

УДК 57.043:577.95;575;592/599

В.П. КОШЕВОЙ¹, И.В. ФУРДА¹, М.И. ЕГОРОВ^{2*}

Влияние N,N-диметилформаида, этиленгликоля и их смеси на криоустойчивость сперматозоидов собак

UDC 57.043:577.95;575;592/599

V.P. KOSHEVOY¹, I.V. FURDA¹, M.I. EGOROV^{2*}

Effect of N,N-Dimethylformamide, Ethylene Glycol and Their Mixture on Cryoresistance of Canine Spermatozoa

Исследовали влияние N,N-диметилформаида (ДМФА) и этиленгликоля (ЭГ), а также их смеси на функциональные свойства сперматозоидов собак (СС), подвергнутых замораживанию-оттаиванию. Установлено, что после замораживания-оттаивания подвижными остаются 20% клеток в присутствии 1 М ДМФА в течение 8 часов. Показано, что уровень функциональной сохранности сперматозоидов собак, криоконсервированных под защитой 1 М раствора ДМФА, позволяет использовать их в искусственном оплодотворении. Использование криозащитной среды на основе смеси ДМФА и ЭГ (концентрация каждого криопротектора 0,5 М) не оказало положительного эффекта на подвижность и переживаемость СС после замораживания-оттаивания.

Ключевые слова: сперматозоиды, подвижность, криоконсервирование, криопротекторы.

Досліджували вплив N,N-диметилформаида (ДМФА) і етиленгліколю (ЕГ), а також їх суміші на функціональні властивості сперматозоїдів собак, підданих заморожуванню-відтаванню. Встановлено, що після заморожування-відтавання рухомими залишаються 20% клітин у присутності 1 М ДМФА протягом 8 годин. Показано, що рівень функціонального збереження сперматозоїдів собак, криоконсервованих під захистом 1 М розчину ДМФА, дозволяє використовувати їх у штучному заплідненні. Використання криозахисного середовища на основі суміші ДМФА і ЕГ (концентрація кожного криопротектора 0,5 М) не виявило позитивного ефекту на рухливість та переживаність СС після заморожування-відтавання.

Ключові слова: сперматозоїди, рухливість, криоконсервування, криопротектори.

The effect of N,N-dimethylformamide (DMFA), ethylene glycol (EG) and their mixture as well on functional properties of canine spermatozoa subjected to freeze-thawing has been studied. It has been found that after freeze-thawing 20% of cells remain motile in the presence of 1M DMFA within 8hrs. It has been shown that the value of functional integrity of canine spermatozoa, cryopreserved with the protection of 1M DMFA, enables to use them in artificial fertilization. Use of cryoprotective medium based on the mixture of DMFA and EG (concentration of each cryoprotectant was 0.5M) did not positively affect motility and survival of canine spermatozoa after freeze-thawing.

Key-words: spermatozoa, motility, cryopreservation, cryoprotectants.

Ранее была показана перспективность применения N,N-диметилформаида (ДМФА) и этиленгликоля (ЭГ) как криопротекторов при работе со сперматозоидами собак (СС) [2, 5, 13, 23]. Получены данные [4], что криозащитные среды могут быть более эффективными при использовании смеси криопротекторов. Применение многокомпонентных сред позволяет совмещать в одной среде факторы криозащиты, присущие каждому компоненту, и снижать концентрацию отдельных составляющих. Цель данной работы – изучить влияние ДМФА, ЭГ в концентрации 1 М, а также их

The prospects of application of N,N-dimethylformamide, ethylene glycol as cryoprotectants when investigating canine spermatozoa (CS) have been previously demonstrated [2, 5, 13, 23]. The data confirming that cryoprotective media may be more efficient when using the mixture of cryoprotectants have been obtained [4]. Use of multi-component media enables the combining in one medium cryoprotective factors inherent to each component and reducing the concentration of some of them. Therefore the research aim was to study the effect of DMFA, EG under 1M concentration as well as their mixture under 0.5M

¹Харьковская государственная зооветеринарная академия МАП Украины

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov region, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+38 (057) 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

смеси в концентрации 0,5 М каждого в трис-фруктозо-альбуминовой среде на функциональные свойства замороженно-оттаянных СС.

Материалы и методы

Для опытов были использованы 25 эякулятов. Донорами спермы были клинически здоровые самцы среднеазиатской овчарки с концентрацией сперматозоидов в нативном эякуляте не меньше 250 млн/мл и с подвижностью клеток не менее 75%. Эякулят собак получали при комнатной температуре (20°C) с помощью массажа предстательной железы в присутствии неэстральной самки с использованием метода [12]. Все фракции эякулята получали раздельно. Для проверки концентрации и подвижности сперматозоидов в нативном эякуляте 0,5 мл второй фракции смешивали с первой и второй в физиологических соотношениях. Концентрацию сперматозоидов в эякулятах оценивали при помощи фотометра КФК-3 (ЗОМЗ, Россия) (ГОСТ 209.09). Подвижность сперматозоидов определяли визуально, используя микроскоп “Биолар” (Польша) при увеличении 280 по стандартному методу (ГОСТ 209.09).

Первую фракцию эякулята, представляющую собой секрет уретральных желез, и третью фракцию, выделяемую предстательной железой [11], раздельно подвергали центрифугированию при 700 g в течение 10 мин, после чего плазму этих фракций криоконсервировали погружением в жидкий азот. Вторую фракцию, представляющую собой секрет эпидидимиса, содержащую сперматозоиды, подвергали центрифугированию при 400 g в течение 3 мин. Плазму второй фракции замораживали погружением в жидкий азот [6].

Сперматозоиды собак криоконсервировали по методике [5]. При этом применяли трис-фруктозо-альбуминовую среду (ТФА), содержащую 0,25 М Трис-буфера (Trizma pH 7,2), 0,05 М фруктозы, 1% яичного альбумина (осмотичность среды 312 мОсмоль, pH 7,2) (все Sigma, США). Использовали криопротекторы ДМФА и ЭГ марки “чда” (“Реахим” Россия), которые дополнительно очищали по методике [9]. Конечная концентрация ДМФА составила 1 М, ЭГ – 1 М, а в смеси ДМФА и ЭГ – по 0,5 М. Замораживали клетки без дополнительной эквilibрации на установке УОП-1 (СКТБ ИПК и К НАН Украины) по режиму: от 5 до –15°C со скоростью 3°C/мин, от –15 до –70°C со скоростью 15°C/мин, и далее их погружали в жидкий азот [5].

Оттаивание клеток и плазмы эякулята производили на водяной бане при температуре 40°C до появления жидкой фазы.

Для оценки относительной переживаемости клеток (динамики снижения подвижности сперма-

concentration for each in tris-fructose-albumin medium on functional properties of frozen-thawed CS.

Materials and methods

In the experiments there were used 25 ejaculates. Clinically healthy male dogs of Central Asian sheep dog served as sperm donors. The concentration of spermatozoa in native ejaculate was not less than 250 mln/ml and cell motility made not less than 75%. Canine ejaculate was procured at room temperature (20°C) by massaging of prostate in the presence of estrous female by means of the method [12]. All fractions of ejaculate were separately obtained. To examine the spermatozoa concentration and motility in native ejaculate 0.5ml of the second fraction was mixed with the first and second ones in physiological ratios. Spermatozoa concentration in ejaculate was assessed using KFK-3 photometer (ZOMZ, Russia) (USSR State Standard 209.09). Spermatozoa motility was visually evaluated using “Biolar” microscope (Poland) with 280 magnification according to the standard method (USSR State Standard 209.09).

The first ejaculate fraction, representing a secret of urethral glands and the third one, secreted by prastate gland [11] were separately centrifuged at 700g for 10 min afterwards the plasma of these fractions was cryopreserved by plunging into liquid nitrogen [6]. The second which is the epididymis secret, containing spermatozoa was centrifuged at 400g for 3 min. The plasma of the second fraction was frozen by plunging into liquid nitrogen [6].

Canine spermatozoa were cryopreserved on the methods [5]. In this case the was applied tris-fructose-albumin medium (TFA), containing 0.25M tris-buffer (Trizma pH 7.2), 0.05 M fructose, 1% egg albumin (medium osmotic pressure 312 mOsm, pH 7.2) (Sigma, USA). There were used DMFA and EG cryoprotectants of “pure for analysis” (“Reakhim”, Russia), which were additionally purified on the method [9]. Final concentration of DMFA made 1M, 1M for EG and by 0.5M for the mixture of DMFA and EG. The cells were frozen with no additional equilibration with UOP-1 (Special Designing and Technical Bureau of the IPC&C) device on the regimen from 5 to –15°C with the rate of 3°C/min, from –15 down to –70°C with the rate of 15°C/min and then they were immersed into liquid nitrogen [5].

Ejaculate cell and plasma thawing was performed on water bath at 40°C up to liquid phase appearance.

To estimate relative survival of cells (dynamics of reduction of spermatozoa motility for a time period) after freeze-thawing the spermatozoa in cryoprotective media were placed into hypothermia conditions (6°C) [4]. For this aim the cell suspension (0.5 ml aliquots) after freeze-thawing were placed into plastic ampoules (Nunc, Israel) and then removed into refrigerator.

тозоидов за период времени) после замораживания-оттаивания сперматозоиды в криозащитных средах были помещены в условия гипотермии (6°C) [4]. Для этого суспензии клеток (аликвоты по 0,5 мл) после замораживания-оттаивания были помещены в открытые пластиковые ампулы (Nunc) и помещены в холодильник.

При отборе самок для искусственного осеменения учитывали общее физиологическое и клиническое состояния животных [3, 14, 16, 17]. Отбирали самок, имеющих одну щенность в предыдущие годы, прошедшую без осложнений, и с многоплодием в помете не меньше 8 щенков.

При искусственном оплодотворении самок применялся внутривлагалищный способ осеменения [19]. Объем вводимой дозы оттаянных клеток – 3 мл. Концентрация подвижных клеток во вводимой дозе после замораживания-оттаивания составляла 120 млн/мл. После осеменения эстральной самки оттаянными сперматозоидами во влагалище вводили капельно в течение 20 мин замороженно-отогретую плазму [20]. Объем вводимой смеси плазм первой и второй фракций составил 1 мл, третьей – 5 мл. Осеменение производили двукратно с интервалом 2-е суток.

Физиологическое состояние щенков оценивали в соответствии с установленными в ветеринарной медицине правилами [3]. При этом опытной группой считали щенков, полученных при использовании замороженно-оттаянных сперматозоидов, а контролем называли группу щенков, полученных от тех же самок при естественном оплодотворении (в щенность, предшествовавшую опыту, без использования замороженно-оттаянных сперматозоидов).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Искусственное оплодотворение самок собак замороженно-оттаянными сперматозоидами остается одним из основных функциональных тестов сохранности клеток [17-20]. В данной работе, после получения результатов переживаемости (подвижности за период времени) клеток, замороженно-оттаянных под защитой ДМФА, ЭГ или их смеси, проверялось функциональное состояние криоконсервированных и оттаянных сперматозоидов с помощью теста на их оплодотворяющую способность. Для этого была проведена серия опытов по замораживанию-оттаиванию клеток с тем криопротектором, который позволял сохранить наивысший процент подвижных сперматозоидов, и по искусственному оплодотворению самок собак замороженно-оттаянными клетками, полученными с помощью выбранного криопротектора.

During selection of females for artificial insemination their general physical and clinical state were taken into account [3, 14, 16, 17]. The females having one or littering during previous years with no complication and with multifetation in litter, not less than 8 puppies, were chosen.

At artificial fertilization of females there was used intra-vaginal mode of insemination [20]. The volume of introduced dose of thawed cells is 3 ml. Concentration of motile cells on the dose to be introduced after freeze-thawing made 120 mln/l. After insemination of estrous female with thawed spermatozoa the frozen-warmed plasma was introduced dropwise into vagina for 20 min [21]. The volume of the mixture to be introduced of the first and second fractions made 1ml and 5 ml for the third one. Insemination was performed twice with 48 hrs interval.

Physiological state of puppies was assessed according to the established in veterinary rules [4]. In this case the puppies obtained with the use of frozen-thawed spermatozoa was considered as experimental group and the control was the one of puppies obtained from the same females during natural fertilization (littering preceding the experiment with no use of frozen-thawed spermatozoa).

Experimental data were statistically processed on Student's test.

Results and discussion

Artificial fertilization of canine females with frozen-thawed spermatozoa has remained one of the main functional tests of cell integrity [17-20]. In this research after receiving the survival results (motility for time period) of cells, frozen-thawed under protection of DMFA, EG or their mixture the functional state of cryopreserved and thawed spermatozoa using the test on their fertilization ability was checked. For this aim there was made the series of experiments on freeze-thawing of cells with the cryoprotectant allowing to preserve the highest percentage of motile spermatozoa as well as on artificial fertilization of canine females with frozen-thawed cells obtained during the chosen cryoprotectant.

It is known that after separation of ejaculate plasma from CS for dilution of centrifuged spermatozoa prior to cryopreservation there are used protective media not containing salt solvents [2, 17]. During phase transition of water into ice the bioobjects are affected the complex of damaging factors, among those intracellular crystallization, salt hyperconcentration are of significant importance [1]. Therefore use of canine ejaculate fraction plasma containing salts [21] for the creation of physiological conditions in cryoprotective solutions is inexpedient. At the same time the establishing of physiological conditions for spermatozoa directly prior to artificial fertilization with frozen-

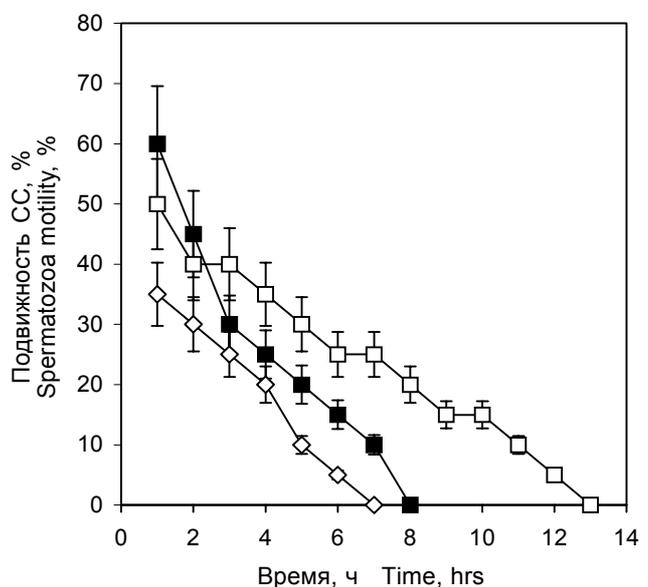
Известно, что после отделения плазмы эякулята от СС для разбавления отцентрифугированных сперматозоидов перед криоконсервированием используют защитные среды, не содержащие растворов солей [2, 17]. Вероятно при фазовом переходе воды в лед СС подвергаются воздействию комплекса повреждающих факторов, среди которых существенное значение имеют внутриклеточная кристаллизация, гиперконцентрация солей [1]. Следовательно, использование плазмы фракций эякулята собак, содержащих соли [11], для создания физиологических условий в криозащитных растворах нецелесообразно. В то же время создание физиологических условий для сперматозоидов непосредственно перед искусственным оплодотворением замороженно-оттаянными клетками может играть существенную роль в получении многоплодных пометов. Получен высокий показатель оплодотворения, когда замороженно-оттаянную вторую фракцию, содержащую клетки, разбавляли смесью плазмы первой и третьей фракций эякулята непосредственно перед искусственным оплодотворением эстральных самок [19, 21]. Для применения указанной добавки в технологии искусственного оплодотворения самок собак необходимо было найти способ хранения плазмы эякулята. В работе [6] показано, что после замораживания-оттаивания изолированных белков-ферментов в буферных и солевых растворах возможно сохранение их молекулярной структуры и биохимических свойств. Поэтому в данной работе была использована замороженно-оттаянная плазма эякулята собак в физиологических соотношениях для разбавления СС непосредственно в процессе оплодотворения.

В первой серии экспериментов сперматозоиды замораживали-оттаивали под защитой ДМФА в концентрации 1 М, ЭГ – 1 М и смеси ДМФА и ЭГ (концентрация каждого вещества 0,5 М) в среде ТФА. Из рисунка видно, что через 1 ч после замораживания-оттаивания клеток лучшие результаты выживаемости наблюдались при использовании смеси криопротекторов. Подвижность составила $60 \pm 10\%$. Однако через 8 ч подвижными оставались только спермии, замороженно-оттаянные под защитой ДМФА, их подвижность составила $25 \pm 5\%$. Таким образом, использование смеси двух криопротекторов ДМФА и ЭГ при замораживании СС не дало положительного эффекта, наблюдавшегося для сперматозоидов петуха [4]. Результаты проведенного эксперимента могут быть подтверждением выводов о большем негативном влиянии ЭГ на спермии по сравнению с ДМФА [5]. Кроме того, снижение концентрации ДМФА в смеси криопротекторов могло также быть

thawed cells may play a significant role in obtaining multi-fetal litters. There was reported about a high index of fertilization when frozen-thawed second fraction, containing the cells was diluted with the mixture of plasmas from the first and third ejaculate fractions directly prior to artificial fertilization of estrous females [19, 21]. To use the additive mentioned in the technique of artificial fertilization it was a need in finding the storage mode of ejaculate plasma. The paper [6] shows that after freeze-thawing of isolated protein enzymes in buffer and salt solutions the preservation of their molecular structure and biochemical properties is possible. Therefore in this research we used frozen-thawed plasma of canine ejaculate under physiological ratio for dilution of CS directly during fertilization.

In the first set of experiments the spermatozoa were frozen-thawed under DMFA protection in concentration of 1M, 1M EG and the mixture of DMFA and EG (concentration of each substance was 0.5 ml) in TFA medium. The figure shows that in 1 hr after freeze-thawing of cells the best results were observed when the mixture of cryoprotectants was used.

The motility made $60 \pm 10\%$. However in 8 hrs just the spermatozoa frozen-thawed under DMFA protection remained motile, their motility made $25 \pm 5\%$. Thus use of the mixture of two cryoprotectants, DMFA and EG when freezing the CS did not affect positively if compared with the effect observed for fowl spermatozoa [4]. The results of this experiment may



Подвижность СС в условиях гипотермии (6°C) после замораживания-оттаивания в присутствии: \square – 1 М ДМФА; \diamond – 1 М ЭГ; \blacksquare – смеси ДМФА и ЭГ (по 0,5 М каждого), $n = 5$.

CS motility under hypothermia (6°C) after freeze-thawing in presence of: \square – 1M DMFA; \diamond – 1M EG; \blacksquare – mixture of DMFA and EG (by 0.5 mg each), $n = 5$.

причиной понижения уровня сохранности сперматозоидов.

Для проверки функциональной полноценности криоконсервированных под защитой ДМФА спермиев собак была проведена серия опытов по искусственному оплодотворению самок замороженно-оттаянными клетками [17-20]. Оценивали многоплодие и физиологическое состояние полученных щенков в течение 25 дней со дня щенения самок (табл. 1). Средние показатели щенения в контрольной и опытной группах составили $9,8 \pm 1,25$ и $6,3 \pm 0,7$ соответственно. Следовательно, в опытной группе количество щенков было меньше, чем в контрольной ($p < 0,05$). Одной из причин снижения многоплодия в пометах опытной группы могло быть понижение жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервирования. Однако

следует отметить, что количество щенков в большинстве пометов (4-х из 5-ти) было на уровне нормы, принятой в племенном собаководстве (6 щенков в помете). Были проведены исследования функционального состояния полученных в контрольной и в опытной группах щенков на момент рождения и на 25-й день жизни. Как видно из табл. 2, в контрольной группе было 6 щенков с массой тела при рождении меньше 0,33 кг. Такие щенки имели определенные отставания в развитии, 2 из них умерли. В то же время в опытной группе щенков со значительными отклонениями от среднего значения живой массы не было.

На основании данных табл. 2 можно сделать вывод о получении физиологически полноценных многоплодных пометов при использовании СС, замороженных и оттаянных под защитой среды ТФА, содержащей 1 М ДМФА. Средняя живая масса пометов в опытной группе была незначительно выше данного показателя контрольной группы как при рождении, так и на 25-й день жизни щенков (различия недостоверны, $p > 0,05$).

Полученные результаты позволяют считать ДМФА более перспективным для криоконсервирования СС криопротектором по сравнению с ЭГ и рекомендовать его для использования в племенном собаководстве.

На сперматозоидах собак ранее было исследовано влияние глицерина, ЭГ, 1,2-пропандиола (1,2-ПД), диметилсульфоксида (ДМСО) и ДМФА. По данным [5] из указанных криопротекторов наиболее эффективную криозащиту проявляет ДМФА. Механизмы влияния ДМФА на сперматозоиды в процессе криоконсервирования изучены недостаточно [5]. Определенные предпосылки к пониманию

Таблица 1. Характер течения эструса и показатели ценности самок в опыте ($M \pm m$, $n=5$)

Table 1. Character of estrus course and littering indices for the females in experiment ($M \pm m$, $n=5$)

Показатели Indices	Самки Females				
	1-я 1 st	2-я 2 nd	3-я 3 rd	4-я 4 th	5-я 5 th
Дни осеменения от начала эструса Days of insemination after estrus	10 – 12	13 – 15	11 – 13	11 – 13	12 – 14
Степень выраженности эструса Estrus manifestation rate	+	+	+	+	+
Реакция на самца Response to a male	+	+	+	+	+
Течение щенности, дней Littering course, days	64	69	65	–	69
Размер помета, голов Litter size, number of puppies	6	6	8	–	5

confirm the conclusions about bigger negative influence of EG on spermatozoa if compared with DMFA [5]. In addition, decreased concentration of DMFA in the mixture of cryoprotectants also might be a cause of the reduction of spermatozoa survival rate.

To check functional integrity of cryopreserved under protection of DMFA canine spermatozoa there were done several experiments on artificial fertilization of females with frozen-thawed cells [18-21]. The multifetation and physiological state of resulted puppies were assessed for 25 days from the date of female whelping (Table 1). Mean values for whelping in the control and experimental groups made 9.8 ± 1.25 and 6.3 ± 0.7 , correspondingly. Therefore in experimental group the number of puppies was lower than in the control one ($p < 0.05$). One of the causes of the reduction of multifetation in the litters of experimental group could be a decrease in spermatozoa viability after cryopreservation. However it should be noted that the number of puppies in the majority of litters (in 4 of 5) was at the norm level assumed in canine breeding (6 puppies in a litter). There were performed the studies of functional state of the puppies obtained in the control and experimental groups to the birth moment and to the 25th day of their life. The Table 2 shows that in the control group there were 6 puppies with a body mass less than 0.33 kg at their birth, these puppies were retarded in their development, 2 of them died. At the same time in experimental group there were no puppies with significant deviations from a mean value of living mass.

Based on the data of Table 2 one can conclude about the obtaining of physiologically valuable multifetal litters when using the CS frozen and thawed under TFA medium protection, containing 1M DMFA.

процессов, происходящих на клеточной мембране при ее контакте с криопротектором, может дать анализ физико-химических характеристик веществ, используемых в криозащитных растворах, а также особенностей плазматических мембран СС. Известно, что коэффициент проницаемости мембран СС для воды (L_p) значительно меньший по сравнению с этим показателем у других млекопитающих [24] и равен $0,0029 \text{ мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{атм}^{-1}$. Следовательно, для криоконсервирования СС желательнее использовать криопротекторы, способные проникать внутрь клеток не только через “водные” каналы, но и через липидный бислой. Вероятно, одной из причин невысоких результатов криоконсервирования СС под защитой глицерина и ЭГ является их сравнительно низкая липофильность [2, 4, 17, 22].

Известно, что показателем, свидетельствующим о способности веществ проникать в липидные участки мембраны клеток, является коэффициент распределения (K_p) веществ в системе вода-неполярная фаза. По убыванию K_p в системе n-октанол-вода изученные криопротекторы, а также некоторые другие распределяются таким образом: ДМСО > ДМФА > 1,2-ПД > ЭГ > глицерин [4]. ДМСО имеет в этом ряду наиболее высокий показатель K_p . Эти данные были получены экспериментальным путем. В работе [10] теоретически показано, что из указанных выше веществ ДМФА и ДМСО обладают свойствами, характеризующими их как вещества, способные проникать через липидные участки мембраны внутрь клеток. Следовательно, ДМСО и ДМФА могут быть перспективными криопротекторами при криоконсервировании СС. В то же время в работах [5, 22] показано, что ДМСО оказывает негативное влияние на СС еще на этапе экспозиции, а подвижность клеток после криоконсервирования под защитой ДМСО существенно ниже по сравнению с подвижностью клеток, замороженно-оттаянных под защитой глицерина. Невысокий криозащитный эффект, полученный при криоконсервировании СС под защитой ДМСО [5, 22], вероятно, обусловлен физико-химическими свойствами его молекулы. По значению дипольного момента криопротекторы, при-

Таблица 2. Характеристика пометов щенков, полученных после оплодотворения самок собак замороженно-оттаянными СС и при естественной случке ($M \pm m, n=5$)

Table 2. Characterization of puppies' litters obtained after fertilization of canine females with frozen-thawed CS and during natural mating ($M \pm m, n=5$)

Показатели Indices	Возраст щенков Age of puppies			
	Опытная группа Experimental group		Контрольная группа Control group	
	1-й день 1 st day	25-й день 25 th day	1-й день 1 st day	25-й день 25 th day
Среднее количество щенков в помете, голов Average number of puppies in litter	6,3±0,7	6,3±0,7	9,8±1,25	9,4±1,47
Средняя живая масса помета, кг Average living mass of litter, kg	0,530±0,1	2,8±0,33	0,505±0,2	2,6±0,17
Аппетит Appetite	+	+	+	+
Поведенческие реакции Behavioral parameters	+	+	+	+
Температура тела, °C Body temperature, °C	Норма	Норма	Норма	Норма
Пульс Pulse	Норма	Норма	Норма	Норма
Уродства Abnormalities	–	–	–	–
Мертворожденные, умершие Dead-born, dead	–	–	–	2
Щенки с массой меньше 0,33 кг Puppies with the weight less than 0.33 kg	2	–	6	–

Average living mass of a litter I experimental group was slightly higher than this index for the control group both at the birth moment and to the 25th day of puppies' life (the differences are not statistically significant, $p > 0.05$).

The obtained results enable the considering of DMFA as more perspective for cryopreservation of CS with cryoprotectant in comparison with EG and the recommending it to be used in canine breeding.

Previously in canine spermatozoa there has been investigated the effects of glycerol, EG, 1,2-propane diol (1,2-PD), dimethylsulfoxide (DMSO) and DMFA. As it was reported [5] from the cryoprotectants mentioned the most effective cryoprotection is manifested by DMFA. Mechanisms of DMFA effect on spermatozoa during cryopreservation have been insufficiently studied [5]. Certain preconditions for understanding the processes proceeding on cell membrane at its contact with cryoprotectant may be provided by the analysis of physical and chemical characteristics of the substances being used in cryoprotective solutions as well as peculiarities of plasma membranes of canine spermatozoa. It is known that permeability coefficient of canine spermatozoa membrane for water (L_p) is significantly less if compared with this value in other mammals [24] and

меняемые для СС, распределяются в ряд: ДМСО>ДМФА>глицерин>ЭГ>1,2-ПД [4]. Эта физико-химическая характеристика веществ отражает их способность к образованию водородных связей как с молекулами воды, так и с функциональными группами химических соединений или макромолекул. На основании анализа физико-химических свойств K_p , дипольного момента рассмотренных криопротекторов, структуры молекул ДМСО и ДМФА, а также с учетом особенностей строения мембран сперматозоидов собак [8, 15], можно предположить, что ДМФА в меньшей степени связывается с полярной областью мембран клеток, а преимущественно встраивается в его неполярную область [4, 5]. В то же время можно предположить, что причины низких результатов сохранности СС под защитой ДМСО связаны с гидрофильно-гидрофобным балансом его молекулы. По-видимому, ДМСО в суспензии СС активно взаимодействует с водой и в меньшей степени локализуется в гидрофобных участках плазматических мембран клеток.

Исследования криозащитных свойств ЭГ в концентрации 1 М, ДМФА в концентрации 1 М и смеси криопротекторов ЭГ и ДМФА в концентрации 0,5 М каждого показали, что ЭГ является менее эффективным криопротектором для СС по сравнению с ДМФА. Криозащитное действие на СС смеси веществ ДМФА и ЭГ в концентрации 0,5 М каждого в среде ТФА менее выражено по сравнению со средой, в которой содержится только ДМФА в концентрации 1 М. Падение показателя подвижности замороженно-оттаянных СС было более выражено в средах, содержащих либо ЭГ, либо смесь ЭГ и ДМФА. Результаты этого эксперимента дают основание сделать вывод о сравнительно более высокой токсичности ЭГ для СС по сравнению с ДМФА.

Выводы

Выявлено, что смесь криопротекторов ДМФА и ЭГ в концентрации 0,5 М каждого вещества проявляет менее выраженное криозащитное действие в отношении сперматозоидов собак, чем ДМФА в концентрации 1 М, но более эффективна при криоконсервировании сперматозоидов собак по сравнению со средой, содержащей ЭГ в концентрации 1 М.

Показано, что сперматозоиды собак, криоконсервированные под защитой ДМФА в концентрации 1 М, в среде, содержащей триоксиметиламинометан, фруктозу и яичный альбумин, сохраняют функциональную активность и при их использовании в искусственном внутривлагалищном осеменении позволяют получать здоровое потомство.

makes $0.0029 \mu\text{m} \times \text{min}^{-1} \times \text{atm}^{-1}$. Consequently for cryopreservation of canine spermatozoa the use of cryoprotectants capable of penetrating inside cells not only via "aqueous" channels but also through lipid bilayer is preferable. One of the causes of not very successful cryopreservation results of CS under either glycerol or EG protection in previous researches [2, 17, 22] is likely their comparatively low lipophilicity [4].

It is known that the feature, testifying to the ability of substances to penetrate in lipid sites of cell membranes is distribution coefficient (K_p) of substances in the system of water-nonpolar phase. On decrease in K_p in the n-octanol-water system the studied and also some other cryoprotectants are distributed by the way as follows: DMSO>DMFA>1,2-PD>EG>glycerol [4]. DMSO has in this row the highest K_p index. These data were experimentally obtained. In the paper [10] there was theoretically demonstrated that among the mentioned above substances DMFA and DMSO had the properties characterising them as those capable of penetrating via membrane lipid sites inside cells. Therefore DMSO and DMFA can be perspective cryoprotectants during CS cryopreservation. At the same time in the papers [5, 22] it was shown that DMSO affected negatively CS even at the exposure stage and post-thaw cell motility when using DMSO was significantly lower if compared with motility of the cells frozen thawed under glycerol protection. Low cryoprotective effect found during CS cryopreservation under DMSO protection in previous researches [5, 22] is probably stipulated by physical and chemical properties of its molecule. On the value of dipole moment the cryoprotectants applied for CS are distributed as the row: DMSO>DMFA>glycerol>EG>1,2-PD [4]. These physical and chemical characteristics of the substances reflects their ability to form hydrogen bonds both with water molecules and with functional groups of chemical compounds or macromolecules. On the base of analysis of physical and chemical K_p properties, dipole moment of considered cryoprotectants, structure of DMSO and DMFA molecules as well as with taking into account the peculiarities of structure of canine spermatozoa membranes [8, 15], one can believe that DMFA in less extent is bound with polar area of cell membranes, and predominantly is built-in its non-polar area [5, 6]. At the same time the causes of low results of CS integrity under DMSO protection in previous researches may be supposed as resulting from hydrophilic-hydrophobic balance of its molecule. Perhaps, DMSO in CS suspension actively interacts with water and in less extent is localized in hydrophobic sites of cell plasma membranes.

Investigations of cryoprotective properties of EG under 1M concentration, DMFA under 1M and mixture

Литература

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев.: Наук. думка, 1994.– 140 с.
2. Егоров М.И., Копейка Е.Ф., Линник Т.П. и др. Влияние глицерина, этиленгликоля и режимов охлаждения на подвижность сперматозоидов собак // Пробл. криобиологии.– 2004.– № 4.– С. 13-20.
3. Кашинцев Б.С. Клиническое исследование больных животных.– Воронеж, 1975.– 36 с.
4. Линник Т.П. Физико-химические факторы криповреждения и криозащиты сперматозоидов петухов в цикле низкотемпературного консервирования: Дис. ... докт. биол. наук.– Харьков, 2003.– 327 с.
5. Линник Т.П., Егоров М.И., Дюбка Т.С., Белоножка А.П. Влияние компонентов криозащитных сред на жизнеспособность сперматозоидов собак в процессе криоконсервирования // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №4.– С. 645-656.
6. Луговой В.И. Механизмы повреждающего действия замораживания на растворимые и мембраносвязанные ферменты: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.– Харьков, 1985.– 38 с.
7. Максудов Г.Ю., Артюшкова В.А., Трошко Е.В. Оценка качества семени животных.– Пуццино, 1988.– 43 с.
8. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.– Киев: Урожай.– 1978.– 225 с.
9. Протива М. Очистка растворителей // Лабораторная техника органической химии.– М.: Мир, 1966.– С. 591-615.
10. Рошаль А.Д., Дюбка Т.С., Линник Т.П. 4'-диметиламинофлавонол – новый флуоресцентный зонд для оценки криопротекторных свойств органических веществ в водных растворах // Вісник Харків. ун-ту.– 2005.– №716.– С. 106-111.
11. Шергин Н.П. Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных.– М., 1967. – 216 с.
12. Патент 68172 А (Україна) МПК 7 А 01 N 1/02 Спосіб отримання сперми собак / В.І. Грищенко, Є.Ф. Копійка, М.І. Єгоров, І.М. Кучков, І.В. Черкашина. Заявл. 31.10.2003. Публ. 15.07.04. Бюл.7.– С. 4.26.
13. Патент 8590 (Україна) МПК 19 А 01 N 1/02 Середовище Єгорова для криоконсервування сперматозоїдів собаки / М.І. Єгоров, В.І. Грищенко, Т.П. Ліннік, О.М. Новиков. Заявл. 10.01.2005. Публ. 15.08.2005. Бюл. 8.
14. Arbeiter K. Anovulatory ovarian cycles in dogs // J. Reprod. Fert. Suppl.– 1993.– Vol. 47.– P. 453-456.
15. Darin-Bennet A., Poulos A., White I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa // J. Reprod. Fert.– 1974.– Vol. 41.– P. 471-474.
16. Dreier H.K., Dreier C. Endoscopic examination of the reproductive tract of the bitch // J. Reprod Fert. Suppl.– 1993.– Vol. 47.– P. 525.
17. England G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review // J. Reprod. Fert. Suppl.– 1993.– Vol. 47.– P. 243-255.
18. Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species // Theriogenology.– 2000.– Vol. 53, N1.– P. 175-186.
19. Fontbonne A., Badinard F. Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen // J. Reprod. Fert. Suppl.– 1993.– Vol. 47.– P. 325-327.
20. Linde-Forsberg C., Forsberg M.J. Result of 527 controlled artificial insemination in dogs // J. Reprod. Fert. Suppl.– 1993.– Vol. 47. – P. 313-323.
21. Nothling J.O., Volkmann D.H. Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility on frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination // J. Reprod. Fert. Suppl.– 1993.– Vol. 47.– P. 329-333.
22. Olar T.T., Bower R.A., Pickett B.W. Influence of extender cryopreservation and seminal processing procedures on of cryoprotectants of EG and DMFA under 0.5 concentrations for each have shown that EG is less effective cryoprotectant for CS if compared with DMFA. Cryoprotective effect of the mixture of DMFA and EG in 0.5 concentration for each in TFA medium on CS is less manifested if compared with the medium, containing only DMFA in the concentration of 1M. The reduction of the motility index of frozen-thawed CS was more manifested in the media containing either EG, or the mixture of EG and DMFA. The results of these experiment permit to conclude about comparatively higher EG toxicity for CS if compared with DMFA.

Conclusions

The mixture of DMFA and EG cryoprotectants under 0.5 M concentration of each has been revealed as manifesting lower cryoprotective influence in respect of canine spermatozoa than 1 M DMFA, but more efficient during cryopreservation of canine spermatozoa with the medium containing 1 M EG.

It has been demonstrated that canine spermatozoa cryopreserved with 1 M DMFA protection in the medium containing trioxymethylaminomethane, fructose and egg albumin preserve functional activity and when being used in artificial intravaginal insemination they enable the obtaining of healthy progeny.

References

1. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova dumka, 1994.– 140 p.
2. Egorov M.I., Kopeika E.F., Linnik T.P. et al. Effect of glycerol, ethylene glycol on morphofunctional characteristics of dogs' spermatozoa at different cryopreservation stages // Problems of Cryobiology.– 2004.– N4. – P. 13-20.
3. Kashintsev B.S. Clinical study of sick animals.– Voronezh, 1975.– 36 p.
4. Linnik T.P. Physical and chemical factors of cryodamage and cryoprotection of fowl spermatozoa in low temperature preservation cycle: Doctor of Biol.Sci. thesis, Kharkov, 2003.– 327 p.
5. Linnik T.P., Egorov M.I., Dyubko T.S. et al. Effect of cryoprotective medium components on canine spermatozoa viability during cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N4.– P. 645-656.
6. Lugovoy V.I. Mechanisms of freezing damaging effect on soluble and membrane-bound enzymes: Author abstract of the thesis of doctor of biol. sciences. – Kharkov. – 1985 – 38 p.
7. Maksudov G.Yu., Artyushkova V.A., Troshko E.V. Estimation of animal's semen quality.– Puschino, 1988.– 43 p.
8. Ostashko F.I. Deep freezing and long-term storage of breeders' sperm.– Kiev: Urozhay,1978.– 25 p.
9. Protiva M. Purification of solvents// Laboratornaya tekhnika organicheskoy khimii.– Moscow: Mir, 1966.– P. 591-615.
10. Roshal A.D., Dyubko T.S., Linnik T.P. 4'-dimethyl-amino-flavonol – new fluorescent probe for estimation of cryoprotective properties of organic substances in aqueous solutions// Visnyk Kharkiv. Univ.– 2005. – N716. – P. 106-111.

- postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws // *Theriogenology*.– 1988.– Vol. 31, N2.– P. 134-142.
23. *Songsasen N., Yu I., Murton S.* Osmotic sensitivity of canine spermatozoa // *Cryobiology*.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 79-90.
24. *Thirumata Sr., Ferrer M. S., Al-Jarrah A.* Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agent // *Cryobiology*.– 2003.– Vol. 47, N2.– P. 109-124.

Поступила 30.06.2006

11. *Shergin N.P.* Biochemistry of agricultural animals' spermatozoa. – Moscow, 1967. – 216 p.
12. *Patent 68172A (Ukraine) IPC 7A 01 N 1/02* Way of canine sperm obtaining/ V.I. Grischenko, E.F. Kopeika, M.I. Egorov, I.M. Kuchkov, I.V. Cherkashina. Applied 31.10.2003. Publ. 15.07.04. Bul. 7. – P. 4.26.
13. *Patent 8590 (Ukraine) IPC 19 A 01 N 1/02* Egorov's medium for cryopreservation of canine spermatozoa/ M.I. Egorov, V.I. Grischenko, T.P. Linnik, O.M. Novikov, Applied 10.01.2005. Publ. 15.08.2005.– Bul. 8.
14. *Arbeiter K.* Anovulatory ovarian cycles in dogs // *J. Reprod. Fertil. Suppl.*– 1993.– Vol. 47.– P. 453-456.
15. *Darin-Bennet A., Poulos A., White I.G.* The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa // *J. Reprod. Fert.*– 1974.– Vol. 41.– P. 471-474.
16. *Dreier H.K., Dreier C.* Endoscopic examination of the reproductive tract of the bitch // *J. Reprod. Fertil. Suppl.*– 1993.– Vol. 47.– P. 525.
17. *England G.C.W.* Cryopreservation of dog semen: a review // *J. Reprod. Fertil. Suppl.*– 1993.– Vol. 47.– P. 243-255.
18. *Farstad W.* Assisted reproductive technology in canid species // *Theriogenology*.– 2000.– Vol. 53, N1.– P. 175-186.
19. *Fontbonne A., Badinand F.* Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen // *J. Reprod. Fertil. Suppl.*– 1993.– Vol. 47.– P. 325-327.
20. *Linde-Forsberg C., Forsberg M.J.* Result of 527 controlled artificial insemination in dogs // *J. Reprod. Fertil. Suppl.*– 1993.– Vol. 47. – P. 313-323.
21. *Nothling J.O., Volkmann D.H.* Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility on frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination // *J. Reprod. Fertil. Suppl.*– 1993.– Vol. 47.– P. 329-333.
22. *Olar T.T., Bower R.A., Pickett B.W.* Influence of extender cryopreservation and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws // *Theriogenology*.– 1988.– Vol. 31, N2.– P. 134-142.
23. *Songsasen N., Yu I., Murton S.* Osmotic sensitivity of canine spermatozoa // *Cryobiology*.– 2002.– Vol. 44, N1.– P. 79-90.
24. *Thirumata Sr., Ferrer M. S., Al-Jarrah A.* Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agent // *Cryobiology*.– 2003.– Vol. 47, N2.– P. 109-124.

Accepted in 30.06.2006