

## Влияние ДМСО и продуктов его распада на сперматозоиды и выживаемость эмбрионов вьюнов *Misgurnus fossilis* L.

Ю.Е. Копейка<sup>1</sup>, В.И. Грищенко<sup>1</sup>, Е.Ф. Копейка<sup>1</sup>, Т.П. Линник<sup>1</sup>, О. В. Бибенко<sup>1</sup>, А. А. Зинченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Национальный научный центр лекарственных средств Минздрав Украины, г. Харьков

## Effect of DMSO and Its Decay Products on Spermatozoa and Survival of Loach *Misgurnus fossilis* L. Embryos

КОПЕЙКА Ю. Е.<sup>1</sup>, ГРИЩЕНКО В. И.<sup>1</sup>, КОПЕЙКА Е. Ф.<sup>1</sup>, ЛИННИК Т. П.<sup>1</sup>, БИБЕНКО О. В.<sup>1</sup>, ЗИНЧЕНКО А. А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>National Centre of Medicinal Means of the Ministry of Health Care of the Ukraine, Kharkov

Для определения влияния ДМСО и продуктов его распада на геном сперматозоидов исследовали выживаемость эмбрионов вьюнов *Misgurnus fossilis* L., полученных с использованием спермы, эквilibрированной 40-50 мин при 4 °С в 3-х растворах 10 %-го ДМСО различной степени очистки. Выживаемость икры и эмбрионов до 20-й стадии не зависела от чистоты фракции ДМСО и была на 1/3 ниже, чем в контроле. Снижение выживаемости эмбрионов после 20-й стадии в опытах с I и II фракциями ДМСО коррелировало с обнаруженными в них продуктами распада ДМСО и было косвенным доказательством их возможного влияния на генетический аппарат сперматозоидов. После эквilibрации спермы в самой чистой III фракции ДМСО выживаемость эмбрионов снижалась, но не у всех самок. Это объясняется меньшим отрицательным воздействием III фракции ДМСО на сперматозоиды, а также, вероятно, различиями в репарационной способности и отягощенности мутациями икры разных самок. Выживаемость эмбрионов зависела от стадии эмбрионального развития. Таким образом, ДМСО оказывал цитотоксическое и селективное действие на сперматозоиды и, возможно, вызывал какие-то нарушения стабильности всего генетического материала клеток, что отражалось на выживаемости эмбрионов. Степень выраженности этого влияния зависела от чистоты ДМСО, потенциала самки и качества ее икры, стадии развития эмбрионов.

Для визначення впливу ДМСО та продуктів його розпаду на геном сперматозоїдів вивчали виживання ембріонів вьюнів *Misgurnus fossilis* L., одержаних з використанням сперми після еквilibрації 40-50 хв при 4°С в 3-х розчинах 10%-го ДМСО різної чистоти. Виживання ікри та ембріонів до 20-ї стадії не залежало від чистоти фракції ДМСО і було на 1/3 нижче, ніж в контролі. Зниження виживання ембріонів після 20-ї стадії в експериментах з I та II фракціями ДМСО корелювало зі знайденими в них продуктами розпаду ДМСО і було непрямим доказом їх можливого впливу на генетичний апарат сперматозоїдів. Після еквilibрації сперми в найчистішій III фракції ДМСО виживання ембріонів знижувалось, але не у всіх самок. Це пояснюється меншим негативним впливом III фракції ДМСО на сперматозоїди, а також, можливо, різницею в репараційній здібності та насиченості мутациями ікри різних самок. Виживання ембріонів залежало від стадії ембріонального розвитку. Таким чином, ДМСО викликав цитотоксичну та селективну дію на сперматозоїди, а також, можливо, якісь зміни стабільності всього генетичного матеріалу клітин, що впливало на виживання ембріонів. Сила цього впливу залежала від чистоти ДМСО, потенціалу самки, якості ікри, стадії розвитку ембріонів.

To examine the effect of dimethylsulfoxide (DMSO) of different purity on the genome of reproductive cells, spermatozoa from loach (*Misgurnus fossilis* L.) were equilibrated in 3 media containing 10 % DMSO of different purity at 4°C for 40-50 minutes. Survival of embryos derived from sperm subjected to DMSO exposure was not affected by the purity of DMSO fractions before 20-th stage of embryo development. It was equally decreased for all three studied fractions of DMSO and it was 1/3 times lower than that in the control. It was explained by presence of cytotoxic and selective effects of DMSO on sperm population in the ejaculate. The estimated decrease of embryo survival after 20-th stage for the embryos derived from sperm equilibrated with fraction I and II correlated with the data obtained after spectrophotometrical analysis of admixtures in DMSO solution. The decrease of embryo survival after 20-th stage was interpreted as indirect evidence of genetic disturbance caused by equilibration of sperm with fraction I and II. The equilibration of sperm with the purest (III) fraction of DMSO caused decrease of survival of embryos as well but not for all females. It was explained by less significant effect of the purest fraction of DMSO on the spermatozoa, and by variety in repair capability and genetic potential between different female individuals. The survival of embryos was dependent on the stage of development. Thus, DMSO has a cytotoxic and selective effect as well as causes some disturbance in genetic material of sperm that consequently brings to the decrease of embryo survival. The estimated effect was dependent on the purity of DMSO, individual female, egg quality and stage of embryo development.

Диметилсульфоксид известен как один из наиболее эффективных криопротекторов, широко используемых в криобиологии и медицине [5, 20]. Но, несмотря на довольно длительное его применение и интенсивное изучение, до сих пор нет полной ясности о механизмах его взаимодействия с клеткой и ее компонентами. Сложно

Dimethyl sulfoxide is known as one of the most efficient cryoprotectants, widely used in cryobiology and medicine [5, 20]. However despite its quite long-term application and intensive studying, till now there is no complete lucidity about the mechanisms of its interaction with a cell and its component. It is very difficult to say how safe is DMSO for genome.

сказать, насколько ДМСО безопасен для генома. Ashwood-Smith и Grant [11] обнаружили увеличенное количество хромосомных аномалий в клетках китайского хомячка, замороженных с 10%-м раствором ДМСО. В повторных экспериментах эти результаты не подтвердились [10], но авторы все же не исключают возможности повреждений генома на молекулярном уровне. Противоречия полученных данных они объясняют тем, что клетки или культуры могли быть поражены вирусами, которые активировались ДМСО или криоконсервированием. Кроме того, при длительной экспозиции клеток с криопротектором возможно дерепрессирующее действие ДМСО на геном [8, 9].

При изучении такого маркера мутагенеза, как обмен участками в сестринских хроматидах, также были получены противоречивые данные. Ashwood-Smith [8, 9] не обнаружил повышения уровня обмена участками сестринских хроматид, тогда как Bouquet et al [12] сообщили о противоположных результатах.

Более стабильные результаты были получены при изучении других характеристик ДНК после воздействия ДМСО на различные клетки [3, 6, 7, 25]. После инкубации органов мышей в растворе ДМСО были обнаружены одонитевые разрывы ДНК [25]. Инкубация клеток культуры фибробластов в течение 1 ч в 1 %-м растворе ДМСО ускоряла щелочную элюцию ДНК, что свидетельствовало о появлении одонитевых разрывов в ее молекулах [6, 7]. Тот же эффект и увеличение вязкости ДНК обнаружили на выделенной из криоконсервированной спермы карпа ДНК [3]. С увеличением концентрации ДМСО до 25% этот эффект увеличивался, а затем снижался, т.е. зависимость количества разрывов ДНК от концентрации ДМСО имела обратимый характер.

Анализ причин противоречий в результатах, получаемых даже одними авторами, показывает, что ни в одной из отмеченных работ не приводятся характеристики степени чистоты используемого ДМСО и условий его хранения. Но известно, что это вещество нестабильно и при несоответствующих условиях хранения разрушается, и, вероятно, может быть одной из причин вариабельности результатов. При контакте с воздухом, под воздействием света и при повышении температуры выше 20°C в ДМСО появляются примеси сульфонов, сульфатов и сульфидов. При смешивании его со средами может даже образовываться формальдегид [17, 18], который хорошо известен как мутаген. Таким образом, из приведенных работ нельзя сказать, что же повлияло на ДНК клеток: ДМСО или продукты его распада. Поэтому цель данного исследования – изучение влияния ДМСО и продуктов его распада на геном сперматозоидов

Ashwood-Smith and Grant [11] have found the increased number of chromosome abnormalities in the cells of Chinese hamster, frozen with 10% DMSO solution. In repeated experiments these results were not confirmed [10], but the authors still do not exclude the possibility of genome impairments at molecular level. The contradictions of the obtained data are explained by them that the cells or cultures could be impaired with the viruses which were activated by DMSO or cryopreservation. In addition, during long-term exposure of cells with cryoprotectant the depressing effect of DMSO on genome is also possible [8, 9].

When studying such a mutagenesis marker as the exchange by sites in sister chromatids, as well there were obtained the contradictory data. Ashwood-Smith [8, 9] did not reveal the increase in the level of the exchange by the sites with sister chromatids, meanwhile Bouquet et al [12] informed about contrary results.

More stable results were obtained when studying other DNA characteristics after DMSO effect on different cells [3, 6, 7, 25]. After incubation of mice organs in DMSO solution there were found DNA ruptures [25]. Incubation of cells of fibroblast cultures during 1 hr in 1% DMSO solution accelerated DNA alkaline elution, that testified to an appearance of single thread ruptures in its molecules [6, 7]. The same effect and an increase in DNA viscosity were revealed on isolated from DNA of carp cryopreserved sperm [3]. With the rise in concentration of the number of DNA up to 25% this effect increased and then reduced, i.e. the dependence of the number of DNA ruptures on the concentration of DMSO was of a reversible character.

The analysis of contradictions in the results, being obtained even by the same authors, has shown that no one among the mentioned works noted the characteristics of the purity degree of the used DMSO and the conditions of its storage. As it is known this substance is instable and under inappropriate storage conditions destroys that probably can be one of the causes of variability of the results. During air contact under light effect and with a temperature increase higher than 20°C in DMSO the admixtures of sulphones, sulphates and sulphides appear. When mixing it with the media, even formaldehyde can be formed [17, 18], which is well known as mutagen. Thus from the papers presented above no one can say what affected the cell DNA: DMSO or its decay products. Therefore the aim of this investigation is to study the DMSO effect and its decay products on the genome of fish spermatozoa in the equilibration process. To estimate possible effects as a test we have chosen the embryo survival.

рыб в процессе эквilibрации. Для оценки возможных эффектов в качестве теста была выбрана эмбриональная выживаемость.

При выполнении исследований 1 л химически чистого ДМСО фирмы РЕАХИМ смешали с 50 г активированного угля и через 24 ч отфильтровали. Затем ДМСО подвергли двойной перегонке при пониженном давлении 133,3-266,6 Па (1-2 мм рт. ст.) и температуре кипения 48-50°C. Фракции, полученные в начале и конце первого цикла перегонки, отбрасывали. Во 2-м цикле очистки использовали только среднюю фракцию, из которой были получены 3 фракции различной степени чистоты (табл. 1). Коэффициент экстинкции каждой фракции определяли на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 275 нм, а коэффициент преломления – на рефрактометре УРЛ-1 при 20°C.

Оценку примесей в разных фракциях ДМСО производили на газовом хроматографе GC14B Shimadzu, Japan. Для получения хроматограмм исследуемых фракций использовали следующие параметры: капиллярную кварцевую колонку размером 60 × 0,32 мм HP-INNOWAX; толщину слоя неподвижной фазы 0,5 мм; температуру колонки 200°C; температуру испарителя и детектора 220°C; скорость газа носителя (гелия) 1,2 мл/мин; деление потока 1:60. Используемый раствор препарата готовили по методике Европейской фармакопии [13]. Содержание диметилсульфона определяли методом абсолютной калибровки, а количество всех остальных примесей – методом внутренней нормализации.

Вьюнов *Misgurnus fossilis* L. инъецировали хорионическим гонадотропином в дозе 200 ед. на самца и 300 ед. на самку (11 самцов и 6 самок). До инъекции рыбу содержали в холодильнике при температуре воды 5°C, а после инъекции – при 18°C.

Через 36 ч после инъекции при появлении в воде первых, выброшенных самками икринок, самцов декапитировали, а их молоки поместили в сухую посуду и раздробили. Затем их смешали вместе и разделили на 4 равные части по 0,4 мл. Каждая порция была эквilibрирована в течение 40 мин при 4°C в 4-х разных растворах. Первая порция была контрольная и состояла из 0,4 мл молока + 0,6 мл среды без криопротектора (39 мМ трис-оксиметил-аминометана, 1,4 мМ восстановленного глутатиона, 139 мМ маннитола, 29 мМ NaCl, 11 мМ CaCl<sub>2</sub>, 2 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 2 мМ KHCO<sub>3</sub>, pH 8,0). Остальные 3 порции спермы были эквilibрированы в такой же среде, но с 10%-м раствором ДМСО разных фракций, полученных после перегонки.

Икра была получена от 6 инъецированных самок. На основании визуальной оценки для эксперимента была отобрана только хорошая икра

In the course of experiments the chemically pure DMSO (1 liter) (REACHIM) was mixed with 50 g of activated carbon and in 24 hrs it was filtered. Then DMSO was twice distilled under lowered pressure 133.3-266.6 Pa (1-2 mm of mercury column) and boiling temperature of 48-50°C. The fractions obtained at the beginning and the end of the first cycle of distillation were excluded. In the second cycle of purification there was used only the average fraction, from which 3 fractions of different purity degree were obtained. Coefficient of extinction for each fraction was determined with the SF-26 spectrophotometer at the wavelength 275 nm, and the coefficient of refraction with the refractor of URL-1 at 20°C.

The estimation of admixtures in various fractions of DMSO was performed with gas chromatograph GC14B (Shimadzu, Japan). To obtain the chromatogramme of the studied fractions we used the following parameters: capillary quartz column with the dimensions 60mm × 0.32mm (HP Innowax); the width of the layer of immobile phase 0.5 mm; column temperature 200°C; temperature of evaporator and detector 220°C; the gas carrier rate (helium) 1.2 ml/min; flux division 1:60. The used solution of preparation was prepared according to the European Pharmacopoeia [13]. The content of dimethyl sulfone was determined by the method of absolute calibration and the amount of other admixtures by the method of inner normalization.

We injected the loaches *Misgurnus fossilis* L. (11 males and 4 females) with chorionic gonadotropin in a dose of 200 units per a male and 300 units per female. Before the injection the fish was maintained in a refrigerator at water temperature of 5°C and at 18°C after the injection.

In 36 hrs after the injection when in water the first eggs appear the males were decapitated and their milt were placed to dry vials and fragmented. Then they were mixed together and were divided into 4 aliquots by 0.4 ml. Each aliquot was equilibrated during 40 min at 4°C in 4 different solutions. The first aliquot was the control and consisted of 0.4 ml of milt + 0.6 ml of medium without cryoprotectant (39 mM tris-oxymethyl-aminomethane, 1.4 mM of reduced glutathione, 139 mM mannitol, 29 mM NaCl, 11 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM KHCO<sub>3</sub>, pH 8.0). The rest 3 aliquots of sperm were equilibrated at the same medium but with 10% solution of DMSO of various fractions obtained after distillation.

The eggs were obtained from 6 injected females. Basing on visual evaluation for the experiment there were chosen only good eggs from 4 females (yellow, transparent). About up to 4,000 eggs from each female were divided into 4 aliquots, that made 16

от 4-х самок (желтая, прозрачная). Приблизительно по 4000 икринок от каждой самки разделили на 4 равные порции, что составило 16 равных порций икры. Осеменение производили в чашках Петри. Каждую порцию икры (приблизительно 1000 икринок) смешали с 0,2 мл суспензии сперматозоидов и 1 мл аквариумной воды в качестве активатора. Для улучшения условий осеменения и предотвращения склеивания икры в комки содержимое чашек Петри интенсивно взбалтывали в течение 90 с. После осеменения каждую порцию икры промыли водой и разделили приблизительно еще на 4 равные части (250 икринок на чашку Петри) для создания оптимальных условий развития эмбрионов.

Оценка выживаемости эмбрионов производилась до стадии вылупления. В результате некротических процессов неоплодотворенная икра и погибшие эмбрионы становились белыми и могли быть легко идентифицированы на основании визуальной оценки. Живые эмбрионы оставались желтоватыми и прозрачными. Погибшие икринки и эмбрионы отбирали регулярно на 8-, 20-, 22-, 30-, 35-, 37-й стадиях развития, определяемых с использованием стереоскопического микроскопа. Воду меняли во время каждого отбора икры. Подсчет выживаемости эмбрионов разбили на 2 этапа: до и после 20-й стадии. Выживаемость до 20-й стадии считали по отношению к общему количеству икры в чашке Петри, после 20-й стадии – к количеству эмбрионов, оставшихся на 20-й стадии развития. Икру инкубировали при 20-22°C.

Чтобы выяснить влияние ДМСО и продуктов его распада на сперматозоиды, оценивали выживаемость эмбрионов в разноуровневом многофакторном эксперименте, в котором 2 фактора были на 4-х уровнях (контроль, I, II и III фракции ДМСО; самки –1, 2, 3 и 4), а один фактор на 2-х (стадии 8 и 20) и 4-х уровнях (стадии 22, 30, 35 и 37). Статистический анализ многофакторных экспериментов проводили с использованием дисперсионного анализа. После этого достоверность различий между подуровнями факторов дополнительно оценивалась с помощью критерия множественных сравнений Дункана.

Физико-химические характеристики 3-х фракций ДМСО обобщены в табл. 1. Результаты хроматографии представлены в табл. 2. На хроматограммах испытуемых растворов присутствовало от 3-х до 4-х дополнительных пиков – примесей, не совпадающих по времени удерживания с пиком диметилсульфона. Содержание диметилсульфона не превышало

аликвотов икры. The insemination was performed in Petri dishes. Each aliquot of eggs (approximately 1,000 eggs) was mixed with 0.2 ml of sperm suspension and 1 ml of aquarium water as an activator. To improve the conditions of insemination and prevent the eggs' sticking into clots the content of Petri dishes was intensively shaken during 90 seconds. After insemination each aliquot of eggs were washed with water and divided approximately in 4 aliquots (250 eggs per Petri dish) to create optimal conditions for embryo development.

The estimation of embryo survival was performed at the stage of hatching. In the result of necrotic processes the non-fertilised eggs and dead embryos became white and could be easily identified basing on visual assessment. Alive embryos have remained yellowish and transparent. Dead eggs and embryos were regularly selected at 8-, 20-, 22-, 30-, 37-th stages of development, determined using stereoscopic microscope. Water was changed during each eggs' selection. The calculation of survival of embryos was divided into 2 stages: before and after 20<sup>th</sup> stage. The survival up to the 20<sup>th</sup> stage was calculated on the ratio to total number of eggs in the Petri dishes, after the 20<sup>th</sup> stage to the number of embryos, remained at the 20<sup>th</sup> stage of development. The eggs were incubated at 20-22°C.

To elucidate the DMSO effect and the products of its decay on spermatozoa we have determined the survival of embryos using the multifactor experiment with various levels, in which 2 factors were at 4 levels (control, DMSO fractions I, II, III; females 1, 2, 3, 4) and one factor at 2 levels (the 8 and 20<sup>th</sup> stages) and 4 levels (22, 30, 35 and 37<sup>th</sup> stages). After dispersion analysis of these experiments with the criterion of Duncan's multiple comparisons we have estimated additionally the statistical significance of the differences between sublevels of the factors.

Physical and chemical characteristics of various different DMSO fractions are summarised in Table 1. The results of chromatography are presented

**Таблица 1.** Физико-химические параметры фракций ДМСО  
**Table 1.** Physical and chemical parameters of DMSO fractions

Номер фракции Fraction number	Коэффициент преломления $N^{20^{\circ}C}$ Refraction coefficient $N^{20^{\circ}C}$	Коэффициент экстинкции $E_{275}$ Extinction coefficient $E_{275}$
ДМСО до перегонки DMSO before distillation	1.4760	1.2
I	1.4778	0.4
II	1.4784	0.32
III	1.4784	0.28

**Таблица 2.** Данные хроматографического анализа фракций ДМСО**Table 2.** Data of chromatographic analysis of DMSO fractions

Название вещества Name of the substance	Фракции Fractions		
	I	II	III
Метилсульфид Methylsulfide	0.021	0.0227	0.0102
Диметилсульфид Dimethylsulfide	0.0092	0.0094	0.0102
ДМСО DMSO	99.9445	99.9472	99.9617
X <sub>1</sub>	0.0065	0.0064	-
X <sub>2</sub>	0.0189	0.0141	0.018
Всего, % Total, %	100	100	100

**Примечание.** X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> – неидентифицированные примеси

**Note.** X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> - non-identified admixtures

0,005% во всех 3-х фракциях ДМСО. Помимо метил- и диметилсульфида были определены еще две неидентифицированные примеси. Но в самой чистой III фракции ДМСО одно из веществ не было идентифицировано.

Из дисперсионного анализа (табл. 3) следует, что все изучаемые группы факторов оказывали значительное влияние ( $P < 0,01$ ) на выживаемость эмбрионов до 20-й стадии. Также значимы и взаимодействия между этими факторами. На рис. 1-3 видно, как изменялась выживаемость эмбрионов в каждой группе исследуемых факторов. Все фракции ДМСО значительно снижали выживаемость эмбрионов на 25-30 % в сравнении с контролем (рис.1). Значительное влияние на этот показатель оказывала самка (рис. 2). Различия в выживаемости эмбрионов между самками были значимы и в контроле (рис. 3).

Как видно из данных (табл. 4), все рассматриваемые факторы оказывали значимое влияние ( $P < 0,01$ ) на изучаемый параметр.

Из рис. 4 следует, что достоверное снижение выживаемости эмбрионов наблюдалось

in Table 2.

On chromatogrammes of the examined solutions there were from 3 to 4 additional peaks: the admixtures, which do not coincide on time of retention with the dimethyl sulfone peak.

Content of dimethyl sulfone did not exceed 0.005% in all 3 fractions of DMSO. In addition to methyl- and dimethyl sulfide we have determined two more non-identified admixtures. However in the purest DMSO fraction III, one of the substances was not identified.

The dispersion analysis (Table 3) shows, that all studied groups of factors affected considerably ( $P < 0.01$ ) the survival of embryos before the 20<sup>th</sup> stage. The interactions between these factors are statistically significant as well.

Figures 1-3 demonstrate the changes in embryo survival for each group of the investigated factors. All DMSO fractions significantly reduced the embryo survival by 25-30% in comparison with the control (Fig. 1). Female considerably affected this index (Fig. 2). The differences in survival of embryos between females were statistically significant in the control as well (Fig. 3).

The data of Table 4 show that all considered factors affected significantly ( $P < 0.01$ ) the parameter under study.

**Таблица 3.** Дисперсионный анализ результатов выживаемости эмбрионов до 20-й стадии  
**Table 3.** Dispersion analysis of survival results of the embryos before the 20<sup>th</sup> stage

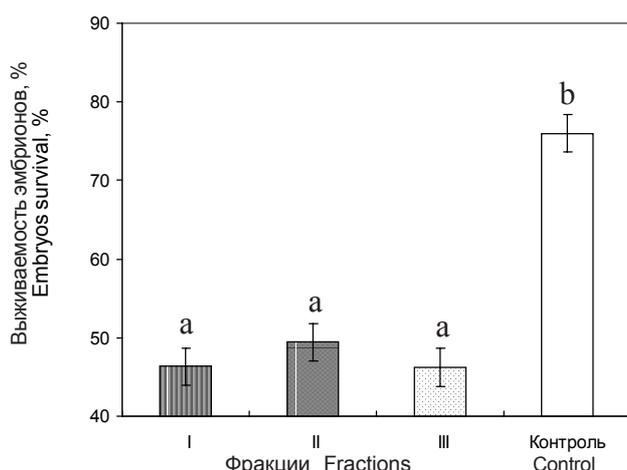
Источники вариаций Source of variations	Сумма квадратов Sum of squares	Степень свободы d.f.	Средний квадрат Mean square	F-отношение F-ratio	Уровень значимости Significance level
Основные эффекты Main effects	186105.98	7	26586.57	578.676	.0000
Фракции ДМСО DMSO fractions	20043.43	3	6681.14	145.420	.0000
Самки Females	3298.89	3	1099.63	23.934	.0000
Стадии Stages	162763.65	1	162763.65	1000.000	.0000
2-факторные взаимодействия 2-factor interactions	11973.110	15	798.2073	17.374	.0000
Фракции ДМСО × Самки DMSO fractions × females	2468.656	9	274.2951	5.970	.0000
Фракции ДМСО × Стадии DMSO fractions × stages	8061.108	3	2687.0360	58.485	.0000
Самки × Стадии Females × Stages	1443.346	3	481.1154	10.472	.0000
Ошибка опыта Residual	4824.1019	105	45.943827		
Всего Total (corr.)	202903.19	127			

**Таблица 4.** Дисперсионный анализ результатов выживаемости эмбрионов после 20-й стадии  
**Table 4.** Dispersion analysis of survival results of the embryos after the 20<sup>th</sup> stage

Источники вариаций Source of variations	Сумма квадратов Sum of squares	Степень свободы d.f.	Средний квадрат Mean square	F-отношение F-ratio	Уровень значимости Significance level
<b>Основные эффекты Main effects</b>					
Фракции ДМСО DMSO fractions	18826.119	3	6275.373	17.750	.0000
Самки Females	4589.465	3	1529.822	4.327	0055
Стадии Stages	47790.554	3	15930.185	45.060	0.0000
<b>2-факторные взаимодействия 2-factor interactions</b>					
Фракции ДМСО × Самки DMSO fractions × females	19423.649	9	2158.1832	6.105	0.0000
Фракции ДМСО × Стадии DMSO fractions × stages	1147.658	9	127.5176	0.361	0.95250
Самки × Стадии Females × Stages	5274.384	9	586.0427	1.658	0.1007
<b>Ошибка опыта Residual</b>	77424.375	219	353.53596		
<b>Всего Total (corr.)</b>	174476.20	255			

только при эквilibрации спермы с I и II фракциями. После эквilibрации спермы с самой чистой III фракцией ДМСО выживаемость эмбрионов была такой же, как в контроле. Значимое влияние на изучаемый параметр оказывали также различия в икре (рис. 5 и 6) и стадиях развития (рис. 7).

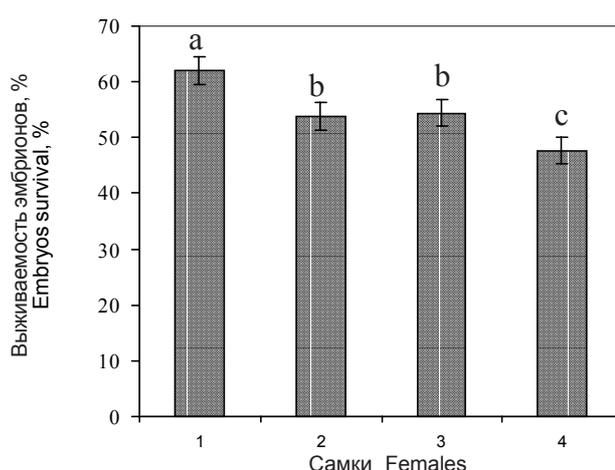
В данном исследовании параметром оценки влияния степени чистоты фракций ДМСО на сперматозоиды была выбрана выживаемость



**Рис. 1.** Выживаемость икры и эмбрионов до 20-й стадии, полученных после эквilibрации спермы с ДМСО разной степени очистки.

**Fig. 1.** Survival of eggs and embryos prior to the 20<sup>th</sup> stage, obtained after sperm equilibration with DMSO of various degree of purification.

нальный потенциал, генетическая информация и энергетические потенциалы, а также их взаимодействие с окружающей средой, имеют большое значение. Такой индекс уже использовался для определения эффекта криоконсервации на геном сперматозоидов лосося [19]. Хотя оценка жизнеспособности проводилась только визуально, на ранних стадиях эмбрионального развития среди белых эмбрионов были также обнаружены неоплодотворенные яйца. Как было показано [4] все неоплодотворенные и партеногенетические яйца погибают из-за

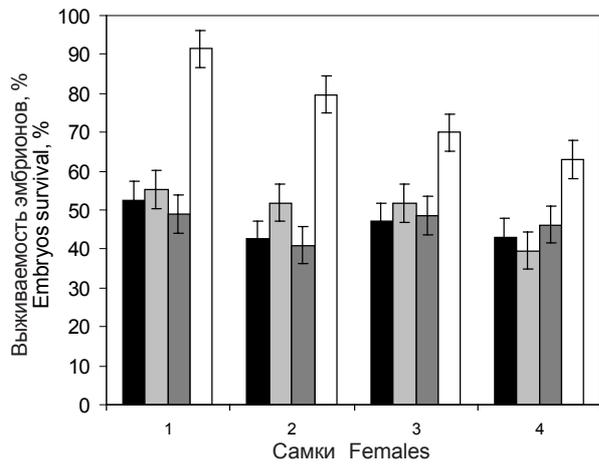


**Рис. 2.** Влияние самки на выживаемость икры и эмбрионов до 20-й стадии.

**Fig. 2.** Female effect on the survival of eggs and embryos prior to the 20<sup>th</sup> stage.

As it proceeds from Fig. 4, the statistically true reduction in embryo survival is observed only during equilibration of sperm with the fractions I and II. After sperm equilibration with the purest DMSO fraction III the survival of embryos was the same as in the control. The significant effect on the studied parameter was caused by the differences in eggs (Fig. 5 and 6) and the stage of development (Fig. 7).

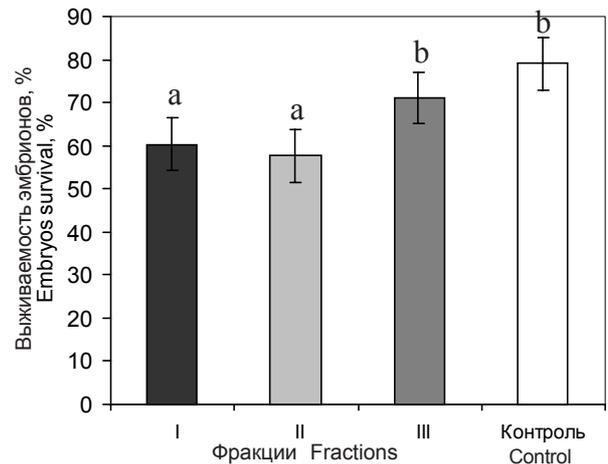
In this study the embryos viability was chosen as the assessment parameter for of DMSO fractions' effect. The integral parameter dependent on various factors, including an inter-



**Рис. 3.** Взаимодействие эффектов самки и обработки спермы ДМСО разной степени очистки (до 20-й стадии): □ - контроль; фракции: ■ - I; ▒ - II; ▓ - III.

**Fig. 3.** Interaction of the female effects and sperm treatment with DMSO of various purification degree (up to the 20<sup>th</sup> stage): □ - control; fractions: ■ - I; ▒ - II; ▓ - III.

эмбрионов. Это очень важный интегральный параметр, зависимый от большого спектра факторов, включая внутренний потенциал, заложенный генетической информацией, энергетическими потенциалами родителей и их взаимодействием с окружающей средой. Такой показатель уже был использован для определения влияния криоконсервирования на геном сперматозоидов выюнов [19]. Поскольку оценка выживаемости производилась только визуально, то на ранних стадиях эмбрионального развития среди отобранных белых эмбрионов была и погибшая неоплодотворенная икрa. Как было показано [4], вся неоплодотворенная и партеногенетическая икрa погибает до 19-й стадии. Поскольку отбор побелевшей икры производился до 20-й стадии, мы можем быть уверены, что вся неоплодотворенная и партеногенетическая икрa погибла и была



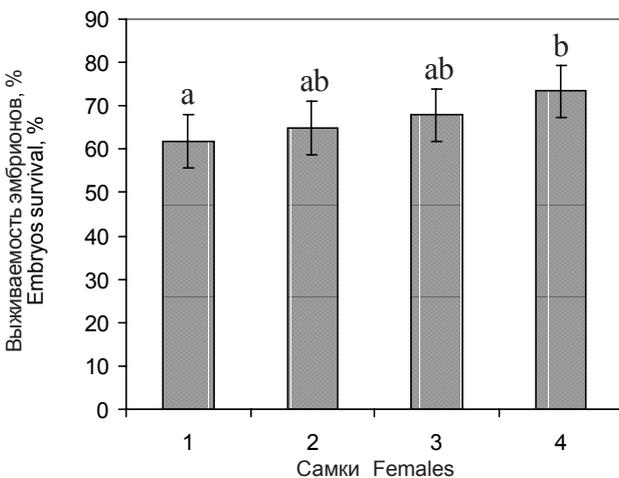
**Рис. 4.** Выживаемость эмбрионов после 20-й стадии, полученных после эквilibрации спермы с ДМСО разной степени очистки.

**Fig. 4.** Survival of embryos after the 20<sup>th</sup> stage, obtained after sperm equilibration with DMSO of various degree of purification.

19<sup>th</sup> stage. As selection of whitened eggs was performed to the 20<sup>th</sup> stage, we can be sure, that all the unfertilized and partenogenetic eggs had died and were removed.

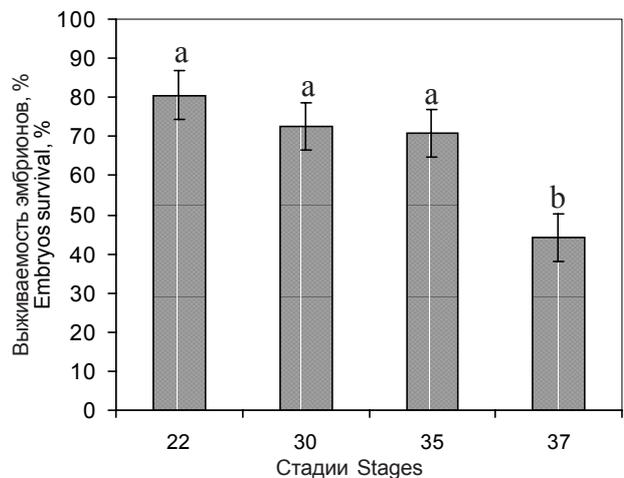
Reduction in the embryos viability after the 20<sup>th</sup> stage was considered to be an indirect index, reflecting the spermatozoa genome damage. Though in the work we have used a multi-factor plan of experiment, had the possibility to study the effect of several factors simultaneously, excluded occasional and unknown ones and minimize the error.

As the Fig. 1 shows, the eggs and embryos viability to the 20<sup>th</sup> stage was about the same level when using equilibrated sperm with various DMSO fractions and significantly lower (by 25-30%) than in the control. It may be supposed that either at this stage the extent of DMSO purity has not affected the spermatozoa or this effect was masked with the



**Рис. 5.** Влияние самки на выживаемость эмбрионов после 20-й стадии.

**Fig. 5.** Female effect on the survival of embryos after the 20<sup>th</sup> stage.



**Рис. 6.** Выживаемость эмбрионов на разных стадиях развития.

**Fig. 6.** Embryo survival at various developmental stage.

отобрана. Снижение выживаемости эмбрионов после 20-й стадии расценивалось нами как косвенный показатель, отражающий повреждение генома сперматозоидов. Поскольку в данной работе использовался многофакторный план эксперимента, то мы имели возможность одновременно изучать влияние нескольких факторов, выделив случайные и неизвестные, и свести к минимуму ошибку.

Как следует из рис. 1, выживаемость икры и эмбрионов до 20-й стадии была практически на одном уровне при использовании спермы эквивилиброванной с разными фракциями ДМСО и значительно ниже (на 25-30 %), чем в контроле. Можно предположить, что на этом этапе степень чистоты ДМСО никак не повлияла на сперматозоиды либо этот эффект был маскирован действием другого, более сильного фактора.

Таким фактором могло быть осмотическое действие разных фракций ДМСО на сперматозоиды. Как известно, сперматозоиды пресноводных рыб очень чувствительны к перепадам осмотического давления [1, 2]. Осмотичность используемых нами защитных сред в момент разбавления спермы (16,6% ДМСО) и при осеменении в несколько раз превышала таковую в контроле, что и могло быть причиной гибели значительного количества сперматозоидов и снижения оплодотворяющей способности спермы. Кроме того, вследствие такого воздействия на клетки уцелела лишь часть сперматозоидов, прошедших селективный отбор. Но так как все признаки предопределены геномом клетки, то селекция к условиям, отличающимся от нормы, могла привести к снижению комбинационной способности геномов будущих организмов и к повышению их смертности. Но последствия такой селекции могли проявиться на любых стадиях эмбрионального развития. Возможность селективных эффектов была показана на примере африканских сомов *Clarius gariepinus* [24], полученных из криоконсервированной спермы, у которых увеличивалась гетерозиготность глюкозофосфат изомеразы в сравнении с родительскими формами.

Учитывая, что осмотичность сред с разными фракциями ДМСО была практически идентичной, то и выживаемость икры и эмбрионов не должна была различаться между ними. Таким образом, определить на данном этапе, как повлияли обнаруженные нами примеси в этих фракциях ДМСО на выживаемость эмбрионов не представляется возможным, так как их действие, вероятно, было смешано с осмотическим и селективным эффектами. Обнаруженные на этих стадиях различия в выживаемости икры и эмбрионов между самками (рис. 2), скорее всего, можно

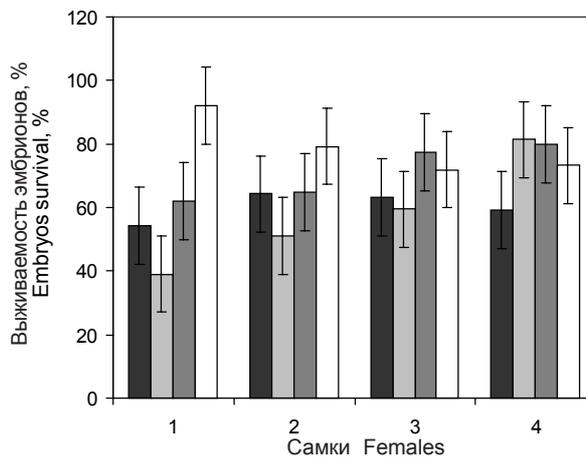


Рис. 7. Взаимодействие эффектов самки и обработки спермы ДМСО разной степени очистки (после 20-й стадии): □ - контроль; фракции: ■ - I; □ - II; ▒ - III.

Fig. 7. Interaction of the female effects and sperm treatment with DMSO of various purification degree (after the 20<sup>th</sup> stage): □ - control; fractions: ■ - I; □ - II; ▒ - III.

another, more powerful factor. Osmotic effect of various DMSO fractions on spermatozoa could be such a factor. As it is known spermatozoa of a freshwater fish are very sensitive to osmotic pressure differentials [1, 2]. Osmotic pressure of the protective media used exceeded a few times the one in the control at the moment of sperm dilution (16,6% DMSO) and insemination, that might cause the death of large number of spermatozoa and reduction of sperm fertilizing capability. In addition, as a result of such an effect on cells only some spermatozoa survived among the ones, being selected. However as all the characteristics are pre-determined by a cell genome, the selection to the conditions, differed on the norm, could result in the fall of genome combination capability of future organisms and in their death rate increase. Consequences of such a selection could be manifested at any stage of embryonic development. Efficacy of selective methods was demonstrated in *Clarius gariepinus* catfish [24]. The authors, studying redistribution of glucosophosphatisomerase alleles in the F1 first fish generation, obtained using frozen sperm, have found the deviation from being supposed Hardy-Weinberg redistribution and proposed the cryopreservation to be the selection method.

Taking into consideration the fact that osmoticity in the media with various DMSO fractions was almost identical, the eggs and embryos viability should not be different. Thus, it is impossible to reveal at this stage in which way the additives found in these DMSO fractions affected the embryos viability, as obviously, their action was combined with osmotic and selective effects. The differences in eggs' and embryos' viability found among females at these stages (Fig. 2), can be explained, probably,

объяснить различиями, как в исходном качестве икры, так и во времени наступления кортикальной реакции. Эти предположения подкрепляются и тем, что и в контроле (рис.3) наблюдались аналогичные различия в выживаемости икры и эмбрионов между самками. Но после 20-й стадии, когда вся неоплодотворенная икра была исключена, оцениваемый параметр, по нашему мнению, являлся уже истинной выживаемостью эмбрионов. И если ДМСО или продукты его распада как-то повлияли на сперматозоиды, осеменившие икру, то, вероятно, это должно было отразиться на выживаемости эмбрионов. Как следует из дисперсионного анализа данных (табл. 4), все исследуемые нами группы факторов оказывали значимое влияние ( $P < 0,01$ ) на выживаемость эмбрионов после 20-й стадии.

Из рис. 4 видно, что с увеличением чистоты используемой фракции (от I к III) увеличивалась и выживаемость эмбрионов. Эквilibрация спермы с самой чистой фракцией III ДМСО уже не приводила к значительным отклонениям средней выживаемости эмбрионов в сравнении с контролем. Сопоставив данные результаты с полученными хроматограммами, можно предположить, что негативное влияние I и II фракций связано с наличием в них неидентифицированного нами вещества  $X_1$ , которое отсутствует в самой чистой фракции III. Таким образом, удаление даже части примесей из ДМСО привело к частичному снижению его отрицательного влияния на геном сперматозоидов. О пагубности загрязнения ДМСО уже сообщалось в [21]. Авторы отметили корреляцию между степенью чистоты ДМСО и контрактальной способностью мышц сердца крыс после замораживания и оттаивания. Как показал анализ взаимодействия фракций ДМСО с самками (рис. 5), самая чистая III фракция ДМСО также приводила к достоверному снижению выживаемости эмбрионов, но не у всех самок. Так, выживаемость эмбрионов, полученных от 1-й и 2-й самок, была достоверно ниже, чем от 4-й самки при эквilibрации спермы с III фракцией ДМСО. Можно предположить, что при осеменении из-за различий в объемах и проницаемости оболочек икры разных самок в икру проникало неодинаковое количество ДМСО и в дальнейшем это приводило к различиям в выживаемости эмбрионов между самками (рис. 6). Полностью отвергнуть такое предположение мы не можем. Хотя, вероятно, если такой эффект и был, то он был незначителен, так как при осеменении икра находилась в растворе с низкой концентрацией ДМСО (1,66 %) очень короткое время (90 с). И сразу после этого она отмывалась водой от остатков сперматозоидов. По данным Эренпрейса [7], изменения ДНК отмечались лишь после эквilibрации фибробластов в

by the differences both in the primary eggs quality and the term of cortical reaction. These suppositions are also confirmed by the fact that similar differences in eggs' and embryos' viability among the females were observed in the control (Fig. 3). However following the 20<sup>th</sup> stage when all unfertilized eggs were removed, the parameter being evaluated, was, according to our point of view, the true embryos viability. Probably, if DMSO or the products of its dissociation affect in a certain way the spermatozoa, fertilized the eggs, this should be reflected on embryo viability. As the dispersion analysis of the data shows, all the factor groups studied significantly affected ( $P < 0.01$ ) the embryos viability following the 20<sup>th</sup> stage.

The Fig. 4 demonstrates, that embryo viability increased with the improvement of the purity extent in the fraction used (I to III). Sperm equilibration with the purest DMSO fraction has not resulted into significant deviations of mean embryos viability index comparing to the control. Comparing these results with the chromatogrammes obtained, it may be supposed that negative effect of I and II fractions is related to the presence in them of non-identified  $X_1$  substance, absent in the most pure fraction. Thus, removal of some additives out of DMSO has resulted in a partial reduction of its negative effect on spermatozoa genome. The danger of DMSO contamination has been already reported [21]. The authors had noticed the correlation in an extent of DMSO purity and contractile capability of heart muscles in rats following freezing and thawing. As the analysis of DMSO fractions interactions in females shows (Fig. 5), the purest DMSO fraction has also caused a significant reduction in embryos viability, but not in all females. Viability of the embryos, derived from the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> females was significantly lower, than in those got from the 4<sup>th</sup> one in the case of sperm equilibration with the 3<sup>rd</sup> DMSO fraction.

One can suppose that during insemination because of the differences in volumes and eggs' membrane permeability of different females a different number of DMSO penetrated into the eggs and further it resulted in differences in embryo survival between females (Fig. 6). We can not completely reject this supposition. Although if probably this effect took place, it was insignificant, as during insemination the eggs were in the solution with low DMSO concentration (1.66%) for a short term (90 sec). Just after that they were washed-out with water up to the spermatozoa residuals. According to the data of Erenprejsa [7] the DNA changes were observed only after fibroblast equilibration during 1 hr in the 1% DMSO solution. By our opinion the dependency of embryo survival on the used eggs can be explained

течение 1 ч в 1 %-м растворе ДМСО. На наш взгляд, зависимость выживаемости эмбрионов от используемой икры может быть объяснена различиями в репарационной способности и отягощенности мутациями икры разных самок. Но разделить эти эффекты в данном исследовании невозможно. В ряде исследований [14, 15, 22] было показано, что репаративная система ооцитов способна репарировать повреждения в ДНК, внесенной спермием.

Выживаемость эмбрионов также варьировала в зависимости от стадии эмбрионального развития (рис. 7). Как известно, эмбрионы в процессе развития проходят ряд критических стадий, на которых в результате реализации генетических потенций сперматозоида и ооцита создаются новые структуры будущего организма. И, естественно, любые изменения генома сперматозоидов или ооцитов должны отразиться на выживаемости эмбрионов. Поэтому увеличение смертности эмбрионов после обработки спермы в растворах с ДМСО свидетельствует о влиянии его на геном или другие структуры, ответственные за реализацию информации ДНК. К таким структурам может быть отнесен центросомальный аппарат спермиев. У всех видов животных, кроме грызунов, центросома вносится в ооцит спермием и структурно представляет собой микротубулярную систему. Она является важным компонентом, обеспечивающим нормальное распределение генетического материала между дочерними клетками в процессе деления [23]. Существуют данные о разрушающем влиянии ДМСО на микротубулярную систему ооцитов мышей [16]. Однако мы не нашли работ, исследующих влияние ДМСО на центросому сперматозоидов.

Из результатов исследования можно сделать заключение, что все изученные фракции ДМСО оказывали отрицательное влияние на сперматозоиды вьюнов *Misgurnus fossilis* L. и, следовательно, на выживаемость эмбрионов. С уменьшением количества продуктов распада во фракциях ДМСО его отрицательное влияние на сперматозоиды снижалось и выживаемость эмбрионов увеличивалась. Используемый нами двухэтапный метод анализа смертности икры и эмбрионов (до и после 20-й стадии эмбрионального развития) позволил разделить последствия влияния разных фракций ДМСО на сперматозоиды на цитотоксические и генетические. Одинаковое действие всех фракций ДМСО до 20-й стадии, проявившееся в повышенной смертности икры и эмбрионов в сравнении с контролем, свидетельствует о сильном цитотоксическом действии этих фракций и о высокой осмотической чувствительности сперматозоидов вьюнов. Сильное цитотоксическое воздействие ДМСО на сперму в момент разбавления ее

by the differences in a reparative ability and the eggs aggravation by mutations of different females. However it is impossible to separate these effects in this investigation. In some works [14, 15, 22] it was shown that a reparative system of oocytes was capable to repair the damages in DNA, introduced by a spermatozoon.

Embryo survival varied depending on the stage of embryonic development (Fig. 7) as well. As it is known, the embryos during the development process have some drastic stages on which as a result of the realisation of genetic potencies of spermatozoon and oocyte the new structures of future organism are formed. And it is natural that any changes in spermatozoa or oocytes genome should have an effect on embryo survival. Therefore the augmentation of embryo death rate after sperm treatment in solutions with DMSO testifies to its effect on genome or other structures responsible for the DNA information realising. A centrosomal apparatus of spermatozoa can be referred to such structures. In all animal species, excepting rodents, the centrosoma is introduced in oocyte by a spermatozoon and structurally represents a microtubular system. It is an important component, providing the normal redistribution for genetic material between daughter cells during fission [23]. There are the data on a destroying effect of DMSO on a microtubular system of murine oocytes [16]. However we did not manage to find the works, studying the effect of the latter on a centrosome of spermatozoa.

According to the investigation results we can conclude that all studied DMSO fractions negatively affected spermatozoa of loach *Misgurnus fossilis* L. and consequently, the embryo survival. With a decrease in a number of decay products in DMSO fractions its negative effect on spermatozoa reduced and there was an increase in embryo survival. Two-stage method we used for the eggs and embryos death rate analysis (before and after the 20<sup>th</sup> stage of embryogenesis) allowed us to divide the consequences of different DMSO fraction effect on spermatozoa in cytokinetic and genetic ones. The similar effect of all DMSO fractions before the 20<sup>th</sup> stage, manifested in an increased death rate of eggs and embryos in comparison with the control, testifies to a strong cytotoxic effect of these fractions and to a high osmotic sensitivity of loach spermatozoa. Strong cytotoxic DMSO effect on sperm at the moment of its dilution with a cryoprotectant, during the equilibration process with DMSO and at the insemination caused the death of a big number of spermatozoa, and, consequently, the selective effect on spermatozoa osmotic resistance, which could result in a decrease in the combination ability of genomes of new organisms, in a selection of features,

криопротектором, в процессе эквilibрации с ДМСО и при осеменении было причиной гибели значительного количества сперматозоидов, а следовательно, и селективного эффекта. Селективный эффект на осмотическую устойчивость сперматозоидов мог привести к снижению комбинационной способности геномов новых организмов, к отбору признаков, несвойственных условиям развития эмбрионов, а поэтому и к повышению их смертности. Различия в смертности эмбрионов после 20-й стадии эмбрионального развития между опытными вариантами и контролем свидетельствуют о влиянии этих фракций ДМСО на генетический аппарат сперматозоидов. С увеличением степени чистоты ДМСО его отрицательное влияние на геном сперматозоидов снижалось. Причем проявление последствий воздействия разных фракций ДМСО на сперматозоиды зависело от икры используемой самки, что, вероятно, может быть объяснено различиями в репарационной способности и отягощенности мутациями икры.

Используемый нами косвенный метод оценки влияния разных фракций ДМСО на геном сперматозоидов не позволяет в настоящий момент указать, какая же структура генетического аппарата сперматозоидов при этом повреждается. Необходимы дальнейшие исследования для нахождения "locus minoris resistentis" во взаимодействии между ДМСО и геномом. Сейчас мы можем лишь сделать заключение, что эквilibрация спермы выюнов с ДМСО может приводить к каким-то нарушениям стабильности всего генетического материала спермы, которые в свою очередь сказываются на выживаемости эмбрионов. Но степень выраженности этого эффекта зависит от степени чистоты ДМСО, потенциала самки и качества ее икры и от стадии развития эмбрионов. Обнаруженное нами влияние самки на проявление последствий экстремальных обработок спермы может быть рекомендовано к использованию для снижения отрицательных последствий воздействия разных экстремальных факторов на сперматозоиды, в том числе и криоконсервирования.

### Литература

1. *Копейка Е.Ф.* Инструкция по низкотемпературной кон-сервации спермы карпа.– Рыбное: ВНПО по рыбоводству, 1986.– 11 с.
2. *Копейка Е.Ф.* Исследования влияния защитных сред на сперму осетровых при низкотемпературной консервации: Автореф. дис... канд. биол. наук.– Харьков, 1982.– 23 с.
3. *Корнилова С.В., Леонтьев В.С., Григорьев Д.Н., Благой И.П.* Изучение влияния низких температур на молекулярные параметры ДНК // Биофизика.– 1997.– Т. 42, N 1.– С. 99-104.
4. *Нейфак А.А., Лозовская Е.П.* Гены и развитие организма. – М.: Наука, 1984.– 192 с.
5. *Пушкарь Н.С., Шраго М. И., Белоус А. М., Калугин Ю. В.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1972.– 204 с.

not inherent to the conditions of embryos development, and therefore in the augmentation of their death rate. The differences in the embryo death rate after the 20<sup>th</sup> stage of embryogenesis between the experimental variants and the control testify to the effect of these DMSO fractions on genetic apparatus of spermatozoa. With an increase in a degree of DMSO purity there was a decrease in its negative effect on spermatozoa genome. At that, the manifestation of consequences of different DMSO fractions effect on spermatozoa depended on eggs of the used female, that, probably, could be explained by the differences in a reparative ability and the eggs aggravation by mutations.

The used by us indirect method for estimating the effect of different DMSO fractions on spermatozoa genome does not allow now to indicate namely which structure of spermatozoa genetic apparatus is damaged at this time. The further investigations are necessary to find-out the "locus minoris resistentis" in the interaction between DMSO and genome. Now we can only conclude that the equilibration of loach sperm with DMSO can result in certain disorders in the stability of all genetic material of sperm, which in their turn affect the embryo survival. However the degree of this effect manifestation depends on the DMSO purity, female potential and its eggs quality, on the embryos developmental stage as well. The revealed by us female effect on the consequences manifestation of the sperm extreme treatments can be recommended to use for decreasing negative consequences of different extreme factor effect on spermatozoa, including cryopreservation.

### References

1. *Kopeika E.F.* Instructions on low temperature preservation of carp sperm.– Rybnoye: All-Union Scientific&Productional Unit on Fishery, 1986.– 11 p.
2. *Kopeika E.F.* Investigations of the effect of protective media on the sperm of sturgeons at low temperature preservation: Author's abstract of the candidate of biological sciences.– Kharkov, 1982.– 23 p.
3. *Kornilova S.V., Leontiev V.S., Grigoriev D.N., Blagoy I.P.* Studying of the effect of low temperatures on molecular parameters of DNA // Biofizika.– 1997.– Vol.42, N1.– P. 99-104.
4. *Neifakh A.A., Lozovskaya E.P.* Genes and organism's development.– M: Nauka, 1984.– 192 p.
5. *Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V.* Cryoprotectants.– Kiev: Naukova dumka, 1972.– 204 p.
6. *Sjakste T.G., Erenprejsa E.A., irne R.A., Sjakste N.I.* Early effects of the dimethylsulfoxide action // Experimental investigations of pathological processes.– Riga; "Zinatne", 1988.– P. 145-151.
7. *Erenprejsa E.A.* Organization of chromatin in nucleus of interphase cell.– Riga, "Zinante", 1990.– 120 p.
8. *Ashwood-Smith M.J.* Genetic damages is not produced by normal cryopreservation procedures involving either glycerol or dimethylsulfoxide: a cautionary note, however, on possible effects of dymethylsulfoxide // Cryobiology.– 1985.– Vol.22, N5.– P. 427-433.

6. Сьяксте Т.Г., Еренпрейса Е.А., Зирне Р.А., Сьяксте Н.И. Ранние эффекты действия диметилсульфоксида // Экспериментальные исследования патологических процессов. – Рига: Зинатне, 1988. – С. 145-151.
7. Эренпрейса Е.А. Организация хроматина в ядре интерфазной клетки. – Рига: Зинатне, 1990. – 120 с.
8. Ashwood-Smith M.J. Genetic damages is not produced by normal cryopreservation procedures involving either glycerol or dimethylsulfoxide: a cautionary note, however, on possible effects of dymethylsulfoxide // Cryobiology. – 1985. – Vol.22, N5. – P. 427-433.
9. Ashwood-Smith M.J. Mechanism of Cryoprotectant Action // Society for Experimental Biology. Temperature and Animal Cells: Proc. Mut. Rurhau. 10-12 Sept., 1986 Cambridge. Symposium of the Society for Experimental Biology Number XXXXI. – 1987. – P. 395-406.
10. Ashwood-Smith M.J., Friedmann C. B. Lethal and Chromosomal Effects of Freezing, thawing, storage time, and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196C in dimethylsulfoxide // Cryobiology. – 1979. – Vol.16, N 2. – P. 132-140.
11. Ashwood-Smith M.J., Grant E. Genetic stability in cellular systems stored in the frozen state // Freezing of mammalian embryos. CIBA Foundation Symposium. – 1977, N52, new series. – P. 251-272.
12. Bouquet M., Selva J., Auroux M. Cryopreservation of mouse oocytes: mutagenic effects in the embryos // Biol. Reprod. – 1993. – Vol.49. – P. 764-769.
13. Dymethyl Sulfoxide. European Pharmacopoeia. 3-rd edition. – 1997. – P. 752-753.
14. Generoso W.M., Cain K.T., Krishna M., Huff S.W. Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1979. – Vol.76, N 1. – P. 435-437.
15. Genesca A., Caballin M.R., Miro R., et al. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg // Hum. Genet. – 1992. – Vol. 89(2). – P. 181-186.
16. Johnson M.H., Pickering S.J. The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte // Development. – 1987. – Vol. 100. – P. 313-324
17. Karran G., Legge M. Non-enzymatic formation of formaldehyde in mouse oocyte freezing mixtures // Hum Reproduction. – 1996. – Vol.11, N12. – P. 2681-2686.
18. Klein S.M., Cohen G., Ceberbaum A.I. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems // Biochemistry. – 1981. – Vol.20. – P. 6006-6012.
19. Kopeika E. F., Neifakh A. A., Zhukinsky V. N. Method of evaluation of genetic apparatus defects of cryopreserved fish sperm during embryo development // Cryo-Letters. – 1994. – Vol.15, N4. – P. 245-250.
20. Lovelock J. E., Bishop M. W. Prevention of freezing damage to living cells by DMSO // Nature. – 1959. – N183 (4666). – P. 1392-1395.
21. Matthes G., Hackensellner, H. A. Correlation between purity and of dimethyl sulfoxide and survival after freezing and thawing // Cryo-Letters. – 1981. – Vol.2. – P.389-392.
22. Matsuda Y., Tobarí I. Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes // Mutat. Res. – 1989. – Vol. 210, N 1. – P. 35-47.
23. Sathananthan A.H, Ratnasooriya W. D, de Silva P. K, Menezes J. Characterization of human gamete centrosomes for assisted reproduction // Ital. J. Anat. Embryol. – 2001. – Vol.106 (2, Suppl. 2). – P. 61-73
24. Van der Bank F.H., Styen G.J. The effect of cryopreservation and various cryodiluents on allozyme variation of glucose phosphate isomerase in the F1 progeny of african catfish *Clarias gariepinus* // Comp. Biochem. Physiol. – 1992, Vol.103B(3). – P. 641-643.
25. Walles S.A.S., Erixon K. Single-strand breaks in DNA of various organs of mice induced by methyl methanesulfonate and dimethylsulfoxide determined by the alkaline unwinding technique // Carcinogenesis. – 1984. – Vol.5. – P. 319-323.
9. Ashwood-Smith M.J. Mechanism of Cryoprotectant Action // Society for Experimental Biology. Temperature and Animal Cells: Proc. Mut. Rurhau. 10-12 Sept., 1986 Cambridge. Symposium of the Society for Experimental Biology Number XXXXI. – 1987. – P. 395-406.
10. Ashwood-Smith M.J., Friedmann C. B. Lethal and Chromosomal Effects of Freezing, thawing, storage time, and X-irradiation on mammalian cells preserved at -196C in dimethylsulfoxide // Cryobiology. – 1979. – Vol.16, N 2. – P. 132-140.
11. Ashwood-Smith M.J., Grant E. Genetic stability in cellular systems stored in the frozen state // Freezing of mammalian embryos. CIBA Foundation Symposium. – 1977, N52, new series. – P. 251-272.
12. Bouquet M., Selva J., Auroux M. Cryopreservation of mouse oocytes: mutagenic effects in the embryos // Biol. Reprod. – 1993. – Vol.49. – P. 764-769.
13. Dymethyl Sulfoxide. European Pharmacopoeia. 3-rd edition. – 1997. – P. 752-753.
14. Generoso W.M., Cain K.T., Krishna M., Huff S.W. Genetic lesions induced by chemicals in spermatozoa and spermatids of mice are repaired in the egg // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1979. – Vol.76, N 1. – P. 435-437.
15. Genesca A., Caballin M.R., Miro R., et al. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg // Hum. Genet. – 1992. – Vol. 89(2). – P. 181-186.
16. Johnson M.H., Pickering S.J. The effect of dimethylsulfoxide on the microtubular system of the mouse oocyte // Development. – 1987. – Vol. 100. – P. 313-324
17. Karran G., Legge M. Non-enzymatic formation of formaldehyde in mouse oocyte freezing mixtures // Hum Reproduction. – 1996. – Vol.11, N12. – P. 2681-2686.
18. Klein S.M., Cohen G., Ceberbaum A.I. Production of formaldehyde during metabolism of dimethyl sulfoxide by hydroxyl radical generating systems // Biochemistry. – 1981. – Vol.20. – P. 6006-6012.
19. Kopeika E. F., Neifakh A. A., Zhukinsky V. N. Method of evaluation of genetic apparatus defects of cryopreserved fish sperm during embryo development // Cryo-Letters. – 1994. – Vol.15, N4. – P. 245-250.
20. Lovelock J. E., Bishop M. W. Prevention of freezing damage to living cells by DMSO // Nature. – 1959. – N183 (4666). – P. 1392-1395.
21. Matthes G., Hackensellner, H. A. Correlation between purity and of dimethyl sulfoxide and survival after freezing and thawing // Cryo-Letters. – 1981. – Vol.2. – P.389-392.
22. Matsuda Y., Tobarí I. Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm and mature oocytes // Mutat. Res. – 1989. – Vol. 210, N 1. – P. 35-47.
23. Sathananthan A.H, Ratnasooriya W. D, de Silva P. K, Menezes J. Characterization of human gamete centrosomes for assisted reproduction // Ital. J. Anat. Embryol. – 2001. – Vol.106 (2, Suppl. 2). – P. 61-73
24. Van der Bank F.H., Styen G.J. The effect of cryopreservation and various cryodiluents on allozyme variation of glucose phosphate isomerase in the F1 progeny of african catfish *Clarias gariepinus* // Comp. Biochem. Physiol. – 1992, Vol.103B(3). – P. 641-643.
25. Walles S.A.S., Erixon K. Single-strand breaks in DNA of various organs of mice induced by methyl methanesulfonate and dimethylsulfoxide determined by the alkaline unwinding technique // Carcinogenesis. – 1984. – Vol.5. – P. 319-323.

*Accepted in 12.11.2002*

*Поступила 12.11.2002*