

УДК 57.043:636.5.082.453

Т.П. Линник^{1*}, И.Н. Мартынюк¹, О.В. Гавилей², Е.М. Белецкий²

Цитотоксическое действие диолов, амидов и их смесей на сперму петухов и индюков до замораживания

UDC 57.043:636.5.082.453

T.P. LINNIK^{1*}, I.N. MARTYNYUK¹, O.V. GAVILEY², E.M. BELETSKY² Cytotoxic Effect of Diols, Amides and Their Mixtures on Fowl and Turkey Sperm Prior to Freezing

Изучали цитотоксичность веществ рядов амидов и диолов (по три представителя) по отношению к спермиям петуха и индюка на этапе подготовки к замораживанию. Показано, что наименьшее повреждающее действие на спермии петуха наблюдается в присутствии диметилформамида (ДМФА) и смеси ДМФА + 2,3-бутандиол, на спермии индюка – этиленгликоля (ЭГ) и смеси ДМФА + ЭГ.

Ключевые слова: цитотоксичность, криопротекторы, амиды, диолы, морфологическая сохранность, инкубация.

Вивчали цитотоксичність речовин рядів амідів і діолів (по три представника) по відношенню до спермій півня й індики на етапі підготовки до заморожування. Показано, що найменша ушкоджуюча дія на спермії півня спостерігається в присутності диметилформаміду (ДМФА) й суміші ДМФА + 2,3-бутандіол, на спермії індики – етиленгліколю (ЕГ) і суміші ДМФА + ЕГ.

Ключові слова: цитотоксичність, криопротектори, аміди, діоли, морфологічна збереженість, інкубація.

There was studied the cytotoxicity of substances from amides' and diols' series (three representatives from each) in respect to the fowl and turkey spermatozoa at a preparative stage to freezing. It was shown, that the lowest damaging effect on fowl spermatozoa was observed in the presence of dimethylformamide (DMFA) and DMFA + 2,3-buthane diol (2,3-BD) mixture and for turkey spermatozoa was ethylene glycol (EG) and DMFA+EG, correspondingly.

Key words: cytotoxicity, cryoprotectants, amides, diols, morphological integrity, incubation.

В настоящее время достигнуты определенные успехи в области криоконсервирования спермы птиц. Но существующие методы не позволяют достаточно эффективно использовать генетический материал высокопродуктивных производителей. Несмотря на усложнение технологии криоконсервирования, применение двух- и трех-этапных режимов охлаждения, многокомпонентных криозащитных сред, удаление криопротекторов перед осеменением, увеличение спермодозы и кратности осеменения реально не удается сохранить после замораживания-оттаивания более 50% абсолютно полноценных сперматозоидов. Поэтому получение высоких, воспроизводимых и стабильных результатов оплодотворенности яиц и вывода молодняка после искусственного осеменения размороженной спермой остается нерешенной проблемой, прежде всего это относится к сперме индюка [11–13]. Одной из причин этого является

Nowadays there have been achieved the certain successes in the field of poultry sperm cryopreservation. But the current methods do not provide quite an efficient usage of genetic material from breeders of high production. In spite of complication of cryopreservation technology, application of two-, three-stage cooling regimens, multicomponent cryoprotective media, cryoprotectant removal before insemination, increase in sperm dose and insemination procedure multiplicity, one does not really manage to preserve more than 50% of absolutely integral spermatozoa after freeze-thawing. Therefore the obtaining of high, reproducible and stable results of egg fertilisation rate and young bird hatching after artificial insemination with frozen-thawed sperm has remained an unsolved task, first of all it concerns the turkey sperm [11–13]. One of these causes is a damaging effect of the applied cryoprotectants on poultry spermatozoa within their cryopreservation cycle. Although the phenomenon of

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²НИИ птицеводства, УААН, с. Борки, Харьковская обл.

* 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

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Poultry Research Institute, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Borki village, Kharkov region

* 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

повреждающее действие применяемых криопротекторов на спермии птиц в цикле их криоконсервирования. Хотя явление цитотоксичности криопротекторов давно общепризнано [10], тем не менее изучено недостаточно. Негативное действие криопротекторов еще до замораживания клеток существенно ограничивает их используемую концентрацию, продуцирует криоповреждения на последующих этапах, снижает их криозащитную эффективность и препятствует полному восстановлению жизнеспособности клеток после оттаивания. Результаты исследования цитотоксического действия криопротекторов на спермии петуха приведены в [6, 8, 11, 12], на спермии индюка – в [14].

Для спермы птиц как криопротекторы применяются глицерин, этиленгликоль (ЭГ), N,N-диметилформамид (DMFA), N,N-диметилацетамид (DMAC) [11, 12], а также 1,2-пропандиол (1,2-ПД), 2,3-бутандиол (2,3-БД) в комбинации с вышеуказанными [6]. При криоконсервировании спермы индюка изучали криозащитную активность глицерина, ЭГ, ДМАЦ и ДМСО [14], но криопротектор, обеспечивающий надежную защиту при действии низких температур, не найден.

Цель работы – сравнительное изучение цитотоксического действия амидов, диолов и их смесей на этапе подготовки к замораживанию спермы петуха и индюка.

Материалы и методы

Для исследований использовали сперму петуха и индюка коллекционных пород НИИП УААН, ее получали методом массажа абдоминальной области. Применяли смесь эякулятов нескольких особей. Для оценки сохранности спермиев определяли подвижность, переживаемость (подвижность во времени) на микроскопе PZO KPI-2 (Польша).

Количество морфологически поврежденных спермиев, окрашенных пропидиум иодидом, определяли на микроскопе Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия) с ртутной лампой, используя набор фильтров для возбуждения 540–550 нм, испускания 560–610 нм. При этом в яркий желто-оранжевый цвет окрашиваются только спермии с поврежденной мембраной. Возникающие патологические изменения структуры спермиев фиксировали с помощью флуоресцентного зонда ДСМ (4-N-димиламиностирил-1-метилпиридин-N-толуолсульфонат), используя набор фильтров для возбуждения 460–490 нм, испускания 510–550 нм. Концентрация красителей в суспензии клеток составляла 40–70 мкМ.

Изучены три соединения ряда диолов: ЭГ, 1,2-ПД, 2,3-БД и три соединения ряда алифатических

cryoprotectant cytotoxicity has been long-recognized [10], it has still remained insufficiently studied. Negative effect of cryoprotectants even before cell freezing significantly limits their used concentration, produces cryodamages at following stages, reduces their cryoprotective efficiency and prevents a complete recovery of cell viability after thawing. Research results of cryoprotectant cytotoxic effect on fowl spermatozoa are given in the papers [6, 8, 11, 12], on turkey spermatozoa in [14].

Glycerol, ethylene glycol (EG), N,N-dimethyl formamide (DMFA), N,N-dimethyl acetamide (DMAC) [11, 12], as well as 1,2-propane diol (1,2-PD), 2,3-butanediol (2,3-BD) in combination with the mentioned above ones are applied as cryoprotectants for poultry sperm [6]. When cryopreserving turkey sperm one studied a cryoprotective activity of glycerol, EG, DMAC and DMSO [14], but no cryoprotectant, providing a reliable protection under low temperature effect, was found-out.

This research was aimed to a comparative study of cytotoxic effect of amides, diols and their mixtures at a preparative stage to fowl and turkey sperm freezing.

Materials and methods

For research we used the fowl and turkey sperm of collection breeds of Poultry Research Institute of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences. It was procured by the massage of abdominal area. The ejaculate mixture from several species was applied. The motility, survival (motility in time) were determined with microscope PZO KPI-2 (Poland) for spermatozoa integrity estimation.

The number of morphologically damaged spermatozoa, stained with propidium iodide, was determined with microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany) equipped with mercurium lamp, using the filter set of 540–550 nm wavelength for excitation and 560–610 nm for emission. Herewith only spermatozoa with a damaged membrane are stained in bright yellow-orange colour. The occurring pathological changes in spermatozoa structure were fixed by means of DSM fluorescent probe (4-N-dimethyl aminostyryl-1-methyl-pyridin-N-toluene sulfonate), using filter set of 460–490 nm wavelength for excitation and 510–550 nm for emission. Dye concentration in cell suspension was 40–70 μM .

There were studied three compounds of diol series: EG, 1,2-PD, 2,3-BD and three ones of aliphatic amides: FA (formamide), DMFA, DMAC. All the substances with “chemically pure” grade were additionally purified and identified according to the standard methods [2, 5].

Fowl and turkey sperm was diluted with 4.7% glucose solution (320 mOsm) in 1:1 and 1:2 ratio,

амидов: формамид (ФА), ДМФА, ДМАЦ. Все вещества марки «х. ч.» (Реахим) дополнительно очищали и идентифицировали общепринятыми методами [2, 5].

Сперму петуха разбавляли 4,7%-м раствором глюкозы (320 мОсмоль) в соотношении 1:1, сперму индюка – в соотношении 1 : 2, выдерживали при 0°C в течение 2 ч. Затем добавляли раствор исследуемого вещества в той же среде до требуемой конечной концентрации в суспензии клеток и инкубировали в течение определенного времени при 20 и 4°C. Варьировали концентрацию веществ от 0,25 до 1 М, время экспозиции спермы птиц с веществами – от 15 мин до 4 ч.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли по методу Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Реакция клетки на воздействие криопротектора требует определенного времени и существенно зависит от температуры прибавления и экспозиции. В связи с этим было изучено повреждающее действие вышеперечисленных веществ на сперматозоиды петуха и индюка в зависимости от их концентрации и продолжительности контакта с клетками при 20 и 4°C. Криопротекторы или их смеси прибавляли к суспензии спермиев в растворе (4,7% глюкозы) до необходимой конечной концентрации. Прибавление чистых веществ не применялось, так как их физико-химические свойства значительно отличаются [5, 7, 9], особенно на этапе взаимодействия веществ со средой, в частности с молекулами воды, поэтому требуется разное время для установления термодинамических параметров (энтропийных и энтальпийных) в объеме раствора. Взаимодействие веществ с водой сопровождается либо эндотермическим (с ФА), либо экзотермическим эффектом (с остальными криопротекторами) [1]. При этом поглощение или выделение тепла при смешении с водой настолько значительно, что может вызвать существенное изменение температуры клеточной суспензии локально или во всем объеме.

На рисунке представлены кривые снижения подвижности спермиев птиц под воздействием исследуемых криопротекторов при 20°C в зависимости от времени инкубации. В контроле через 4 ч хранения подвижными оставались до 60% спермиев петуха и до 50% спермиев индюка, но морфологически целыми не более 30% клеток в первом случае, не более 15% – во втором.

Введение криопротекторов в клеточную суспензию снижает подвижность сперматозоидов индюка по отношению к контролю через 15 мин инкубации. При этом с 2,3-БД подвижными остается не более

соответственно, с 2 hrs' exposure at 0°C. Then there was added the solution of studied substance in the same medium up to the required final concentration in cell suspension and incubated within the certain time at 20 and 4°C. Substance concentration and poultry sperm exposure time with substances were varied from 0.25 to 1M and from 15 min to 4 hrs, correspondingly,

The results were statistically processed with the Student-Fisher test.

Results and discussion

Cell response to cryoprotectant effect requires a certain time and significantly depends on addition temperature and exposure. Due to this fact there was studied a damaging effect of the mentioned above substances on the fowl and turkey spermatozoa depending on their concentration and contact duration with cells at 20 and 4°C. Cryoprotectants or their mixtures were added into spermatozoa suspension in the solution (4.7% glucose) up to the necessary final concentration. No pure substance adding was applied, since their physical and chemical properties significantly differed [5, 7, 9], especially at the stage of substance interaction with the medium, water molecules, in particular, therefore different time was needed to establish the thermodynamic parameters (entropy and enthalpy ones) in solution volume. Substance interaction with water is accompanied either with endothermic (with FA) or exothermic (with other cryoprotectants) effects [1]. At the same time the heat adsorption or release during mixing with water is so much significant, that may cause the temperature change in cell suspension in a local way or in the whole volume.

The Figure shows the curves of poultry spermatozoa motility decrease under the effect of the studied cryoprotectants at 20°C depending on incubation time. In the control after 4 hrs' storage up to 60 and 50% fowl and turkey spermatozoa, correspondingly, remained motile, but morphologically integral were not more, than 30 and 15% in the first and second cases, correspondingly.

Cryoprotectant introduction into a cell suspension reduces the turkey spermatozoa motility in respect to the control in 15 min of incubation. At the same time with 2,3-BD not more, than a half of cells remains motile. A sharp decrease in rectilinear-progressive movement of turkey spermatozoa is observed in 2 hrs (Figure, b), in 3–4 hrs of spermatozoa incubation with all the cryoprotectants, excluding EG and DMFA, cells completely die.

Decrease in motility of fowl spermatozoa under the effect of the studied substances, excluding FA, in contrast to the turkey spermatozoa, occurs more gradually (Figure, a). When introducing FA into the fowl spermatozoa suspension, more than 50% cells lose their

половины клеток. Резкое падение прямолинейно-поступательного движения спермиев индюка наблюдается через 2 ч (рисунок, б), через 3–4 ч инкубации спермиев со всеми криопротекторами, кроме ЭГ и ДМФА, клетки гибнут полностью.

Снижение подвижности сперматозоидов петуха под воздействием исследуемых веществ, кроме ФА, в отличие от спермиев индюка происходит более плавно (рисунок, а). При введении ФА в суспензию спермиев петуха подвижность теряют более 50% клеток, через 60 мин инкубации остается около 30–35% подвижных сперматозоидов и далее наблюдается полная гибель клеток. Реакция спермиев индюка на введение ФА отличается от спермиев петуха. Через 15 мин инкубации подвижность сохраняли 75% клеток, через 60 мин наблюдалось 50% подвижных сперматозоидов индюка, но через 3 ч все клетки погибли.

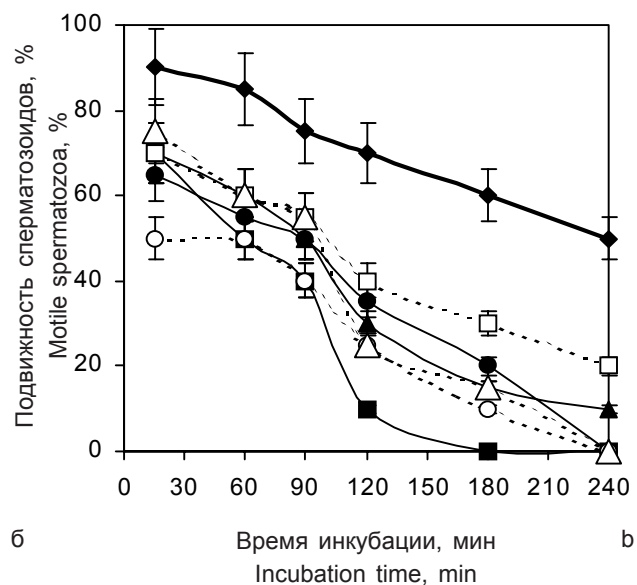
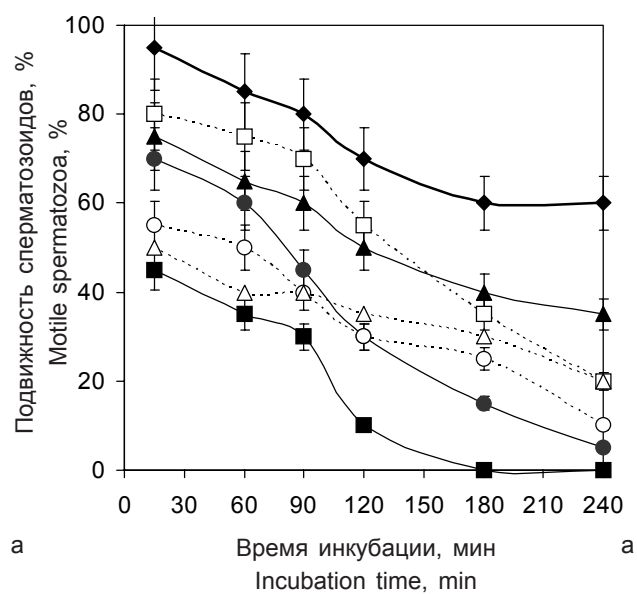
Следует отметить, что введение 1,2-ПД в суспензию спермиев петуха вызывало потерю подвижности 50% клеток. Это не согласуется с ранее полученными данными [8], вероятно, причиной является другой состав среды. Но через 4 ч инкубации подвижность спермиев петуха наблюдалась в присутствии 1, 2-ПД (рисунок, а).

Снижение температуры инкубации спермиев птиц с криопротекторами позволяет существенно уменьшить их повреждающее действие на клетки, т. е. их цитотоксичность [6, 8, 12]. Была изучена переживаемость спермиев петуха и индюка в зависимости от концентрации веществ и продолжительности их контакта с клетками при температуре 4°C. Из табл. 1 видно, что общий характер реакции спермиев петуха и индюка под воздействием изученных амидов и диолов практически не изменился. Снижение концентрации веществ в суспензии спермиев птиц приводит к повышению количества подвижных клеток на 10–15% на протяжении всего времени инкубации. Даже спермии индюка, более чувствительные к воздействию криопротекторов, сохраняют свою подвижность в течение длительного времени. Через 3 ч наблюдается до 15–20% подвижных спермиев индюка (с ЭГ, ДМФА и ДМАЦ до 30–40%) и до 25–35% спермиев петуха сохраняют подвижность (с ЭГ, 1,2-ПД и ДМФА до 40–45%). Полная гибель сперматозоидов индюка за период инкубации отмечается в присутствии ФА, 1,2-ПД и 2,3-БД. Спермии петуха полностью теряют подвижность за период инкубации только с ФА (табл. 1).

В табл. 2 представлено количество морфологически поврежденных спермиев петуха и индюка при действии изученных веществ в зависимости от их концентрации и температуры инкубации.

motility, approximately 30–35% motile spermatozoa remain in 60 min after incubation with following complete cell death observation. Turkey spermatozoa response to FA introduction differs from the fowl ones. In 15 min after incubation the motility was kept in 75% of cells, in 60 min 50% motile turkey spermatozoa were observed, but 3 hrs later all the cells died.

Of note is the fact, that 1,2-PD introduction into the fowl spermatozoa suspension caused the motility loss in 50% cells. This fact does not correlate with the



Зависимость сохранности спермиев петуха (а) и индюка (б) до замораживания от времени инкубации с криопротекторами при 20°C (концентрация криопротекторов 1 М): ◆ – контроль; ■ – ФА; ▲ – ДМФА; ● – ДМАЦ; □ – ЭГ; ○ – 2,3-БД; △ – 1,2-ПД.

Dependency of fowl (a) and turkey (b) spermatozoa integrity prior to freezing on incubation time with cryoprotectants at 20°C (concentration of cryoprotectants made 1 M): ◆ – control; ■ – FA; ▲ – DMFA; ● – DMAC; □ – EG; ○ – 2,3-BD; △ – 1,2-PD.

Таблица 1. Зависимость сохранности спермиев петуха и индюка до замораживания от времени инкубации с криопротекторами при 4°C (n = 6)

Table 1. Dependency of fowl and turkey spermatozoa integrity prior to freezing on incubation time with cryoprotectants at 4°C (n = 6)

Исследуемое вещество Studied substance	Концентрация, М Concentration, M	Подвижность, %, через мин. Motility, %, in min.					
		15	60	90	120	180	240
Спермии петуха Fowl sperm							
Контроль Control	—	95 ± 4	90 ± 9	85 ± 9	85 ± 9	70 ± 7	60 ± 6
ФА FA	0,25	60 ± 6	50 ± 5	40 ± 4	30 ± 3	20 ± 2	10 ± 1
	0,5	60 ± 6	50 ± 5	40 ± 4	25 ± 3	10 ± 1	0
	1,0	50 ± 5	40 ± 4	35 ± 4	20 ± 2	0	0
ДМФА DMFA	0,5	85 ± 9	80 ± 8	70 ± 7	60 ± 6	50 ± 5	30 ± 3
	1,0	80 ± 8	75 ± 8	65 ± 7	55 ± 6	45 ± 5	35 ± 4
ДМАЦ DMAC	0,5	80 ± 8	75 ± 8	65 ± 7	50 ± 5	30 ± 3	20 ± 2
	1,0	75 ± 8	70 ± 7	50 ± 5	35 ± 4	20 ± 2	10 ± 1
ЭГ EG	0,5	85 ± 9	80 ± 8	70 ± 7	65 ± 7	45 ± 5	30 ± 3
	1,0	80 ± 8	75 ± 8	70 ± 7	60 ± 6	40 ± 4	20 ± 2
2,3-БД 2,3-BD	0,5	70 ± 7	60 ± 6	45 ± 5	40 ± 4	35 ± 4	15 ± 2
	1,0	60 ± 6	55 ± 6	40 ± 4	35 ± 4	25 ± 3	10 ± 1
1,2-ПД 1,2-PD	0,5	65 ± 7	60 ± 6	55 ± 6	45 ± 5	40 ± 4	30 ± 3
	1,0	60 ± 6	50 ± 5	45 ± 5	30 ± 3	30 ± 3	20 ± 2
Спермии индюка Turkey sperm							
Контроль Control	—	90 ± 9	85 ± 9	80 ± 8	70 ± 7	65 ± 7	55 ± 6
ФА FA	0,25	85 ± 9	70 ± 7	55 ± 6	35 ± 4	25 ± 3	0
	0,5	80 ± 8	70 ± 7	50 ± 5	30 ± 3	е _д /single	0
	1,0	75 ± 8	65 ± 7	45 ± 5	15 ± 2	8 ± 1	0
ДМФА DMFA	0,5	85 ± 9	80 ± 8	70 ± 7	50 ± 5	35 ± 4	20 ± 2
	1,0	80 ± 8	70 ± 7	60 ± 6	45 ± 5	20 ± 2	15 ± 2
ДМАЦ DMAC	0,5	85 ± 9	70 ± 7	65 ± 7	50 ± 5	35 ± 4	20 ± 2
	1,0	70 ± 7	65 ± 7	60 ± 6	40 ± 4	30 ± 3	15 ± 2
ЭГ EG	0,5	85 ± 9	80 ± 8	70 ± 7	55 ± 6	45 ± 5	30 ± 3
	1,0	75 ± 8	70 ± 7	60 ± 6	50 ± 5	30 ± 3	20 ± 2
2,3-БД 2,3-BD	0,5	70 ± 7	60 ± 6	55 ± 6	40 ± 4	15 ± 2	е _д /single
	1,0	60 ± 6	50 ± 5	45 ± 5	30 ± 3	15 ± 2	е _д /single
1,2-ПД 1,2-PD	0,5	80 ± 8	75 ± 8	60 ± 6	40 ± 4	25 ± 3	15 ± 2
	1,0	75 ± 8	70 ± 7	60 ± 6	30 ± 3	15 ± 2	е _д /single

Рассмотрены данные, полученные через 30 мин инкубации клеток с криопротекторами. Это время, в течение которого спермии птиц реально находятся в контакте с криопротекторами в процессе криоконсервирования и могут оказывать негативное действие: на этапе подготовки к замораживанию и при охлаждении до появления твердой фазы; от момента оттаивания спермы и до введения ее в репродуктивный тракт самок, так как изученные вещества не удаляются перед осеменением из размороженной клеточной суспензии. Снижение концентрации веществ в суспензии и температуры инкубации уменьшает количество морфологически поврежденных клеток. При этом с менее цитотоксическими веществами уровень снижения количества спермиев петуха с морфологическими патологиями при температуре 4°C достигает 20–35%, спермиев индюка – 20–25% (табл. 2). Результаты проведенных исследований (табл. 1 и 2, рисунок) свидетельствуют, что по степени повышения цитотоксического действия на сперматозоиды петуха изученные вещества располагаются в ряд: ДМФА > ЭГ > ДМАЦ > 1,2-ПД > 2,3-БД > ФА; на сперматозоиды индюка – ЭГ > ДМФА > ДМАЦ = 1,2-ПД = ФА > 2,3-БД.

В табл. 2 представлены также основные морфологические повреждения спермиев петуха и индюка через 30 мин инкубации при температуре 20°C. Для их определения использовали зонд ДСМ, который практически не влияет на жизнеспособность спермиев птиц. Через 30 мин после введения ДСМ в контроль подвижность падает не более чем на 5%, что согласуется с ранее полученными данными для спермы собак [4].

Сперматозоиды птиц имеют сложную морфологию, неоднородную структуру цитоскелета и гетерогенную цитоплазматическую мембрану, отличающуюся по своему составу и свойствам на разных участках. Например, липиды неравномерно распределяются в различных участках мембран спермиев. Отрицательно заряженные фосфолипиды в основном локализируются в передней части плазматической мембраны головки спермия, в области шейки их количество уменьшается, в хвостовой отсутствуют. При связывании ДСМ с цитоплазматической мембраной спермия наблюдается многоцветная флуоресценция – головка окрашивается в яркий оранжево-желтый цвет, остальные части – в зеленый. ДСМ известен как потенциалозависимый зонд и используется для определения поверхностного потенциала клеток [3]. Оранжево-желтый цвет головок спермиев петуха и индюка свидетельствует об изменении потенциала в присутствии всех криопротекторов, кроме ДМАЦ. К тому же введение ДМАЦ в суспензии

previous data [8], the reason is probably in other medium composition. However 4 hrs after incubation the fowl spermatozoa motility was observed at 1,2-PD presence (Figure, a).

Decrease in poultry spermatozoa incubation temperature with cryoprotectants enables a significant reduction of their damaging effect on cells, *i. e.* their cytotoxicity [6, 8, 12]. The fowl and turkey spermatozoa survival depending on substance concentration and duration of their contact with cells at 4°C were studied. The Table 1 shows the common character of fowl and turkey spermatozoa response under the effect of studied amides and diols as practically unchanged. Decrease in substance concentration in poultry spermatozoa suspension results in an increase of motile cell number by 10–15% within the whole incubation time. Even turkey spermatozoa, being more sensitive to cryoprotectant effect, preserve their motility within a long time. Three hours later there is observed up to 15–20% of turkey motile spermatozoa (up to 30–40% with EG, DMFA and DMAC) and to 25–35% of fowl ones preserve their motility (up to 40–45% with EG, DMFA and DMAC). A complete death of turkey spermatozoa within the incubation period is observed in the presence of FA, 1,2-PD and 2,3-BD. Fowl spermatozoa completely lose their motility within the incubation period only with FA (Table 1).

The Table 2 demonstrates a number of morphologically damaged fowl and turkey spermatozoa under the effect of studied substances depending on their concentration and incubation temperature. The data, obtained in 30 min after cell incubation with cryoprotectants, were envisaged. This is the time, during which the poultry spermatozoa are really being in the contact with cryoprotectants during cryopreservation and may cause a negative effect: at a preparative stage to freezing and under cooling up to solid phase appearance; from the moment of sperm thawing and to its introduction into female reproductive tract, since the studied substances are not removed before insemination from a frozen-thawed cell suspension. Decrease in substance concentration in a suspension and incubation temperature reduces the number of morphologically damaged cells. At the same time with less cytotoxic substances the level of reduction of fowl and turkey spermatozoa number with morphological pathologies at 4°C achieves 20–35 and 20–25%, correspondingly (Table 2). Our findings (Table 1 and 2, Figure) testify to the fact, that according to the degree of cytotoxic effect rise on fowl spermatozoa the studied substances are placed in the series such as: DMFA > EG > DMAC > 1,2-PD > 2,3-BD > FA; as for turkey ones there is: EG > DMFA > DMAC = 1,2-PD = FA > 2,3-BD.

The Table 2 shows the principal morphological damages of fowl and turkey spermatozoa 30 min after

Таблица 2. Морфологическая сохранность сперматозоидов петуха и индюка до замораживания в зависимости от концентрации криопротектора и температуры инкубации (n = 6)

Table 2. Morphological integrity of fowl and turkey spermatozoa prior to freezing depending on cryoprotectant concentration and incubation temperature (n = 6)

Исследуемое вещество Studied substance	Концентрация, М Concentration, M	Подвижность, %, через 15 мин при 20°C Motility, % in 15 min at 20°C	Количество сперматозоидов с морфологическими повреждениями, %, через 30 мин при температуре Percentage of spermatozoa with morphological disorders, % at the temperature of		Основные морфологические повреждения через 30 мин при 20°C Main morphological disorders in 30 min at 20°C
			4°C	20°C	
Спермии петуха Fowl sperm					
Контроль Control		95 ± 4	10,1 ± 0,5	12,7 ± 0,6	Ед. без акросом Single without acrosome
ФА FA	0,25	50 ± 5	18,7 ± 1,9	21,5 ± 2,2	Шаровидные акросомы, раздутые головки, изогнутые шейки, скрученные хвосты Spherical acrosomes, swollen heads, bent necks, screw tails
	0,5	50 ± 5	20,9 ± 2,1	23,7 ± 2,4	
	1,0	45 ± 5	26,3 ± 2,6	28,9 ± 2,9	
ДМФА DMFA	0,5	80 ± 8	12,1 ± 0,8	16,3 ± 1,1	Набухшие головки, акросомы отсутствуют, изогнутые шейки Swollen heads, no acrosome, bent necks
	1,0	75 ± 8	14,5 ± 1,0	22,6 ± 1,6	
ДМАЦ DMAC	0,5	75 ± 8	14,7 ± 1,0	18,4 ± 1,3	Спермии сжались, шаровидные акросомы или отсутствуют, изогнутые шейки Shrunk spermatozoa, spherical acrosomes or absent, bent necks
	1,0	70 ± 7	21,9 ± 1,5	27,8 ± 1,9	
ЭГ EG	0,5	85 ± 9	11,6 ± 0,8	16,9 ± 1,2	Шаровидные акросомы, раздутые головки, изогнутые шейки Spherical acrosomes, swollen heads, bent necks
	1,0	80 ± 8	23,1 ± 1,6	30,1 ± 2,1	
2,3-БД 2,3-BD	0,5	65 ± 7	24,3 ± 2,4	27,2 ± 2,7	Акросомы отсутствуют, раздутые головки, изогнутые шейки, скрученные хвосты No acrosomes, swollen heads, bent necks, screw tails
	1,0	55 ± 6	37,6 ± 3,8	41,4 ± 4,1	
1,2-ПД 1,2-PD	0,5	60 ± 6	15,1 ± 1,5	19,8 ± 2,0	Шаровидные акросомы или отсутствуют, изогнутые шейки, скрученные хвосты Spherical acrosomes or absent, bent necks, screw tails
	1,0	50 ± 5	30,2 ± 3,0	39,7 ± 4,0	
Спермии индюка Turkey sperm					
Контроль Control		90 ± 5	11,2 ± 0,6	14,2 ± 0,7	—
ФА FA	0,25	80 ± 8	14,6 ± 1,0	20,4 ± 1,4	Шаровидные акросомы, раздутые головки, изогнутые шейки, скрученные хвосты Spherical acrosomes, swollen heads, bent necks, screw tails
	0,5	75 ± 8	15,4 ± 1,1	21,7 ± 1,5	
	1,0	70 ± 7	20,5 ± 1,4	24,9 ± 1,7	
ДМФА DMFA	0,5	80 ± 8	13,9 ± 1,0	18,1 ± 1,3	Набухшие головки, акросомы отсутствуют, изогнутые шейки Swollen heads, no acrosome, bent necks
	1,0	70 ± 7	20,4 ± 1,4	23,2 ± 1,6	
ДМАЦ DMAC	0,5	85 ± 9	14,0 ± 1,4	18,3 ± 1,8	Спермии сжались, шаровидные акросомы или отсутствуют, изогнутые шейки Shrunk spermatozoa, spherical acrosomes or absent, bent necks
	1,0	65 ± 7	29,7 ± 3,0	34,2 ± 3,4	
ЭГ EG	0,5	85 ± 9	13,3 ± 0,9	17,6 ± 1,2	Шаровидные акросомы, раздутые головки, изогнутые шейки Spherical acrosomes, swollen heads, bent necks
	1,0	70 ± 7	19,8 ± 1,4	22,5 ± 1,6	
2,3-БД 2,3-BD	0,5	60 ± 6	29,6 ± 3,0	32,1 ± 3,2	Акросомы отсутствуют, раздутые головки, изогнутые шейки, скрученные хвосты No acrosomes, swollen heads, bent necks, screw tails
	1,0	50 ± 5	40,1 ± 4,0	46,7 ± 4,7	
1,2-ПД 1,2-PD	0,5	80 ± 8	20,1 ± 2,0	24,8 ± 2,5	Шаровидные акросомы или отсутствуют, изогнутые шейки, скрученные хвосты Spherical acrosomes or absent, bent necks, screw tails
	1,0	75 ± 8	24,7 ± 2,5	31,6 ± 3,2	

пензию спермиев вызывает резкое уменьшение их размеров. Это обусловлено, видимо, дегидратацией клеток под действием этого криопротектора. Известно, что ДМАЦ обладает высокой скоростью диффузии через мембрану и относится к осмотически неактивным веществам. Поэтому более вероятно предположить появление липидных пор как за счет дефектов, возникающих под влиянием мембранотропности ДМАЦ, так и за счет тепловых флуктуаций в липидном бислое.

Из табл. 2 следует, что морфологические повреждения, которые возникают в присутствии изученных криопротекторов и нарастают в течение инкубации, типичны для спермиев петуха и индюка. При этом наибольшее количество спермиев птиц с морфологическими аномалиями и в более короткий срок появляется в присутствии 1,2-ПД, ФА и 2,3-БД (табл. 2), несмотря на высокую подвижность спермиев индюка после введения, например ФА, которая сохраняется достаточно длительное время.

Одним из эффективных способов снижения цитотоксического действия криопротекторов на клетки является использование их композиций [6,8]. Такой способ позволяет снизить содержание отдельных криопротекторов в суспензии сперматозоидов, сохраняя при этом общую концентрацию смеси на уровне, необходимом для обеспечения криозащитной активности (не менее 1М). Состав композиции проникающих криопротекторов формируется с учетом разницы их физико-химических свойств (вязкость водных растворов, энергия водородной связи с молекулами воды и функциональными группами белков, способность к электростатическим и гидрофобным взаимодействиям). Немаловажное значение имеют механизм и скорость проницаемости криопротекторов через мембрану, отличающуюся между веществами разных химических классов (амиды, диолы) и в пределах одного класса

В табл. 3 и 4 представлены результаты исследования подвижности спермиев петуха и индюка во времени, их количества с морфологическими повреждениями под действием смесей криопротекторов (диол + амид, диол + диол) при температуре 20 и 4°C. Более высокая сохранность спермиев индюка наблюдалась в присутствии трех смесей: ДМФА + ЭГ, ФА + ЭГ и 1,2-ПД + ЭГ. Но следует признать, что достоверных отличий показателей жизнеспособности спермиев индюка под защитой смесей по сравнению с отдельными криопротекторами не обнаружено (табл. 1–4), вероятно потому, что оценка повреждающего действия смесей веществ проведена в более жестких условиях:

incubation at 20°C. For their determination we used the DSM probe, which did not practically affect the poultry spermatozoa viability. In 30 min after DSM introduction into the control the motility falls not more, than by 5%, that correlated with previous data for canine spermatozoa [4].

The poultry spermatozoa have a complicated morphology, heterogeneous cytoskeletal structure and a heterogeneous cytoplasmic membrane, differing by its composition and properties at various sites. For example, the lipids are non-uniformly distributed in different sites of spermatozoa membranes. Negatively charged phospholipids are mostly localised in an anterior part of plasma membrane of spermatozoon head, their number reduces in a neck area and is absent in a tail one. During DSM binding with spermatozoon cytoplasmic membrane there is observed a multicolour fluorescence: head is stained with a bright orange-yellow colour, the rest parts are green. DSM is known as a potential-dependent probe and is used for cell surface potential determination [3]. An orange-yellow colour of fowl and turkey spermatozoa heads testifies to a change in potential in the presence of all the cryoprotectants, excluding DMAC. In addition the DMAC introduction into spermatozoa suspension causes a sharp decrease in their size. This is evidently stipulated by cell dehydration under this cryoprotectant effect. DMAC is known to possess a high diffusion rate through a membrane and is referred to the osmotically inactive substances. Therefore it is more probable to assume the appearance of lipid pores both due to the defects, occurring under the effect of DMAC membrane tropicity and heat fluctuation in lipid bilayer.

As it proceeds from Table 2, the morphological damages, occurring in the presence of the studied cryoprotectants and increasing during incubation are typical for the fowl and turkey spermatozoa. At the same time the highest number of poultry spermatozoa with morphological abnormalities and in a shorter term appears in the presence of 1,2-PD, FA and 2,3-BD (Table 2), in spite of a high motility of turkey spermatozoa after introduction of FA, for example, which is preserved for quite a long time.

One of the efficient ways of cytotoxic effect decrease in cryoprotectants on cells is the usage of their compositions [6, 8]. Such a way enables to reduce the content of some cryoprotectants in spermatozoa suspension, thereby preserving the total concentration of mixture at the level, necessary for providing cryoprotective activity (not less, than 1 M). The content of penetrative cryoprotectant composition is formed taking into account the difference in their physical and chemical properties (viscosity of aqueous solutions, energy of hydrogen bond with water molecules and

Таблица 3. Зависимость сохранности спермиев птиц до замораживания от времени инкубации со смесью криопротекторов при 20°C (n = 6)

Table 3. Dependency of poultry spermatozoa integrity on incubation time with cryoprotectant mixture at 20°C (n = 6)

Смесь криопротекторов Mixture of cryoprotectants	Подвижность (%) через время, мин Motility (%) in time, min						Количество спермиев с морфологическими повреждениями, % Number of spermatozoa with morphological disorders, %	
	15	60	90	120	180	240	30 мин 30 min	60 мин 60 min
Спермии индюка Turkey sperm								
Контроль Control	90 ± 4	85 ± 4	75 ± 4	70 ± 4	60 ± 3	50 ± 3	14,2 ± 0,7	15,7 ± 0,8
ФА + ЭГ FA + EG	70 ± 5	65 ± 5	60 ± 4	50 ± 4	40 ± 3	15 ± 1	29,0 ± 2,0	34,3 ± 2,4
ДМФА + ЭГ DMFA + EG	75 ± 5	70 ± 5	65 ± 5	60 ± 4	50 ± 4	30 ± 2	26,3 ± 1,8	31,7 ± 2,2
ДМАЦ + ЭГ DMAC + EG	60 ± 6	55 ± 6	50 ± 5	40 ± 4	30 ± 3	15 ± 2	37,6 ± 3,8	40,0 ± 4,0
1,2-ПА + ЭГ 1,2-PD + EG	75 ± 5	70 ± 5	60 ± 4	60 ± 4	45 ± 3	30 ± 2	34,1 ± 2,4	38,6 ± 2,7
2,3-БД + ЭГ 2,3-BD + EG	60 ± 6	60 ± 6	50 ± 5	35 ± 4	30 ± 3	15 ± 2	39,8 ± 4,0	43,9 ± 4,4
1,2-ПА + ФА 1,2-PD + FA	50 ± 5	40 ± 4	35 ± 4	25 ± 3	20 ± 2	0	49,3 ± 4,9	55,9 ± 5,6
2,3-БД + ФА 2,3-BD + FA	70 ± 7	60 ± 6	55 ± 6	40 ± 4	25 ± 3	0	40,6 ± 4,0	47,5 ± 4,7
2,3-БД + ДМФА 2,3-BD + DMFA	60 ± 6	55 ± 6	40 ± 4	30 ± 3	20 ± 2	10 ± 1	41,4 ± 4,1	49,0 ± 4,9
2,3-БД + ДМАЦ 2,3-BD + DMAC	50 ± 5	40 ± 4	30 ± 3	25 ± 3	15 ± 2	0	56,3 ± 5,6	60,1 ± 6,0
ЭГ + 1,2-ПА + 2,3-БД EG + 1,2-PD + 2,3-BD	65 ± 7	55 ± 6	45 ± 5	40 ± 4	30 ± 3	20 ± 2	46,5 ± 4,6	50,2 ± 5,0
Спермии петуха Fowl sperm								
Контроль Control	95 ± 4	85 ± 4	80 ± 4	70 ± 4	60 ± 3	50 ± 3	12,7 ± 0,6	19,6 ± 1,0
ФА + ЭГ FA + EG	65 ± 7	60 ± 6	50 ± 5	40 ± 4	30 ± 3	20 ± 2	27,6 ± 2,8	38,8 ± 3,9
2,3-БД + ФА 2,3-BD + FA	55 ± 6	50 ± 5	40 ± 4	35 ± 4	20 ± 2	0	39,0 ± 3,9	48,1 ± 4,8
2,3-БД + ДМФА 2,3-BD + DMFA	70 ± 5	65 ± 5	60 ± 4	45 ± 3	35 ± 3	20 ± 2	29,8 ± 2,1	32,4 ± 2,3

Примечание: Соотношение веществ в двойных смесях 1:1, в тройной – 1: 1: 0,5. Общая концентрация 1 М.

Notes: Substance ratio in double mixtures is 1:1, and 1:1:0.5 in triple ones. Total concentration made 1M.

после предварительного хранения спермы птиц в течение 4 ч при температуре 4°C. Несмотря на это, со смесью ДМФА + ЭГ получены результаты, сравнимые по уровню сохранности спермиев индюка, наблюдаемые в присутствии отдельных криопротекторов, что позволяет считать перспективным использование указанной смеси при криоконсервировании спермы индюка.

На сперме петуха изучено повреждающее действие на клетки только трех комбинаций: ЭГ +

functional protein groups, capability for electrostatic and hydrophobic interactions). Of importance are the mechanism and rate of cryoprotectant permeability through a membrane, differing between the substances of various chemical classes (amides, diols) within one class.

In the Tables 3 and 4 there are summarised the results of study of fowl and turkey spermatozoa motility in time, their number with morphological damages under the effect of cryoprotectant mixtures (diol+amide,

Таблица 4. Зависимость сохранности спермиев птиц до замораживания от времени инкубации со смесью криопротекторов при 4°C (n = 6)

Table 4. Dependency of poultry spermatozoa integrity on incubation time with cryoprotectant mixture at 4°C (n = 6)

Смесь криопротекторов Mixture of cryoprotectants	Подвижность (%) через время, мин Motility (%) in time, min						Количество спермиев с морфологическими повреждениями, % Number of spermatozoa with morphological disorders, %	
	15	60	90	120	180	240	30 мин 30 min	60 мин 60 min
Спермии индюка Turkey sperm								
Контроль Control	90 ± 5	85 ± 4	80 ± 4	70 ± 4	60 ± 3	45 ± 2	11,2 ± 0,6	13,5 ± 0,7
ФА + ЭГ FA + EG	70 ± 5	70 ± 5	65 ± 5	55 ± 4	45 ± 3	20 ± 2	24,7 ± 1,7	30,0 ± 2,1
ДМФА + ЭГ DMFA + EG	75 ± 5	70 ± 5	70 ± 5	65 ± 5	50 ± 4	30 ± 2	23,0 ± 1,6	28,1 ± 2,0
ДМАЦ + ЭГ DMAC + EG	70 ± 7	60 ± 6	55 ± 6	50 ± 5	40 ± 4	20 ± 2	30,7 ± 3,1	32,4 ± 3,2
1,2-ПА + ЭГ 1,2-PD + EG	75 ± 5	70 ± 5	65 ± 5	60 ± 4	50 ± 4	30 ± 2	29,6 ± 2,1	31,5 ± 2,2
2,3-БД + ЭГ 2,3-BD + EG	65 ± 7	60 ± 6	50 ± 5	40 ± 4	35 ± 4	20 ± 2	34,5 ± 3,4	38,8 ± 3,9
1,2-ПА + ФА 1,2-PD + FA	70 ± 7	60 ± 6	40 ± 4	30 ± 3	25 ± 3	10 ± 1	42,3 ± 4,2	49,0 ± 4,9
2,3-БД + ФА 2,3-BD + FA	75 ± 8	65 ± 7	40 ± 4	35 ± 4	30 ± 3	10 ± 1	37,7 ± 3,8	43,1 ± 4,3
2,3-БД + ДМФА 2,3-BD + DMFA	65 ± 7	60 ± 6	60 ± 6	40 ± 4	25 ± 3	15 ± 2	38,9 ± 3,9	40,2 ± 4,0
2,3-БД + ДМАЦ 2,3-BD + DMAC	60 ± 6	55 ± 6	45 ± 5	30 ± 3	20 ± 2	10 ± 1	47,1 ± 4,7	53,2 ± 5,3
ЭГ + 1,2-ПА + 2,3-БД EG + 1,2-PD + 2,3-BD	70 ± 7	60 ± 6	50 ± 5	40 ± 4	30 ± 3	15 ± 2	39,7 ± 4,0	46,4 ± 4,6
Спермии петуха Fowl sperm								
Контроль Control	95 ± 4	90 ± 5	85 ± 4	85 ± 4	70 ± 4	60 ± 3	10,1 ± 0,5	11,6 ± 0,6
ФА + ЭГ FA + EG	60 ± 6	60 ± 6	55 ± 6	40 ± 4	35 ± 4	25 ± 3	25,1 ± 2,5	36,2 ± 3,6
2,3-БД + ФА 2,3-BD + FA	60 ± 6	50 ± 5	45 ± 5	35 ± 4	30 ± 3	20 ± 2	34,0 ± 3,4	43,2 ± 4,3
2,3-БД + ДМФА 2,3-BD + DMFA	80 ± 6	75 ± 5	65 ± 5	50 ± 4	35 ± 3	20 ± 2	26,3 ± 1,8	29,4 ± 2,1

Примечание: Соотношение веществ в двойных смесях 1:1, в тройной – 1: 1: 0,5. Общая концентрация 1 М.

Notes: Substance ratio in double mixtures is 1:1, and 1:1:0.5 in triple ones. Total concentration made 1M.

ФА, 2,3-БД + ФА и 2,3-БД + ДМФА, так как цитотоксичность и криозащитная активность смесей на основе амид + диол детально исследованы [6, 8]. Получены удовлетворительные данные оплодотворяемости, выводимости и вывода молодняка после осеменения кур деконсервированной спермой. Из трех изученных смесей более высокую подвижность и морфологическую сохранность сперматозоидов петуха при принятых условиях

diol+diol) at 20 and 4°C. Higher integrity of turkey spermatozoa was observed in the presence of three mixtures: DMFA+EG, FA+EG and 1,2-PD+EG. However it should be admitted, that no statistically significant differences of viability indices of turkey spermatozoa under protection of mixtures compared to some cryoprotectants were revealed (Tables 1–4), probably, due to harder conditions: after preliminary storage of poultry spermatozoa within 4 hrs at 4°C. In

эксперимента наблюдали в присутствии 2,3-БД + ДМФА.

Выводы

Проведенные исследования показали, что спермии индюка более чувствительны к действию изученных веществ на этапе подготовки к замораживанию по сравнению со спермиями петуха. Поэтому следует сократить до минимума время инкубации спермиев индюка (не более 15 мин) с криопротекторами при положительных температурах (не выше 4°C).

По степени увеличения негативного действия амидов и диолов на спермии петуха изученные вещества расположились в ряд: ДМФА > ЭГ > ДМАЦ > 1,2-ПД > 2,3-БД > ФА; на спермии индюка: ЭГ > ДМФА > ДМАЦ = 1,2-ПД = ФА > 2,3-БД.

Наименьшее цитотоксическое действие на спермии индюка до замораживания наблюдается в присутствии смеси криопротекторов ДМФА + ЭГ, на спермии петуха – ДМФА + 2,3-БД с общей концентрацией 1М при соотношении веществ 1:1.

Литература

1. Белоусов В.П., Панов М.Ю. Термодинамика водных растворов неэлектролитов. – Л.: Химия, 1983. – 265 с.
2. Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Д., Тупс Э. Органические растворители. – М.: Химия, 1968. – 1450 с.
3. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
4. Дюбко Т.С., Егоров М.И., Линник Т.П. и др. Флуоресцентные зонды для исследования сперматозоидов в криозащитных средах // Цитология. – 2007. – Т. 49, №6. – С. 521–526.
5. Карапетян Ю.А., Энчис В.Н. Физико-химические свойства электролитных неводных растворов. – М.: Химия, 1989. – 252 с.
6. 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, №1. – С. 42–49.
7. Линник Т.П. Амиды алифатических кислот – эффективные криопротекторы. I. Физико-химические свойства соединений ряда амидов // Пробл. криобиологии. – 1998. – №3. – С. 21–28.
8. Линник Т.П. Фізико-хімічні фактори кріопшкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Харків, 2003. – 36 с.
9. Пичугин Ю.И., Новиков А.Н., Линник Т.П. Зависимость цитотоксичности и криопротекторной активности диолов от их структуры и физико-химических свойств. II. Криоконсервирование спермы карпа // Сб. научных трудов "Криоконсервирование клеток и тканей". – Харьков, 1989. – С. 15–28.
10. Fahy G. M., Lilley T. H., Lindsell H. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of

spite of this fact, with DMFA+EG mixture there were obtained the results, comparable by the level of turkey spermatozoa integrity, observed in the presence of some cryoprotectants, that enables considering to be perspective the usage of the mentioned mixture for turkey sperm cryopreservation.

In fowl sperm there was studied a damaging effect on cells of only three combinations: EG+FA, 2,3-BD+FA and 2,3-BD+DMFA, since the cytotoxicity and cryoprotective activity of mixtures on the base of amide+diol have been studied in details [6, 8]. Satisfactory data of hatchability and hatching of young birds after hen insemination with frozen-thawed sperm, were obtained. From the three studied mixtures a higher motility and morphological integrity of fowl spermatozoa under the accepted experimental conditions were observed in the presence of 2,3-BD+DMFA.

Conclusions

The research performed demonstrated the turkey spermatozoa to be more sensitive to the effect of studied substances at a preparative stage to freezing, compared to the fowl ones. Therefore the incubation time for turkey spermatozoa should be reduced to the minimum (not more than 15 min) with cryoprotectants at positive temperatures (not higher than 4°C).

By the degree of negative effect increase of amides and diols on fowl spermatozoa the studied substances are placed in the series: DMFA > EG > DMAC > 1,2-PD > 2,3-BD > FA; as for turkey there is: EG > DMFA > DMAC = 1,2-PD = FA > 2,3-BD.

The lowest cytotoxic effect on turkey and fowl spermatozoa prior to freezing was observed in the presence of DMFA + EG and DMFA + 2,3-BD mixtures, correspondingly, with 1 M total concentration under 1:1 ratio.

References

1. Belousov V.P., Panov M. Yu. Thermodynamics of non-electrolyte aqueous solutions. – Leningrad: Khimiya, 1983. – 265 p.
2. Waisberger A., Proskauer E., Riddik J., Tups E. Organic solvents. – Moscow: Khimiya, 1968. – 1450p.
3. Dobretsov G.E. Fluorescent probes in studying cells, membranes and lipoproteins. – Moscow: Nauka, 1989. – 277 p.
4. Dyubko T.S., Egorov M.I., Linnik T.P. et al. Fluorescent probes to study spermatozoa in cryoprotective media // Tsitologiya. – 2007. – Vol. 49, N6. – P. 521–526.
5. Karapetyan Yu.A., Enchis V.N. Physical and chemical properties of electrolyte non-aqueous solutions. – Moscow: Khimiya, 1989. – 252 p.
6. Linnik T.P., Bizikina O.V. Cytotoxicity and cryoprotective activity of diols, amides and their mixtures under fowl sperm cryopreservation // Biofizika Zhivoj Kletki. – 2003. – Vol. 7, N1. – P. 42–49.
7. Linnik T.P. Amides of the aliphatic acids are effective cryoprotectants. I. Physical-chemical properties of the

- molecular mechanisms // *Cryobiology*. – 1990.– Vol. 27, N3.– P. 247–268.
11. *Hammerstedt R.N., Graham J. K.* Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol // *Cryobiology*. – 1992. – Vol. 29, N1.– P. 26-38.
 12. *Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B.* Cryopreservation of poultry semen // *Brit. Poultry Sci.*– 1995.– Vol. 36, N5.– P. 805–811.
 13. *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, N6.– P. 871–891.
 14. *Wishart G.J.* The cryopreservation of germplasm in domestic and non-domestic birds // *Cryobanking the genetic resource* / Eds.: P.F. Watson and W.V. Holt.– London, 2001.– P.181–200.
- Поступила 10.11.2009*
Рецензент М.П. Петрушко
8. *Linnik T.P.* Physical and chemical factors of cryodamages and cryoprotection of fowl spermatozoa in low temperature preservation cycle: Author's abstract of thesis of doctor of biol. sciences.– Kharkiv, 2003.– 36 p.
 9. *Pichugin Yu.I., Novikov A.N. Linnik T.P.* Dependency of cytotoxicity and cryoprotective activity of diols on their structure and physical-chemical properties. II. Carp sperm cryopreservation // *Collection of Scientific Papers "Cell and tissue cryopreservation"*.—Kharkov, 1989.– P. 15–28.
 10. *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.
 11. *Hammerstedt R.N., Graham J. K.* Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol // *Cryobiology*. – 1992. – Vol. 29, N1.– P. 26-38.
 12. *Tselutin K., Narubina L., Mavrodina T., Tur B.* Cryopreservation of poultry semen // *Brit. Poultry Sci.*– 1995.– Vol. 36, N5.– P. 805–811.
 13. *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, N6.– P. 871–891.
 14. *Wishart G.J.* The cryopreservation of germplasm in domestic and non-domestic birds // *Cryobanking the genetic resource* / Eds.: P.F. Watson and W.V. Holt.– London, 2001.– P.181–200.

Accepted in 10.11.2009