascularization of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Anim. Reprod. Sci.* 2012;134(3-4):197-202. DOI 10.1016/j.anireprosci.2012.08.002.
- Liu J.-L., Kusakabe H., Chang C.-C., Suzuki H., Schmidt D.W., Julian M., Pfeffer R., Bormann C.L., Tian X.C., Yanagimachi R., Yang X. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol. Reprod.* 2004;70(6):1776-1781. DOI 10.1095/biolreprod.103.025957.
- Long J.A., Bongalardo D.C., Pelaez J., Saxena S., Settar P., O'Sullivan N.P., Fulton J.E. Rooster semen cryopreservation: effect of pedigree line and male age on post-thaw sperm function. *Poult. Sci.* 2010;89(5):966-973. DOI 10.3382/ps.2009-00227.
- Madeddu M., Mosca F., Abdel Sayed A., Zaniboni L., Mangiagal-li M.G., Colombo E., Cerolini S. 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. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;171:58-64. DOI 10.1016/j.anireprosci.2016.05.014.
- Mara L., Casu S., Carta A., Dattena M. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim. Reprod. Sci.* 2013;38(1-2):25-38. DOI 10.1016/j.anireprosci.2013.02.006.
- Mavrodina T., Stanishevskaya O., Cherepanov S., Silyukova Y. Influence of sperm quality (cryopreserved and native) on the duration of spermatozoa storage in reproductive tracts of turkeys. *Anim. Reprod. Sci.* 2018a;194:e13. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.04.034.
- Mavrodina T., Stanishevskaya O., Cherepanov S., Silyukova Y. Influence of osmolality of the media for dilution and cryopreservation of turkey toms' sperm on fertilization ability of thawed sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 2018b;53(2):164.
- Morris G.J., Acton E., Murray B.J., Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*. 2012;64:71-80. DOI 10.1016/j.cryobiol.2011.12.002.
- Mosca F., Madeddu M., Abdel Sayed A., Zaniboni L., Iaffaldano N., Cerolini S. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. *Cryobiology*. 2016;73(3):343-347. DOI 10.1016/j.cryobiol.2016.10.001.
- Mosca F., Zaniboni L., Abdel Sayed A., Madeddu M., Iaffaldano N., Cerolini S. Effect of dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed chicken semen. *Poult. Sci.* 2019;98(11):6071-6077. DOI 10.3382/ps/pez303.
- Muir W., Wong G.-K., Zhang Y., Wang J., Groenen M., Crooijmans R., Megens H.-J., Zhang H., Okimoto R., Vereijken A., Jungerius A., Albers G., Lawley C., Delany M., MacEachern S., Cheng H. Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105(45):17312-17317. DOI 10.1073/pnas.0806569105.
- Nandi S., Whyte J., Taylor L., Sherman A., Nair V., Kaiser P., McGrew M.J. Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. *Poult. Sci.* 2016;95:1905-1911.
- Partyka A., Bonarska-Kujawa D., Sporniak M., Strojceki M., Nizański W. Modification of membrane cholesterol and its impact on frozen-thawed chicken sperm characteristics. *Zygote*. 2016;24(5): 714-723.
- Pini T., Leahy T., Graaf S. Sublethal sperm freezing damage: manifestations and solutions. *Theriogenology*. 2018;118:172-181. DOI 10.1016/j.theriogenology.2018.06.006.
- Pleshanov N., Cherepanov S., Stanishevskaya O. Chicken sperm cryopreservation as a tool of maintenance genetic diversity in small scale populations (Proc. of the XVth Eur. Poultry Conf. Dubrovnik). *World's Poult. Sci. J.* 2018;445.
- Pleshanov N., Stanishevskaya O. Evaluation of the cocks spermatozoa membranes' damaging during cryopreservation with use of Sperm VitalStain colorant. *Reprod. Domest. Anim.* 2018;53(S2):183.
- Pleshanov N., Stanishevskaya O., Silyukova Y. Inheritance of cock's sperm cryostability. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(3):133.
- Qadeer S., Khan M., Shahzad Q., Azam A., Ansari M., Rakha B., Ejaz R., Husna A., Duman J., Akhter S. Efficiency of beetle (*Dendroides canadensis*) recombinant antifreeze protein for buffalo semen freezability and fertility. *Theriogenology*. 2016;86(7):1662-1669. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.05.028.
- Rakha B., Ansari M., Akhter S., Hussaina I., Blesbois E. Cryopreservation of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;174:45-55. DOI 10.1016/j.anireprosci.2016.09.004.
- Robertson L., Brown H., Staines H., Wishart G. Characterization and application of an avian *in vitro* spermatozoa-egg interaction assay using the inner perivitelline layer from laid chicken eggs. *J. Reprod. Fertility*. 1997;110(2):205-211.
- Saint Jalme M., Lecoq R., Seigneurin F., Blesbois E., Plouzeau E. Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*. 2003;59(3-4):875-888. DOI 10.1016/S0093-691X(02)01153-6.

- Santiago-Moreno J., Bernal B., Pérez-Cerezales S., Castaño C., Tolodano-Díaz A., Esteso M.C., Gutiérrez-Adán A., López-Sebastián A., Gil M.G., Woelders H., Blesbois E. Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PLoS One*. 2019;14(1):e0209910. DOI 10.1371/journal.pone.0209910.
- Santiago-Moreno J., Castaño C., Tolodano-Díaz A., Coloma M.A., López-Sebastián A., Prieto M.T., Campo J.L. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: optimization of freezing rate and equilibration time. *Poult. Sci.* 2011; 90(9):2047-2053.
- Seigneurin F., Blesbois E. Update on semen cryopreservation methods in poultry species. In: Proc. of the XIIIth Eur. Poultry Conf. 2010;172. Available at: https://www.visitvalencia.com/sites/default/files/pdfs/valencia_convention_bureau/candidaturas/epc2022valenciabiad.pdf
- Shahba M., El-Sheshtawy R., El-Azab A., Abdel-Ghaffar A., Ziada M., Zaky A. The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. *Asian Pac. J. Reprod.* 2016;5(6):524-535. DOI 10.1016/j.apjr.2016.11.002.
- Shahverdi A., Sharafi V., Gourabi H., Yekta A.A., Esmaeili V., Sharbatoghli M., Janzamin E., Hajnasrollahi M., Mostafayi F. Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*. 2015;83:78-85. DOI 10.1016/j.theriogenology.2014.07.044.
- Silversides F.G., Robertson M., Liu J. Cryoconservation of avian gonads in Canada. *Poult. Sci.* 2013;92(10):2613-2617.
- Silyukova Y., Pleshonov N., Stanishevskaya O. The influence membranes damage and activity of roosters' sperm on the fertilization of eggs when using cured cryopreserved sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 2019;54(3):101.
- Song X.Y., Silversides F. Offspring produced from orthotopic transplantation of chicken ovaries. *Poult. Sci.* 2007;86:107-111. DOI 10.1093/ps/86.1.107.
- Stanishevskaya O., Pleshonov N. Cryotolerance of cocks' sperm depending on their breed and individual properties. *Anim. Reprod. Sci.* 2018a;194:e1-e27. DOI 10.1016/j.anireprosci.2018.04.031.
- Stanishevskaya O., Pleshonov N. Evaluation of the cocks spermatozoa membranes' damaging during cryopreservation with use of Sperm VitalStain colorant. *Reprod. Domest. Anim.* 2018b;53(2):183.
- Stanishevskaya O., Pleshonov N. Livability of chicken embryos, obtained after insemination by frozen/thawed sperm, depending on storage duration of incubation eggs. *Reprod. Domest. Anim.* 2018c; 53(2):199.
- Svoradová A., Kuželová L., Vašíček J., Baláži A., Hanusová E., Chrenek P. *In vitro* effect of various cryoprotectants on the semen quality of endangered Oravka chicken. *Zygote*. 2017;26(01):33-39. DOI 10.1017/s0967199417000685.
- Svoradová A., Kuželová L., Vašíček J., Olexíková L., Baláži A., Kulíková B., Hrnčár C., Ostro A., Bednarczyk M., Chrenek P. The assessment of cryopreservation on the quality of endangered Oravka rooster spermatozoa using casa and cytometry. *CryoLetters*. 2018; 39(6):359-365.
- Thélie A., Bailliard A., Seigneurin F., Zerjal T., Tixier-Boichard M., Blesbois E. Chicken semen cryopreservation and use for the restoration of rare genetic resources. *Poult. Sci.* 2019;98(1):447-455. DOI 10.3382/ps/pey360.
- Thieu Ngoc Lan Phuong, Váradi E., Vegi B., Liptói K., Barna J. Comparison between low/programmable freezing and fast freezing protocols of Hungarian guinea fowl semen. *Athens J. Nat. Formal Sci.* 2014;1(3):175-183. DOI 10.13140/2.1.2727.2322.
- Tonus C., Cloquette K., Ectors F., Piret J., Gillet L., Antoine N., Desmecht D., Vanderplasschen A., Waroux O., Grobet L. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reprod. Fertil. Dev.* 2016;28:628-639.
- Tonus C., Connan D., Waroux O., Vandenhove B., Wayet J., Gillet L., Desmecht D., Antoine N., Ectors F.J., Grobet L. Cryopreservation of chicken primordial germ cells by vitrification and slow freezing: a comparative study. *Theriogenology*. 2017;88:197-206. DOI 10.1016/j.theriogenology.2016.09.022.
- Valcarce D.G., Carton-García F., Riesco M.F., Herraiz M.P., Robles V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology*. 2013;1:723-730. DOI 10.1111/j.2047-2927.2013.00116.x.
- van der Lavoie M., Diamond J., Leighton P., Mather-Love C., Heyer B., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L., Gessaro T., Swanberg S., Delany M., Etches R. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*. 2006;441(7094):766-769.
- Varadi E., Vegi B., Liptói K., Barna J. Methods for cryopreservation of Guinea fowl sperm. *PLoS One*. 2013;8(4):e62759. DOI 10.1371/journal.pone.0062759.
- Vilagrán I., Castillo-Martín M., Prieto-Martínez N., Bonet S., Yeste M. Triosephosphate isomerase (TPI) and epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5) are markers for boar sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;165:22-30. DOI 10.1016/j.anireprosci.2015.12.001.
- Vilagrán I., Yeste M., Sancho S., Castillo J., Oliva R., Bonet S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*. 2015;3(2):345-356. DOI 10.1111/andr.12009.
- Wakayama S., Kamada Y., Yamanaka K., Kohda T., Suzuki H., Shimazu T., Tada M.N., Osada I., Nagamatsu A., Kamimura S., Nagatomo H., Mizutani E., Ishino F., Yano S., Wakayama T. Healthy offspring from freeze-dried mouse spermatozoa held on the International Space Station for 9 months. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 14(23):5988-5993. DOI 10.1073/pnas.1701425114.
- Wang S., Wang W., Xu Y., Tang M., Fang J., Sun H., Sun Y., Gu M., Liu Z., Zhang Z., Lin F., Wu T., Song N., Wang Z., Zhang W., Yin C. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. *Proteomics*. 2014;14:298-310. DOI 10.1002/pmic.201300225.
- Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000;60-61:481-492.
- Wildt D. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation. *ILAR J.* 2000;41(4):228-234. DOI 10.1093/ilar.41.4.228.
- Woelders H. Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poult. Sci.* 2006;85:216-222.
- Wu Y., Guo L., Liu Z., Wei H., Zhou Y., Tan J., Peng J. Microelements in seminal and serum plasma are associated with fresh semen quality in Yorkshire boars. *Theriogenology*. 2019;132:88-94. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.04.002.

ORCID ID

Y.L. Silyukova orcid.org/0000-0003-1905-6373
O.I. Stanishevskaya orcid.org/0000-0001-9504-3916
N.V. Dementieva orcid.org/0000-0003-0210-9344

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-16-00009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 10.10.2019. После доработки 13.11.2019. Принята к публикации 04.12.2019.