

УДК 57.043:591.463.1

Е.Ф. Копейка

Экологическая ниша как фактор, определяющий криорезистентность сперматозоидов рыб

UDC 57.043:591.463.1

E.F. Kopeika

Ecological Niche as the Factor Determining Cryoresistance in Fish Spermatozoa

Реферат: В работе проведено сравнение криорезистентности сперматозоидов рыб из разных экологических ниш и объяснена природа различий на основании результатов собственных исследований и данных других авторов. С использованием методов криоконсервирования и визуальной оценки подвижности спермы установлены различия криорезистентности сперматозоидов рыб, нерестящихся в пресной воде при температуре 0...10°C (6 видов лососевых рыб), 18...25°C (5 пород карпов) и морской воде при 16...25°C (кефаль-сингиль). Установлено, что количественные и качественные различия в подвижности размороженной спермы рыб из разных экологических ниш, обусловлены разной прочностью межмолекулярных связей липидов мембран и соотношением между компонентами, определяющим образование гидрофильных пор при фазовых переходах липидов.

Ключевые слова: экологическая ниша, температура, соленость воды, рыбы, сперматозоиды, криоповреждения, криорезистентность, гидрофильные поры.

Реферат: У роботі проведено порівняння криорезистентності сперматозоїдів риби із різних екологічних ніш та пояснено природу відмінностей на основі власних досліджень та даних інших авторів. З використанням методів криоконсервування сперми та візуальної оцінки її рухливості була визначена криорезистентність сперми риби із нерестом у прісній воді за температури 0...10°C (6 видів лососевих риби), 18...25°C (5 порід карпів) та морській воді при 16...25°C (кефаль-сінгіль). Встановлено, що кількісні та якісні відмінності в рухливості розмороженої сперми риби із різних екологічних ніш обумовлені різною міцністю міжмолекулярних зв'язків ліпідів мембран та співвідношенням між її компонентами, яке визначає утворення гідрофільних пор при фазових переходах ліпідів.

Ключові слова: екологічна ніша, температура, солоність води, риби, сперматозоїди, криоушкодження, криорезистентність, гідрофільні пори.

Abstract: In this research we have compared the spermatozoa cryoresistance of fish species from different ecological niches and explained the nature of differences based on our own results and published data. Differences in spermatozoa cryoresistance of fish species, spawning in fresh water at 0...10°C (6 species of salmonids), 18...25°C (5 species of carp) and in marine water at 16...25°C (mullet-golden mullet) were established using cryopreservation and visual assessment methods for sperm motility. Quantitative and qualitative differences in motility of frozen-thawed fish sperm from different ecological niches were established as stipulated by different strength of molecule-to-molecule bonds of membrane lipids and the ratio between components, determining the formation of hydrophilic pores at lipid phase transitions.

Key words: ecological niche, temperature, water salinity, fish species, spermatozoa, cryoinjuries, cryoresistance, hydrophilic pores.

В процессе длительной эволюции среда обитания рыб расширилась от Арктики и Антарктики с температурой воды от $-1,91^{\circ}\text{C}$ до горячих вод пустынь с температурой 52°C , от мелководья пресных озер и рек до глубоких соленых вод морей и океанов [13]. Установлено, что условия обитания и размножения рыб оказали влияние на свойства репродуктивных клеток, однако сравнительных данных относительно криоустойчивости сперматозоидов рыб из разных экологических ниш получено недостаточно [5]. Кроме того, были изучены различия криоустойчивости сперматозоидов рыб

During long evolution the fish habitat extended from the Arctic and Antarctic with water temperature from -1.91°C to desert hot waters of 52°C , from shallow of freshwater lakes and rivers to deep salt water of seas and oceans [32]. Fish habitat and reproduction conditions were established to affect the properties of reproductive cells, but there were not enough comparative data on fish spermatozoa cryosensitivity from different ecological niches [7]. In addition, the differences in fish spermatozoa cryoresistance of only two spawning niches have been studied, but the mechanism of their cryodamage and the

Отдел криобиологии системы репродукции, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Department of Cryobiology of Reproduction System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Адрес для корреспонденции:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-19, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: e.kopeik@yahoo.com

Address for correspondence:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: e.kopeik@yahoo.com

Поступила 28.05.2014

Принята в печать 01.10.2014

Received May, 28, 2014

Accepted October, 01, 2014

только из двух ниш нереста, но механизм их криоповреждения и причины появления качественных различий не выяснены. Поэтому целью работы было сравнить криорезистентность сперматозоидов рыб из разных экологических ниш, объяснить природу установленных различий и механизм повреждений на основании результатов собственных исследований и данных других авторов.

Материалы и методы

Объектом изучения были сперматозоиды разных пород карпов, нерестящихся в пресной воде при температуре 18...25°C, лососевых Камчатки, Сахалина и Прибалтики с температурой нереста 0...10°C, а также кефали-сингиля *Liza aurata* (Risso), нерестящейся в соленой воде Азовского моря при 16...25°C. Для исследования спермы рыб, нерестящихся в пресной воде, использовали разработанную нами для спермы карпов криозащитную среду, содержащую 60,06 mM NaCl; 0,67 mM KCl; 0,68 mM CaCl₂·6H₂O; 1,75 mM MgSO₄·7H₂O; 27,8 mM NaHCO₃; 3,3 mM сахарозы; 68,8 mM маннита; 117 mM трис-оксиметил-аминометана; 1,39 mM восстановленного глутатиона, pH среды доводили до значения 8,1 добавлением HCl. Затем полученную среду смешивали с желтком куриного яйца в соотношении 9:1.

К одной части спермы лососевых рыб при постоянном перемешивании медленно добавляли при 5°C по стенке флакона три части раствора, содержащего 6,67% (об/об) диметилсульфоксида (ДМСО), конечная концентрация которого в суспензии клеток соответствовала 5%. Сперму карпов разбавляли 1:1 средой с этиленгликолем до конечной концентрации криопротектора 8,2% (об/об).

Сперму карпов и лососевых рыб криоконсервировали в ампулах по 0,7 мл в парах жидкого азота по следующей программе охлаждения: от 5 до -15°C со скоростью 1–2 град/мин; от -15 до -70°C со скоростью 15–20 град/мин при последующем погружении в жидкий азот.

Сперму кефали-сингиля разбавляли 1:4 средой, содержащей 0,102 M сахарозы, 0,176 M KCl и 1,26 M ДМСО (9,9% об/об) в конечной концентрации. Ампулы с суспензией клеток (0,5 мл) помещали на горизонтальную пластину, находящуюся на высоте 7 см над поверхностью жидкого азота, в который их погружали через 30 мин. Сперму размораживали в водяной бане при 40°C до появления жидкой фазы. Размораживание завершали, интенсивно встряхивая ампулы при комнатной температуре.

Подвижность сперматозоидов до и после криоконсервирования оценивали визуально под микроскопом при ×800. Сперму карпов и лососевых рыб

reasons of occurred qualitative differences have remained unclear. Therefore, the research aim was to compare the cryoresistance of fish spermatozoa from different ecological niches, to explain the nature of differences set and the mechanism of injury based on own results and data reported in literature.

Materials and methods

The research objects were spermatozoa of different carp species spawning in fresh water at 18...25°C, those of salmon fishes of Kamchatka, Sakhalin and the Baltic states with 0...10°C spawning temperature, as well as mullet-golden mullet *Liza aurata* (Risso), spawning in saltwater of the Sea of Azov at 16...25°C. To study the sperm of fish spawning in fresh water we used the cryoprotective media designed by us for carp sperm containing 60.06 mM NaCl; 0.67 mM KCl; 0.68 mM CaCl₂·6H₂O; 1.75 mM MgSO₄·7H₂O; 27.8 mM NaHCO₃; 3.3 mM sucrose; 68.8 mM mannitol; 117 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane; 1.39 mM reduced glutathione, medium pH was approached to 8.1 by adding HCl. Then the obtained medium was mixed with egg yolk in 9:1 ratio.

The one part of salmon sperm was slowly supplemented with three parts of the solution containing 6.67% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), final concentration of which in cell suspension corresponded to 5%, under continuous stirring at 5°C, and on the flask wall. The carp sperm was 1:1 diluted with ethylene glycol-containing medium up to 8.2% final concentration of cryoprotectant (v/v).

The sperm of carp and salmon fishes were cryopreserved in 0.7 ml vials in liquid nitrogen vapors by the following cooling program: from 5 down to -15°C and -15 down to -70°C with 1–2 and 15–20 deg/min rate respectively, followed by immersion into liquid nitrogen.

The mullet-golden mullet sperm were 1:4 diluted with the medium containing 0.102 M sucrose, 0.176 M KCl and 1.26 M DMSO (9.9% v/v) in final concentration. Vials with cell suspension (0.5 ml) were placed on a horizontal plate, located at 7 cm height above the liquid nitrogen surface, wherein they were immersed 30 min later. The sperm were thawed in a water bath at 40°C until liquid phase appeared. Thawing was completed by intensive shaking of vials at room temperature.

Spermatozoa motility prior to and after cryopreservation was visually assessed with microscope at ×800. The carp and salmon sperm were activated by 40-fold water dilution, and the ratio of forwardly moving cell number to the total number of spermatozoa in a visual field was determined, expressed in percentage. Spermatozoa motility of mullet-golden mullet was determined in marine water.



активировали разбавлением водой в 40 раз и сразу определяли отношение количества поступательно движущихся клеток к общему количеству сперматозоидов в поле зрения, которое выражали в процентах. Подвижность сперматозоидов кефали-сингиля определяли в морской воде.

При статистической обработке результатов использовали программу «Excel» («Microsoft», США). Значимость различий между выборками определяли с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Установлено, что температура воды при нересте у карпов и лососевых рыб значимо влияла на подвижность размороженной спермы (рисунок).

После размораживания средняя подвижность сперматозоидов лососевых рыб ($17,4 \pm 5,9\%$) ($n = 36$) была в 2,8 раза ниже ($p < 0,01$), чем карпов ($48,5 \pm 10,8\%$) ($n = 30$). Среди лососевых рыб нерка нерестится при самой низкой температуре. Подвижность ее сперматозоидов после размораживания самая низкая. Кроме того, сперматозоиды лососевых рыб без добавления активатора вибрировали на месте, а при активации в солевых средах имели более высокую подвижность, чем в пресной воде. При повторной оценке качества спермы карпов в течение нескольких секунд подвижность клеток в отдельных образцах была на 20–40% ниже, чем сразу после размораживания. Ранее нами было отмечено, что сперматозоиды рыб, нерестящихся в пресной воде, стали обладать большей чувствительностью к изменениям осмотичности среды по сравнению со спермой до замораживания [6, 23]. Поэтому при осеменении яйцеклеток карпов использовали солевые среды, а для спермы осетровых рыб уменьшали степень разбавления [6].

Размороженная сперма кефали-сингиля *Liza aurata* (Risso) имела подвижность ($65,8 \pm 7,3\%$) ($n = 6$) или 95,1% по отношению к контролю до замораживания ($69,2 \pm 6,1\%$) ($n = 6$). Для этой спермы характерна высокая криорезистентность, как и для других исследованных нами морских рыб [5, 19].

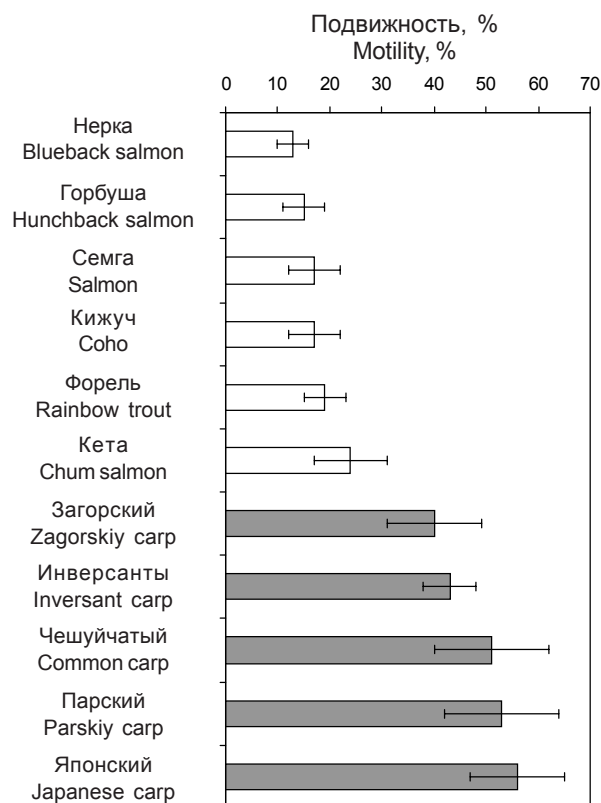
Полученные результаты свидетельствуют о связи криорезистентности сперматозоидов рыб с нишей размножения (различиями в температуре воды при нересте и солености воды). В процессе длительной эволюции и акклиматизации организмов с разными геномами к определенным условиям обитания или размножения сформировались сперматозоиды с разной морфологией, структурой мембран и другими характеристиками. Среди рыб, нерестящихся в пресной воде, сперматозоиды осетровых в отличие от карпов и лососевых имеют акросому. Для лосо-

Results were statistically processed using Excel software (Microsoft, USA). Significance of differences between samples was determined using the nonparametric Mann-Whitney U-test.

Results and discussion

The water temperature during carp and salmon spawning was established to significantly affect the frozen-thawed sperm motility (Figure).

After thawing an average motility of spermatozoa in salmon species equaled to ($17.4 \pm 5.9\%$) ($n = 36$) was 2.8 times lower ($p < 0.01$) than in carp ones ($48.5 \pm 10.8\%$) ($n = 30$). Among salmon species the Blueback salmon spawns at the lowest temperature. The motility of its spermatozoa after freeze-thawing is the lowest. In addition the salmon spermatozoa vibrated *in situ* if no activating agent was added, but when activated in saline media they had a higher motility than in fresh water. During repeated assessment of carp sperm quality within a few seconds the



Подвижность размороженных сперматозоидов: □ – виды лососевых рыб (температура воды при нересте 0...10°C); ■ – породы карпов (температура воды при нересте 18...25°C); данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение.

Motility of frozen-thawed spermatozoa: □ – salmon species (0...10°C water temperature during spawning); ■ – carp breeds (18...25°C water temperature during spawning); data are means ± standard deviation.



севых и осетровых рыб характерна разная температура воды при нересте. В процессе акклиматизации рыб к пресной и морской воде возникли разные механизмы активации сперматозоидов, существенно повлиявшие на криорезистентность. Сперматозоиды речных рыб при выходе в пресную воду с осмотичностью ниже 250 мОсмоль/кг набухают и активируются [19]. Сперматозоиды морских рыб активируются при повышении осмотичности среды от 350 до 1100 мОсмоль/кг [33], не изменяя объем [19]. Для сперматозоидов рыб, нерестящихся в пресной воде, характерна низкая проницаемость мембран, так как при солёности воды ниже 5–8‰ повреждаются некоторые белки, ДНК и гиалуриновая кислота [10]. Проницаемость для воды мембран сперматозоидов *Xiphophorus maculatus* составляет 0,005–0,009 мкм/мин/атм [34], зебрафиш *Danio rerio* – 0,021 мкм/мин/атм [22], карпа *Cyprinus carpio* – 0,16 мкм/мин/атм [7]. У сперматозоидов пресноводных рыб более короткое время подвижности по сравнению с некоторыми видами морских рыб. Эти данные свидетельствуют о том, что криорезистентность сперматозоидов рыб, нерестящихся в пресной воде (карпов и лососевых рыб), ниже, чем у сперматозоидов морских рыб (кефаль-сингиль).

Кроме способов активации и проницаемости мембран, сперматозоиды рыб, нерестящихся в пресной и солёной воде, имеют разный состав мембран, что также существенно влияет на криорезистентность [5]. У сперматозоидов морских рыб с высокой криорезистентностью соотношение холестерина:фосфолипиды (ХЛ:ФЛ) в 2,5–3 раза выше, чем у сперматозоидов пресноводных рыб с более низкой криорезистентностью [5]. Практически полная сохранность размороженных клеток морских рыб может быть обусловлена влиянием высоких концентраций холестерина на фазовые переходы липидов мембран и более высокой проницаемостью мембран, чем у рыб, нерестящихся в пресной воде. Даже в процессе акклиматизации форели к солёной воде увеличивается проницаемость мембран сперматозоидов к пропидиум йодиду [25]. Как было доказано на модельных объектах, фазовые переходы могут быть исключены при высоких концентрациях холестерина [16, 30]. По данным некоторых авторов фазовый переход липидов мембран может быть причиной повреждений и гибели клеток [3, 11, 21]. Благодаря высокой концентрации холестерина и проницаемости мембран сперматозоиды морских рыб, по нашему мнению, менее чувствительны к режимам криоконсервирования и составу сред, чем сперматозоиды рыб, нерестящихся в пресной воде. Как показал J.H.S. Vlastxer [14], кусочки молока сельди, криоконсервированные

motility of cells in certain samples was by 20–40% lower than right after thawing. Previously we have noted that the spermatozoa of fish spawning in fresh water have become more sensitive to changes in medium osmolarity as compared to the sperm before freezing [17, 18]. Therefore, for carp egg insemination we used the saline media, and for sperm of sturgeon species we reduced the dilution rate [18].

Frozen-thawed sperm of mullet-golden mullet *Liza aurata* (Risso) had motility of $65.8 \pm 7.3\%$ ($n = 6$) or 95.1% relative to the control $69.2 \pm 6.1\%$ ($n = 6$) before freezing. This sperm is characterized by a high cryoresistance, as well as that for other marine fishes we studied [7, 10].

Our findings testify to the relationship of fish spermatozoa cryoresistance with reproductive niche (differences in water temperature during spawning and water salinity). During long evolution and acclimatization of organisms with different genomes to certain conditions of habitat or reproduction there were formed the spermatozoa with different morphology, structure of membranes and other indices. Among the freshwater spawning fish the sturgeon sperm unlike carp and salmon ones have an acrosome. For salmon and sturgeon fishes different water temperatures during spawning are characteristic. During acclimatization of fish to fresh and marine waters there have been appeared various mechanisms of sperm activation significantly affecting the cryoresistance. River fish spermatozoa when releasing into a fresh water with an osmoticity below 250 mOsm/kg swell and are activated [10]. Marine fish spermatozoa are activated with increasing the osmoticity of the medium from 350 to 1,100 mOsm/kg [28] without changing the volume [10]. For the sperm of fresh water spawning fish, membrane low permeability is characteristic, since when the water salinity is below 5–8‰ some proteins (DNA and hyaluronic acid) are damaged [16]. Permeability for water of the sperm membranes of *Xiphophorus maculatus* makes 0.005–0.009 $\mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$ [29], 0.021 $\mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$ [14] for zebrafish *Danio rerio*, 0.16 $\mu\text{m}/\text{min}/\text{atm}$ for common carp *Cyprinus carpio* [30]. In freshwater fish sperm the motility time is shorter as compared with certain types of marine fish. These data suggest that sperm cryoresistance of fish spawning in fresh water (carp and salmon) is lower than that of marine fish spermatozoa (mullet-golden mullet).

In addition to the methods of activation and permeability of membrane, the sperm of fish spawning in fresh and marine waters, have different compositions of membranes, also significantly affecting cryoresistance [7]. In marine fish sperm with a high cryoresistance the cholesterol: phospholipid ratio (CL:FL) is in 2.5–3 times higher than that of freshwater fish sperm

в разбавленной морской воде с 12,5% глицерина со скоростью 1 град/мин или путем их погружения в сухую углекислоту (-79°C), оплодотворили 85 и 80% яйцеклеток соответственно.

Таким образом, криорезистентность сперматозоидов морских рыб по сравнению со спермой рыб, нерестящихся в пресной воде, более высокая и связана с высоким соотношением ХЛ:ФЛ. Но она неодинакова у всех видов каждой ниши, так как исходные геномы всех рыб разные. Соотношение ХЛ:ФЛ в мембранах сперматозоидов рыб и других животных в каждой экологической нише различно, потому что при любых условиях функционирования клеток оно поддерживает жидкокристаллическое состояние мембран. Но С. Labbe и G. Maisse исходя из результатов экспериментов по акклимации радужной форели (микижи) *Oncorhynchus mykiss* к разным температурам [24] и форели *Salmo trutta f. fario* к разной солености воды [25] пришли к выводу, что холестерин не повышает криорезистентность сперматозоидов, а содержание рыбы в соленой воде не влияет на его концентрацию в мембранах. Однако такое заключение не совсем корректно, так как авторы сравнивали результаты экспериментов по акклимации рыб [24, 25] с данными по акклиматизации [5]. При этом они получили интересные результаты [24], подтверждающие направленность общебиологических процессов, происходящих в природе. После трех лет выращивания форели при 8 и 18°C [24] в мембранах сперматозоидов были идентичны соотношения ХЛ:ФЛ, а также оплодотворяющая способность размороженной спермы, что свидетельствовало о закреплённых в геноме свойствах клеток и преадаптационном синдроме [8]. После перемещения рыб в ванну с температурой 13°C в мембранах сперматозоидов обеих групп изменилась концентрация холестерина – основного модулятора мембран, противодействующего изменению температуры и сохраняющего их фазовое состояние [16]. У рыб, выращенных при 8°C , на 21-е сутки после переноса соотношение ХЛ:ФЛ в мембранах сперматозоидов увеличилось на 23,5%, что отрицательно повлияло на оплодотворяющую способность криоконсервированной спермы из-за отсутствия у форели системы устранения избытка холестерина. А в другой группе рыб, выращенной при 18°C , соотношение ХЛ:ФЛ уменьшилось на 18,2%, что не повлияло на результаты оплодотворения. Если изменение соотношения ХЛ:ФЛ в сперме было в физиологических пределах, то оно не оказывало отрицательного влияния на оплодотворяющую способность криоконсервированных сперматозоидов. В частности С. Pustowka и соавт. [35] установили, что форель,

with lower cryoresistance [7]. Quite a complete preservation of marine fish thawed cells may be due to the influence of high cholesterol concentrations on the phase transitions of membrane lipids and higher membrane permeability than the ones in fresh water spawning fish. Even during the trout acclimation to marine water the sperm membrane permeability to propidium iodide increases [20]. As it was shown in the model objects, the phase transitions could be excluded at high cholesterol concentrations [6, 25]. As some authors reported the phase transition of the membrane lipids can be the cause of a damage and death of the cells [3, 12, 15]. Due to a high cholesterol concentration and membrane permeability the marine fish spermatozoa from our point of view are less sensitive to cryopreservation regimens and the compositions of media than the fresh water spawning fish. Blaxter J.H.S. showed, that herring milt pieces cryopreserved either in diluted marine water with 12.5% glycerol at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ or by immersing them into a dry carbon dioxide (-79°C) fertilized, respectively 85 and 80% of oocytes [4].

Thus marine fish sperm cryoresistance if compared with the one of fresh water spawning fish sperm is higher and associated with a high CL:PL ratio. But it is not the same for all the species of each niche, since the initial genomes of all the fishes are different. The CL:PL ratio in membranes of fish sperm and other animals in each ecological niche is different, because under any conditions of functioning of the cells, it maintains a cell membrane liquid-crystalline state. However, С. Labbe and G. Maisse using the results of experiments on acclimation of rainbow trout (Kamchatka steelhead) *Oncorhynchus mykiss* to different temperatures [19] and *Salmo trutta f. fario* trout to various water salinities [20] concluded that cholesterol did not increase sperm cryoresistance, and the maintenance of fish in a marine water did not affect its concentration in membranes. However, this conclusion is not quite correct, since the authors compared the results of experiments on acclimation of fishes [19, 20] with the data on acclimatization [7]. Herewith they have got some interesting results [19], confirming the baseline of general biological processes occurring in nature. After three years of growing the trout at 8 and 18°C [19] in the sperm membranes the CL:PL ratio was identical as well as thawed sperm fertilizing abilities, indicating the fixed in genome cell properties and pre-adaptation syndrome [34]. When placing the fish into 13°C bath in the sperm membranes of both groups the concentration of cholesterol as the main modulator of membrane resisting the temperature alterations and preserving their phase state changed [6]. In the fish grown at 8°C , to the 21st post-transfer day the CL:PL ratio in sperm membranes increased



потреблявшая корм с большим содержанием холестерина, имела и самую высокую криорезистентность спермы.

Основная причина различий криорезистентности исследуемых нами видов карпов и лососевых рыб связана с температурой акклиматизации. Это наиболее сильный фактор окружающей среды, определяющий основные свойства мембран, клеток и организмов. В соответствии с законом Аррениуса при отклонении температуры на 10°C в 2–3 раза изменяется скорость реакций и на 3% – кинетическая энергия молекул, определяющая прочность слабых межмолекулярных связей мембран и других структур. Клетки могут функционировать при разных температурах, если мембраны находятся в жидкокристаллическом состоянии, которое достигается в результате гомовискозной адаптации липидов [36], семилабильного состояния белков [1], а также изменения термодинамических характеристик мембран и свойств клеток [11]. Как было показано в работе J.A. Logue и соавт. [28] на 17 видах костистых рыб и двух видах гомойотермных животных (крыса, индюк), обитающих в разных температурных зонах, межвидовые различия состава мембран имеют адаптивную связь с температурой: чем ниже температура обитания вида, тем больше концентрация ненасыщенных жирных кислот (ЖК) в фосфатидилхолине (ФХ) и фосфатидилэтаноламине (ФЭА). Для синаптических мембран мозга антарктических видов рыб характерна наиболее высокая степень ненасыщенности ЖК, а для гомойотермных животных самая низкая. Установлено, что при холодовой адаптации у ФХ увеличивается концентрация полиненасыщенных ЖК, а у ФЭА мононенасыщенных ЖК [28]. У видов, адаптированных к холоду, ненасыщенность ЖК имеет линейную зависимость с количеством двойных связей в каждой из них. Такая направленность процессов под действием разных температур имеет общебиологический характер.

Лососевые рыбы, для которых характерна низкая температура воды при нересте, имеют самые слабые межмолекулярные связи в мембранах, наиболее высокую степень ненасыщенности ЖК, самое низкое соотношение ХЛ:ФЛ [24, 29]. Из-за высокой ненасыщенности ЖК сперматозоидам свойственна наибольшая жидкость мембран, необходимая для функционирования при отрицательных и положительных околонулевых температурах. Вероятно, этим можно объяснить наиболее низкую криорезистентность сперматозоидов лососевых. Вследствие высокой жидкости мембран сперматозоидов лососевых при охлаждении спермы белки свободно перемещаются, образуя кластеры [17], что создает неоднородность мем-

by 23.5%, that negatively affected the fertilizing ability of cryopreserved sperm because of the lack in a trout of the mechanism eliminating an excessive cholesterol. And in another group, grown at 18°C, the CL:PL ratio decreased by 18.2%, that did not affect the fertilization results. If the change in the CL:PL ratio in sperm was within physiological limits, it did not negatively affect the fertilizing ability of cryopreserved sperm. In particular S. Pustowka *et al.* [31] found that the high cholesterol fed trout had the highest sperm cryoresistance.

The main reason of the differences in cryoresistance of the studied by us carp and salmon species is related to temperature acclimation. This is the most powerful environmental factor, determining basic properties of membranes, cells and organisms. In accordance with the Arrhenius law during temperature deviation by 10°C the rates of reaction changed in 2–3 times and by 3% did the kinetic energy of molecules, which determined the strength of weak intermolecular bonds of membranes and other structures. The cells may function at different temperatures, if the membranes are in liquid crystal state, which is achieved by homoviscous adaptation of lipids [33], semilabile state of proteins [1], as well as changes in thermodynamic characteristics of membranes and cell properties [15]. As J.A. Logue *et al.* demonstrated [23] in 17 species of bony fishes and two species of homoiothermal animals (rat, turkey) habitant in different temperature zones, the differences between species in composition of membranes were adaptively related to temperature: the lower the temperature of the species, the higher the concentration of unsaturated fatty acid (FA) in phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PEA). For brain synaptic membranes of Antarctic fish species the highest degree of FA unsaturation is characteristic and for homeothermal animals is the lowest one. It has been established that during cold adaptation in FC the concentration of polyunsaturated FA increases, while in PEA the one of monounsaturated FA does [23]. In cold adapted species the unsaturation of FA is of linear dependence with the number of double bonds in each of them. This orientation of the processes under the influence of different temperatures is of general biological origin.

Salmons, characterized by a low water temperature during spawning have the weakest molecule-to-molecule bonds in the membranes, the highest degree of FA unsaturation, the lowest CL:PL ratio [19, 24]. Because of high FA unsaturation the sperm is peculiar with the highest fluidity of membranes, needed for functioning at negative and positive near-zero temperatures. This can likely explain the lowest cryoresistance of salmon sperm. As the consequence of



браны и может привести к утрате белков, а также к ее повреждению при фазовом переходе липидов [2, 3]. Карпы нерестятся при более высоких температурах, поэтому соотношение ХЛ:ФЛ у них выше на 11% [5], чем у лососевых [24], и более прочные межмолекулярные связи липидов мембран. По нашему мнению, вследствие этого в их мембранах не образуются кластеры белков при криоконсервировании [18]. Поэтому криорезистентность спермы карпов выше, чем сперматозоидов лососевых рыб. Однако потери липидов или белков могут происходить и при разбавлении спермы криозащитной средой на подготовительном этапе, создавая неоднородность мембраны и предпосылки к криповреждениям при фазовом переходе липидов мембран.

В мембранах сперматозоидов карпов [5], лососевых [24, 29] и рыб, нерестящихся в соленой воде, обнаружены полиненасыщенные ЖК [5], с присутствием которых многие авторы связывают криорезистентность сперматозоидов сумчатых млекопитающих [31], хряков [38], слонов [37], лисиц [32], человека [20] и птиц [15]. Как считают П. Хочачка и Дж. Сомеро [11], эти кислоты могут предохранять встроенные в мембраны белки, образуя с ними большое количество слабых гидрофобных связей. Сохранность мембранных белков при криоконсервировании чрезвычайно важна в реализации функций сперматозоидов. При кормлении карпов форелевым кормом с высоким содержанием белков подвижность и оплодотворяющая способность размороженной спермы были соответственно на 30 и 50% выше, чем у потреблявших корм с низкой концентрацией белка [12]. По мнению В. Litman и D. Mitchell [27] увеличение полиненасыщенности ЖК в положении sn-2 влияет на степень сжимаемости двойного слоя липидов мембран при криоконсервировании, вследствие чего могут происходить конформационные изменения ферментов, связанных с мембранами. Вероятно, благодаря наличию полиненасыщенных ЖК и антифризов при криоконсервировании спермы Атлантической зубатки *Anarhichas lupus* в семенной плазме подвижность сохраняли 25% клеток, а после добавления криопротектора сохранность подвижных клеток увеличилась до 80% [26]. Основные криповреждения сперматозоидов происходят при фазовых переходах липидов мембран на этапах замораживания и размораживания. При этом часть клеток утрачивает способность активироваться из-за дефицита энергии и грубых повреждений мембран вследствие утраты белков и липидов мембран, а также образования пор. У оставшихся сперматозоидов из-за гидрофильных пор, образовавшихся в мембранах в процессе фазового перехода липидов, повышается осмотическая чувствительность, хруп-

high fluidity of salmon sperm membranes during sperm cooling the proteins move freely by forming the clusters [8], that creates a membrane heterogeneity and can result in the loss of proteins, as well as in its damage during phase transition of lipids [2, 3]. Carps spawn at higher temperatures, so the CL:PL ratio in them is higher by 11% [7] than that for salmons [19], and have stronger intermolecular bonds of membrane lipids. We believe that due to this in their membranes no protein clusters are formed during cryopreservation [9]. Therefore carp sperm cryoresistance is higher than the one of salmon sperm. However, the loss of lipids or proteins can occur when sperm is diluted at the preliminary stage by cryoprotective medium, making the membrane heterogenous and the preconditions for cryoinjury during phase transition of membrane lipids.

In sperm membranes of carp [7], salmon [19, 24], and the fishes spawning in marine water, there were found polyunsaturated FA [7], the presence of which many authors associate the cryoresistance of sperm of marsupial mammals [26], boars [38], elephants [36], foxes [27], humans [11] and birds [5]. P. Hochachka and G. Somero [15] believe that these acids can protect membrane incorporated proteins, by forming with them a large number of weak hydrophobic bonds. Preservation rate of membrane proteins during cryopreservation is extremely important in implementing the spermatozoa functions. When feeding carps with a trout feed with high protein content the motility and fertilizing ability of thawed sperm were respectively 30 and 50% higher than in those fed with low protein concentration fishfood [37]. According to B. Litman and D. Mitchell [22], an increase of FA polyunsaturation in sn-2 position affects the degree of a double layer compressability of lipid membranes during cryopreservation, which may occur due to conformational changes in membranes associated enzymes. Probably due to the presence of polyunsaturated FA and antifreezes during cryopreservation of Atlantic wolffish *Anarhichas lupus* sperm 25% of the cells retained the motility and after cryoprotectant addition the preservation rate of motile cells increased up to 80% in semen plasma [21]. Basic cryoinjuries of spermatozoa occur during phase transitions of membrane lipids at the stages of freezing and thawing. Herewith a part of cells loses its ability to be activated due to energy deficit and severe membrane damages as the consequence of the loss of proteins and membrane lipids and pore formation. The remaining spermatozoa due hydrophilic pores formed in membranes during phase transition of lipids an osmotic sensitivity, fragility of membranes [2], and stress susceptibility [17, 18] are increased. Even in 1935, B. Deryagin [35] was the first who explained the mechanism of liquid thin



кость мембран [2] и чувствительность к стрессам [6, 23]. Еще в 1935 г. Б. Дерягин [9] впервые объяснил механизм повреждений тонких пленок жидкостей как результат возникновения раскливающего давления. А.М. Белоус и соавт. [3] теоретически обосновали вероятность возникновения пор в криоконсервированных клетках в процессе фазового перехода липидов мембран. Затем возникновение гидрофильных пор в процессе замораживания было показано на модельных пленках липидов [2] и эритроцитах [4].

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение, что экологическая ниша обитания или нереста рыб при взаимодействии с разными геномами клеток формирует разные свойства сперматозоидов рыб (в том числе и криорезистентность). Криорезистентность сперматозоидов рыб в каждой нише различна и имеет полифакторную природу. Она зависит от прочности межмолекулярных связей компонентов мембран, степени жидкостности мембран, количества полиненасыщенных ЖК, соотношения ХЛ:ФЛ и от содержания белков. При низких температурах нереста рыб и концентрации солей в воде криорезистентность сперматозоидов более низкая, чем в нишах с более высокой температурой и соленостью воды. Качественные изменения свойств мембран сперматозоидов, вызывающие хрупкость мембран и повышенную чувствительность к осмотичности среды, возникают в результате образования в мембранах гидрофильных пор при фазовом переходе липидов.

Литература

1. Александров В.Я. Клетки, молекулы и температура. – Ленинград. – Наука, 1975. – 332 с.
2. Антонов В.Ф., Черныш А.М., Пасечник В.И. и др. / Биофизика: Учеб. для вузов. – М.: Владос, 1999. – 288 с.
3. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Бондаренко Т.П. Молекулярные механизмы криоповреждений биомембран // Биофизика. Физико-химические механизмы криоповреждений биологических структур / Под ред. чл.-корр. АН УССР Н.С. Пушкаря. – М., 1978. – Т. 9. – С. 80–114.
4. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. – К.: Наук. думка, 1994. – 144 с.
5. Дрокин С.И., Копейка Е.Ф., Грищенко В.И. Различия в устойчивости к криоконсервированию и специфика липидных составов сперматозоидов морских и пресноводных видов рыб // ДАН СССР. – 1989. – Т. 304, №6. – С. 1493–1496.
6. Копейка Е.Ф., Новиков А.Н. Криоконсервирование спермы рыб. В кн.: Криоконсервирование клеточных суспензий / Под ред. А.А. Цуцаевой. – К.: Наук. думка, 1983. – С. 204–215.
7. Пуговкин А.Ю., Копейка Е.Ф., Нардид О.А., Черкашина Я.О. Исследование проницаемости мембран сперматозоидов

film damages as a result of the appearance of disjoining pressure. A.M. Belous and co-authors [3] theoretically grounded the probability of pores appearance in cryopreserved cells during phase transition of membrane lipids. Then the appearance of hydrophilic pores during freezing has been shown in model films of lipids [2] and erythrocytes [13].

Thus due to these findings we may conclude that ecological niche of habitat or spawning of fish when interacting different genomes of cells forms various properties of fish spermatozoa (including cryoresistance too). Fish spermatozoa cryoresistance in each niche is different and is of polyfactor origin. It depends on the strength of molecule-to-molecule bonds of membrane components, fluidity rate of membranes, number of polyunsaturated FA, CH:FL ratio and protein content. Under low temperatures of fish spawning and salt concentration in water the spermatozoa cryoresistance is lower than in the niches with higher temperatures and water salinity. Qualitative changes in the properties of sperm membranes, causing their fragility and an increased sensitivity to medium osmoticity, occur as the result of formation in membranes of hydrophilic pores at phase transition of lipids.

References

1. Alexandrov V.Ya. Cells, macromolecules and temperature. Leningrad: Nauka; 1975.
2. Antonov B.F., Chernisch A.M., Pasetchnik V.I. et al. Biophysics: Textbook for university students. Moscow: Vlados; 1999.
3. Belous A.M., Bondarenko V.A., Bondarenko T.P. Molecular mechanisms of cryodamages in biomembranes. In: N.S. Pushkar, editor. Biophysics. Physical and chemical mechanisms of cryodamages in biological structures. Moscow; 1978; 9: 80–114.
4. Blaxter J.H.S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature 1953; 172(4391): 1189–1190.
5. Blesbois E., Grasseau I. and Seigneurin F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction 2005; 129(3): 371–378.
6. Crockett E.L. Cholesterol Function in Plasma Membranes from Ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. Amer Zool 1998; 38(2): 291–304.
7. Drokin S.I., Kopeika E.F., Grischenko V.I. Differences in resistance to cryopreservation and specificity of lipid formulations of spermatozoa of marine and freshwater fish species. DAN USSR 1989; 304(6): 1493–1496.
8. Drokin S., Stein H., Bartscherer H. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta F. fario*). Cryobiology 1998; 37(3): 263–270.
9. Drokin S.I., Stein H., Govorukha T.P. Ultrastructure of carp *Cyprinus carpio* spermatozoa after cooling, dilution and freeze-thawing. CryoLetters 2003; 24(1): 49–55.
10. Dzuba B.B., Kopeika E.F. Relationship between the changes in cellular volume of fish spermatozoa and their cryoresistance. CryoLetters 2002; 23(6): 353–360.



- карпа для молекул воды // Биофизика. – 2014. – Т. 59. Вып. 3. – С. 481–487.
8. Смирнов Л.П., Богдан В.В. Липиды в физиолого-биохимических адаптациях эктотермных организмов к абиотическим и биотическим факторам среды. – М.: Наука, 2007. – 184 с.
 9. Сумм Б.Д. Основы коллоидной химии: 2-е изд. – М.: Академия, 2007. – 241 с.
 10. Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов. – Ленинград: Наука, 1974. – 236 с.
 11. Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. – М.: Мир, 1977. – 310 с.
 12. Цветкова Л.И., Титарева Л.Н., Кочетов А.А. и др. О некоторых факторах, влияющих на криоустойчивость спермы карпа *Cyprinus carpio* // Вопросы ихтиологии. – 1995. – Т. 35, №6. – С. 804–810.
 13. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных. Приспособление и среда: В 2-х кн. – М.: Мир, 1982. – 800 с.
 14. Blaxter J.H.S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring // *Nature*. – 1953. – Vol. 172, №4391. – P. 1189–1190.
 15. Blesbois E., Grasseau I., Seigneurin F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation // *Reproduction*. – 2005. – Vol. 129, №3. – P. 371–378.
 16. Crockett E.L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature // *Amer. Zool.* – 1998. – Vol. 38, №2. – P. 291–304.
 17. Drokin S., Stein H., Bartscherer H. Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta F. fario*) // *Cryobiology*. – 1998. – Vol. 37, №3. – P. 263–270.
 18. Drokin S.I., Stein H., Govorukha T.P. Ultrastructure of carp *Cyprinus carpio* spermatozoa after cooling, dilution and freeze-thawing // *CryoLetters*. – 2003. – Vol. 24, №1. – P. 49–55.
 19. Dzuba B.B., Kopeika E.F. Relationship between the changes in cellular volume of fish spermatozoa and their cryoresistance // *CryoLetters*. – 2002. – Vol. 23, №6. – P. 353–360.
 20. Giraud M.N., Motta C., Boucher D. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa // *Human Reproduction*. – 2000. – Vol. 15, №10. – P. 2160–2164.
 21. Ghetler Y., Yavin S., Shalgi R., Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes // *Human Reproduction*. – 2005. – Vol. 29. – P. 1–5.
 22. Hagedorn M., Ricker J., McCarthy M. et al. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm // *Cryobiology*. – 2009. – Vol. 58, №1. – P. 12–19.
 23. Kopeika E., Kopeika J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish // In: *Fish Spermatology* / Eds.: S.M.H. Alavi, J. Cosson, K. Coward, Gh. Rafiee. – Oxford: Alpha Science Ltd, 2007. – P. 347–396.
 24. Labbe C., Maise G. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane // *Aquaculture*. – 1996. – Vol. 145, №4. – P. 281–294.
 25. Labbe C., Maise G. Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity // *Aquaculture*. – 2001. – Vol. 201, №3–4. – P. 287–299.
 26. Le Francois N.R., Lamarre S.G., Tveiten H. et al. Sperm cryoconservation in *Anarhichas* sp., endangered cold-water aquaculture species with internal fertilization // *Aquacult. Int.* – 2007. – Vol. 16. – P. 273–279.
 27. Litman B., Mitchell D. A role for phospholipids polyunsaturation in modulating membrane protein function // *Lipids*. – 1996. – Vol. 31, №1. – P. 193–197.
 28. Logue J.A., de Vries A.L., Fodor E. et al. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure // *J. Exp. Biol.* – 2000. – Vol. 203, Pt. 14. – P. 2105–2115.
 29. Giraud M.N., Motta C., Boucher D. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction* 2000; 15(10): 2160–2164.
 30. Ghetler Y., Yavin S., Shalgi R., Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Human Reproduction* 2005; 29: 1–5.
 31. Gordienko E.A., Puschkar N.S. Physical grounds of low temperature preservation of cell suspensions. Kiev: Naukova dumka; 1994.
 32. Hagedorn M., Ricker J., McCarthy M. et al. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Cryobiology* 2009; 58(1): 12–19.
 33. Hochachka P.W., Somero G.N. Strategies of biochemical adaptation. Philadelphia: Saunders; 1973.
 34. Khebovitch V.V. The critical salinity of biological processes. Leningrad: Nauka; 1974.
 35. Kopeika E., Kopeika J. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi S.M.H., Cosson J., Coward K., Rafiee Gh., editors: *Fish Spermatology*. Oxford: Alpha Science Ltd; 2007. p. 347–396.
 36. Kopeika E.F., Novikov A.N. Cryopreservation of sperm fish. In: Tsutsayeva A.A., editor. *Cryopreservation of cell suspensions*. Kiev: Naukova dumka; 1983. p. 204–215.
 37. Labbe C., Maise G. Influence of rainbow trout thermal acclimation on sperm cryopreservation: relation to change in the lipid composition of the plasma membrane. *Aquaculture* 1996; 145(4): 281–294.
 38. Labbe C., Maise G. Characteristics and freezing tolerance of brown trout spermatozoa according to rearing water salinity. *Aquaculture* 2001; 201(3–4): 287–299.
 39. Le Francois N.R., Lamarre S.G., Tveiten H. et al. Sperm cryoconservation in *Anarhichas* sp., endangered cold-water aquaculture species with internal fertilization. *Aquacult Int* 2007; 16: 273–279.
 40. Litman B., Mitchell D.A. A role for phospholipids polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids* 1996; 31(1): 193–197.
 41. Logue J.A., de Vries A.L., Fodor E. et al. Lipid compositional correlates of temperature-adaptive interspecific differences in membrane physical structure. *J Exp Biol* 2000; 203(14): 2105–2015.
 42. Mansour N., Lahnsteiner F., McNiven M.A. et al. Relationship between fertility and fatty acid profile of sperm and eggs in Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture* 2011; 318(3–4): 371–378.
 43. McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry* 1993; 32(2): 516–522.
 44. Miller R.R. Jr, Sheffer C.J., Cornett C.L. et al. Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. *Cryobiology* 2004; 49(2): 137–148.
 45. Miller R.R. Jr., Cornett C.L., Waterhouse K.E. et al. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. *Cryobiology* 2005; 51(1): 66–75.
 46. Morisawa M., Suzuki K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 1980; 210(4474): 1145–1147.
 47. Pinisetty D., Huang C., Dong Q. et al. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platy fish *Xiphophorus maculatus*. *Cryobiology* 2005; 50(3): 250–263.
 48. Pugovkin A.Yu., Kopeika E.F., Nardid O.A., Cherkashina Ya.O. Study of membrane permeability of carp sperm for water molecules. *Biophysics* 2014; 59(3): 481–487.



29. Mansour N., Lahnsteiner F., McNiven M.A. et al. Relationship between fertility and fatty acid profile of sperm and eggs in Arctic char, *Salvelinus alpinus* // *Aquaculture*. – 2011. – Vol. 318, Issues 3–4. – P. 371–378.
30. McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32, №2. – P. 516–522.
31. Miller R.R. Jr, Sheffer C.J., Cornett C.L. et al. Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success // *Cryobiology*. – 2004. – Vol. 49, №2. – P. 137–148.
32. Miller R.R. Jr, Cornett C.L., Waterhouse K.E. et al. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation // *Cryobiology*. – 2005. – Vol. 51, №1. – P. 66–75.
33. Morisawa M., Suzuki K. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts // *Science*. – 1980. – Vol. 210, №4474. – P. 1145–1147.
34. Pinisetty D., Huang C., Dong Q. et al. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platy fish *Xiphophorus maculatus* // *Cryobiology*. – 2005. – Vol. 50, №3. – P. 250–263.
35. Pustowka C., McNiven M.A., Richardson G.P. et al. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation // *Aquaculture Research*. – 2000. – Vol. 31, №3. – P. 297–305.
36. Sinensky M. Homeoviscous adaptation a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1974. – Vol. 71, №2. – P. 522–525.
37. Swain S.E., Miller R.R. Jr. A postcryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa // *Zoo Biology*. – 2000. – Vol. 19, №5. – P. 461–473.
38. Waterhouse K.E., Hofmo P.O., Tverdal A. et al. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm // *Reproduction*. – 2006. – Vol. 131, №5. – P. 887–894.
31. Pustowka C., McNiven M.A., Richardson G.P. et al. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation. *Aquaculture Research* 2000; 31(3): 297–305.
32. Schmidt-Nielsen, Knut. *Animal Physiology: Adaptation and Environment*, 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1997.
33. Sinensky M. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71(2): 522–525.
34. Smirnov L.P., Bogdan V.V. *Lipids in physiological and biochemical adaptations of ectothermic organisms to abiotic and biotic environmental factors*. Moscow: Nauka; 2007.
35. Summ B.D. *Foundations of colloid chemistry*. 2nd ed. Moscow: Akademia; 2007.
36. Swain S.E., Miller R.R. Jr. A postcryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. *Zoo Biology* 2000; 19(5): 461–473.
37. Tsvetkova L.I., Titareva L.N., Kochetov A.A. et al. About certain factors affecting cryoresistance of *Cyprinus carpio* carp sperm. *Journal of Ichthyology* 1995; 35(6): 804–810.
38. Waterhouse K.E., Hofmo P.O., Tverdal A. et al. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 2006; 131(5): 887–894.

