

Влияние компонентов криозащитных сред на жизнеспособность сперматозоидов собак в процессе криоконсервирования

Т. П. Линник, М.И. Егоров, Т. С. Дюбко, А.П. Белоношко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryoprotective Media Components on Dog Spermatozoa Viability During Cryopreservation

T.P. LINNIK, M.I. EGOROV, T.S. DYUBKO, A.P. BELONOZHKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследовалось влияние криопротекторов (КП): глицерина (ГЛ), этиленгликоля (ЭГ), диметилсульфоксида (ДМСО), N,N-диметилформамида (ДМФ), 1,2-пропандиола (1,2-ПД) в концентрации 1 М на жизнеспособность сперматозоидов собак (СС) до и после замораживания-оттаивания в 3-х средах, отличающихся по составу. В первой среде (ТФЖ) содержался желток куриных яиц, во второй (ТФА) - яичный альбумин, третья среда (ТФ) использовалась без добавок. Установлено, что самая высокая жизнеспособность СС как до, так и после криоконсервирования наблюдалась под защитой ДМФ в среде ТФА. Предлагается возможный механизм влияния яичного альбумина на жизнеспособность СС в сочетании с ДМФ.

Ключевые слова: сперматозоиды, подвижность, криоконсервирование, криопротекторы, альбумин, яичный желток.

Досліджувався вплив криопротекторів гліцерину (ГЛ), етиленгліколю, диметилсульфоксиду, N,N-диметилформаміду, 1,2-пропандіолу в концентрації 1 М на життєздатність сперматозоїдів собак (СС) до і після заморожування-відтавання в 3-х середовищах, які різняться складом. У першому середовищі (ТФЖ) містився жовток курячих яєць, у другому (ТФА) – яєчний альбумін, третє середовище використовувалось без добавок. Установлено, що найвища життєздатність СС як до, так і після криоконсервування спостерігалась під захистом ДМФ в середовищі ТФА. Запропоновано можливий механізм впливу яєчного альбуміну на життєздатність СС в сполученні з ДМФ.

Ключові слова: сперматозоїди, рухливість, криоконсервування, криопротектори, альбумін, яєчний жовток.

There was studied the effect of such cryoprotectants (CP) as: glycerol (GL), ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO), N,N-dimethyl formamide (DMF), 1,2-propanediol (1,2-PD) in 1 M concentration on dog spermatozoa (DS) viability before and after freeze-thawing in 3 media, differing by composition. The first medium (TFY) comprised the yolk of chicken eggs, the second one (TFA) consisted of egg albumin, the third one (TF) was used without additives. It was established, that the highest viability of DS both before and after cryopreservation was observed under DMF protection in TFA medium. A possible mechanism of egg albumin effect on DS viability in combination with DMF is discussed.

Key-words: spermatozoa, motility, cryopreservation, cryoprotectants, albumin, egg yolk.

Вымирание все большего количества видов животных, ухудшение племенных показателей породных линий побуждают ученых всего мира искать возможность сохранить генофонд фауны созданием зоопарков редких видов и при помощи современных биотехнологий, позволяющих криоконсервировать половые клетки животных и создавать их низкотемпературные банки [5]. Такая же тенденция наблюдается и в кинологии, которая оказалась перед фактом уменьшения племенного поголовья многих пород собак. Как показывает анализ данных [12, 13, 19], проблема криоконсервирования СС не решена, так как предложенные методы не позволяют сохранить более 30% абсолютно полноценных клеток. Поэтому разработка эффективного метода криоконсервирования СС является актуальной задачей. Последние 10

The extinction of a great number of animal species, worsening of pedigree indices in breed lines make scientists from all around the world to search for the possibility for fauna gene fund preservation by creating zoos for rare species and using current biotechnologies, enabling animal sexual cell cryopreservation and their low temperature banks creation [5]. The similar tendency is also observed in dog breeding, that was faced with the fact of breeding-stock reduction in many dog breeds. As the data analysis shows [12, 13, 19], the problem of DS cryopreservation has not been solved, since the methods proposed do not enable the preservation of more than 30% absolutely integral cells. Therefore the elaboration of efficient method for DS cryopreservation has remained an actual task. Within the recent 10 years the intensive investigations of different factors of DS cryodamage and cryopreservation

Адрес для корреспонденции: Линник Т.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Linnik T.P., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str.,Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail:cryo@online.kharkov.ua

лет интенсивно ведутся исследования различных факторов криоповреждения и криозащиты СС в процессе замораживания-оттаивания [12, 19-22].

Одним из ключевых вопросов в решении данной проблемы является выбор КП. Для криоконсервирования СС в качестве КП опробованы 3 соединения – ГЛ, ЭГ и ДМСО [13, 19, 22]. Результаты исследований во многом противоречат друг другу, отсюда следует, что оптимальный криопротектор для СС не найден. Показано, что ДМСО в концентрации 0,6 М оказывает повреждающее действие на СС еще на этапе подготовки клеток к замораживанию [13].

Наиболее широко для замораживания СС используется ГЛ, который позволяет получить после оттаивания жизнеспособные клетки, но подвижность сперматозоидов при этом варьирует от 15 до 60% [12, 13]. Предполагается [13], что причиной высокой вариабельности результатов может быть возникающий под воздействием ГЛ осмотический шок. На сперматозоидах петухов показано, что добавление ГЛ приводит к набуханию головок, искривлению сперматозоидов в области шейки, смещению митохондрий, ультраструктурным изменениям акросом, способствует утечке ферментов [18, 23]. Обращается внимание и на другие потенциальные эффекты ГЛ [23], в частности, возможность модификации липидного бислоя, обусловленной способностью ГЛ образовывать водородные связи с полярными группами головок фосфолипидов, вероятность его участия в метаболизме клеток. Токсическое действие на клетки может оказывать метаболит ГЛ метилглиоксаль [16]. Обсуждается возможность взаимодействия ГЛ с цитоскелетом и микротубулярными белками сперматозоидов, а также его влияние на слизистые оболочки репродуктивного тракта самок [23]. Отмечается, что ГЛ оказывает негативное воздействие на оплодотворяющую способность СС [13].

По немногочисленным данным [13, 22], ЭГ по сравнению с ГЛ более перспективен для СС. Подвижность клеток после прибавления ЭГ не снижается по сравнению с контролем, а с ГЛ падает на 5-10% [22]. Количество сперматозоидов с морфологическими повреждениями еще на этапе экспозиции в присутствии ГЛ достигает 35%, с ЭГ не превышает 25%. Данные о криопротекторной активности ЭГ по отношению к СС варьируют в широких пределах [11, 24]. В [22] подвижность СС после замораживания-оттаивания с ЭГ показана на уровне 60% при концентрации 0,5 М, при этом с ГЛ остается не более 30% подвижных клеток. В [13] отмечается, что ГЛ проявляет более эффективную криозащиту по сравнению с ЭГ. В указанных работах использовали методы замора-

during freeze-thawing have been carrying-out. [12, 19-22].

The choice of CP is one of the key-questions during this task solving. For DS cryopreservation 3 compounds were tested as cryoprotectants: GL, EG and DMSO [13, 19, 22]. The results of investigations greatly contradict one another, that results in the fact that the optimal cryoprotectant for DS is not found. DMSO in 0.6 M concentration was shown to have a damaging effect on DS even at the stage of cell preparation to freezing [13].

The most widely applied CP for DS cryopreservation is GL, enabling to obtain the viable cells after freeze-thawing, but at the same time the spermatozoa motility varies from 15 to 60% [12, 13]. The reason for a high variability of the results is assumed to be an osmotic shock, occurring under GL effect [12]. In fowl spermatozoa the GL addition was demonstrated as resulting in head swelling, spermatozoa curvature in neck area, shift of mitochondria, ultrastructural changes in acrosomes, and contributing to enzymes release [18, 23]. The attention is paid to other potential GL effects [23]: the possibility of lipid bilayer modification, stipulated by GL capability to form hydrogen bonds with polar groups of phospholipid heads, the feasibility of its participation in cell metabolism. Toxic effect on cells can be caused by GL metabolite: methyl glyoxal [16]. The possibility of GL interaction with cytoskeleton and microtubular proteins of spermatozoa, as well as its effect on female reproductive tract mucous membrane are discussed [23]. GL is noted to cause a negative effect on DS fertilising ability [13].

According to not numerous data [13, 22], EG in comparison with GL is more perspective for DS. Cell motility after EG adding does not decrease in comparison with the control, and GL decreases by 5-10% [22]. A number of spermatozoa with morphological damages even at exposure stage at GL presence achieves 35%, but it does not exceed 25% with EG. The data about EG cryoprotective activity in respect of DS varies in wide limits [11, 24]. In the paper [22] DS motility after freeze-thawing with EG was shown at the level of 60% at 0.5M concentration, meanwhile not more than 30% of motile cells remains with GL. As detailed by [13], GL manifests more efficient cryoprotection in comparison with EG. In the mentioned papers there were used the methods of DS freezing in open granules on dry ice without identifying cooling rates, that significantly complicated their reproducibility.

For DS low temperature preservation one usually applies polycomponent cryoprotective media. By analogy with the methods for sperm freezing of other animals they comprise besides CP the chicken egg yolk. However the usage of this component is not processible due to the inconstancy of composition, a

живания СС в открытых гранулах на сухом льду без идентификации скоростей охлаждения, что значительно усложняет их воспроизводимость.

Для низкотемпературного консервирования СС применяют, как правило, многокомпонентные криозащитные среды. В их состав по аналогии с методами замораживания спермы других видов животных, кроме КП, входит желток куриных яиц. Однако использование данного компонента нетехнологично из-за непостоянства состава, кратковременности хранения, возможности развития в желтке патогенной микрофлоры [4]. Известно [8, 9, 11, 21], что успешное криоконсервирование сперматозоидов разных видов животных возможно и в безжелточных средах, содержащих водорастворимые белки, в частности такие альбумины, как бычий сывороточный альбумин (БСА), сывороточный альбумин человека и другие. Таким образом, для криоконсервирования СС остается перспективным поиск эффективных криозащитных сред, включающих как КП, так и мембраностабилизирующие добавки.

Цель данной работы – исследование эффективности влияния проникающих криопротекторов 1,2-ПД, ДМФ, ДМСО, ЭГ и ГЛ, относящихся к разным классам химических соединений, в трех различающихся по составу криозащитных средах на выживаемость СС до и после замораживания – оттаивания. В первой среде (ТФЖ) содержался желток куриных яиц, во второй (ТФА) – яичный альбумин, третья среда (ТФ) использовалась без этих добавок. Предпринята попытка выяснить возможный механизм действия яичного альбумина на жизнеспособность спермиев в процессе криоконсервирования.

Материалы и методы

Сперма для исследований была получена от 4-х клинически здоровых кобелей при комнатной температуре (20°C) массажем предстательной железы в присутствии неэстральной самки [7]. Эякулят спермы собак состоит из 3-х фракций, выделяющихся с небольшим временным интервалом. Это дает возможность получить все фракции эякулята отдельно, что позволяет предотвратить преждевременную активацию СС под воздействием 3-й фракции, представляющей собой секрет предстательной железы [10].

Для опытов были использованы 8 эякулятов, состоящих из первой и второй фракций свежеполученной спермы. Концентрацию сперматозоидов в эякулятах оценивали при помощи фотометра КФК-3 (“ЗОМЗ”, Россия). Процент подвижных сперматозоидов определяли визуально под микроскопом “Биолар”, Польша (×280). Для оценки переживаемости клеток до и после замораживания спермато-

short term of storage, possibility of pathogenic microflora development in yolk [4]. The successful spermatozoa cryopreservation of different animals is known to be possible even in yolk-free media, containing water-soluble proteins, in particular such albumins as calf serum albumin (CSA), human serum albumin etc [8, 9, 11, 21]. Thus, for DS cryopreservation the search for the efficient cryoprotective media, comprising both CP and membrane-stabilising additives has still remained perspective.

This work was aimed to investigate the efficiency of such penetrating cryoprotectants as 1,2-PD, DMF, DMSO, EG and GL, relating to different classes of chemical compounds in three cryoprotective media, differing by composition of cryoprotective media on DS survival before and after freeze-thawing. First medium (TFY) contained chicken egg yolk, the egg albumin was in the second one (TFA) and the third one (TF) was free of them. The attempt to find out the possible mechanism of egg albumin effect on spermatozoa viability during cryopreservation was undertaken.

Materials and methods

Sperm for investigations was obtained from 4 clinically healthy dog males at a room temperature (20°C) by massing prostate gland at non-estrous female presence [7]. Dog sperm ejaculate consists of 3 fractions, releasing with a short time interval. This enables to obtain all ejaculate fractions separately, that permits to avoid a premature DS activation under 3rd fraction effect, representing the prostate gland discharge [10].

In the experiments we used 8 ejaculates, comprising first and second fractions of freshly isolated sperm. Spermatozoa concentration in ejaculates was estimated with photometer КПК-3 (Russia). The percentage of motile spermatozoa was visualised under microscope “Biolar”, Poland (×280). Spermatozoa in cryoprotective media were placed under hypothermia conditions (6°C) in order to evaluate cell survival before and after freezing. The evaluation of spermatozoa motility was done in 60 min.

The obtained material was divided in 15 aliquots by 0.7 ml and placed in 1 ml plastic vials. Spermal plasm was removed from each aliquot by centrifuging at 400 g during 3 min. Aliquots were divided in 3 groups (by 5 samples each). Cells of the 1st group were resuspended with TFY medium, the 2nd one with TFA and TF for the 3rd one in 1:1 ratio. The main composition of all three media included 0.2 M Tris-buffer (Trizma pH 7.2, “Sigma”) and 0.05 M fructose with 320 mOsm osmotic rate, pH 7.2. In TFY medium we added 20% (v/v) of chicken egg yolk and 1% egg albumin (“Reakhim”, Russia) for TFA medium. TFA medium was free of additives.

зоиды в криозащитных средах были помещены в условия гипотермии (6°C). Оценка подвижности сперматозоидов производилась через 60 мин.

Полученный материал разделили на 15 аликвот по 0,7 мл и поместили в пластиковые ампулы объемом 1 мл. Из каждой аликвоты удалили спермальную плазму центрифугированием при 400 г в течение 3-х минут. Аликвоты разделили на три группы (по 5 проб в каждой). Клетки 1-й группы ресуспендировали средой ТФЖ, 2-й – ТФА, 3-й – ТФ в соотношении 1:1. Основной состав всех трех сред включал 0,2 М трис-буфера (Trizma pH 7,2, "Sigma") и 0,05 М фруктозы с осмотичностью 320 мОсмоль, pH 7,2. В среду ТФЖ было добавлено 20% (v/v) желтка куриных яиц, в среду ТФА – 1% яичного альбумина ("Реахим", Россия). Среда ТФ не содержала дополнительных добавок.

После охлаждения суспензии сперматозоидов (10 мин) до температуры 6°C ко всем трем группам были добавлены в соотношении 1:1 предварительно охлажденные до той же температуры растворы ГЛ, ЭГ, ДМСО, ДМФ и 1,2-ПД (концентрация 2 М) в средах, соответствующих каждой группе. Конечная концентрация КП составила 1 М.

Подготовленные образцы сперматозоидов были расфасованы в пластиковые соломинки типа "СЖ" объемом 0,33 см³ по 200 мкл. Замораживание СС было проведено без дополнительной эквипирации на установке УОП-1 (СКТБ ИПКиК) по разработанному режиму [3]: от 5 до –15°C со скоростью 3°C/мин, от –15 до –70°C со скоростью 15°C/мин и далее – погружение в жидкий азот. Скорость охлаждения контролировали при помощи медь-константановой термопары.

Оттаивание производили на водяной бане при температуре 40°C до появления жидкой фазы (3-5 с).

Было исследовано взаимодействие яичного альбумина с СС, отмытыми от спермальной плазмы в среде ТФ, а также с модельными мультислойными липосомами из яичного фосфатидилхолина до замораживания. Для этого применяли ковалентно меченый флуоресцентным красителем Tasman Green-404 (TG-404) яичный альбумин, полученный из Института монокристаллов НАН Украины. Флуоресценцию TG-404 возбуждали светом с длиной волны 404 нм (синий светофильтр), а регистрировали при 515 нм (желто-зеленый светофильтр). Липосомы получали испарением 10%-го спиртового раствора яичного фосфатидилхолина под вакуумом с последующим растворением в среде ТФ [17]. Полученная суспензия имела концентрацию липида 20 мг/мл. Флуоресценцию регистрировали на флуоресцентном микроскопе МП-4 (ЛОМО, Россия), оснащенном цифровой видеокамерой Olympus, сопряженной

After cooling spermatozoa suspension (10 min) down to 6°C, to all three groups there were added in 1:1 ratio the preliminarily cooled down to the same temperature GL, EG, DMSO, DMF and 1,2-PD solutions (2 M concentration) in the media, corresponded to each group. CP final concentration made 1M.

Prepared spermatozoa samples were packed in 0.33 cm³ "S-Zh" type plastic straws by 200 µl. DS freezing was carried-out without additional equilibration using UOP-1 device (Special Design & Construction Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine) by the developed regimen [3]: from 5 to –15°C with 3°C/min rate, from 15 to –70°C with 15°C/min, with following immersion into liquid nitrogen. Cooling rate was controlled with copper-constantan thermocouple. Thawing was performed on water bath at 40°C up to liquid phase appearance (3-5 sec).

The interaction of egg albumin with DS, washed out from spermal plasm in TF medium, as well as with model multi-layer liposomes from egg phosphatidylcholine prior to freezing was investigated. For this purpose the fluorescent dye-covalent labelled Tasman Green-404 (TG-404) egg albumin, obtained from the Institute for Single Crystals, was applied. TG-404 fluorescence was excited with light with 404 nm wavelength (blue light filter), but registered at 515 nm (yellow-green light filter). Liposomes were obtained by evaporating 10% egg phosphatidylcholine alcohol solution under vacuum with following dissolving in TF medium [17]. The obtained suspension has 20 mg/ml lipid concentration. The fluorescence was registered with fluorescent microscope MP-4 (LOMO, Russia), supplied with computer-connected digital Olympus videocamera. The results obtained were statistically processed with Student method.

Experiments were performed according to the "Common Principles of Experiments in Animals", approved by the 1st National Congress on Bioethics (Kiev, 2001) and agreed with the statements of "European Convention on Vertebrate Protection, Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985).

Results and discussion

The effect of 5 cryoprotectants (GL, EG, 1,2-PD, DMSO, DMF) on DS survival prior to freezing at hypothermia (6°C) in three cryoprotective media, differing by the composition (TFY, TFA, TF) was investigated. The observation was performed up to a complete loss of spermatozoa motility. In the control group, representing the spermatozoa suspension in cryoprotectant-free TF medium, the cell motility reduced during 15 hrs down to 30% level, under which the usage of ejaculate for fertilisation is considered to

с компьютером. Для статистической обработки полученных результатов использовали метод Стьюдента.

Эксперименты проведены в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными 1-м Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001) и согласованными с положениями “Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985).

Результаты и обсуждение

Было исследовано влияние 5 криопротекторов (ГЛ, ЭГ, 1,2-ПД, ДМСО, ДМФ) на переживаемость СС до замораживания при гипотермии (6°C) в трех криозащитных средах, отличающихся по составу (ТФЖ, ТФА, ТФ). Наблюдения проводили до полной потери подвижности спермиев. В контрольной группе, представляющей собой суспензию сперматозоидов в среде ТФ без криопротектора, подвижность клеток снижалась в течение 15 ч до уровня 30%, ниже которого использование эякулята для оплодотворения считается нецелесообразным. На рис. 1 показаны результаты инкубации клеток с КП в течение 6 ч, так как при более продолжительном их контакте наблюдалась потеря подвижности СС ниже необходимого минимума.

Все изученные КП в концентрации 1М отрицательно влияли на переживаемость СС до замораживания, но снижение подвижности клеток в их присутствии существенно зависело от среды разбавления. Низкая переживаемость СС, независимо от вида КП, наблюдалась в среде ТФЖ, в состав которой входит 20% яичного желтка (рис. 1), при этом потеря подвижности сопровождалась значительной агглютинацией клеток. В среде ТФА, в которую вместо желтка был добавлен 1% яичного альбумина, и в среде ТФ (без добавок) подвижность СС сохранялась через 3 и 6 ч инкубации, но только с двумя КП (ДМФ и ЭГ) на достаточно высоком уровне. В присутствии ДМФ подвижными оставались 60±6% (рис. 1), с ЭГ через 3 ч – 55±5%, через 6 ч – не более 30±4% клеток. Наблюдалась тенденция к снижению переживаемости СС с ДМФ и ЭГ в среде ТФ (рис. 1, в), но разница со средой ТФА была не достоверна ($p \leq 0,05$). Подвижность СС в присутствии ДМСО, ГЛ и 1,2-ПД через 6 ч инкубации во всех средах не превышала 10-20%. По положительному влиянию на подвижность СС КП распределились в следующий ряд: ГЛ≈ДМСО≈1,2-ПД>ЭГ>ДМФ. Такое же распределение КП получено и в среде ТФЖ через 3 ч инкубации (см. рис. 1, б), но уровень сохранности клеток был существенно ниже, чем в средах ТФА и ТФ. Таким образом, среди изученных КП меньшее повреж-

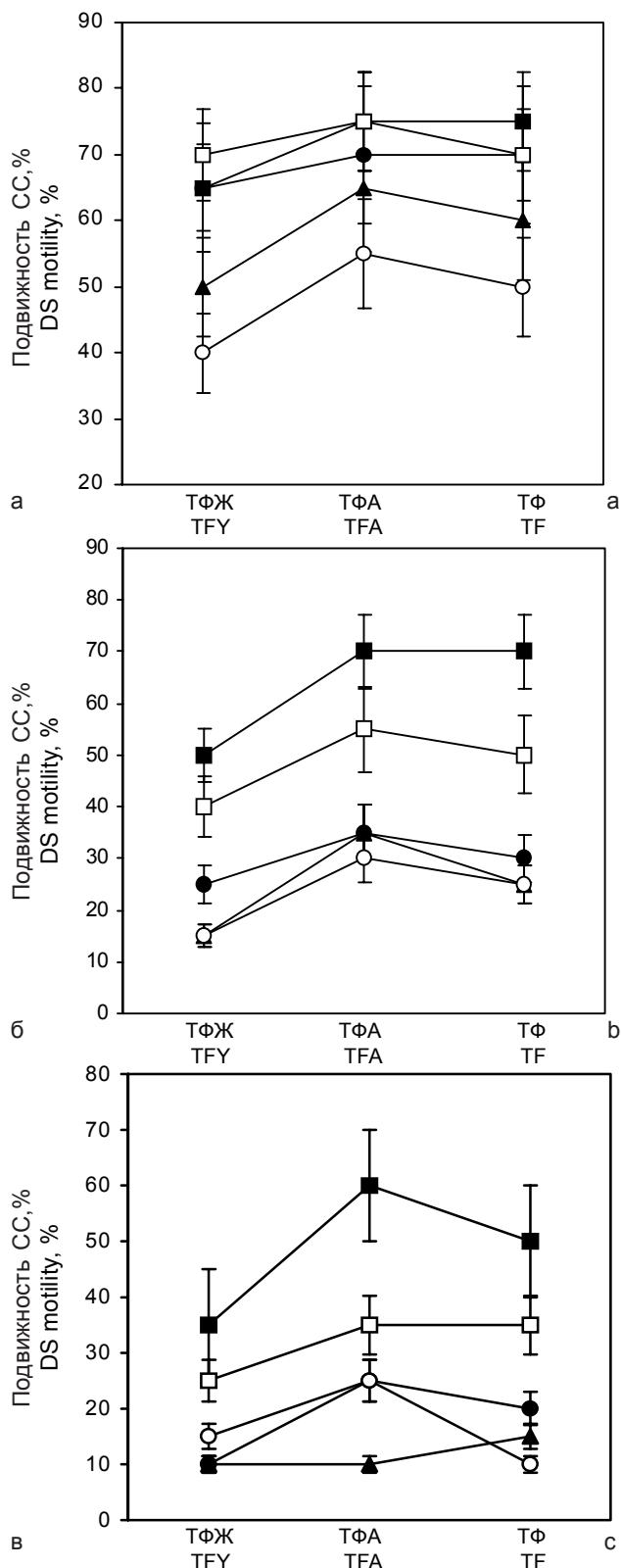


Рис.1. Подвижность СС до замораживания в средах ТФЖ (с желтком), ТФА (с белком) и ТФ в присутствии исследуемых криопротекторов через 1 (а), 3 (б) и 6 ч (в) инкубации при температуре 6°C: ■ – ДМФ; □ – ЭГ; ▲ – ГЛ; ● – ДМСО; ○ – 1,2-ПД.

Fig.1. DS motility before freezing in TFY (with yolk), TFA (with white) and TF media at the presence of studied cryoprotectants in 1 (a), 3 (b) and 6 hrs (c) incubation at 6°C: ■ – DMF; □ – EG; ▲ – GL; ● – DMSO; ○ – 1,2-PD.

дающее действие на СС до замораживания проявляют ДМФ и ЭГ в среде, содержащей яичный альбумин.

На рис. 2 представлена переживаемость СС после замораживания-оттаивания в средах ТФЖ, ТФА и ТФ в присутствии исследуемых КП в условиях гипотермии.

Лучшие результаты получены при криоконсервировании СС с ДМФ в среде ТФА. Через час после оттаивания СС подвижность сохранялась у $55\pm 4\%$ клеток (рис. 2, а), лишь через 6 ч хранения в условиях гипотермии она снижалась до уровня $30\pm 5\%$ (рис. 2, в). Количество подвижных клеток, криоконсервированных с ЭГ в среде ТФА, через час после оттаивания составляло $35\pm 7\%$ (рис. 2, а), через 3 ч падало до уровня $25\pm 5\%$, через 6 ч подвижных клеток в поле зрения не наблюдалось. Сохранность СС, криоконсервированных в присутствии ДМСО, 1,2-ПД и ГЛ в среде ТФА, не превышала уровня $30\pm 4\%$ сразу после оттаивания. Затем наблюдалось постепенное снижение подвижности клеток (рис. 2, б). Через 3 ч хранения подвижность СС в присутствии ДМСО и 1,2-ПД падала до уровня 5%, независимо от среды разбавления, а в присутствии ГЛ оставались подвижными около $20\pm 5\%$ клеток в средах ТФЖ и ТФА. Через 6 ч хранения при 6°C подвижность наблюдалась только у СС, криоконсервированных с ДМФ (в среде ТФА – около $30\pm 5\%$, в средах ТФЖ и ТФ – не более 5-10%). С другими КП подвижных клеток обнаружить не удалось (рис. 2, в). Низкая жизнеспособность СС после замораживания-оттаивания отмечалась в среде ТФ независимо от вида КП.

Повреждение клеток, вызванное введением КП и продолжительностью их контакта, может отражать вклад как осмотической, так и химической (биохимической) компоненты в общее их цитотоксическое действие [1]. Изученные вещества относятся к разным классам химических соединений (полиолам, амидам, сульфоксидам), имеют различную структуру, но при этом все они отвечают требованиям, необходимым для эффективных КП (высокая гидрофильность), и хорошо проникают внутрь клеток. На других объектах показано [1, 15], что механизм их проницаемости отличается: дизамещенные амиды (ДМФ) не вызывают осмотический стресс у клеток, что обусловлено их высокой способностью проникать непосредственно через липидный бислой мембран в отличие от полиолов, которые преимущественно диффундируют внутрь клеток через водные каналы. Скорость проницаемости веществ через мембраны и их цитотоксичность зависит от геометрических размеров молекул и их гидрофобности [1, 15], характеристикой которой может

be not expedient. The Fig. 1 demonstrates the results of cell incubation with CP for 6 hrs, because during their more prolonged contact the loss in DS motility lower than the necessary minimum was noted.

All studied CP in 1 M concentration negatively affected the DS survival before freezing, but a decrease in cell motility in their presence considerably depended on dilution medium. Low DS survival, independently on CP type was observed in TFY medium, comprised 20% egg yolk (Fig. 1), at the same time the loss of motility was accompanied with a considerable cell agglutination. In TFA medium, where 1% egg albumin was added instead of yolk and in TF medium (without additives) the SD motility was kept after 3 and 6 hrs of incubation, but only with two CP (DMF and EG) it was at a quite high level. At DMF presence $60\pm 6\%$ cells (Fig. 1, b, c) remained motile, with EG in 3 hrs it was $55\pm 5\%$ and not more than $30\pm 4\%$ of cells in 6 hrs. The tendency to a decrease in SD survival with DMF and EG in TF medium (Fig. 1, c) was observed, but the difference with TFA medium was not statistically significant ($p\leq 0.05$). DS motility at DMSO, GL and 1,2-PD presence in 6 hrs of incubation in all media did not exceed 10-20%. By positive effect on DS motility the cryoprotectants were distributed in the following series: $GL\approx DMSO\approx 1,2-PD > EG > DMF$. The same DS redistribution was obtained in TFY medium in 3 hrs of incubation (see Fig. 1, b), but the level of cell integrity was significantly lower, than in TFA and TF media. Thus, among studied CP the less damaging effect on DS prior to freezing was manifested by DMF and EG in the egg albumin-contained medium.

Fig.2. demonstrates the DS survival after freeze-thawing in TFY, TFA and TF media at the presence of studied CP under hypothermia conditions.

The best results were obtained during DS cryopreservation with DMF in TFA medium. An hour after DS thawing the motility was kept in $55\pm 4\%$ cells (Fig 2, a), but in 6 hrs of storage under hypothermia conditions it decreased down to $30\pm 5\%$ level (Fig. 2, c). The number of motile cells, cryopreserved with EG in TFA medium, an hour after thawing was $35\pm 7\%$ (Fig. 2, a), in 3 hrs it decreased down to $25\pm 5\%$ level, in 6 hrs no motile cells were observed in visual field. The integrity of DS, cryopreserved at DMSO, 1,2-PD and GL presence in TFA medium did not exceed the level of $30\pm 4\%$ right after thawing. Then a gradual decrease in cell motility (Fig. 2, b) was noted. After 3 hrs' storage DS motility at DMSO and 1,2-PD reduced down to 5% level (independently on dilution medium), but at GL presence nearly $20\pm 5\%$ cells in TFY and TFA media remained motile. After 6 hrs' storage at 6°C the motility was observed only in DS, cryopreserved with DMF (nearly $30\pm 5\%$ in TFA medium, in TFY and TF media it was not more than 5-10%).

служить коэффициент распределения КП в системе вода – неполярная фаза (в частности, н-октанол). Изученные КП имеют следующие коэффициенты распределения в системе вода-н-октанол [1]: ГЛ – 0,005; ЭГ – 0,040; 1,2-ПД – 0,076; ДМФ – 0,233; ДМСО – 0,247. В этом же порядке увеличивается и их гидрофобность. Учитывая это, трудно объяснить, почему ДМФ и ЭГ, разные по структуре, а главное по гидрофобности, проявляют одинаково низкую цитотоксичность по отношению к СС. Но, принимая во внимание данные о способности изученных веществ проникать через мембраны клеток, на основании которых можно распределить их в ряд по степени уменьшения коэффициентов проницаемости: ДМФ > ЭГ > 1,2-ПД > ГЛ > ДМСО, предполагаем следующее. Именно осмотический фактор вносит основной вклад в общее цитотоксическое действие трех последних КП, обусловленное не столько их гидрофобностью, сколько размерами молекул и способностью этих веществ уменьшать проницаемость мембран для воды [1, 15].

Анализ полученных результатов показывает, что желток куриных яиц оказывал некоторое положительное влияние на сохранность СС после оттаивания в сравнении с той средой, в которой он не использовался. Известно, что состав плазматических мембран или, например, соотношение холестерина и фосфолипидов обуславливает в определенной степени резистентность спермиев к снижению температур [4, 5]. Предполагается [4], что яичный желток в криозащитной среде изменяет величину этого соотношения у спермиев, стабилизирует белок-липидные комплексы, вызывает изменение температур фазовых переходов липидов мембран в сторону более низких значений, предотвращая холодный шок клеток. Однако положительный эффект желтка куриных яиц при действии низких температур на клетки в значительной степени зависит от их видовой специфичности.

Включение яичного альбумина в криозащитную среду вместо яичного желтка позволяет сохранить подвижность клеток до и после замораживания на более высоком уровне. В отличие от яичного желтка водорастворимые белки, в частности альбумины, не изменяют отношение холестерин/фосфолипиды в мембранах клеток при отсутствии в среде бикарбонатов [14]. На сперматозоидах баранов и быков показано [24], что альбумины проявляют положительное влияние на подвижность сперматозоидов, способствуют сохранности их мембран, но не всегда предотвращают повреждение акросом [9, 11], которое может быть обусловлено влиянием альбумина на капацитацию и акросомальную реакцию сперматозоидов.

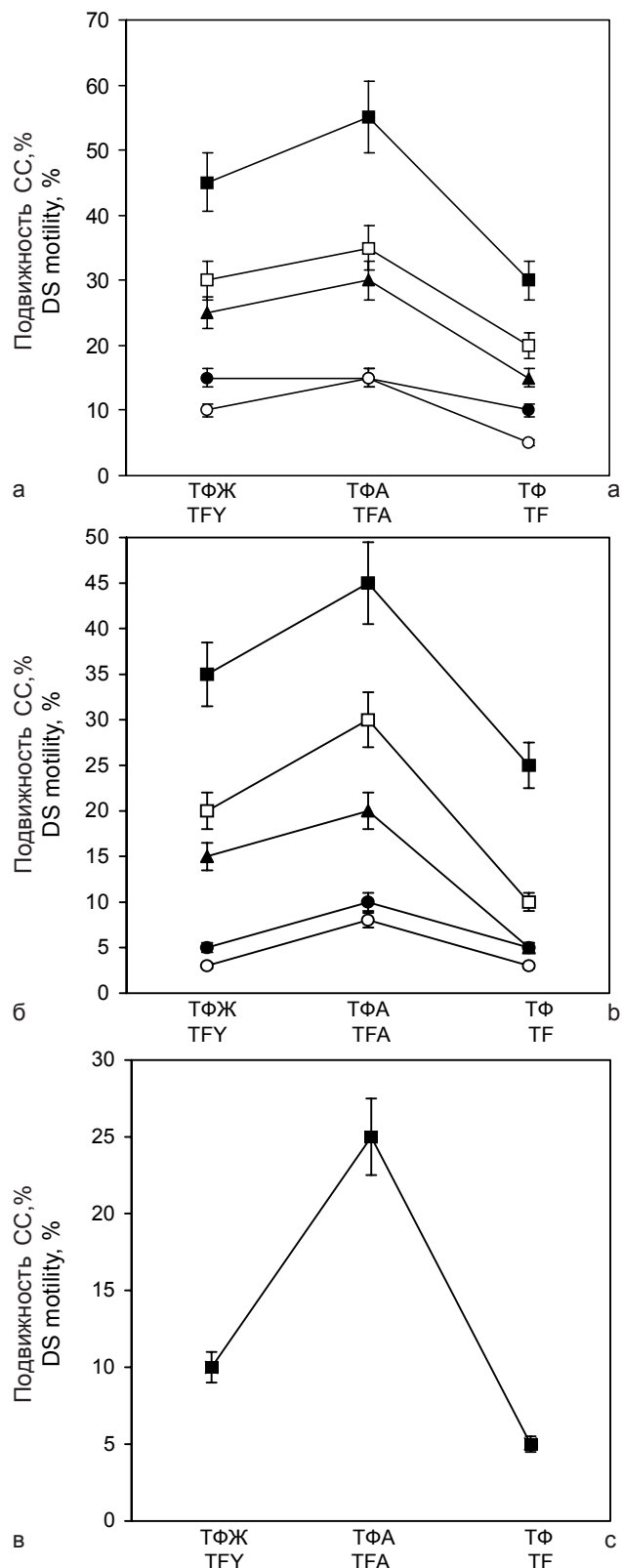


Рис. 2. Подвижность СС после замораживания-оттаивания в средах ТФЖ, ТФА и ТФ под защитой исследуемых криопротекторов через 1 (а), 3 (б) и 6 ч (в) хранения при температуре 6°C: ■ – ДМФ; □ – ЭГ; ▲ – ГЛ; ● – ДМСО; ○ – 1,2-ПД.

Fig. 2. DS motility after freeze-thawing in TFY, TFA and TF media under protection of studied cryoprotectants in 1 (a), 3 (b) and 5 hrs (c) of storage at 6°C: ■ – DMF; □ – EG; ▲ – GL; ● – DMSO; ○ – 1,2-PD.

Однако отмечается, что в присутствии БСА снижаются уровень агглютинации сперматозоидов, скорость накопления лактата, ингибируется перекисное окисление липидов. Альбумины обладают выраженными антиоксидантными свойствами [8].

В работе [11] рассматривается возможный механизм положительного действия БСА на мембраны клеток. Указывается, что белковые компоненты необходимы для поддержания фосфолипидных фракций в плотно ассоциированном виде с плазматической мембраной, сохранения фосфолипидов в солюбилизированной форме, уменьшения диффузии липидов в мембранах. Высказывается предположение, что БСА может сорбироваться на липидном бислое, тем самым предотвращая агрегацию везикул и стабилизируя поверхность бислоя [2], т.е. проявлять мембраностабилизирующее действие. Предположение о возможном взаимодействии БСА с мембранами клеток косвенно подтверждают данные [9, 21] об отсутствии концентрационной зависимости (1, 4, 6%) их положительного влияния на подвижность и целостность мембран сперматозоидов при инкубации *in vitro*.

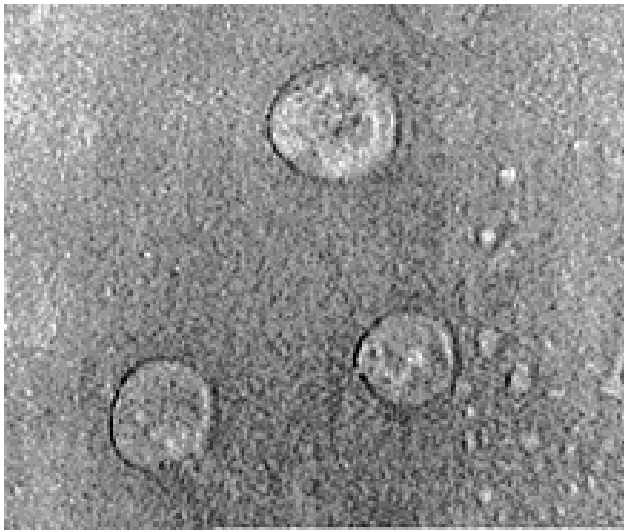
Пытаясь проверить справедливость такого механизма влияния белков на сохранность клеток, мы исследовали взаимодействие яичного альбумина с искусственными липидными мембранами и отмытыми СС. После добавления в суспензию мультислойных везикул альбумина, меченого TG-404, обнаружена ярко-зеленая флуоресценция липосом, наиболее выраженная по периметру, однозначно отражающая сорбцию альбумина на поверхности липидного бислоя. Однако после добавления меченого альбумина в суспензию сперматозоидов флуоресценции клеток обнаружено не было. Это может быть связано с особенностями регистрации флуоресценции при измерениях в люминесцентном микроскопе, при которой наблюдаются сигналы от единичных клеток. Но даже при очень высоком содержании клеток концентрация их мембран остается небольшой и доля связанного с ними красителя также невелика. Поэтому визуально зарегистрировать сигнал от молекул альбумина, сорбированных на поверхности липидного бислоя СС, достаточно сложно [2]. В нашей работе липосомы и СС значительно отличались по размеру и количеству мест локализации альбумина, это позволяет предположить, что связывание альбумина с липидами, аналогичное наблюдаемому на липосомах, имеет место и для клеток СС. Однако это предположение требует дальнейших доказательств.

Полученная высокая жизнеспособность СС при криоконсервировании под защитой ДМФ в сочета-

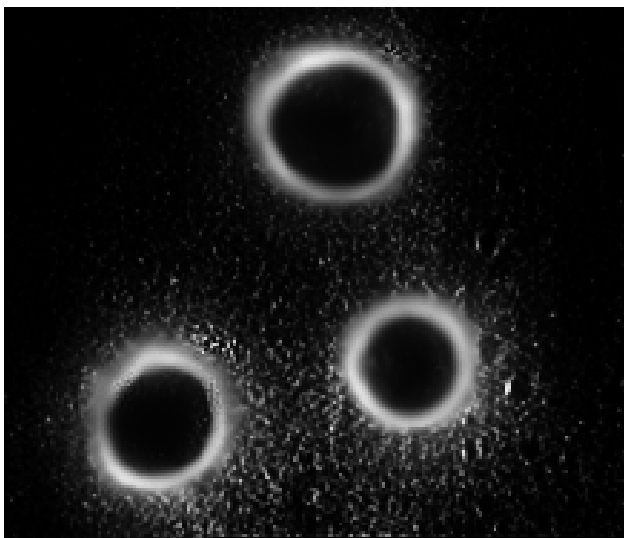
We did not manage to find out the motile cells with other CP (Fig. 2, c). DS low viability after freezethawing was observed in TF medium, independently on CP type.

Cell damage, caused by CP introduction and the duration of their contact can reflect the contribution of both osmotic and chemical (biochemical) component into their common cytotoxic effect [1]. The studied substances are related to different classes of chemical compounds (polyols, amides, sulfoxides), have different structure, but at the same time they all meet the requirements, needed for efficient CP (high hydrophilic properties) and penetrate well into cells. In other objects it was demonstrated [1, 15] that the mechanism of their penetration was different: disubstituted amides (DMS) did not cause an osmotic stress in cells, that was stipulated with their high capability to penetrate directly through a lipid membrane bilayer in contrast to polyols, which mostly diffused into cells through water channels. The rate of substance penetration through membranes and their cytotoxicity depend on geometrical sizes of molecules and their hydrophobicity [1, 15], which characteristic may be the coefficient of CP distribution in water-nonpolar phase system (in particular, n-octanol). Studied CPs have the following distribution coefficients in the water-n-octanol system [1]: 0.005 for GL; 0.040 for EG; 0.076 for PD; 0.233 for DMF; 0.247 for DMSO, their hydrophobicity augments in the same order as well. Taking into account this fact, it is difficult to explain why DMF and EG, being different by the structure, and mostly by hydrophobicity, manifest the same low cytotoxicity in respect of DS. However, taking into account the data about the capability of studied substances to penetrate through cell membranes, based on which we can allocate them in series by the degree of decreasing of permeability coefficients: DMF>EG>1,2-PD>GL>DMSO, we assume the following. Namely osmotic factor makes the main contribution into the total cytotoxic effect of three latter CP, stipulated not so much by their hydrophobic properties, as molecule sizes and capability of these substances to reduce membrane permeability for water [1, 15].

The analysis of the results obtained demonstrates that the chicken egg yolk caused a certain positive effect on DS integrity after thawing in comparison with yolk-free medium. It is known, that the composition of plasmatic membranes or, for example, the ratio of cholesterol and phospholipids stipulate in the certain extent the spermatozoa resistance to temperature decrease [4, 5]. One assumes [4], that the egg yolk in a cryoprotective medium changes the value of this ratio in spermatozoa, stabilizes the protein-lipid complexes, causes the change in temperatures of phase transitions of lipid membranes into the side of lower values, preventing cold shock in cells. However a positive



а



б

Рис. 3. Мультислойные липосомы в растворе яичного альбумина, меченого красителем TG-404: а – фазово-контрастное изображение; б – то же поле в режиме флуоресценции с желто-зеленым светофильтром.

Fig. 3. Multi-layer liposomes in egg albumin solution, labelled with TG-404 dye: а – the phase-contrast image; б – the same field in the fluorescence regimen with yellow-green light filter.

нии с яичным альбумином позволяет предположить следующий механизм их совместного криозащитного действия. ДМФ, являясь апротонным растворителем, способным образовывать сильные межмолекулярные водородные связи, в первую очередь с молекулами воды, эффективно защищает клетки по коллигативному механизму. Его высокая гидрофобность позволяет быстро проникать непосредственно через липидный бислой мембран СС, не вызывая осмотического стресса. Но отмеченные сильные акцепторные свойства и высокая гидрофобность ДМФ могут быть причиной нарушения структуры мембран СС, в частности белок-липидных взаимодействий.

effect of chicken egg yolk under low temperature effect on cells depends in a considerable extent on their species-specificity.

The inclusion of egg albumin into cryoprotective medium instead of egg yolk enables preservation of cell motility before and after freezing at a higher level. In contrast of egg yolk the water-soluble proteins, albumins in particular, do not change the cholesterol/phospholipids ratio in cell membranes at bicarbonate absence in the medium [14]. In sheep and bovine spermatozoa it was shown [24], that albumins manifested a positive effect on spermatozoa motility, contributed to their membrane integrity, but not always prevented acrosome damaging [9, 11], that can be stipulated by albumin effect on capacitation and acrosomal reaction of spermatozoa. However it was noted, that at BSA presence there was a decrease in agglutination level of spermatozoa, lactate accumulation rate, and the lipid peroxidation was inhibited. Albumins have strongly manifested antioxidant properties [8].

The work [11] envisages the possible mechanism of positive BSA effect on cell membranes. Protein components are designated to be necessary for maintaining phospholipid fractions in a tight associated form with plasmatic membrane, preservation of phospholipids in soluble form, reduction of lipid diffusion in membranes. One suggests that BSA can be sorbed on lipid bilayer, thereby preventing the aggregation of vesicles and stabilising bilayer surface [2], i.e. manifest the membrane-stabilising effect. The suggestion about possible BSA interaction with cell membranes are indirectly proved by the data [9, 21] about the absence of concentration dependency (1; 4; 6%) of their positive effect on motility and spermatozoa membrane integrity during incubation in vitro.

When trying to verify the correctness of such effect mechanism of proteins on cell integrity, we studied the interaction of egg albumin with artificial lipid membranes and washed-out DS. After adding TG-404-labelled albumin into a suspension of multilayer vesicles there was found out a vivid-green liposome fluorescence, mostly manifested along the perimeter, uniformly reflecting albumin sorption on lipid bilayer surface. However, after adding labelled albumin into spermatozoa suspension no cell fluorescence was revealed. This can be related to the peculiarities of fluorescence registering when measuring in luminescent microscope, when signals from single cells are observed. However, even at a very high cell content their membrane concentration remains low and a part of bound with it dye is also small. Therefore it is quite difficult to visually register the signal from albumin molecules, being sorbed on a surface of DS lipid bilayer [2].

In our work liposomes and DS differed in a considerable extent by size and number of albumin localisation sites, that enabled to assume that albumin

Альбумин способен связывать электронно-донорные молекулы ДМФ образованием водородно-связанных комплексов с протонодонорными центрами молекул белка, в частности с гидроксильными и сульфгидрильными группами аминокислотных остатков. При этом ассоциированные с белком молекулы ДМФ располагаются в непосредственной близости от гидрофобных участков альбумина [6], в которые ДМФ из-за наличия двух метильных групп может встраиваться. Таким образом, как гидрофобные, так и гидрофильные области молекулы альбумина способны взаимодействовать с ДМФ, снижая его внутриклеточную концентрацию, не позволяя достигнуть ее цитотоксического уровня. В то же время комплекс альбумина с ДМФ может влиять на структуру растворителя [6], модифицируя процесс кристаллизации, и выступать как самостоятельный криозащитный агент.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности последующих исследований криопротекторных свойств ДМФ, ЭГ и криозащитных сред с добавками альбуминов при криоконсервировании СС.

Выводы

1. Показано, что ДМФ и ЭГ проявляют высокую криозащитную активность в отношении СС и не оказывают на них существенного цитотоксического действия, что позволяет рассматривать эти вещества как перспективные КП для низкотемпературного хранения СС.

2. Выявлено, что замена желтка куриных яиц в составе среды на яичный альбумин не снижает жизнеспособность СС в процессе криоконсервирования. Лучшие результаты после замораживания-оттаивания СС получены при сочетании в криозащитной среде 1 М ДМФ с 1%-м яичным альбумином.

Установлен факт взаимодействия флуоресцентно меченого яичного альбумина с искусственными липидными мембранами.

Литература

1. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М. Механізми проникання криопротекторів крізь мембрани еритроцитів // Пробл. криобіології.– 2002.– № 4. – С.9–15.
2. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов.– М.: Наука, 1989.– 219 с.
3. Егоров М.И., Копейка Е.Ф., Линник Т.П., Кучков И.Н. Влияние глицерина, этиленгликоля и режимов охлаждения на подвижность сперматозоидов собак // Пробл. криобіології.– 2004.– № 4.– С. 13-20.
4. Наук В.А. Структура и функция спермиев с/х животных при криоконсервировании.– Кишинев: Штиинца, 1991.– 199 с.
5. Наук В.А., Борончук Г.В., Ротт Н.Н. Длительное сохранение спермы сельскохозяйственных и диких

binding with lipids, similar to the observed one in liposomes, took place for DS cells as well, but this supposition required further proofs.

The obtained high DS viability during cryopreservation under DMF protection in combination with egg albumin requires to elucidate the mechanism of their mutual cryoprotective effect. DMF, being an aprotic solvent capable to form strong intermolecular hydrogen bonds, first of all with water molecules, efficiently protects cells by colligative mechanism. Its high hydrophobicity enables rapid penetration directly through a lipid bilayer of DS membranes, without causing an osmotic stress. But the noted string acceptor properties and a high DMF hydrophobicity can be the cause for DS membrane structure impairment, in particular protein-lipid interactions.

Albumin is capable to bind the electron-donor DMF molecules by forming hydrogen-bound complexes with proton-donor centres of protein molecules, with hydroxyl and sulfhydryl groups of aminoacid residuals, in particular. At the same time the associated with protein DMF molecules are placed into a direct proximity of albumin hydrophobic sites [6], where DMF can be built in due to the presence of two methyl groups. Thus, both hydrophobic and hydrophil areas of albumin molecule are able to interact with DMF, by decreasing its intracellular concentration, without enabling its cytotoxic level achievement. At the same time the complex of albumin with DMF can affect the solvent structure [6], by modifying crystallisation process and act as an independent cryoprotective agent.

The results obtained testify to the perspective of further research of cryoprotective properties in DMF, EG and cryoprotective media with albumin additives during DS cryopreservation.

Conclusions

1. DMF and EG were shown to manifest a high cryoprotective activity in respect of DS and cause no significant cytotoxic effect in them, that enabled considering these substances as perspective CP for DS low temperature storage.

2. The substitution of chicken egg yolk in medium composition for egg albumin was revealed not decreasing DS viability during cryopreservation. The best results after DS freeze-thawing were obtained when combining 1M DMF with 1% egg albumin in cryoprotective medium.

The fact of fluorescent-labelled egg albumin interaction with artificial lipid membranes was established.

References

1. Gordienko O.I., Gordienko E.A., Linnik T.P., Kompaniets A.M. Mechanisms of cryoprotectant permeation via erythrocytes membranes // Problems of Cryobiology.– 2002.– N4.– P. 9-15.

- животных // Консервация генетических ресурсов.– Пушчино, 1991.– С. 35-81.
6. Туров В.В., Покровский В.А., Чуйко А.А. Влияние сывороточного альбумина на температуру образования эвтектик в бинарных растворах органических соединений // Биофизика.– 1994.– Т.39. Вып. 6.– С. 988-992.
 7. Пат.68172 А (Україна) МПК 7А01 N 1/02. Спосіб отримання сперми собак./ В.І. Грищенко, Є.Ф. Копійка, М.І. Єгоров, І.М. Кучков, І.В. Черкашина. Заявл. 31.10.2003; Опубл. 15.07.04.– Бюл. 7.– С. 4.26.
 8. Alvarez J.G., Storey B.T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility // Biol. Reprod.– 1983.– Vol. 29, N3.– P. 548-555.
 9. Blesbois E., Caffin J.P. Serum like' albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4°C // Br. Poult. Sci.– 1992.– Vol. 33, N3.– P. 663-670.
 10. Boucher J.H., Foote R.H., Kirk R.W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves // Cornell Vet.– 1959.– Vol.47.– P. 67-89.
 11. De Leeuw F.E., De Leeuw A.M., Den Daas J.H. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing // Cryobiology.– 1993.– Vol. 30, N1.– P. 32-44.
 12. England G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review// J. Reprod. Fertil. Suppl.– 1993.– Vol. 47.– P. 243-255.
 13. Fahrig B.M. Cryopreservation by pellet freezing of epididymal and ejaculated spermatozoa from male dog: B. S. Thesis.– Louisiana State University, 2003.– 312 p.
 14. Fleisch F.M., Brouwers J.F., Niveststein P.F. et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane // J. Cell Sci.– 2001.–Vol. 114, Pt. 19.– P. 3543-3555.
 15. Gilmore J.A., McGann L.E., Lui J. et al. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa // Biol. Reprod.– 1995.– Vol. 53.– P. 985-995.
 16. Katkov I.I., Katkova N., Critser, J.K., Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations // Cryobiology.– 1998.– Vol.37.– P. 325-338.
 17. Kimelberg H.K. Influence of lipid phase transitions and Cholesterol on Protein-Lipid Interactions // Cryobiology.– 1978.– Vol. 15.– P. 222-226.
 18. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y. The role of glycerol and dimethyl sulfoxide on the freezing of fowl spermatozoa // CryoLett.– 1989.– Vol.10.– P. 393-400.
 19. Olar T. T., Bower R. A., Pickett B. W. Influence of extender cryopreservation and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws // Theriogenology.– 1988.– Vol. 31, N2.– P. 134-142.
 20. Pena A., Linde-Forsberg C. Effect of equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa // Theriogenology.– 2000.– Vol. 54.– P. 859-875.
 21. Risopatron J., Catalan S., Miska W. et al. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro // Reprod. Domest. Anim.– 2002.– Vol.37, N6.– P. 347-351.
 22. Solares M.P., Rossi C.A.R., Mezzalaira A., Cecim M. Ethylene glycol on canine semen cryopreservation // Ciencia Rural.– 2002.– Vol. 32, N4.– P. 649-655.
 23. Watson P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing // Reprod. Fertil. Dev. – 1995.– Vol. 7.– P. 871-891.
 2. Dobretsov G.E. Fluorescent probes in studying cells, membranes and lipoproteins.– Moscow: Nauka, 1989.– 219 p.
 3. Egorov M.I., Kopeika E.F., Linnik T.P., Kuchkov I.N. Effect of glycerol, ethylene glycol on morphofunctional characteristics of dog's spermatozoa at different cryopreservation stages// Problems of Cryobiology.– 2004.– N4.– P. 13-20.
 4. Nauk V.A. Structure and function of agricultural animals' spermatozoa during cryopreservation.– Kishinev: Shtiintsa, 1991.– 199 p.
 5. Nauk V.A., Boronchuk G.V., Rott N.N. Long-term sperm storage of agricultural and wild animals// Preservation of genetic resources.– Puschino, 1991.– P.35-81.
 6. Turov V.V., Pokrovsky V.A., Chujko A.A. Effect of serum albumin on temperature of eutectic formation temperature in binary solutions of organic compounds // Biophysics.– 1994.– Vol. 39, Issue 6.– P. 988-992.
 7. Patent 68172 A (Ukraine) IPC 7A01 N1/02. Way for dog sperm obtaining/V.I. Grischenko, E.F. Kopeika, M.I. Egorov, I.M. Kuchkov, I.V. Cherkashina. Applied 31.10.2003; Published 15.07.04.– Bull. 7.– P. 4.26.
 8. Alvarez J.G., Storey B.T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility // Biol. Reprod.– 1983.– Vol. 29, N3.– P. 548-555.
 9. Blesbois E., Caffin J.P. Serum like' albumin of fowl seminal plasma and effects of albumin on fowl spermatozoa stored at 4°C // Br. Poult. Sci.– 1992.– Vol. 33, N3.– P. 663-670.
 10. Boucher J.H., Foote R.H., Kirk R.W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves // Cornell Vet.– 1959.– Vol.47.– P. 67-89.
 11. De Leeuw F.E., De Leeuw A.M., Den Daas J.H. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing // Cryobiology.– 1993.– Vol. 30, N1.– P. 32-44.
 12. England G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review// J. Reprod. Fertil. Suppl.– 1993.– Vol. 47.– P. 243-255.
 13. Fahrig B.M. Cryopreservation by pellet freezing of epididymal and ejaculated spermatozoa from male dog: B. S. Thesis.– Louisiana State University, 2003.– 312 p.
 14. Fleisch F.M., Brouwers J.F., Niveststein P.F. et al. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane // J. Cell Sci.– 2001.–Vol. 114, Pt. 19.– P. 3543-3555.
 15. Gilmore J.A., McGann L.E., Lui J. et al. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa // Biol. Reprod.– 1995.– Vol. 53.– P. 985-995.
 16. Katkov I.I., Katkova N., Critser, J.K., Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: Chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations // Cryobiology.– 1998.– Vol.37.– P. 325-338.
 17. Kimelberg H.K. Influence of lipid phase transitions and Cholesterol on Protein-Lipid Interactions // Cryobiology.– 1978.– Vol. 15.– P. 222-226.
 18. Maeda T., Terada T., Tsutsumi Y. The role of glycerol and dimethyl sulfoxide on the freezing of fowl spermatozoa // CryoLett.– 1989.– Vol.10.– P. 393-400.
 19. Olar T. T., Bower R. A., Pickett B. W. Influence of extender cryopreservation and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws // Theriogenology.– 1988.– Vol. 31, N2.– P. 134-142.
 20. Pena A., Linde-Forsberg C. Effect of equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa // Theriogenology.– 2000.– Vol. 54.– P. 859-875.

24. Wolfe C.A., James P.S., Gunning A.P. et al. Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull spermatozoa after washing and exposure to macro-molecules BSA and PVP // Mol. Reprod. Dev.– 2000.– Vol.59, N3.– P. 306-313.

Поступила 21.02.2005

21. Risopatron J., Catalan S., Miska W. et al. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated in vitro // Reprod. Domest. Anim.– 2002.– Vol.37, N6.– P. 347-351.

22. Solares M.P., Rossi C.A.R., Mezzalaira A., Cecim M. Ethylene glycol on canine semen cryopreservation // Ciencia Rural.– 2002.– Vol. 32, N4.– P. 649-655.

23. Watson P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing // Reprod. Fertil. Dev. – 1995.– Vol. 7.– P. 871-891.

24. Wolfe C.A., James P.S., Gunning A.P. et al. Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull spermatozoa after washing and exposure to macro-molecules BSA and PVP // Mol. Reprod. Dev.– 2000.– Vol.59, N3.– P. 306-313.

Accepted in 21.02.2005