

УДК 57.043: 636.5.082.453

Т.П. Линник\*, И.Н. Мартынюк

## Подходы к созданию криозащитных сред при криоконсервировании спермы птиц

UDC 57.043: 636.5.082.453

T.P. LINNIK\*, I.N. MARTYNYUK

## Approaches to Creation of Cryoprotective Media for Cryopreservation of Avian Sperm

Представлен обзор литературных и собственных исследований состава и физико-химических свойств криозащитных сред при криоконсервировании спермы птиц. Предложен основной принцип формирования среды из компонентов, выполняющих определенную функцию в цикле замораживания-оттаивания. Обсуждается положительная роль включения в состав среды белковых добавок вместо липидов (яичный желток). Рассматривается перспективность применения сложных композиций криопротекторов на основе диолов и амидов в сочетании с непроницаемыми водорастворимыми полимерами. Предлагаются правила составления смеси криопротекторов, основанные на снижении их цитотоксичности, скорости и механизмах их проницаемости через мембрану сперматозоидов, влиянии на процессы вне- и внутриклеточной кристаллизации осмотически активной воды.

**Ключевые слова:** сперма птиц, криоконсервирование, криозащитная среда, криопротекторы, цитотоксичность, диолы, амиды.

Представлено огляд літературних і власних досліджень складу та фізико-хімічних властивостей криозахисних середовищ при криоконсервуванні сперми птахів. Запропоновано основний принцип формування середовища з компонентів, що виконують певну функцію у циклі заморожування-відтавання. Обговорюється позитивна роль включення до складу середовища білкових добавок замість ліпідів (ячний жовток). Розглядається перспективність застосування складних композицій криопротекторів на основі діолів та амідів у поєднанні з непроницаючими водорозчинними полімерами. Пропонуються правила складання суміші криопротекторів, засновані на зниженні їх цитотоксичності, швидкості і механізмах їх проникності через мембрану сперматозоїдів, впливу на процеси поза-і внутрішньоклітинної кристалізації осмотично активної води.

**Ключові слова:** сперма птахів, криоконсервування, криозахисне середовище, криопротектори, цитотоксичність, діоли, аміди.

A review of the literature and our own studies of the composition and physico-chemical properties of the cryoprotective media during cryopreservation of avian sperm is presented. Basic principle of forming media from components that perform specific functions in a cycle of freeze-thawing is proposed. We discuss the positive role of inclusion in the composition of the medium of protein supplements instead of lipids (egg yolk). We consider the prospects of complex compositions of cryoprotectants on the basis of diols and amides in combination with non-invasive water-soluble polymers. There are proposed rules of making a mixture of cryoprotectants based on the reduction of their cytotoxicity, the rate and mechanisms of their permeability through the membrane of spermatozoa, the impact on the processes of extra- and intracellular crystallization of osmotically active water.

**Key words:** avian sperm, cryopreservation, cryoprotective medium, cryoprotectants, cytotoxicity, diols, amides.

За 200 лет исследования условий хранения спермы *in vitro* накоплен огромный материал, касающийся различных аспектов этой проблемы. К настоящему времени список видов, на которых проводились эксперименты по замораживанию спермы, включает более двух сотен различных птиц, рептилий, рыб, беспозвоночных (иглокожих и моллюсков), а также млекопитающих и человека [3, 6, 13, 17–20, 23, 27, 32, 45]. У большинства из них получено восстановление оплодотворяющей способности сперматозоидов после замораживания-оттаивания. Современные методы криоконсервирования спермы сельскохо-

Enormous information concerning different aspects of sperm *in vitro* storage conditions has been accumulated for 200 years of studying this problem. By now the list of species, in which experiments on freezing sperm were carried out, includes more than 200 different birds, reptilians, fish, invertebrates (echinoderms and molluscs) as well as mammals and the human [3, 6, 13, 17–20, 23, 27, 32, 45]. Restoration of fecundating ability of spermatozoa after freeze-thawing was achieved in most of these species. In general modern methods for cryopreservation of breeder animals' sperm provide

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-30-07, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

\* To whom correspondence should be addressed: 23,  
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373  
3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

зайственных животных и птиц в целом обеспечивают удовлетворительное получение потомства, но все же не позволяют эффективно использовать генетический материал высокопродуктивных производителей в селекционно-племенной практике, так как после замораживания-оттаивания спермы практически всех видов, включая и сперму птиц, удается сохранить не более 50% функционально полноценных клеток [13, 18, 27, 34, 45–47]. Криоконсервирование спермы некоторых птиц, в частности индюка, до сих пор остается нерешенной проблемой.

Разбавление спермы криозащитной средой – один из наиболее важных этапов в цикле ее криоконсервирования. Именно состав и физико-химические свойства защитной среды являются определяющими при подготовке спермы к замораживанию и обуславливают эффективность криоконсервирования. Опубликованы результаты испытаний огромного числа разных сред для разбавления и замораживания спермы птиц [2, 6, 10, 13, 22, 32, 35–40, 44]. Предлагались разнообразные подходы к созданию защитных сред, но подтвердили свою эффективность и в основном применяются два: формирование среды, максимально приближенной по составу к спермальной плазме [32, 35–39]; составление среды из компонентов, которые выполняют определенную функцию – компенсируют или предотвращают изменения в спермиях, возникающие на разных стадиях криоконсервирования [6, 13, 18, 47]. Один из наиболее интересных подходов к разработке сред базируется на идее – не копировать состав плазмы, а нейтрализовать "вредные компоненты" секретов половых желез, активирующих сперматозоиды во время эякуляции, тормозить метаболические процессы, максимально переводить сперматозоиды в состояние покоя еще на этапе разбавления и инкубации. Известно [4], что природа наделила многие биологические объекты различного уровня организации (от клетки до целого организма) свойством переходить в состояние покоя, сохраняя при этом жизнеспособность и значительно повышая свою устойчивость к неблагоприятным внешним воздействиям. Накоплены многочисленные факты в пользу того, что экзогенное или эндогенное торможение метаболизма клеток в условиях стресса может иметь защитное значение [16]. При всей привлекательности и внешней простоте этого подхода в полной мере реализовать его в практике криоконсервирования спермы не удастся. Одной из основных причин является недостаточность знаний о метаболических путях жизненного цикла сперматозоидов.

Следует обратить внимание на перспективность еще одного подхода к разработке сред для спермы птиц. Давно обнаружен и подтвержден феномен длительного переживания сперматозоидов птиц (приблизительно для 30 видов) в половых путях самок,

satisfactory obtainment of progeny, but still do not allow efficient usage of genetic material of heavy yielders in selection and pedigree practice, since they succeeded in saving not more than 50% of functionally adequate cells after freeze-thawing of sperm of almost all species including avian sperm [13, 18, 27, 34, 45–47]. Cryopreservation of sperm of certain birds species, for example turkey, still presents an unsolved challenge.

Dilution of sperm with a cryoprotective medium is one of the most important steps in a cryopreservation cycle. It is the composition and physico-chemical properties of a medium that are determinants, when sperm being prepared for freezing, and that condition cryopreservation efficiency. The results of testing a great number of various media for dilution and freezing of avian sperm have been published [2, 6, 10, 13, 22, 32, 35–40, 44]. Omnigenous approaches to creation of protective media were suggested, but only two confirmed their efficiency and are generally applied: formation of a medium maximally similar to sperm plasma by its composition [32, 35–39]; concoction of a medium from components, which perform a certain function – compensate or prevent changes occurring in spermatozoa at different cryopreservation stages [6, 13, 18, 47]. One of the most interesting approaches to elaboration of media is based on the idea of not copying plasma composition, but neutralising gonad secretion "harmful components" activating spermatozoa during ejaculation, inhibiting metabolic processes, maximal shifting spermatozoa to quiescence as early as at the stages of dilution and incubation. It is known [4] that nature endued a lot of biological objects of different levels of organisation (from a cell to the whole organism) with the property of shifting to quiescence and at the same time maintaining viability and significantly increasing their tolerance to unfavourable environmental impacts. Numerous facts attest to the protective role of exogenous or endogenous inhibition of cell metabolism under stress conditions [16]. Although this approach is rather attractive and seemingly easy, nobody has succeeded in bringing it into effect in cryopreservation practice to the full. Insufficiency of our knowledge on metabolic ways of spermatozoa life cycle is one of the essential reasons.

One should pay attention to prospectivity of another approach to elaboration of media for avian sperm. The phenomenon of long-term survival of avian spermatozoa (approximately of 30 species) in females' germ tracks, which is called "physiological preservation". Its duration varies from 6 to 90 days for different species [6, 15, 19, 30]. The place for spermatozoa survival in birds is glands of uterus-vagina commissure; they are called sperm-nests or

называемого "физиологической консервацией", длительность которой для разных видов колеблется от 6 до 90 суток [6, 15, 19, 30]. Местом переживания сперматозоидов у птиц являются железы матковлагалищного соединения, их называют "спермохранящими" (*sperm-nests* или *sperm-hosts glands*) [15, 30], в которых сперматозоиды находятся в заторможенном состоянии, интенсивность метаболических процессов низкая. Поэтому естественно предположить, что идеальными для длительного хранения спермы *in vitro* при гипотермии или в глубокозамороженном состоянии, могут быть среды, близкие по составу и свойствам к секрету "спермохранящих" желез полового тракта самок, например к среде трубчатых желез хранения сперматозоидов в яйцеводу кур. Однако в таком случае придется применять в составе среды активаторы метаболизма, какие из них наиболее пригодны при замораживании, не известно. Не ясно также, на каком этапе в цикле криоконсервирования их вводить, вероятнее всего после оттаивания перед осеменением. В литературе опубликованы некоторые данные о составе и свойствах секрета полового тракта самок. Показано, что содержание калия в секрете матки кур в 4 раза выше, чем в плазме спермы [21, 24], обнаружено значительное количество инозитола в экстракте из различных областей яйцевода кур, наибольшее – в воронке и железах матковлагалищного соединения [6, 29]. Отмечено повышенное содержание ионов  $Zn^{2+}$  в "спермохранящих" железах самок птиц [26]. При этом условия хранения сперматозоидов анаэробные, pH колеблется в пределах 6,5–6,9. Последние 25 лет интенсивно ведется поиск факторов, обеспечивающих "физиологическую консервацию" сперматозоидов в половых путях самок и параллельно изучается биологическая активность компонентов семенной плазмы спермы. Инкубируют сперматозоиды с эпителиальными тканями различных участков яйцевода птиц, выделяют и пытаются идентифицировать биологически активные фракции [24, 46]. При этом данные о молекулярной массе и химической природе выделенных фракций, которым отводится роль стабилизаторов, у разных авторов часто отличаются. Искусственно моделируют условия "физиологической консервации" спермы, подбирая газовый состав в камерах инкубации и одновременно варьируя композицию среды. Консервируют сперму с экстрактами клеточных культур, полученных из почек птиц, скелетных мышц эмбрионов птиц [25]. Определенные успехи достигнуты, но остаются невыясненные аспекты, что затрудняет целенаправленное использование результатов этих исследований на практике. К основным из них относятся: противоречивость данных разных авторов о составе семенной плазмы и эпителиальных секретов "спермохранящих" желез; отсутствие, как правило, четкой идентификации

sperm-host glands [15, 30]. Spermatozoa are in an arrested state in them; intensity of metabolic processes is low. That is why it is logical to assume that media similar by their compositions and properties to secretion of females' germ track sperm-host glands, for example to the medium of tubular glands of the hen's oviducts, may be ideal for long-term *in vitro* storage of sperm under hypothermia and deep freezing. However in this case one has to add metabolism activators to media. It is unknown which of them are the most suitable for freezing. It is also unclear at which stage of cryopreservation they should be included, probably after thawing and prior to insemination. Some data on the composition and properties of females' germ track secretion are published. It was shown that in the hen's uterus secretion potassium content was 4 times as much as that in sperm plasma [21, 24]; a considerable inositol amount was found in humor from different areas of the hen's oviducts, it was the highest in the infundibulum and uterus-vagina commissure glands [6, 29]. An increased ion  $Zn^{2+}$  content in bird females' sperm-nests was registered [26]. Here the conditions of spermatozoid storage are anaerobic; pH varies within the range of 6.5–6.9. Factors determining "physiological preservation" of spermatozoa in females' germ tracks have been intensively sought after over the last 25 years; in parallel with that biological activities of sperm plasma components have been investigated. Spermatozoa are incubated with epithelial tissues from different parts of birds' oviducts; there are attempts of extracting and identifying biologically active fractions [24, 46]. Here with the data by different researchers on molecular weights and chemical nature of the fractions extracted, which are considered to be stabilisers, often vary. With gas composition in incubation chambers being selected and simultaneously medium composition being counterchanged, conditions of "physiological preservation" of sperm are artificially modelled. Sperm is preserved with cell culture extracts obtained from avian kidneys, embryonic skeletal muscles [25]. A certain success has been achieved, but a lot of aspects remain unclear, which hinders purposeful introduction of results of these investigations into practice. Among the main aspects there are inconsistencies of data by different researchers on sperm plasma and sperm-nest epithelial secretion compositions, usual lack of clear identification of biologically active fractions extracted from them and finally technological intricacies of the many approaches above-mentioned.

As it was noted above, a lot of compositionally various cryoprotective media were suggested for cryopreservation of fowl sperm. Besides penetrating and non-penetrating cryoprotectants more than 50

выделенных из них биологически активных фракций и, наконец, технологическая сложность многих из вышеперечисленных приемов.

Как отмечалось выше, для криоконсервирования спермы петухов предложено множество различных по составу криозащитных сред. В составе сред, исключая проникающие и непроникающие криопротекторы, изучено более 50 различных веществ, включая углеводы (моно-, ди- и полисахариды), аминокислоты, органические (глутаматы, лактаты, цитраты, ацетаты) и неорганические (хлориды, сульфаты, фосфаты, карбонаты) соли, некоторые биологически активные соединения (альбумины, липиды, ферменты, гормоны, антиоксиданты и т. д.). Очевидно нецелесообразно было испытывать такое большое количество многокомпонентных сред, поскольку часто у разных авторов они мало отличаются друг от друга.

Анализ литературных и собственных данных [5, 10, 13, 22, 32, 35–40, 44] позволяет утверждать, что при формировании многокомпонентной криозащитной среды для криоконсервирования спермы птиц наиболее оптимальным является подход, схема которого представлена в таблице. Основной принцип формирования основывается на включении в состав среды компонентов, выполняющих определенную функцию в цикле криоконсервирования спермы птиц.

Применение защитной среды для разбавления спермы преследует как минимум три цели. Первая – однородно распределить сперматозоиды так, чтобы получить необходимую и достаточную концентрацию клеток при осеменении. Вторая – поддерживать жизнеспособность сперматозоидов в течение краткого или длительного гипотермического хранения *in vitro*, что необходимо на этапе подготовки к замораживанию. Следует отметить, что хранение спермы птиц *in vitro* в условиях гипотермии (0...5°C) является важной самостоятельной задачей, так как широко используется в селекционно-племенной практике для искусственного осеменения [35–39, 45].

Третья цель – предотвратить или максимально уменьшить действие низких температур (вне- и внутриклеточной кристаллизации, повышения концентрации солей и т. д.) на этапе замораживания сперматозоидов, а также избежать осмотического дисбаланса в момент оттаивания в сочетании с соответствующими скоростями охлаждения и отогрева клеточной суспензии. Поэтому требования к составу криозащитных сред в зависимости от поставленной задачи могут существенно отличаться. Например, для обеспечения жизнеспособности сперматозоидов на этапе подготовки к замораживанию в условиях гипотермии необходимы компоненты, поддерживающие осмотический баланс, буферную емкость, их энергоснабжение для сохранения метаболизма на определенном уровне, а также антиоксиданты для

different substances including carbohydrates (mono-, di-, and polysaccharides), amino acids, organic (glutamates, lactates, citrates, acetates) and inorganic (chlorides, sulphates, phosphates, carbonates) salts, some biologically active compounds (albumin, lipids, enzymes, hormones, antioxidants *etc.*) were studied as parts of media. Apparently it is inexpedient to study such a great number of multicomponent media, as they differ little from one another in different works.

Analysis of literature and our own data [5, 10, 13, 22, 32, 35–40, 44] allows asserting that the approach, a scheme of which is presented in the Table, is the most optimal for the development of a multicomponent cryoprotective medium for cryopreservation of avian sperm. The fundamental principle of the development is based on the inclusion of components performing certain functions in the cryopreservation cycle of avian sperm into media.

Application of cryoprotective media for dilution of sperm pursues 3 objectives at least: the first one is homogenous distribution of spermatozoa so that to obtain required and sufficient concentrations of cells for insemination. The second objective is supporting spermatozoa viability during short- or long-term hypothermic *in vitro* storage, which is necessary at the preparative stage prior to freezing. It should be noted that *in vitro* storage of avian sperm under hypothermic conditions (0...5°C) is a detached vital task, as it is widely used in selection-pedigree practice for artificial insemination [35–39, 45].

The third aim is to prevent or to weaken maximally low temperature impact (extra- and intracellular crystallization, increased concentration of salts *etc.*) at the stage of freezing spermatozoa as well as to avoid osmotic dysbalance at the moment of thawing by combining appropriate cooling and heating rates of cell suspensions. That is why requirements to cryoprotective media compositions can vary considerably depending on an assigned task. For example, components supporting osmotic balance, buffer capacity, energy production for maintenance of metabolism on a certain level as well as antioxidants for weakening repercussions of oxidative stress occurring during sperm ejaculation and *in vitro* storage are necessary to provide viability of spermatozoa under hypothermic conditions at the preparative stage prior to freezing [2, 31, 34]. One should take into account that reactive oxygen species and free radicals of unsaturated fat acids being a damaging factor, at the same time perform a regulatory role in physiological processes in cells: signal transduction and fertilization [32].

In the first place a cryoprotectant with sufficiently high cryoprotective activity is needed as a part of media to prevent repercussions of water-ice

снижения последствий окислительного стресса, возникающего при эякуляции спермы и хранении *in vitro* [2, 31, 34]. Следует учитывать, что активные формы кислорода и свободные радикалы ненасыщенных жирных кислот, являясь повреждающим фактором, одновременно выполняют регуляторную роль в физиологических процессах клетки: сигнальной трансдукции, акросомальной реакции, капацитации и оплодотворении [32].

Для предотвращения последствий фазовых переходов вода-лед при замораживании-оттаивании клеточных суспензий в составе среды прежде всего требуется присутствие криопротектора с достаточно высокой криозащитной активностью [8, 9, 12, 13]. Идеальный вариант, когда компоненты криозащитной среды одновременно выполняют несколько функций. Так, например, углеводы могут обеспечить необходимую осмотичность во внеклеточной среде, являются энергосубстратами для клетки в анаэробных и аэробных условиях, стабилизируют белково-липидные комплексы мембран сперматозоидов и структуру цитоскелета и проявляют криозащитную активность в отношении сперматозоидов, полностью или частично заменяя обычные криопротекторы. Добавка биологически активных веществ, как правило, имеет вспомогательный характер и необходима при выраженном нарушении гомеостаза клеток. Например, антиоксиданты целесообразно использовать для предотвращения перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран сперматозоидов, у которых ферменты, регулирующие ПОЛ, отличаются низкой активностью [2]. Или, например, применение в среде при криоконсервировании спермы птиц ингибиторов фосфоэстеразы – фермента распада цАМФ. Установлено, что направленное воздействие на цАМФ – одного из основных нуклеотидов, обеспечивающих биоэнергетику клетки и обуславливающих подвижность и выживаемость сперматозоидов, оказывает положительный эффект на результат криоконсервирования спермы [42]. По характеру действия биологически

Схема формирования состава криозащитной среды для спермы птиц компонентами, выполняющими определенную функцию в цикле криоконсервирования

Scheme of the development of a cryoprotective medium for avian sperm with components performing certain functions in the cryopreservation cycle

Выполняемая функция Function		Вещества Substances
Поддержание Supporting	осмотического баланса osmotic balance	Органические и неорганические соли: глутаматы, цитраты, ацетаты калия, натрия и магния. Углеводы. Непроницающие криопротекторы Organic and inorganic salts: potassium, sodium and magnesium glutamates, citrates, acetates. Carbohydrates. Non-penetrating cryoprotectants
	кислотно-основного равновесия acid-base equilibrium	Неорганические буферные системы, органические буферы: TES, TEST, TRIS и т.д. Inorganic buffer systems, organic buffers: TES, TEST, TRIS etc.
	ионной силы ionic strength	Органические и неорганические соли щелочно-земельных металлов: натрия, калия, магния, кальция Organic and inorganic salts of alkaline-earth metals: sodium, potassium, magnesium, calcium
Энергоснабжение Energy production		Углеводы, глутамат натрия Carbohydrates, sodium glutamate
Комплексообразующая активность Chelating activity		Молоко, сыворотки, протеины, глутаматы, протамин сульфат, ЭДТА и т.д. Milk, sera, proteins, glutamates, protamine sulphate, EDTA etc.
Криопротекторная активность Cryoprotective activity		Полиолы, амиды, сульфоксиды, водорастворимые полимеры – ПВП и др. Polyols, amides, sulfoxides, water-soluble polymers: PVP etc.
Модификаторы кристаллообразования Crystal formation modifiers		Синтетические водорастворимые полимеры: ПВП, ПВС и др., протеины, природные антифризы Synthetic water-soluble polymers: PVP, PVA etc., proteins, natural antifreezes
Биологическая активность Biological activity	антибактериальная antibacterial	Гентамицин, стрептомицин и т.д. Gentamycin, streptomycin etc.
	мембрано-стабилизирующая membrane-stabilising	Протеины, липиды, аминокислоты, углеводы, БАС* Proteins, lipids, amino acids, carbohydrates, BACs*
	антиоксидантная antioxidative	Неорганические и органические тиоловые соединения – искусственные или природного происхождения и др. Inorganic and organic thiol compounds of artificial or natural origin etc.
	ингибиторы или активаторы других ферментативных систем, метаболические регуляторы inhibitors or activators of other enzyme systems, metabolic regulators	БАС, ферменты, гормоны: аденозин, теофиллин, дибукаин, моненсин, дипиридамола и др. BACs, enzymes, hormones: adenosine, theophylline, dibucaine, monensin, dipyridamole etc.

**Примечание:** БАС – биологически активные соединения.

**Note:** BACs – biologically active compounds.

активные добавки можно разделить на две группы: к первой относятся вещества, непосредственно влияющие на функциональные характеристики сперматозоидов: антиоксиданты, стабилизаторы энергетического баланса, ингибиторы или активаторы проницаемости мембран для молекул воды, ионов солей, неэлектролитов и другие метаболические регуляторы. Ко второй относятся соединения, действующие на организм самки – стимулируют моторику репродуктивного тракта, облегчая продвижение сперматозоидов, ускоряют овуляцию яйцеклеток и т. д. Как правило, это либо ферменты (например, муциназа), либо гормоны (эстрофан, окситоцин и др.). В криозащитных средах для спермы птиц они используются редко, но их положительное влияние на конечный результат криоконсервирования спермы других видов животных и человека подтверждалось неоднократно [6, 17, 45].

Рассмотрим компоненты, присутствие которых необходимо в защитной среде и в принципе достаточно для успешного хранения спермы птиц *in vitro*.

**Углеводы.** Большинство криозащитных сред, используемых для низкотемпературного хранения спермы птиц, подобрано эмпирически. В составе многокомпонентных сред при криоконсервировании спермы птиц испытано около 10 различных углеводов – моно-, ди- и трисахаридов. Углеводы являются энергосубстратами для сперматозоидов, именно это определяет необходимость их введения в состав среды как для гипотермического хранения, так и для низкотемпературного ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Установлено, что моносахариды усваиваются быстрее, поэтому их использование предпочтительнее [6, 13, 17, 47]. К тому же углеводы являются мощными осмотическими регуляторами вне- и внутриклеточной среды. Интерес вызывает способность углеводов (особенно дисахаридов) проявлять криозащитную активность в отношении спермы некоторых видов животных при отсутствии обычных криопротекторов [41, 42]. Предполагается, что углеводы оказывают стабилизирующее влияние на мембраны клеток за счет образования сильных водородных связей между гидроксильными группами сахаров и полярными группами фосфолипидов. При этом считается, что дисахариды более эффективны, чем моносахариды, а их криопротекторная активность, благодаря влиянию на бислой цитоплазматической мембраны, может иметь специфический характер и не быть обусловлена только "коллагативным эффектом" или вносить дополнительный аспект в общий механизм их действия. Положительный криозащитный эффект углеводов без обычных криопротекторов в отношении сперматозоидов [48] выявлен при концентрации в среде, гипертоничной (450–550 мОсмоль) по отношению к спермальной плазме, и достаточно высоких скорос-

phase transition during freeze-thawing of cell suspensions [8, 9, 12, 13]. The situation when components of a cryoprotective medium perform several functions simultaneously is ideal. For example, carbohydrates can provide required osmoticity in extracellular medium, they are energy substrates for cells under anaerobic and aerobic conditions, stabilize protein-lipid complexes of spermatozoid membranes and cytoskeleton and have cryoprotective activity towards spermatozoa completely or partially substituting conventional cryoprotectants. Addition of biologically active substances, as a rule, is accessory and needed when cell homeostasis is conspicuously distorted. For example, it is wise to use antioxidants to prevent lipid peroxidation (LPO) of spermatozoid membranes, whose LPO-regulating enzymes are characterized by their low activities [2]. Or, for example, application of phosphodiesterase (an enzyme of cAMP decomposition) inhibitors in media for cryopreservation of avian sperm. Directed influence on cAMP, one of the basic nucleotides providing cell bioenergy and determining motility and survival of spermatozoa, was discovered to affect positively the yield of sperm cryopreservation [42]. Biologically active additives can be sorted into two groups by nature of their action: substances directly influencing functional parameters of spermatozoa belong to the first group: antioxidants, energy balance stabilizers, inhibitors or activators of membrane permeability for water molecules, salt ions, non-electrolytes and other metabolic regulators. Substances affecting the female organism belong to the second one: they stimulate motor activity of germ track facilitating spermatozoa propulsion, accelerate ovulation of ova *etc.* Generally these are either enzymes (for example, mucinase) or hormones (estrophan, oxytocin and others). They are rarely used in cryoprotective media for avian sperm, but their positive effects on the final results of sperm cryopreservation in other animal species and human sperm were confirmed more than once [6, 17, 45].

Let us discuss components that are necessary in protective media and essentially sufficient for successful *in vitro* storage of avian sperm.

**Carbohydrates.** Most of cryoprotective media used for low temperature storage of avian sperm were selected empirically. Nearly 10 different carbohydrates: mono-, di-, and trisaccharides, were tested in multicomponent media for cryopreservation of avian sperm. Carbohydrates are energy substrates for spermatozoa, namely this dictates the necessity of their introducing in media both for hypothermic storage and for low temperature one ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Monosaccharides were established to digest faster, that is why it is preferable to use them [6, 13, 17,

тях охлаждения (100–300°C/мин). Практически все углеводы имеют низкую эвтектику, высокую вязкость их растворов при температурах ниже 0°C, значительно влияют на форму и размеры каналов незамерзающей фракции воды. Углеводы, в частности глюкоза, являются стабилизаторами белковых гелей, следовательно, могут существенно повышать структурную стабильность цитоскелета к действию повреждающих факторов в процессе криоконсервирования. Установлено [13], что по степени положительного влияния на жизнеспособность сперматозоидов птиц (в частности, петухов) с учетом всех показателей сохранности до и после замораживания-оттаивания изученные углеводы расположились в следующий ряд: фруктоза ≈ глюкоза > лактоза > сахароза > мальтоза > трегалоза > раффиноза. Моносахариды восстанавливают после замораживания-оттаивания подвижность до 45–50% клеток и поддерживают их активность в течение более длительного времени, сохраняя при этом большее количество сперматозоидов с целыми акросомами. В то время как дисахариды оказывают, в основном, положительное влияние на целостность мембран головок с незначительным преимуществом перед моносахаридами.

*Белковый компонент.* Разбавление эякулированной спермы искусственной криозащитной средой часто приводит к нежелательным последствиям: от агглютинации сперматозоидов до преждевременной акросомной реакции. Предполагается, что возможной причиной этого является снижение концентрации положительно заряженных катионных белков в плазме спермы, которые, адсорбируясь на поверхности клеток, несущей отрицательный заряд, выполняют определенную защитную функцию, например предотвращают сперматозоиды от преждевременной активации [24, 46]. Предполагается, что белки могут воздействовать на агрегатное состояние фосфолипидов мембран, включаться в их растворение, поддерживать конфигурацию липидной поверхности и тем самым стабилизировать и предохранять цитоплазматические мембраны от повреждений в цикле криоконсервирования. Ранее [17] эта роль отводилась липидам, обязательным компонентом среды для замораживания спермы считался яичный желток. Его применение при криоконсервировании спермы имеет существенные недостатки: невозможность стерилизовать среду и стандартизовать липидный состав желтка, сложность при оценке сохранности сперматозоидов после оттаивания экспресс-методами и удаление перед осеменением. Использование отдельных, выделенных и очищенных липидов (например фосфатидилхолина) дает положительный эффект, но экономически невыгодно. Поэтому был предпринят поиск эффективной замены яичного

47]. Besides, carbohydrates are powerful osmotic regulators of extra- and intracellular media. Capacity of carbohydrates (especially disaccharides) for exerting cryoprotective effect towards sperm of some animals without conventional cryoprotectants is of great interest [41, 42]. It is assumed that carbohydrates stabilize cell membranes owing to formation of strong hydrogen bonds between saccharide hydroxyl groups and phospholipid polar groups. Herewith disaccharides are considered to be more efficient than monosaccharides, and their cryoprotective activity due to the influence on cytoplasmatic membrane bilayer can be of specific nature and cannot be attributed only to “colligative effect” or contribute additionally to the general mechanism of their action. A positive cryoprotective effect of carbohydrates without conventional cryoprotectants towards spermatozoa [48] was registered in a medium, which was hypertonic (450–550 mOsmol) related to sperm plasma at rather fast rates of cooling (100–300°C/min). Almost all carbohydrates are characterized by low eutectics, high viscosity of their solutions at temperatures below 0°C, affect significantly shape and size of unfrozen water canals. Carbohydrates, in particular glucose, are stabilizers of protein gels, consequently, can considerably enhance structural stability of cytoskeleton against damaging factors in the course of cryopreservation. It was revealed [13] that the carbohydrates investigated according to the extent of their positive influence on avian (in particular fowl) spermatozoa viability were ranked in the following manner taking into account all the indices of safety prior to and after freeze-thawing: fructose ≈ glucose > lactose > sucrose > maltose > trehalose > raffinose. Monosaccharides restore motility of up to 45–50% of cells after freeze-thawing and support their activity for a longer period, at the same time saving more spermatozoa with intact acrosomes, whereas disaccharides exert a positive effect on head membrane integrity mainly with imponderable advantage over monosaccharides.

*Protein Components.* Dilution of ejaculated sperm with an artificial cryoprotective medium often results in undesired consequences: from spermatozoid agglutination to preterm acrosome reaction. It is assumed that a possible cause of it is a reduction in positively charged cation proteins' concentration in sperm plasma, which, absorbing on negatively charged cell surface, perform a certain protective function, for example, prevent spermatozoa from preterm activation [24, 46]. It is surmised that proteins can affect aggregate state of membrane phospholipids, participate in their solubilisation, support lipid surface configuration and therethrough stabilize

желтка в составе сред. Многочисленные эксперименты подтвердили, что белки (в частности альбумины), введенные в состав криозащитных сред вместо яичного желтка, оказывают положительное действие [7, 22, 32, 45]. Особо следует отметить обнаруженный феномен существенного снижения цитотоксического действия диметилформаида (ДМФА) на сперматозоиды петуха при положительных температурах в присутствии белковых добавок. Например, подвижность спермиев петуха в средах с белковыми добавками без криопротектора при гипотермии сохранялась в течение 180 ч (в 1,5 раза дольше обычного), с ДМФА – до 72 ч, что в 5 раз превышает время переживаемости спермиев в его присутствии [7, 13]. Среди изученных белковых добавок наиболее эффективными оказались мукопротеиды (овомукоид) и альбумины (БСА, САЧ, яичный альбумин). Однако следует обратить внимание на то, что сохранение оплодотворяющей способности сперматозоидов после криоконсервирования без удаления криопротектора в присутствии белковых добавок зависит от их концентрации в среде, которая для получения высоких результатов не должна превышать 0,5%.

*Органические и неорганические соли.* В составе сред испытаны десятки солевых компонентов [2, 6, 17, 32, 35–40], выполняющих различные функции. Основные из них – поддерживать осмотический баланс, буферную емкость, сохранять физиологическое соотношение  $K^+$ ,  $Na^+$ -ионов и микроэлементов. Полностью осветить опубликованный материал по данному аспекту в рамках одной статьи не представляется возможным, поэтому остановимся только на главных моментах. Во-первых, опыт показывает, что использование органических солей предпочтительнее, во-вторых, нет необходимости применять буферы, так как буферная емкость спермальной плазмы птиц устойчива и только при разбавлении не менее 1:5 или 1:6 резко снижается [23, 31]. Кроме того, известно [47], что в пределах рН от 6,0 до 8,0 оплодотворяющая способность спермиев птиц сохраняется на высоком уровне при хранении *in vitro*. Практически во все коммерческие среды (как правило, зарубежные) обязательно входит глутамат натрия, так как установлено [6, 32], что содержание глутаминовой кислоты в сперме птиц во много раз выше по сравнению со спермой других видов животных. Присутствие глутамината в таком количестве в сперме птиц объясняется его участием во многих метаболических процессах, основным из которых является энергетический цикл. Широко применяемыми компонентами сред являются также ацетат или цитрат  $K^+$ , хлориды  $Mg^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ , эффективность использования которых доказана. Введение в среду перечисленных солей достаточно для сохранения жизнеспособности спермиев птиц *in vitro* в течение

cytoplasmic membranes and protect them against injuries in the cryopreservation cycle. Earlier [17] this role was assigned to lipids; egg yolk was thought to be an indispensable component of media for cryopreservation of sperm. Its usage for cryopreservation has significant disadvantages: it is impossible to sterilize the media and to standardize the yolk lipid composition, spermatozoa integrity is difficult to estimate by express-methods after thawing and removing cryoprotectants prior to insemination. Application of individual isolated and purified lipids (e.g. phosphatidyl choline) exerts a positive effect, but is economically unsound. That is why an efficient substitute of egg yolk was searched for. Numerous experiments confirmed that proteins (in particular, albumins) introduced in cryoprotective media instead of egg yolk exerted positive effects [7, 22, 32, 45]. The phenomenon of a considerable reduction in dimethyl formamide (DMFA) cytotoxicity for the fowl spermatozoa at positive temperatures in the presence of protein additives should be noted specifically. For example, the fowl spermatozoa motility in media containing protein additives, but without cryoprotectant, remained unchanged for 180 hrs (half as much as the usual term). When DMFA was added to such media, the spermatozoid motility remained unchanged for 72 hrs, which was 5 times longer than the time of their survival in its presence [7, 13]. Among the protein additives investigated mucoproteins (ovomucoid) and albumins (BSA, HSA, yolk albumin) turned out to be the most efficient. Nevertheless one should pay attention to the fact that maintenance of spermatozoa fecundating ability after cryopreservation without removing cryoprotectants and with protein additives depends on their concentrations in media, which are not supposed to exceed 0.5%.

*Organic and inorganic salts.* Dozens of salts [2, 6, 17, 32, 35–40] performing different functions were tested as parts of media. Their basic functions are supporting osmotic balance, buffer capacity, maintaining physiological ratio  $K^+$ ,  $Na^+$  ions and microelements. It is impossible to give a complete coverage to all the published results on this matter within a single article, so we shall only dwell on the main moments. Firstly, experience shows that the usage of organic salts is more preferable, secondly, there is no need to use buffers, as buffer capacity of avian sperm plasma is tolerant and decreases sharply only being diluted not less than 1:5 or 1:6 [23, 31]. Besides, it is known [47] that avian spermatozoa fecundating ability remains high in the pH range from 6.0 to 8.0 during *in vitro* storage. Almost all commercial media contain sodium glutamate, since it was discovered [6, 32] that glutamic acid



длительного времени при гипотермии, а также при криоконсервировании.

Сперматозоиды в процессе подготовки, охлаждения, замораживания, оттаивания и осеменения подвергаются значительным колебаниям ионной силы и осмотического давления внеклеточного окружения, и их выживаемость в итоге зависит от того, как они способны переносить резко изменяющиеся условия на этапах низкотемпературного консервирования. Осмотичность предложенных для криоконсервирования спермы птиц сред варьирует от 290 до 450 мОсмоль [2, 6, 13, 17, 32, 35–40]. Известно [31, 47], что оплодотворяющая способность спермиев сохраняется *in vitro* в условиях гипотермии в защитных средах с осмотичностью от 250 до 400 мОсмоль ( $\Delta 0,455\text{--}0,736^\circ\text{C}$ ) в течение длительного времени, начинает снижаться после 24 ч хранения. Поэтому при разработке состава среды и оптимального соотношения компонентов не следует выходить за пределы этого диапазона, поскольку осмотичность является одной из самых важных её физико-химических характеристик. При криоконсервировании спермы петуха оптимальное значение осмотичности криозащитных сред находится в области гипертонии по отношению к семенной плазме спермы и равно 395–400 мОсмоль при pH  $6,7 \pm 0,5$ , оптимальное значение ионной силы среды равно  $0,200 \pm 0,025$  моль/л [13].

*Криопротекторы.* Вещества, которые обеспечивают защиту сперматозоидов от действия низких температур ( $-196^\circ\text{C}$ ), следует применять только при криоконсервировании спермы, но не при гипотермическом хранении. Большинство используемых криопротекторов чужеродны и неиндифферентны по отношению к клеткам. Повреждающее действие, которое оказывают криопротекторы еще до замораживания, существенно ограничивает их используемую концентрацию и продуцирует криоповреждения на последующих этапах криоконсервирования, следовательно, снижает их криозащитную активность [14, 28]. Рассчитано, что необходимая концентрация криопротектора для эффективной криозащиты на коллигативной основе должна быть не менее 2,9 М, при замораживании методом витрификации со скоростями охлаждения, легко реализуемыми на практике, – не менее 5 М [13, 28]. Сперматозоиды не выдерживают таких концентраций и гибнут прежде всего от осмотического стресса. Реально применяемые концентрации криопротекторов при криоконсервировании спермы птиц не превышают 0,5–1,0 М [6, 13, 30]. Даже эти концентрации криопротекторов не являются безопасными, могут вызывать структурные и функциональные повреждения сперматозоидов (от 10 до 30%) еще на этапе инкубации до замораживания в зависимости от ее продолжительности и температуры [14, 28].

content was manifold higher in avian sperm than in sperm of other animals. Such high content of glutamine in avian sperm is attributed to its participation in many metabolic processes including energetic cycle. Potassium acetate and citrate, magnesium and zinc chlorides, which proved their efficiency, are also widely used components of media. Addition of the salts indicated to media is sufficient for maintenance of avian spermatozoa viability *in vitro* both for a long-term hypothermic storage and upon cryopreservation.

Spermatozoa in the process of preparing, cooling, freezing, thawing and inseminating are subjected to significant fluctuations of extracellular environment ion force and osmotic pressure, and eventually their survival depends on how well they are able to endure drastically changing conditions at the stages of low temperature preservation. Osmoticity of the media suggested for cryopreservation of avian sperm varies from 290 to 450 mOsmol [2, 6, 13, 17, 32, 35–40]. Fecundating ability of spermatozoa is known [31, 47] to remain unchanged under hypothermic conditions *in vitro* in protective media with the osmoticity from 250 to 400 mOsmol ( $\Delta 0.455\text{--}0.736^\circ\text{C}$ ) for a long time, then it starts decreasing after 24-hour storage. That is why when media compositions and optimal ratios of components being elaborated, one should not fall outside the limits of this diapason, since osmoticity is one of the most important physico-chemical parameters of media. For cryopreservation of the fowl sperm the optimal values of cryoprotective media osmoticity lie in the range of 395–400 mOsmol, which is hypertonic related to sperm plasma, at pH  $6.7 \pm 0.5$ , the optimal value of ion force is  $0.200 \pm 0.025$  mol/l [13].

*Cryoprotectants.* Substances protecting spermatozoa against low temperature ( $-196^\circ\text{C}$ ) should be applied for cryopreservation of sperm, but not for hypothermic storage. Most of cryoprotectants in use are alien and unindifferent for cells. Damaging impact exerted by cryoprotectants already prior to cryopreservation considerably limits their concentrations. It results in cryoinjuries at the following stages of cryopreservation and, consequently reduces their cryoprotective activity [14, 28]. The required concentration of a cryoprotectant was calculated to be not less than 2.9 M for efficient cryoprotection on the colligative basis, and not less than 5 M upon vitrification at cooling rates easily achieved in practice [13, 28]. Spermatozoa do not withstand such concentrations and die first of all because of osmotic stress. Cryoprotectants concentrations applied in reality for cryopreservation of avian sperm do not exceed 0.5–1.0 M [6, 13, 30]. Even these concentrations are not innocuous and can cause structural

На криозащитную активность для спермы птиц испытаны десятки низкомолекулярных веществ, относящихся к различным классам химических соединений – одноатомные и многоатомные спирты, амиды, сульфоксиды, этаноламины, аминокислоты, но широкое применение в птицеводстве получили не более 5 соединений [2, 6, 10, 13, 22, 30, 32, 35–40, 44].

Разработаны и успешно применяются методы замораживания-оттаивания спермы птиц (петухов, гусей и уток) с алифатическими амидами в качестве основного криопротектора, обеспечивающие вывод молодняка на уровне 60–80% от числа заложенных яиц [6, 8–13, 30, 43]. Но при этом после оттаивания спермы приходится увеличивать количество клеток в спермодозе и кратность осеменения. Следует отметить, что до сих пор не удается получить высокие и стабильные результаты при криоконсервировании спермы индюков [46, 47]. Уникальные физико-химические свойства дизамещенных амидов (N,N-диметилформамида, N,N-диметилацетамида), а именно: способность к сильным гидрофильным и одновременно к гидрофобным взаимодействиям, а также высокая проницаемость внутрь клеток обуславливают их криозащитную активность [8, 13]. В большинстве стран с развитым птицеводством для криоконсервирования спермы птиц продолжают применять традиционные криопротекторы: глицерин, ДМСО, этиленгликоль, несмотря на существенные недостатки каждого из них [30, 32, 35–39]. С ДМСО и этиленгликолем не удается получать стабильно высокие результаты, оплодотворяемость яиц спермой, замороженной с этими криопротекторами, не превышает 50–60%. Глицерин оказывает на сперматозоиды птиц контрацептивное действие. Содержание глицерина в криозащитной среде, даже в концентрации 1–3%, значительно снижает оплодотворяющую способность спермиев птиц [30]. Для сохранения высокой оплодотворяющей способности сперматозоидов его содержание в среде должно быть в 10–20 раз ниже, чем применяемое при криоконсервировании (10–15%). К тому же проницаемость глицерина через мембрану сперматозоидов самая низкая по сравнению с другими криопротекторами. Поэтому технология замораживания-оттаивания спермы птиц с глицерином сложная: применяют многоступенчатое введение в суспензию клеток во избежание осмотического стресса, а главное – обязательное его удаление перед осеменением.

Для снижения цитотоксического действия криопротекторов на этапе подготовки спермы к замораживанию лучше вводить их только в растворе сред. Прибавление веществ в чистом виде нежелательно, так как экзотермический эффект их смешивания с водой, составляющей основную часть суспензий клеток, может приводить к локальным перегревам, повышать температуру инкубации и вызывать пов-

and functional injuries of spermatozoa (from 10 to 30%) already at the incubation stage prior to freezing depending on the incubation duration and temperature [14, 28].

Dozens of low-molecular substances belonging to different chemical groups – monoatomic and polyatomic alcohols, amides, sulfoxides, ethanol amines, amino acids were tested for cryoprotective activity on avian sperm, but not more than 5 compounds became widely used in poultry industry [2, 6, 10, 13, 22, 30, 32, 35–40, 44].

Methods for freeze-thawing of avian (fowl, goose, duck) sperm with aliphatic amides as a basic cryoprotectant were developed. They are applied successfully and provide hatching of offspring on the level of 60–80% related to the number of the eggs laid [6, 8–13, 30, 43]. However, the cell number in a sperm dose and number of insemination events within a week have to be increased after thawing sperm. It should be noted that high and stable yield of cryopreservation of the turkey sperm is still beyond attainment [46, 47]. Unique physico-chemical properties of disubstituted amides (N,N-dimethyl formamide, N,N-dimethyl acetamide), namely capacity for strong both hydrophilic and hydrophobic interactions as well as high permeability into cells precondition their cryoprotective activity [8, 13]. In most countries with advanced poultry industry they continue to apply traditional cryoprotectants for cryopreservation of avian sperm: glycerol, Me<sub>2</sub>SO, ethylene glycol despite significant disadvantages of each of them [30, 32, 35–39]. Neither Me<sub>2</sub>SO nor ethylene glycol gives steadily good results, the rate of fertilisation of oviducts with sperm frozen with these cryoprotectants does not exceed 50–60%. Glycerol exerts an contraceptive effect on avian spermatozoa. Glycerol even at the concentration of 1–3% in a cryoprotective medium reduces avian spermatozoa fecundating ability [30]. To maintain spermatozoa fecundating ability high enough glycerol content in medium must be 10–20 times as little as that applied for cryopreservation (10–15%). Besides, glycerol permeability through spermatozoon membrane is the lowest as compared to other cryoprotectants. That is why the technology of avian sperm freeze-thawing with glycerol is complicated, multi-step introduction is used lest osmotic stress occur, and it is imperative that it should be removed before insemination.

It is better to add cryoprotectants only in media solutions to decrease their cytotoxic impacts. It is undesirable to add pure substances, as exothermic effect from their mixing with water, which is the major portion of cell suspensions, can lead to local overheating, increase incubation temperature and cell injuries. It is necessary to make the duration of the contact of cryoprotectants with cells at all of the

реждение клеток. Необходимо сократить до минимума продолжительность контакта криопротекторов с клетками на всех этапах цикла криоконсервирования, включающего подготовку спермы к замораживанию, время от начала кристаллизации внеклеточной среды и до исчезновения жидкой фазы, интервал с момента оттаивания и до введения в репродуктивный тракт самок. Прибавление и инкубацию сперматозоидов с криопротекторами (кроме глицерина) до замораживания следует проводить при околонулевых температурах.

Существует еще один способ снижения цитотоксичности криопротекторов, применяемый для замораживания биологических объектов методом витрификации, а именно: использование смеси разных криопротекторов, эффективность которого доказана [1, 30]. При этом снижается концентрация отдельных криопротекторов в суспензии клеток, следовательно, уменьшается их повреждающее действие. При подборе смеси рекомендуется использовать сочетание веществ с различной структурой и физико-химическими свойствами. Идеальными для этого являются дизамещенные амиды и диолы, так как они относятся к высокогидрофильным веществам, образуют сильные водородные связи с молекулами воды, превосходящими по энергии связь вода-вода. Но при этом амиды являются акцепторами протонов, диолы – донорами, вязкость водных растворов амидов в несколько раз ниже, чем в растворах диолов. В силу этого амиды и диолы по-разному влияют на процесс кристаллизации внеклеточного раствора и предотвращают внутриклеточную кристаллизацию, губительную для акросом сперматозоидов. Амиды и диолы относятся к проникающим криопротекторам, но скорость и механизм их диффузии через мембрану клеток отличаются. Дифильность дизамещенных амидов обеспечивает сверхбыструю проницаемость в клетку. Их транспорт через мембрану осуществляется преимущественно через липидный бислой, и только около 20% проникает через белковые водные каналы (белок полосы 3 и акваглицеропорины). В то время как для диолов доминирующим путем диффузии в клетку является гидрофильный – по белковым водным каналам [5]. Используя смесь амидов и диолов в составе криозащитных сред, можно существенно сократить время насыщения сперматозоидов криопротекторами до замораживания и не удалять их из суспензии перед осеменением.

Непроникающие криопротекторы, как правило водорастворимые полимеры, самостоятельно для криоконсервирования спермы птиц не применяются, используются только в композиции с проникающими. Добавление в криозащитную среду полимера (в частности ПВП с м. м. 12000) оказывает положительное действие, но только в смеси с криопротекторами, водные растворы которых имеют очень

cryopreservation stages, including preparation of sperm for freezing, the time between extracellular medium nucleation and liquid phase disappearance and period from the thawing moment to injection of sperm into female germ tracks, as short as possible. Addition of cryoprotectants (except glycerol) and incubation of spermatozoa with them prior to freezing should be carried out at subzero temperatures.

There is another way of reducing cryoprotectants cytotoxicity applied for freezing bioobjects by vitrification, namely using mixtures of different cryoprotectants. The efficiency of this method was proved [1, 30]. Herewith concentration of each cryoprotectant in cell suspension is decreased, therefore their damaging impacts are weakened. It is recommended to use combinations of substances with different structures and physico-chemical properties. Disubstituted amides and diols are ideal for these purpose, as they are referred to highly hydrophilic substances, form strong hydrogen bonds with water molecules energetically exceeding water-water bonds. At the same time amides are acceptors of protons, diols are donors; amide aqueous solution viscosity is several times as little as diol solution viscosity. By virtue of this amides and diols affect crystallisation of extracellular solution in different manner and prevent intracellular crystallisation lethal for spermatozoa acrosomes. Amides and diols belong to penetrating cryoprotectants, but rates and mechanisms of their diffusion through cell membranes differ. Diphility of disubstituted amides provides their super-rapid penetration into cells. Their transmembrane transport is realised predominantly through lipid bilayer, and only about 20% penetrate through protein water channels (protein of band 3 and aquaglyceroporins), while for diols the dominating way of diffusion is a hydrophilic one, through protein water channels [5]. Using mixtures of amides and diols in cryoprotective media, one can significantly reduce the time of saturation of spermatozoa with cryoprotectants prior to freezing without removing them from suspension before insemination.

Non-penetrating cryoprotectants, which, as a rule, are water-soluble polymers, are not used for cryopreservation of avian sperm alone, but only in combination with penetrating ones. Adding a polymer to a cryoprotective medium (in particular PVP with the molecular weight of 12,000) exerts a positive effect, but only in combinations with cryoprotectants, which aqueous solutions have very low viscosity at subzero temperatures. Usage of polymers allows considerable increasing in extracellular medium viscosity as temperature declines, therefore active influencing “water-ice” phase transition. It is known [13] that water-soluble polymers are good modifiers of crystal formation. Nevertheless their

низкую вязкость при температурах около 0°C. Использование полимеров позволяет существенно повысить вязкость внеклеточной среды при снижении температуры, следовательно, активно влиять на фазовый переход "вода-лед". Известно [13], что водорастворимые полимеры являются хорошими модификаторами кристаллообразования льда. Но положительный эффект полимеров наблюдается только при очень низких концентрациях (0,1–0,3%), что обусловлено, возможно, их дестабилизирующим влиянием на мембраны сперматозоидов при более высоком содержании в среде.

Таким образом, применяемые в настоящее время защитные среды, разработанные на основе вышеописанных принципов их создания, позволяют сохранять сперму птиц *in vitro* при положительных температурах и в глубоком замороженном состоянии без утраты основной функции сперматозоидов – оплодотворяющей способности. Но поиск эффективных криозащитных сред продолжается, так как до сих пор не удается успешно криоконсервировать сперму некоторых видов птиц, например индюков.

### Литература

1. *Бизикина О.В., Линник Т.П.* Криоконсервирование спермы петухов. III. Цитотоксичность и криопротекторная активность смеси N,N-диметилформамида с диолами // Пробл. криобиологии.– 2002.– №1.– С. 39–44.
2. *Борончук Г.В.* Специфика изменений физиолого-биохимических реакций в процессе криоконсервации спермы различных видов животных и разработка методов повышения ее криорезистентности: Автореф. дис. ... д-ра биол.наук.– Кишинев, 1998.– 36 с.
3. *Броерский А.В.* Криоконсервация спермы с/х птицы. (Обзор иностранной литературы) // С.-х. биология.– 1989.– №2.– С. 33–39.
4. *Елифанова О.И., Терских В.В., Полуновский В.А.* Покоящиеся клетки. Свойства и функции в организме.– М.: Наука, 1983.– 176 с.
5. *Коваленко Г.В., Коваленко И.Ф., Линник Т.П.* Проницаемость мембран эритроцитов крысы и кролика для криопротекторов ряда амидов и диолов // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №4.– С. 365–373.
6. *Курбатов А.Д., Платов Е.М., Корбан Н.В.* Криоконсервация спермы с/х животных.– Л.: Агропромиздат, 1988.– 256 с.
7. *Линник Т.П., Терещенко А.В., Артеменко А.Б.* Влияние белковых добавок к криозащитной среде на сохранность спермиев петухов при криоконсервировании // Пробл. криобиологии.– 1996.– №2.– С. 35–39.
8. *Линник Т.П.* Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. I. Физико-химические свойства соединений ряда амидов // Пробл. криобиологии.– 1998.– №3.– С. 21–28.
9. *Линник Т.П.* Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. II. Криозащитные свойства соединений ряда амидов // Пробл. криобиологии.– 1999.– №2.– С. 22–32.
10. *Линник Т.П., Грищенко В.И., Артеменко А.В., Терещенко А.В.* Влияние осмотичности криозащитной среды на сохранность спермиев петухов при криоконсервировании // Проблемы криобиологии.– 2000.– №2.– С. 86–93.

positive effects are only observed at very low concentrations, which is likely to be attributed to their destabilising influence on spermatozoid membranes at higher concentrations in media.

Thus applied at present cryoprotective media developed on the ground of the principles above-described allow *in vitro* storage of avian sperm at positive temperatures and in deeply-frozen state without loss in the main function of spermatozoa: fecundating ability. But search for efficient cryoprotective media continues, since successful cryopreservation of sperm for some avian species (*e.g.* turkey) still poses a challenge.

### Литература

1. *Bizikina O.V., Linnik T.P.* Fowl sperm cryopreservation. III Cytotoxicity and cryoprotective activity of N,N-dimethyl formamide with diol mixtures // Problems of Cryobiology.– 2002.– N1.– P. 39–44.
2. *Boronchuk G.V.* Specifics of changes in physiology-biochemical reactions in the process of cryopreservation of different animals species' sperm and elaboration of methods for enhancing its cryoresistance: Author's abstract of the thesis of Doctor of Biological Sciences.– Kishinyov, 1998.– 36 p.
3. *Broyersky A.V.* Cryopreservation of poultry sperm (Review of foreign literature) // Selskokhozyaystvennaya Biologiya.– 1989.– N2.– P. 33–39.
4. *Yepifanova O.I., Terskikh V.V., Polunovsky V.A.* Quiescent cells. Properties and functions in the organism.– Moscow: Nauka, 1983.– 176 p.
5. *Kovalenko G.V., Kovalenko I.F., Linnik T.P.* Membrane permeability of rat's and rabbit's erythrocytes for cryoprotectants of amide and diol series // Problems of Cryobiology.– 2007.– Vol. 17, N4.– P. 365–373.
6. *Kurbatov A.D., Platov Ye. M., Korban N.V.* Cryopreservation of farmery animals' sperm.– Leningrad: Agropromizdat, 1988.– 256 p.
7. *Linnik T.P., Tereschenko A.V., Artemenko A.B.* Effect of protein additives in cryoprotective medium on the integrity of rooster spermatozoa at cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1996.– N2. - P. 35-39.
8. *Linnik T.P.* Amides of aliphatic acids are effective cryoprotectants. I. Physical-chemical properties of the compounds out of the amide series // Problems of Cryobiology.– 1998.– N3.– P. 21–28.
9. *Linnik T.P.* Amides of aliphatic acids are efficient cryoprotectants. II. Cryoprotective properties of compounds of amide series compounds // Problems of Cryobiology.– 1999.– N2.– P. 22–32.
10. *Linnik T.P., Grischenko V.I., Artemenko A.B. et al.* Effect of osmoticity of cryoprotective medium on survival of cock sperm during cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 2000.– N2.– P. 86–93.
11. *Linnik T.P., Bizikina O.V.* Fowl sperm cryopreservation. I. Cytotoxicity of diols and amides // Problems of Cryobiology.– 2001.– N2.– P. 72–79.
12. *Linnik T.P., Bizikina O.V.* Fowl sperm cryopreservation. II. Amide and diol cryoprotective activity // Problems of Cryobiology.– 2001.– N4.– P. 43–51.
13. *Linnik T.P.* Physical and chemical factors of cryodamage and cryoprotection of fowl spermatozoa in cycle of low temperature preservation: Author's abstract of the thesis of Doctor of Biological Sciences.– Kharkiv, 2003.– 36 p.

11. *Линник Т.П., Бизикина О.В.* Криоконсервирование спермы петухов. I. Цитотоксичность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №2.– С. 72–79.
12. *Линник Т.П., Бизикина О.В.* Криоконсервирование спермы петухов. II. Криозащитная активность диолов и амидов // Пробл. криобиологии.– 2001.– №4.– С. 43–51.
13. *Ліннік Т.П.* Фізико-хімічні фактори крипошкоджень і криозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис. ... докт. біол. наук.– Харків, 2003.– 36 с.
14. *Линник Т.П., Бизикина О.В.* Цитотоксичность и криопротекторная активность диолов, амидов и их смесей при криоконсервировании спермы петухов // Биофизика живой клетки.– 2003.– Т. 7.– С. 42–49.
15. *Максудов Г.Ю., Артюшкова В.А.* Физиологическая консервация спермы позвоночных.– Пушино: ОНТИ ПНЦ АН СССР, 1989.– 73 с.
16. *Мелехов Е.И.* О возможном принципе регуляции повреждений и защитной реакции клетки // Журнал общей биологии.– 1983.– Т. XLIV, №3.– С. 386–397.
17. *Милованов В.К.* Биология воспроизводства и искусственного осеменения животных.– М.: Сельхозиздат, 1962.– 696 с.
18. *Наук В.А.* Структура и функция спермиев с/х животных при криоконсервировании.– Кишинев: Штиинца, 1991.– 199 с.
19. *Наук В.А., Борончук Г.В., Потт Н.Н.* Длительное сохранение спермы сельскохозяйственных и диких животных // Консервация генетических ресурсов.– Пушино, 1991.– С. 35–81.
20. *Осташко Ф.И.* Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей.– Киев: Урожай.– 1978.– 225 с.
21. *Райцина С.С.* Сперматогенез и структурные основы его регуляции.– М.: Наука, 1985.– 206 с.
22. *Сахацкий Н.И., Терещенко А.В., Артеменко А.Б. и др.* Разработка защитной среды для консервации спермы петухов // Научно-техн. бюл. УкрНИИП, Харьков.– 1988.– Вып. 24.– С. 29–32.
23. *Терещенко А.В.* Сохранность сперматозоидов петухов в зависимости от условий криоконсервирования: Автореф. дис. ... канд.биол.наук.– Харьков, 1988.– 16 с.
24. *Шергин Н.П.* Биохимия сперматозоидов сельскохозяйственных животных.– М.: Колос, 1967.– 232 с.
25. *Ashizawa K., Okauchi K.* Stimulation of sperm motility and oxygen consumption of fowl spermatozoa by a low molecular weight fraction of seminal plasma // J. Reprod. Fertil.– 1984.– Vol. 71, N3.– P. 593–598.
26. *Bakst M.R.* Anatomical basis of sperm-storage in the avian oviduct // Scanning Microsc.– 1987.– Vol. 1, N4.– P. 1257–1266.
27. *Bellagamba F., Cerolini S., Cavalchini L.G.* Cryopreservation of poultry semen: a review // World's Poultry Sc. J.– 1993.– Vol. 49, N2.– P. 157–166.
28. *Fahy G. M., Lilley T. H., Lindsell H. et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N3.– P. 247–268.
29. *Fujihara N., Koga O.* Factor(s) influencing the survival of cock spermatozoa *in vitro* // Can. J. Anim. Sc.– 1982.– Vol. 62.– P. 951–953.
30. *Hammerseddt, R.H., Graham, J.K.* Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N1.– P. 26–38.
31. *Latif A., Ijaz A., Aleem M., Mahmud A.* Effect of osmotic pressure and pH on the short-term storage and fertility of broiler breeder sperm // Pakistan Vet. J.– 2005.– Vol. 25, N4.– P. 179–182.
32. *Lake P.E.* The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm // Poultry Sc.– 1986.– Vol. 65, N1.– P. 1–15.
33. *Linnik T.P., Bizikina O.V.* Cytotoxicity and cryoprotective activity of diols, amides and their mixtures upon cryopreservation of fowl sperm // Biofizika Zhivoy Kletki.– 2003.– Vol. 7.– P. 42–49.
34. *Maksudov G. Yu. Artyushkova V.A.* Physiological preservation of vertebrates' sperm.– Pushchino: Pushchino Scientific Centre of Academy of Sciences of USSR, 1989.– 73 p.
35. *Melekhov Ye.I.* A possible principle for regulation of cell injuries and protective reactions // Zhurnal Obschey Biologii.– 1983.– Vol. XLIV, N3.– P. 386–397.
36. *Milovanov V.K.* Biology of reproduction and artificial insemination of animals.– Moscow: Selkhozizdat, 1962.– 696 p.
37. *Nauk V.A.* Structure and functions of farmery animals spermatozoa upon cryopreservation.– Kishinyov: Shtiintsa, 1991.– 199 p.
38. *Nauk V.A., Boronchuk G.V., Rott N.N.* Long-term storage of farmery and wild animals' sperm // Preservation of Genetic Resources.– Pushchino, 1991.– P. 35–81.
39. *Ostashko F.I.* Deep freezing and long-term storage of breeders' sperm.– Kiev: Urozhay, 1978.– 225 p.
40. *Raytsina S.S.* Spermatogenesis and structural principles of its regulation.– Moscow: Nauka, 1985.– 206 p.
41. *Sakhatsky N.I., Tereschenko A.V., Artemenko A.B. et al.* Elaboration of a protective medium for preservation of roosters' sperm // Scientific and Technical Bulletin of Ukrainian Scientific Research Institute for Ecological Problems, Kharkov.– 1988.– Issue 24.– P. 29–32.
42. *Tereschenko A.V.* Fowl spermatozoa integrity depending on cryopreservation conditions: Author's abstract of the thesis of Candidate of Biological Sciences.– Kharkov, 1988.– 16 p.
43. *Shergin N.P.* Biochemistry of farmery animals' spermatozoa.– Moscow: Kolos, 1967.– 232 p.
44. *Ashizawa K., Okauchi K.* Stimulation of sperm motility and oxygen consumption of fowl spermatozoa by a low molecular weight fraction of seminal plasma // J. Reprod. Fertil.– 1984.– Vol. 71, N3.– P. 593–598.
45. *Bakst M.R.* Anatomical basis of sperm-storage in the avian oviduct // Scanning Microsc.– 1987.– Vol. 1, N4.– P. 1257–1266.
46. *Bellagamba F., Cerolini S., Cavalchini L.G.* Cryopreservation of poultry semen: a review // World's Poultry Sc. J.– 1993.– Vol. 49, N2.– P. 157–166.
47. *Fahy G. M., Lilley T. H., Lindsell H. et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N3.– P. 247–268.
48. *Fujihara N., Koga O.* Factor(s) influencing the survival of cock spermatozoa *in vitro* // Can. J. Anim. Sc.– 1982.– Vol. 62.– P. 951–953.
49. *Hammerseddt, R.H., Graham, J.K.* Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol // Cryobiology.– 1992.– Vol. 29, N1.– P. 26–38.
50. *Latif A., Ijaz A., Aleem M., Mahmud A.* Effect of osmotic pressure and pH on the short-term storage and fertility of broiler breeder sperm // Pakistan Vet. J.– 2005.– Vol. 25, N4.– P. 179–182.
51. *Lake P.E.* The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm // Poultry Sc.– 1986.– Vol. 65, N1.– P. 1–15.

33. *Lamirande E., Jiang H., Zini A. et al.* Reactive oxygen and sperm physiology // *Rev. Reprod.*– 1997.– Vol. 2, N1.– P. 48–54.
34. *Leibo S.P., Bradley L.* Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa // *The male gamete: from basic science to clinical applications* / Ed. by C. Gagnon.– St. Louis: Cache River Press, 1999.– P. 502–516.
35. *Sexton T. J.* A new poultry semen extender. 1. Effect of extension on fertility of chicken semen // *Poultry Sc.*– 1977.– Vol. 56, N6.– P. 1443–1446.
36. *Sexton T. J.* A new poultry semen extender. 3. Effect of storage conditions on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C // *Poultry Sc.*– 1978.– Vol. 57, N1.– P. 285–289.
37. *Sexton T.J.* A new poultry semen extender.5. Relationship of diluent components to cytotoxic effects of dimethylsulfoxide on turkey spermatozoa // *Poultry Sc.*– 1980.– Vol. 59, N5.– P. 1142–1144.
38. *Sexton T. J., Fewlass T.A.* A new poultry semen extender. 2. Effects of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C // *Poultry Sc.*– 1978.– Vol. 57, N1.– P. 277–284.
39. *Sexton T. J., Jacobs L.A., McDaniel G.R.* A new poultry semen extender. 4. Effects of antibacterial in the control of bacterial contamination in chicken semen // *Poultry Sc.*– 1980.– Vol. 59, N1.– P. 274–281.
40. *Schramm G.P.* Ein neues Medium zur Verdünnung und Flüssigkonservierung von Hahnensperma // *Monatsh. Veterinärmed.*– 1982.– Vol. 37, N3.– S. 900–902.
41. *Storey B.T., Noiles E.E., Thompson K.A.* Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation // *Cryobiology.*– 1998.– Vol. 37, N1.– P. 46–58.
42. *Sztejn J.M., Noble K., Farley J.S., Mobraaten, L.E.* Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation // *Cryobiology.*– 2001.– Vol. 41, N1.– P. 28–39.
43. *Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B.* Cryopreservation of poultry semen // *Brit. Poultry Sc.*– 1995.– Vol. 36, N1.– P. 805–811.
44. *Watanabe M., Terada T.* Fertility of frozen fowl semen stored for long term (9years) // *Journal of the Faculty of Applied Biological Science Hiroshima University Fukuyama, Japan.*– 1980.– Vol. 19, N2.– P. 155–159.
45. *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, N2.– P. 871–891.
46. *Watson P.F., Holt W.V.* Cryobanking the genetic resource: Wildlife conservation for the future?– London, New York, 2001.– 423 p.
47. *Wishart G.J.* The cryopreservation of germplasm in domestic and non-domestic birds // *Cryobanking the genetic resource: Wildlife conservation for the future?* / Ed. by P.F. Watson, W.V. Holt.– London, New York, 2001.– P. 181–200.
48. *Woelders H., Matthijs A., Engel B.* Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing // *Cryobiology.*– 1997.– Vol. 35, N1.– P. 93–105.
37. *Sexton T.J.* A new poultry semen extender.5. Relationship of diluent components to cytotoxic effects of dimethylsulfoxide on turkey spermatozoa // *Poultry Sc.*– 1980.– Vol. 59, N5.– P. 1142–1144.
38. *Sexton T. J., Fewlass T.A.* A new poultry semen extender. 2. Effects of the diluent components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C // *Poultry Sc.*– 1978.– Vol. 57, N1.– P. 277–284.
39. *Sexton T. J., Jacobs L.A., McDaniel G.R.* A new poultry semen extender. 4. Effects of antibacterial in the control of bacterial contamination in chicken semen // *Poultry Sc.*– 1980.– Vol. 59, N1.– P. 274–281.
40. *Schramm G.P.* Ein neues Medium zur Verdünnung und Flüssigkonservierung von Hahnensperma // *Monatsh. Veterinärmed.*– 1982.– Vol. 37, N3.– S. 900–902.
41. *Storey B.T., Noiles E.E., Thompson K.A.* Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation // *Cryobiology.*– 1998.– Vol. 37, N1.– P. 46–58.
42. *Sztejn J.M., Noble K., Farley J.S., Mobraaten, L.E.* Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation // *Cryobiology.*– 2001.– Vol. 41, N1.– P. 28–39.
43. *Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B.* Cryopreservation of poultry semen // *Brit. Poultry Sc.*– 1995.– Vol. 36, N1.– P. 805–811.
44. *Watanabe M., Terada T.* Fertility of frozen fowl semen stored for long term (9years) // *Journal of the Faculty of Applied Biological Science Hiroshima University Fukuyama, Japan.*– 1980.– Vol. 19, N2.– P. 155–159.
45. *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, N2.– P. 871–891.
46. *Watson P.F., Holt W.V.* Cryobanking the genetic resource: Wildlife conservation for the future?– London, New York, 2001.– 423 p.
47. *Wishart G.J.* The cryopreservation of germplasm in domestic and non-domestic birds // *Cryobanking the genetic resource: Wildlife conservation for the future?* / Ed. by P.F. Watson, W.V. Holt.– London, New York, 2001.– P. 181–200.
48. *Woelders H., Matthijs A., Engel B.* Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing // *Cryobiology.*– 1997.– Vol. 35, N1.– P. 93–105.

*Accepted in 06.04.2010*

*Поступила 06.04.2010  
Рецензент Л. Ф. Розанов*