

## Влияние глицерина, этиленгликоля на морфофункциональные характеристики сперматозоидов собак на разных этапах криоконсервирования

М.И. ЕГОРОВ, Е.Ф. КОПЕЙКА, Т.П. ЛИННИК, И. Н. КУЧКОВ  
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Glycerol, Ethylene Glycol on Morphofunctional Characteristics of Dogs' Spermatozoa at Different Cryopreservation Stages

M.I. EGOROV, E.F. KOPEIKA, T.P. LINNIK, I.N. KUCHKOV  
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследовали влияние глицерина (ГЛ) и этиленгликоля (ЭГ) на выживаемость сперматозоидов собак (СС) после замораживания-оттаивания в зависимости от концентрации криопротекторов, режимов охлаждения и времени эквilibрации, а также изменение клеточного объема СС после введения в суспензию растворов криопротекторов турбидиметрическим методом. Выявлено, что наилучшая подвижность СС наблюдалась после криоконсервирования под защитой ЭГ в конечной 7%-й концентрации при замораживании на первом этапе со скоростью 3°C/мин без предварительной эквilibрации. Показано, что 7%-й ЭГ вызывает значительно меньшие изменения клеточного объема в сравнении с глицерином.

**Ключевые слова:** сперматозоиды, подвижность, эквilibрация, криоконсервирование, глицерин, этиленгликоль.

Досліджували вплив глицерину та етиленгліколю на рухливість сперматозоїдів собак (СС) після заморожування-відтавання в залежності від їхньої концентрації, режимів охолодження і часу еквilibрації, а також якісну зміну клітинного об'єму СС після введення в суспензію розчинів криопротекторів за допомогою турбідиметричного методу. Виявлено, що найкраща рухливість СС спостерігалася після криоконсервування під захистом етиленгліколю в 7%-й кінцевій концентрації при заморожуванні на першому етапі зі швидкістю 3°C/хв без попередньої еквilibрації. Показано, що 7%-й етиленгліколь викликає значно менші зміни клітинного об'єму в порівнянні з глицерином тієї ж концентрації.

**Ключові слова:** сперматозоїди, рухливість, еквilibрація, криоконсервування, глицерин, етиленгліколь.

There has been studied the effect of glycerol and ethylene glycol (EG) on survival of dogs' spermatozoa (DS) after freeze-thawing depending on the concentration of cryoprotectants, cooling regimens and equilibration time, as well as the change in DS cell volume after the cryoprotectants being introduced into suspension by means of turbidimetric method. The highest motility of DS was revealed after cryopreservation under EG protection with final concentration of 7% when being frozen at the first stage with the rate of 3°C/min with no preliminary equilibration. It has been shown that 7% EG causes quite less alterations in cell volume if compared to glycerol.

**Key-words:** spermatozoa, motility, equilibration, cryopreservation, glycerol, ethylene glycol.

Возросший интерес к проблеме криоконсервирования спермы собак обусловлен, во-первых, необходимостью сохранить генетический материал исчезающих пород собак; во-вторых, криоконсервирование половых клеток позволяет эффективно обмениваться генофондом ценных производителей; в-третьих, по данным, полученным за последние 5 лет, возникла целесообразность накопления спермы собак в низкотемпературных банках как модельного объекта для изучения наследственных заболеваний, которые идентичны заболеваниям человека [13].

Данные литературы свидетельствуют о том, что задача криоконсервирования СС до настоящего времени остается нерешенной [3].

Успех низкотемпературного консервирования практически всех биологических объектов, включая и сперму, зависит от многих факторов, к важнейшим из которых относится правильный

Growing interest to the problem of dogs' sperm cryopreservation is stipulated firstly by the necessity to preserve genetic material of endangered dogs' species, secondly, cryopreservation of sexual cells allows an effective exchange of gene fond of valuable sires; thirdly according to the data been obtained within recent 5 years, there has been arisen the expediency of accumulating the dog's sperm in low temperature banks as model objects to study inherent diseases, which are identical to human ones [13].

Literature data testify to the fact that the task of DS cryopreservation up to now has remained unsolved [3].

The success of low-temperature preservation of practically all biological objects, including sperm, depends on many factors, to the most important of them are referred as follows: correct choice of cryoprotectant and its concentration, composition of cryoprotective medium, cooling and freezing regimens.

**Адрес для корреспонденции:** Линник Т.П. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-20-67, факс: +38 (057) 772-00-84, 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 57 772 2067, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

выбор криопротектора и его концентрации, состава криозащитной среды, режимов охлаждения и замораживания.

По данным [3-5, 7-15] для криоконсервирования спермы собак в качестве криопротекторов опробованы 3 соединения: глицерин, этиленгликоль и диметилсульфоксид.

Широко используемый для замораживания спермы собак ГЛ позволяет получить после оттаивания жизнеспособные клетки, но подвижность сперматозоидов по данным [4] варьирует в диапазоне от 15 до 60%. Возможной причиной этого является возникающий под воздействием ГЛ осмотический шок [13]. Однако данная гипотеза требует дальнейшего изучения. Если она получит подтверждение, возникнет необходимость поэтапного введения и выведения ГЛ, что значительно усложняет методику криоконсервирования. К тому же в [5] отмечается, что ГЛ оказывает негативное воздействие на оплодотворяющую способность СС.

По мнению некоторых авторов [13], ЭГ более перспективен по сравнению с ГЛ, так как не оказывает выраженного цитотоксического действия на СС. В работе [5] показано, что подвижность клеток после прибавления ЭГ к суспензии на этапе подготовки к замораживанию не снижается по сравнению с контролем, в то время как с ГЛ падает на 5-10%. По данным [12] количество сперматозоидов с морфологическими повреждениями в присутствии ГЛ достигает 35 % еще во время экспозиции до замораживания, а с ЭГ не превышает 25%.

Результаты, полученные с ЭГ после замораживания, достаточно противоречивы. Одни авторы [12] отмечают, что подвижность СС после замораживания-оттаивания с ЭГ при концентрации 0,5 М сохраняется на уровне 60% (при этом с ГЛ не более 30% подвижных клеток), другие [5] считают, что ГЛ проявляет более эффективную криозащиту по сравнению с ЭГ, но сохранность клеток после оттаивания находится на очень низком уровне (не более 25 % подвижных клеток). Значительные расхождения в полученных результатах, вероятно, объясняются использованием различных режимов охлаждения и замораживания, а также низким качеством исходной спермы.

Цель данной работы – сравнить влияние ГЛ и ЭГ на выживаемость СС до и после замораживания по 2-м режимам охлаждения в зависимости от концентрации криопротекторов в суспензии и времени экспозиции клеток с ними. Предпринята попытка оценить изменение клеточного объема после введения криопротекторов в суспензию для подтверждения гипотезы о влиянии осмотического шока на СС.

According to the literature data [3-5, 7-15] for cryopreservation of canine sperm as cryoprotectants there were tested 3 compounds, glycerol, ethylene glycol and dimethyl sulfoxide.

Widely used for freezing of canine sperm glycerol allows the obtaining of viable cells after thawing, but spermatozoa motility according to the data [4] varies within the range from 15 to 60%. This is probably due to appearing under the effect of glycerol osmotic shock [13]. However this hypothesis requires further studying. If it is confirmed there will appear the necessity of step-wise introduction and removal of glycerol, that makes cryopreservation methods quite complicated. Moreover in the paper [5] there was noted that glycerol negatively affected fertilizing ability of DS.

On some authors' opinion [13] EG is more promising in comparison with glycerol, because it does not cause marked cytotoxic effect on DS. In the paper [5] there was shown that the motility of cells after adding EG to suspension at the stage of preparing to freezing did not reduce if compared with the control, whilst with glycerol it fell by 5-10%. According to the data [12] the number of morphologically damaged spermatozoa in the presence of glycerol reaches 35% even during exposure before freezing and with EG does not exceed 25%.

Results obtained with EG after freezing are quite contradictory. Some authors [12] believe that the motility of DS after freeze-thawing with 0.5 M EG is kept at the level of 60% (meanwhile with glycerol not more than 30% of motile cells), other authors [5] believe that glycerol has more effective cryoprotective properties, but cell survival after thawing is on very low level (not more than 25% motile cells). Considerable variations in the obtained results are likely explained by the usage of different regimens of cooling and freezing as well as by the low quality of initial semen.

The aim of the work is to compare the effect of glycerol and EG on the survival of DS before and after freezing according to two cooling regimens depending on the concentration of cryoprotectants in suspension and the exposure time of cells with them. There was made an attempt to assess the change in cell volume after introduction of cryoprotectants into suspension to confirm the hypothesis about the effect of osmotic shock on DS.

### Materials and methods

Sperm for research was obtained from 3 clinically healthy dog males at room temperature (20°C) by means of massage of prostate in the presence of estrous female. Sperm ejaculate of the dogs consists of 3 fractions, separately secreting with a short time interval. This allows during an experiment to receive

## Материалы и методы

Сперма для исследований была получена от 3-х клинически здоровых кобелей при комнатной температуре (20°C) с помощью массажа предстательной железы в присутствии эстральной самки. Эякулят спермы собак состоит из трех фракций, выделяющихся отдельно с небольшим временным интервалом. Это дает возможность в эксперименте получить все фракции эякулята отдельно. Данная процедура позволяет избежать преждевременной активации СС под воздействием 3-й фракции, представляющей собой секрет предстательной железы [3].

Для опытов были использованы 7 эякулятов, состоящих из первой и второй фракций свежеполученной спермы. Третья фракция получена отдельно. Концентрацию сперматозоидов в эякулятах оценивали фотометрическим методом. Процент подвижных сперматозоидов определяли визуально под микроскопом “Биолар” (×250).

Для определения переживаемости клеток после оттаивания сперматозоиды в криозащитных средах были помещены в термостат при температуре 38°C. Оценка подвижности сперматозоидов производилась через каждые 10 мин.

В первой серии экспериментов полученный материал (первая и вторая фракции спермы) разделили на 4 аликвоты по 1 мл, их отцентрифугировали в пластиковых ампулах объемом 1 мл при 400 г в течение 3 мин. Надосадок удалили. Осадок сперматозоидов ресуспендировали средой, содержащей 0,2 М Трис-буфера (“Trizma pH 7,2”, “Sigma”), 0,05 М фруктозы, 20% (v/v) желтка куриных яиц в соотношении 1:1. Осмотичность среды 320 мОсмоль, pH 7,2.

После охлаждения суспензии сперматозоидов в течение 10 мин до температуры 4°C в аликвоты была добавлена в соотношении 1:1 вышеуказанная среда с ГЛ или ЭГ, также предварительно охлажденная до 4°C. Были исследованы конечные концентрации ГЛ и ЭГ в суспензии сперматозоидов 3 и 7%. Часть образцов замораживали без эквilibрации сперматозоидов с криопротекторами, другую – выдерживали в течение 1 ч при температуре 4°C и только затем замораживали.

Для замораживания спермы использовали пластиковые соломинки типа “СЖ” объемом 0,33 см<sup>3</sup>. Подготовленные образцы сперматозоидов были расфасованы в соломинки по 200 мкл, одну половину соломинок помещали в теплоизолирующую рубашку, вторая оставалась открытой. Контроль снижения температуры проводили при помощи медь-константановой термопары и по полученной термограмме определяли скорость охлаждения.

all the fractions of ejaculate separately. This procedure permits to avoid untimely activation of DS under the effect of the third fraction, which is prostate secretion [3].

For the experiments there were used 7 ejaculates, consisting of the first and second fractions of freshly isolated sperm. The third fraction is obtained separately. The spermatozoa concentration in ejaculates was assessed photometrically. The percentage of motile spermatozoa was visually determined under “Biolar” microscope (×250 magnification).

To determine the cell survival after thawing the spermatozoa in cryoprotective media were placed into thermostat at 38°C. The estimation of spermatozoa motility was made in every 10 min.

In the first session of experiments the obtained material (first and second sperm fractions) were divided into 4 aliquots by 1 ml, they were centrifuged in 1 ml plastic ampoules at 400g for 3 min. Supernatant was removed. Spermatozoa sediment was re-suspended with the medium, containing 0.2M tris-buffer (“Trizma pH 7.2”, “Sigma”), 0.05M fructose, 20% (v/v) chicken’s egg yolk in the 1:1 ratio. Medium osmolality was 320 mOsm, pH 7.2.

After cooling the suspension of spermatozoa for 10 min down to the temperature of 4°C into aliquots there was added under the 1:1 ratio the mentioned above medium with glycerol of EG, also preliminarily cooled down to 4°C. There were studied final concentrations of glycerol and EG in the suspension of spermatozoa of 3 and 7%. The part of samples were frozen without equilibration of spermatozoa with cryoprotectants, another part was maintained for 1 hour at 4°C and only afterwards was frozen.

To freeze the sperm there were used 0.33 cm<sup>3</sup> plastic straws. Prepared samples of spermatozoa were packed into the straws by 200 µl, one part of the straws was removed into heat-insulating jacket, another one remained open. The control of temperature reduction was made using copper-constantan thermocouple and on the thermogram we obtained cooling rate was found.

Freezing of DS with glycerol and EG according to literature data [3-5, 7-15] in the majority of the methods is performed as two stages: at the first stage from 5°C to –15°C with cooling rate of 2-10°C/min, at the second stage from –15° down to –70°C with cooling rate of 10-20°C/min.

Taking into account mentioned above freezing of DS in plastic straws was performed by means of laboratory device according to two regimens: the first one was from 5° to –15°C with cooling rate of 3°C/min, from –15° down to –100°C with the rate with the rate of 10°C/min and later immersion into liquid nitrogen;

Замораживание СС с ГЛ и ЭГ по литературным данным [3-5, 7-15] в большинстве методов производится в два этапа: на первом этапе – от 5 до  $-15^{\circ}\text{C}$  со скоростью охлаждения  $2-10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , на втором этапе от  $-15$  до  $-70^{\circ}\text{C}$  со скоростью охлаждения  $10-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

Учитывая вышесказанное, замораживание СС в пластиковых соломинках было проведено на лабораторной установке по двум режимам: первый – от 5 до  $-15^{\circ}\text{C}$  со скоростью охлаждения  $3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , от  $-15$  до  $-100^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , далее погружение в жидкий азот; второй – от 5 до  $-15^{\circ}\text{C}$  со скоростью охлаждения  $6^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , от  $-15$  до  $-100^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , далее погружение в жидкий азот.

Оттаивание производили на водяной бане при температуре  $40^{\circ}\text{C}$  до появления жидкой фазы (не более 3-5 с).

Для статистической обработки полученных результатов использовали метод Стьюдента.

Во второй серии экспериментов оценивали динамику изменения объема СС после введения в суспензию растворов криопротекторов. Использовали ГЛ и ЭГ в 7%-й концентрации. Исследования проводили турбидиметрическим методом, основанном на том, что при прохождении падающего света через суспензию, содержащую клетки, поглощение практически отсутствует и ослабление интенсивности падающего света равно полной интенсивности света, рассеянного клетками во всех направлениях. Описание метода и его теоретическое обоснование приведены в [2]. Учитывая, что зависимость объема клеток от поглощения света является нелинейной функцией, а интенсивность прошедшего света значительно зависит от соотношения размера клеток и длины волны падающего света, говорить об измерении абсолютных значений объемов клеток, исходя из наших данных, невозможно. Однако качественно описать динамику изменения объема клеток можно. При проведении эксперимента оценивали фотоэлектродвижущую силу во времени.

### Результаты и обсуждение

Анализ результатов показывает, что еще до замораживания после эквilibрации сперматозоидов с криопротекторами в течение 1 ч наблюдалось существенное снижение подвижности СС (рис. 1) в присутствии ЭГ и ГЛ независимо от их концентрации. Но следует отметить, что ЭГ оказывал меньшее цитотоксическое действие на СС как через 2-5 мин после прибавления криопротекторов, так и после 1 ч эквilibрации клеток с ним. Полученные результаты о более низкой цитотоксичности ЭГ в сравнении с ГЛ согласуются с данными [12, 13]. Кроме этого, выявлено, что при увеличе-

the second one from  $5^{\circ}\text{C}$  down to  $-15^{\circ}\text{C}$  with cooling rate of  $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . From  $-15^{\circ}\text{C}$  down to  $-100^{\circ}\text{C}$  with the rate of  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and then immersion into liquid nitrogen.

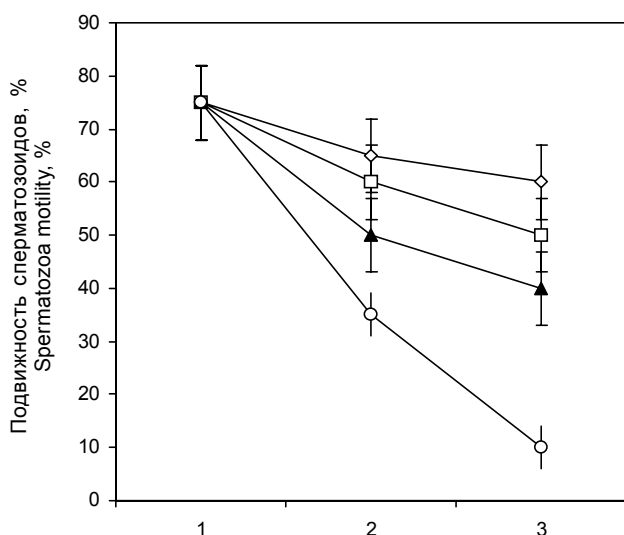
Thawing was conducted in water bath at  $40^{\circ}\text{C}$  up to appearance of liquid phase (not more than 3-5 seconds).

For statistical processing of the obtained results the Student's test was used.

In the second session of experiments there was estimated the dynamics of volume changes for DS after introduction into suspension of cryoprotectants' solutions. There were used glycerol and EG under 7% concentration. The studies were performed with turbidimetric method, based on the passing of falling light via the suspension, containing the cells, the absorption is practically absent and weakening of intensity of falling light is equal to a total intensity of light, scattered by cells in all directions. The method description and its theoretical substantiation are reported elsewhere [2]. Taking into account that the dependence of cell volume on light adsorption is non-linear function and the intensity of passed light significantly depends on the ratio of cell size and wave length of falling light, it is impossible to speak about measuring the absolute values of cell volumes, proceeding from our data. However it is possible to describe qualitatively the dynamics of cell volume change. When performing the experiment there was evaluated photoelectromotive force in time.

### Results and discussion

Analysis of the results shows that even before freezing after equilibration of spermatozoa with cryoprotectants for 1 hour there was observed considerable reduction of DS motility (Fig. 1) in the presence of EG and glycerol not depending on their concentration. But it should be noted that EG caused less cytotoxic effect on DS both in 2-5 min after cryoprotectant adding and in an hour of cell equilibration with it. Obtained results about lower cytotoxicity of EG in comparison with glycerol are in accordance with the data [12, 13]. In addition, it has been revealed that with an increase in glycerol concentration from 3 to 7% the motility of spermatozoa reduces much bigger than when glycerol concentration is getting higher. This may testify to glycerol stronger osmotic effect on spermatozoa, that causes the death of cells. The correctness of such a conclusion is indirectly confirmed by the dynamics of volume change for spermatozoa under the effect of EG and glycerol. As Figure 2 shows even during the first seconds of cells' contact with cryoprotectans their strong shrinking takes place. Afterwards gradual rise in cell volume is observed up to the levels exceeding initial one. These cell changes are more manifested in the solution of glycerol than in



**Рис.1.** Переживаемость СС в присутствии криопротекторов ГЛ и ЭГ в 3- и 7%-й концентрации до замораживания: 1 – подвижность без криопротектора; 2 – подвижность через 2-5 мин после введения криопротекторов; 3 – подвижность через 60 мин после введения криопротекторов. ◇ – 3%-й ЭГ; □ – 7%-й ЭГ; ▲ – 3%-й ГЛ; ○ – 7%-й ГЛ.

**Fig. 1.** Survival of DS in the presence of glycerol and EG cryoprotectants under concentration of 2 and 7% before freezing: 1- motility without cryoprotectant; 2 – that in 2-5 min after cryoprotectants' introduction; 3 – that in 60 min after cryoprotectants' introduction. ◇ – 3% EG; □ – 7% EG; ▲ – 3% glycerol; ○ – 7% glycerol;

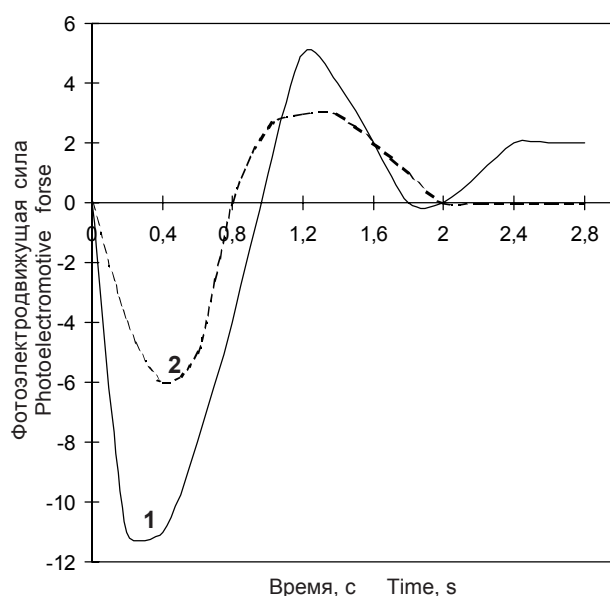
нии концентрации ГЛ с 3 до 7%-й подвижность сперматозоидов снижается значительно больше, чем при повышении концентрации ЭГ. Это может свидетельствовать о более сильном осмотическом воздействии ГЛ на сперматозоиды, которое и вызывает гибель клеток. Правильность подобного вывода косвенно подтверждается динамикой изменения объема сперматозоидов под воздействием ЭГ и ГЛ. Как видно из рис. 2, уже в первые секунды контакта клеток с криопротекторами происходит сильное их сжатие. Затем наблюдается постепенное увеличение объема клеток до уровня, превышающего исходный. Эти изменения клеток более выражены в растворе с ГЛ, чем с ЭГ. На сперматозоидах человека было показано [6], что коэффициент проницаемости ЭГ через их мембраны в 3 раза выше, чем у ГЛ ( $7,9 \times 10^{-3}$  и  $2,1 \times 10^{-3}$  см/мин соответственно). Можно предположить, что ГЛ и через мембраны СС проникает более медленно, чем ЭГ и поэтому оказывает существенное осмотическое воздействие на клетки. Вероятно, именно это вызывает гибель основной части сперматозоидов с ГЛ еще до замораживания, а также повышает чувствительность СС к повреждающим факторам в процессе замораживания-оттаивания.

Об этом также свидетельствуют результаты выживаемости СС после оттаивания. Из рис.3

that of EG. In human spermatozoa it has been demonstrated [6] that permeability coefficient for EG via their membranes three times higher than for glycerol ( $7.9 \times 10^{-3}$  and  $2.1 \times 10^{-3}$  cm/min, correspondingly). One can suppose that glycerol penetrates through DS membranes slower too, than EG and therefore causes significant osmotic effect on cells. Namely this likely leads to the death of main part of spermatozoa with glycerol even before freezing and also increases the DS sensitivity to damaging factors during freeze-thawing process.

The results of DS survival testify to the same after thawing. Figure 3 shows that after freeze-thawing not depending on the use cooling regimen a big number of cells is preserved under EG protection. In this case the cell survival is higher in the 7% EG solutions. With the increase in time of sperm equilibration in the media with cryoprotectants up to 1 hour the number of motile cells statistically and significantly reduced both before and after freezing ( $p \leq 0.05$ ).

Increase in cooling rate of sperm during freezing (second regimen) both with glycerol and EG (Fig. 3) resulted in even more death of cells. Each cryoprotectant is known to manifest its potential cryoprotective activity at optimal cooling rate, depending on its capability to penetrate inside the cells, and more important on the effect of cryoprotectants on permeability of membranes for water. EG has been shown to reduce the permeability of human spermatozoa membranes for water almost in 2.5 times (without cryoprotectant  $L_p = 1.84$ , with EG it is equal to  $0.74 \mu\text{m} \times \text{min}^{-1} \times \text{atm}^{-1}$ ). There are findings [15] that permeability of DS membranes



**Рис 2.** Динамика изменения объема СС под воздействием криопротекторов. 1 – ГЛ; 2 – ЭГ.

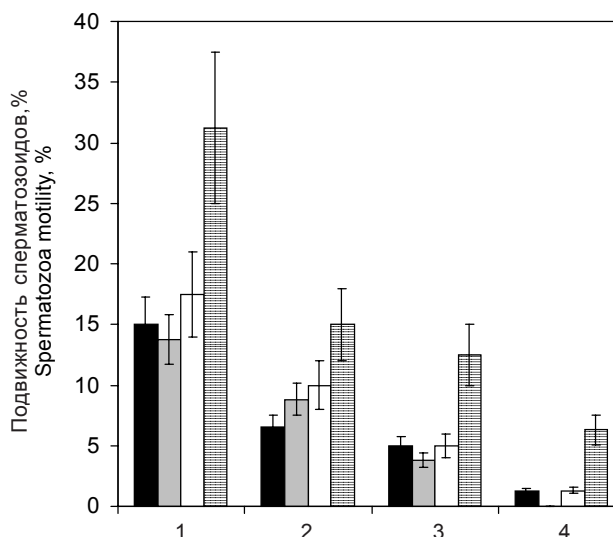
**Fig. 2.** Dynamics of volume changes for DS under the effect of cryoprotectants. 1 – glycerol; 2 – EG.

видно, что после замораживания-оттаивания независимо от использованного режима охлаждения большее количество клеток сохраняется под защитой ЭГ. При этом выживаемость клеток выше в растворах ЭГ с 7%-й концентрацией. С увеличением времени эквilibрации спермы в средах с криопротекторами до 1-го часа количество подвижных клеток достоверно уменьшалось, как до, так и после замораживания ( $p \leq 0,05$ ).

Увеличение скорости охлаждения спермы при замораживании (второй режим) как с ГЛ, так и с ЭГ (рис.3) приводило к еще большей гибели клеток. Известно, что каждый криопротектор проявляет свою потенциальную криопротекторную активность при оптимальной скорости охлаждения, которая зависит от его способности проникать внутрь клеток, а главное от влияния криопротекторов на проницаемость мембран для воды. Показано [6], что ЭГ снижает проницаемость мембран сперматозоидов человека для воды почти в 2,5 раза (без криопротектора  $L_p$  равен  $1,84$ , с этиленгликолем –  $0,74 \text{ мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{атм}^{-1}$ ). Получены данные [15], что проницаемость мембран СС для воды чрезвычайно низкая, коэффициент проницаемости равен  $0,0029 \text{ мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{атм}^{-1}$ . Этим можно объяснить, почему применение медленных скоростей охлаждения с ЭГ приводит к более высокой сохранности клеток после замораживания. Как показали результаты проведенных исследований, максимальная выживаемость СС после оттаивания наблюдается в присутствии ЭГ в 7%-й концентрации при замораживании по первому режиму, который предусматривает использование более медленных скоростей охлаждения на первом и на втором этапах ( $p \leq 0,05$ ).

Известно, что переживаемость сперматозоидов в большей степени коррелирует с их оплодотворяющей способностью, чем просто подвижность. Поэтому была проведена оценка переживаемости СС, замороженных по первому режиму охлаждения, без предварительной эквilibрации клеток с криопротекторами. Из рис. 4 видно, что максимальная переживаемость наблюдалась у СС, криоконсервированных в присутствии ЭГ в 7%-й концентрации. После 30 мин хранения спермы при температуре  $38^\circ\text{C}$ , соответствующей физиологической норме собак, подвижными оставались около 25% сперматозоидов, в то время как в остальных вариантах наблюдалась подвижность на уровне не выше 15%, разница достоверна ( $p \leq 0,05$ ).

Полученные результаты подтверждают перспективность использования ЭГ в качестве криопротектора для криоконсервирования спермы собак. Этиленгликоль, вероятно, более эффективный криопротектор для СС по сравнению с ГЛ, так как вызывает минимальное отклонение клеточного



**Рис. 3.** Подвижность СС после оттаивания в зависимости от концентрации криопротекторов ГЛ и ЭГ по первому и второму режимам замораживания: 1,2 – без эквilibрации с криопротекторами; 3,4 – с предварительной эквilibрацией с криопротекторами. ■ – 3%-й ГЛ; ▣ – 7%-й ГЛ; ▨ – 7%-й ЭГ.

**Fig. 3.** Motility of DS after thawing depending on concentration of cryoprotectants, glycerol and EG according to the first and second freezing regimens: 1,2 – without equilibration with cryoprotectants; 3,4 – equilibration with cryoprotectants. ■ – 3% glycerol; ▣ – 7% glycerol; ▨ – 7% EG.

for water is quite low, permeability coefficient is equal to  $0.0029 \text{ мкм} \times \text{мин}^{-1} \times \text{атм}^{-1}$ . This may explain why the application of slow cooling rates with EG results in higher integrity of cells after freezing. The results of conducted studies demonstrate that maximum survival of DS after thawing is observed in the presence of 7% EG during freezing according to the first regimen, which foresees the usage of lower cooling rates at the first and second stages.

Spermatozoa survival is known to correlate in bigger extent with their fertilizing ability, than just motility. Therefore there was assessed the survival of DS frozen according to the first cooling regimen without preliminary equilibration of cells with cryoprotectants. Figure 4 demonstrates that maximum survival was found in DS cryopreserved in the presence of 7% EG.

After 30-min's sperm storage at  $38^\circ\text{C}$ , which is physiological norm for dogs, about 25% of spermatozoa remained motile, meanwhile the rest showed the motility at the level not higher than 15%, the difference is statistically significant ( $p \leq 0.05$ ).

The obtained results confirm the perceptiveness of EG usage as cryoprotectant to cryopreserve canine sperm. Ethylene glycol is probably more effective cryoprotectant for DS if compared with glycerol, since it causes minimum deviation of cell volume from isotonic one during freeze-thawing, stipulated by its high penetrating ability via cell membranes [6].

объема от изотонического в процессе замораживания и оттаивания, обусловленное его высокой проникающей способностью через мембраны клеток [6].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о более высокой цитотоксичности ГЛ в отношении СС, обусловленной более низкой его способностью проникать внутрь клеток в сравнении с ЭГ. Резкие изменения объема клеток в среде с ГЛ могут быть причиной осмотического шока СС и повышения их чувствительности к повреждающим факторам в процессе криоконсервирования и низкой сохранности клеток после замораживания-оттаивания.

### Выводы

1. Доказана перспективность применения ЭГ как криопротектора в 7%-й концентрации в сравнении с ГЛ при криоконсервировании спермы собак.

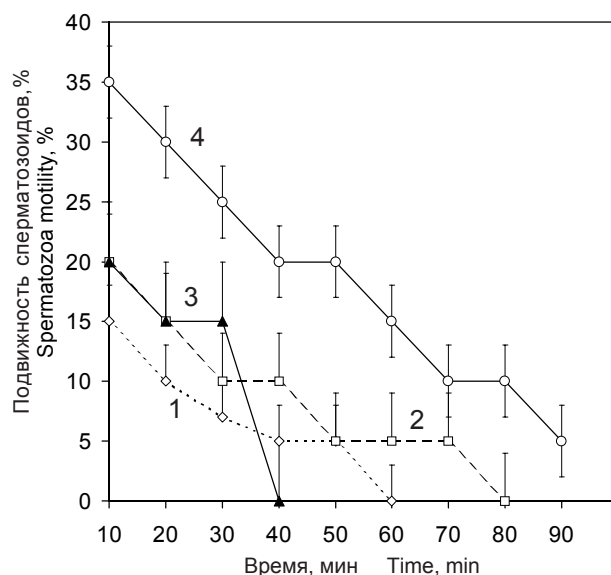
2. Установлено, что эквilibрация СС с криопротекторами на этапе подготовки к замораживанию в течение часа отрицательно влияет на их выживаемость после оттаивания.

3. Отмечена более высокая сохранность СС после оттаивания при замораживании на первом этапе криоконсервирования со скоростью 3°C/мин, на втором – 10°C/мин.

4. Установлено, что при эквilibрации СС в средах с ГЛ происходят большие изменения объема клеток, чем в средах с ЭГ, возможно, из-за более низкой проницаемости мембран этих клеток для ГЛ, что может служить причиной возникновения осмотического шока и повышения чувствительности клеток к повреждающим факторам в цикле криоконсервирования.

### Литература

1. Манк В. В., Лебовка Н. И. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса воды в гетерогенных системах. – Киев: Наук. думка, 1988. – 202 с.
2. Новиков А. Н., Пресяжнюк В. А. Прибор для изучения процесса коагуляции коллоидных систем // Коллоидный журн. – 1962. – Т. 31, №4. – С. 559 – 563.
3. 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.
4. England G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review // J. Reprod Fertil. Suppl. – 1993. – Vol.47. – P. 243-255.
5. Fahrig B.M. Cryopreservation by pellet freezing of epididymal and ejaculated spermatozoa from male dog: B.S. Thesis. – Louisiana State University, 2003. – 312 p.
6. Gilmore J. A., Mc Gann L. E., Lui J. K. Effect of Cryoprotectant Solutes on Water Permeability Of Human Spermatozoa // Biol. Reprod. – 1995. – Vol. 53. – P. 985-995.



**Рис. 4.** Переживаемость СС после оттаивания, замороженных по первому режиму без эквilibрации с криопротекторами. 1 – 3%-й ГЛ; 2 – 7%-й ГЛ; 3 – 3%-й ЭГ; 4 – 7%-й ЭГ.

**Fig. 4.** Survival of DS after thawing, the one frozen according to the first regimen without equilibration with cryoprotectants. 1 – 3% glycerol; 2 – 7% glycerol; 3 – 3% EG; 4 – 7% EG.

Thus the obtained data testify to higher cytotoxicity of glycerol in respect of DS, that is stipulated by its lower capability to penetrate inside cells in comparison with EG. Sharp changes of cell volume in the medium with glycerol may be the cause of DS osmotic shock and the rise in their sensitivity to damaging factors during cryopreservation and low cell integrity after freeze-thawing.

### Conclusions

1. The prospects of EG application as a cryoprotectant in 7% concentration have been proved in comparison with glycerol when cryopreserving the dogs' sperm.

2. It has been established the equilibration of DS with cryoprotectants at the stage of preparing to freezing during an hour negatively affects their survival after thawing.

3. High integrity of DS has been noted after thawing when freezing at the first cryopreservation stage with the rate of 3°C/min and 10°C/min at the second one.

4. During DS equilibration in glycerol media the bigger changes in cell volume have been found to occur than in those with EG, likely, because of low permeability of membranes of these cells for glycerol, that may serve as the cause of osmotic shock appearance and increase in cell sensitivity to damaging factors in cryopreservation cycle.

7. *Koutsarova N., Todorov P., Koutsarov G.* Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa // *J. Reprod. Fertil.*– 1997.– Vol. 51.– P.117-121.
8. *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.
9. *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.
10. *Pena A., Linde-Forsberg C.* Effect of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa // *Theriogenology.*– 2000.– Vol. 54.– P. 703-718.
11. *Pena A., Lopez-Lugilde L., Barrio M. et al.* Studies on the Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of frozen-thawed dog spermatozoa influence of equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating condition // *Reprod. Domest. Anim.*– 2003.– Vol. 38.– P. 27-35.
12. *Solares M. P., Rossi C.A.R., Mezzalaira A., Cecim M.* Ethylene glycol on canine semen cryopreservation // *Ciencia Rural, Santa Maria.*– 2002.– Vol. 32, N4.– P. 649-655.
13. *Songsasen N., Yu I., Murton S. et al.* Osmotic sensitivity of canine spermatozoa // *Cryobiology.*– 2002.– Vol. 44.– P. 79-90.
14. *Songsasen N., Godke R. A., Leibo S. P.* Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates // *Cryobiology.*– 2002.– Vol. 44.– P. 62-78.
15. *Thirumata S., Ferrer M.S., Al-Jarrah A. et al.* Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agent // *Cryobiology.*– 2003.– Vol. 47.– P. 109-124.

*Поступила 23.03.2004*

## References

1. *Mank V.V., Lebovka N.I.* Spectroscopy of nuclear magnetic resonance of water in heterogenous systems.– Kiev: Naukova Dumka, 1988.– 202 p.
2. *Novikov A.N., Presyazhnyuk V.A.* Device for studying the process of coagulation of colloid systems// *Kolloidny zhurnal.*– 1962.– Vol. 31, N4.– P. 559-563.
3. *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.
4. *England G. C. W.* Cryopreservation of dog semen: a review // *J. Reprod Fertil. Suppl.*– 1993.– Vol.47.– P. 243-255.
5. *Fahrig B.M.* Cryopreservation by pellet freezing of epididymal and ejaculated spermatozoa from male dog: B.S. Thesis.– Louisiana State University, 2003.– 312 p.
6. *Gilmore J. A., Mc Gann L. E., Lui J. K.* Effect of Cryoprotectant Solutes on Water Permeability Of Human Spermatozoa // *Biol. Reprod.*– 1995.– Vol. 53.– P. 985-995.
7. *Koutsarova N., Todorov P., Koutsarov G.* Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa // *J. Reprod. Fertil.*– 1997.– Vol. 51.– P.117-121.
8. *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.
9. *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.
10. *Pena A., Linde-Forsberg C.* Effect of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa // *Theriogenology.*– 2000.– Vol. 54.– P. 703-718.
11. *Pena A., Lopez-Lugilde L., Barrio M. et al.* Studies on the Intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of frozen-thawed dog spermatozoa influence of equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating condition // *Reprod. Domest. Anim.*– 2003.– Vol. 38.– P. 27-35.
12. *Solares M. P., Rossi C.A.R., Mezzalaira A., Cecim M.* Ethylene glycol on canine semen cryopreservation // *Ciencia Rural, Santa Maria.*– 2002.– Vol. 32, N4.– P. 649-655.
13. *Songsasen N., Yu I., Murton S. et al.* Osmotic sensitivity of canine spermatozoa // *Cryobiology.*– 2002.– Vol. 44.– P. 79-90.
14. *Songsasen N., Godke R. A., Leibo S. P.* Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates // *Cryobiology.*– 2002.– Vol. 44.– P. 62-78.
15. *Thirumata S., Ferrer M.S., Al-Jarrah A. et al.* Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agent // *Cryobiology.*– 2003.– Vol. 47.– P. 109-124.

*Accepted in 23.03.2004*