

## СРАВНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЗЕАРАЛЕНОНА И ТОКСИНА Т-2 НА ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЛОШАДЕЙ И БЫКОВ IN VITRO ДО И ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

© А. В. Ткачев,<sup>1</sup> О. Л. Ткачева

Национальный фармацевтический университет, Харьков, 61002, Украина;

<sup>1</sup>электронный адрес: sasha\_sashaola@mail.ru

Представлены результаты исследований цитотоксического действия зеараленона и токсина Т-2 на сперматозоиды лошадей и быков при инкубации и после оттаивания по Харьковской технологии получения и криоконсервирования спермы. Впервые показано токсическое влияние *in vitro* зеараленона и токсина Т-2 в различных концентрациях (от 0.5 до 0.01 мМ) на целостность мембран, а также на биологические показатели сперматозоидов лошадей и быков до и после заморозки и размораживания. Показано, что при добавлении 0.5 мМ зеараленона биологическая активность нативных спермиев через 1 ч не изменялась, а после размораживания спермиев снижалась на 19.4 % или на 0.69 балла ( $P < 0.01$ ) в сравнении с контролем. Токсин Т-2 в концентрации 0.5 мМ через 1 ч снижал биологическую активность нативных спермиев на 0.59 балла ( $P < 0.01$ ), а после размораживания уменьшал ее на 60.28 %, или на 2.14 балла ( $P < 0.001$ ). Зеараленон в концентрации 0.25 мМ за 1 ч действия не влиял на активность нативной спермы, но активность спермиев после размораживания ухудшалась на 12.2 %, или на 0.41 балла ( $P < 0.05$ ). Токсин Т-2 в концентрации 0.25 мМ снижал активность нативной спермы через 1 ч действия на 0.46 балла ( $P < 0.05$ ), а после размораживания спермиев ухудшал ее на 1.77 балла ( $P < 0.001$ ) в сравнении с контролем. Наименьшей концентрацией токсина Т-2, дающей снижение показателей спермы, оказалась 0.01 мМ. Негативное влияние зеараленона в такой дозе на нативную сперму отсутствовало, а спермии после размораживания лишь незначительно снижали активность и переживаемость (на 0.09 балла и 0.27 ч соответственно). При одновременном добавлении зеараленона и токсина Т-2 в одинаковой дозе по 0.01 мМ биологическая переживаемость и абсолютный показатель переживаемости нативной спермы снижались на 0.36 балла и 0.64 ч ( $P < 0.05$ ) соответственно.

Ключевые слова: микотоксины, зеараленон, токсин Т-2, цитотоксическое действие, сперматозоиды, лошадь, бык.

Принятые сокращения: АПП — абсолютный показатель переживаемости.

В последние годы в мире появляется все больше публикаций о снижении репродуктивной функции как людей, так и у животных (Luconi et al., 1999, 2004; Tesarik et al., 2000; Tsakmakidis et al., 2006). В разных странах мира каждая 3—5-я семейная пара вынуждена прибегать к услугам клиники репродуктивной медицины с целью рождения ребенка. При этом клиники репродуктивной медицины сталкиваются с теми же проблемами, что и животноводство, — со снижением эффективности криоконсервирования спермы (Ronquist, Brody, 1985; Milano et al., 1991; Sousa et al., 2002; Савченкова и др., 2016). Снижение эффективности криоконсервирования спермы человека и животных может быть вызвано наличием даже допустимого уровня микотоксинов в пищевых продуктах для людей и в кормах для животных (Диаз, 2006; Ткачев, 2015а).

Одним из факторов, который может снижать биологические показатели сперматозоидов, может быть влияние допустимых концентраций микотоксинов корма при длительном хроническом токсикозе, который проходит без выраженных клинических признаков (Диаз, 2006; Ткачев, 2014а). Группой исследователей еще в 1994 г.

было доказано, что при длительном поступлении в организм лошадей корма, содержащего зеараленон в допустимых концентрациях, происходило его накопление в тканях простаты, семенниках, яичниках у самок, почках, гипоталамусе и выделение с мочой в количестве до 7 мМ (Erasmuson et al., 1994). Отсюда велика вероятность попадания большого количества микотоксинов в сперму при эякуляции, что может снижать биотехнологическую пригодность спермиев к криоконсервированию (Ткачев, 2013б). В 2011 г. итальянские исследователи доказали негативное влияние зеараленона и его производных на акросомную реакцию и показатели подвижности свежеполученных спермиев жеребца *in vitro* (Filannino et al., 2011). Еще раньше негативный эффект микотоксинов *in vitro* был показан на сперме баранов и хряков (Farnworth, Trenholm, 1983). В 2001 г. в США регистрировались массовые аборт у кобыл между 40 и 100 сут жеребости; причиной оказалось поступление с кормом в организм кобыл зеараленона в допустимых дозах в течение более 2 нед, и ущерб составил 336 млн долларов США (Диаз, 2006). Все вышеизложенное подтверждает недостаточную изученность влияния микотоксинов *in vitro* на био-

логические показатели сперматозоидов лошадей, быков и других животных после криоконсервирования и необходимость проведения таких исследований.

Учитывая высокую контаминацию зерна пшеницы, ячменя, кукурузы и других микотоксинами (Ткачев, 2014б), негативное влияние микотоксинов корма на гормональный и цитогенетический статус животных и людей (Arvidson et al., 1989; Carlini et al., 1997; Francavilla et al., 2003; Lukoseviciute et al., 2007; Ткачев, 2015б), а также низкую криорезистентность сперматозоидов (Graham, 1996), необходимо установить минимальные концентрации микотоксинов, которые негативно влияют на биологические показатели половых клеток лошадей, быков и других животных.

В животноводстве России, Украины, стран СНГ и мира также прослеживается резкое снижение воспроизводительных качеств самцов и самок сельскохозяйственных животных. Например, в наших предыдущих работах было показано, что количество фактически родившихся жеребят на 100 кобыл в среднем по всей отрасли коневодства Украины не превышает 50. Это привело к тому, что в настоящее время на Украине только 3 породы имеют достаточное количество племенного воспроизводительного поголовья из 12 официально зарегистрированных (Ткачев, 2013а). Поэтому первостепенной научно-практической задачей биологии репродукции является повышение выхода молодняка за счет более широкого применения размороженной спермы высокоценных производителей, которая сдерживается низкой биотехнологической пригодностью размороженной спермы жеребцов. Известно, что до половины производителей как на Украине, так и в мире дают биотехнологически пригодную сперму, которая либо погибает в процессе замораживания—оттаивания, либо теряет оплодотворяющую способность после деконсервации (Magistrini et al., 1996; Casey et al., 1997; Mottershead, 2000; Katila, 2001; Ткачев, 2013а).

Среди микотоксинов наиболее опасными для репродуктивной функции животных и людей являются зеараленон и токсин Т-2. Зеараленон ( $C_{18}H_{22}O_5$ , мол. масса 318.36) является микотоксином нестероидной природы, который вырабатывается плесневыми грибами рода *Fusarium*, оказывает эстрогенное действие на организм человека и животных, провоцируя аборт, бесплодие, гинекомастию, возникновение опухолей молочных желез. Токсин Т-2 ( $C_{24}H_{34}O_8$ , мол. масса 466.52) является высокотоксичным трихотетеновым микотоксином, вырабатывается теми же грибами (род *Fusarium*), при попадании в организм человека провоцирует развитие алиментарной токсической алейкии и полиорганные патологии и в некоторых исторических событиях применялся в качестве биологического оружия, так называемый желтый дождь (Filannino et al., 2011).

Цель настоящей работы — исследовать *in vitro* цитотоксическое действие зеараленона и токсина Т-2 в различных дозах, снижающее криорезистентность сперматозоидов лошадей и быков по Харьковской технологии криоконсервирования спермы.

## Материал и методика

Работу проводили на Украине на разделенных эякулятах 3 жеребцов-производителей бельгийской породы, 3 жеребцов-производителей украинской верховой поро-

ды и 3 быков черно-пестрой породы. Получение, криоконсервирование спермы жеребцов и быков проводили по разработанной нами Харьковской технологии (Ткачев, 2013а). Принципиальными отличиями Харьковской технологии криоконсервирования спермы от других являются применение экспериментального устройства для двухэтапного замораживания с возможностью экспедиционной работы и большой объем спермодозы (4—5, а не 0.25—0.50 мл, как в западноевропейских технологиях). Эякуляты получали 2 раза в неделю. После получения и перед криоконсервированием в состав разбавителя для спермы вводили зеараленон (Sigma, США) и (или) токсин Т-2 (Sigma, США) в концентрации от 0.50 до 0.01 мМ. Для этого каждый эякулят делили на 4 равные части. Первая часть служила контролем, во вторую добавляли зеараленон, в третью — токсин Т-2, в четвертую — зеараленон и токсин Т-2 одновременно в равных дозах. Затем проводили сравнение данных, полученных на нативной свежеразбавленной и на размороженной сперме. В качестве разбавителя для спермы использовали раствор по рецепту SMED (100 мл дистиллированной воды, 37 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 0.07 мМ  $KH_2PO_4$ , 35.7 мМ  $NaHCO_3$ , 2.4 мМ  $MgSO_4$ , 10 мМ HEPES, 1.7 мМ  $CaCl_2$ , 84.3 мМ фруктозы, 5.5 мМ глюкозы и 0.3 г бычьего сывороточного альбумина, pH 7.2), а при замораживании в этот разбавитель добавляли проникающий криопротектор глицерин (Sigma, США) до 7 % от конечного объема разбавителя. На нативной (свежеполученной) и размороженной сперме с помощью общепринятых методик (ГОСТ 20909.4-75; ГОСТ 24168-80; ГОСТ 26030-83) (Filannino et al., 2011; Ткачев, 2013б) определяли основные показатели, общепринятые в биологии репродукции животных. Активность спермиев определяли визуально под световым микроскопом Jenaval (Германия) в баллах (1 балл равен 10 % живых сперматозоидов с прямолинейно-поступательным движением) при увеличениях объектива 10× и 20×; переживаемость спермиев определяли в часах в термостате при 37 °С. Это один из важнейших биологических показателей, по которому можно предполагать результативность осеменения; снижение активности спермиев в термостате до 0.5 балла (до 5 %) являлось завершающим моментом определения переживаемости; абсолютный показатель переживаемости (АПП, расчетная величина в усл. ед.) более объективно характеризует сохранение сперматозоидами своей активности во время переживания в термостате рассчитывали по общепринятой формуле государственных стандартов. Разрушение акросом сперматозоидов под действием микотоксинов после криоконсервирования изучали с помощью светового микроскопа Jenaval (Германия) при увеличении объектива 100×.

Статистическую обработку данных осуществляли общепринятыми методиками (Плохинский, 1969), а также с применением специализированной программы SPSS for Windows.

## Результаты

Для установления минимальных доз микотоксинов, которые могут снижать основные биологические показатели сперматозоидов лошадей при криоконсервировании, изучено влияние *in vitro* зеараленона и токсина Т-2 на количественные и качественные показатели нативных и размороженных спермиев на разделенных эякулятах ло-

Цитотоксическое действие зearаленона (Z) и токсина Т-2 на нативные и размороженные сперматозоиды лошадей

Токсин и его концентрация, мМ	Показатель		
	активность, баллы	переживаемость, ч	АПП, усл. ед.
<b>Нативные спермии</b>			
Z, 0.01	5.91 ± 0.09 (5.91 ± 0.09)	5.18 ± 0.12 (5.18 ± 0.12)	14.91 ± 0.09 (14.91 ± 0.09)
Z, 0.05	5.82 ± 0.12 (5.82 ± 0.12)	5.18 ± 0.12 (5.18 ± 0.12)	14.64 ± 0.15 (14.91 ± 0.09)
Z, 0.10	5.91 ± 0.09 (5.91 ± 0.09)	4.91 ± 0.09 (5.09 ± 0.09)	14.55 ± 0.13 (14.82 ± 0.10)
Z, 0.25	5.73 ± 0.14 (5.73 ± 0.14)	4.64 ± 0.20 <sup>a</sup> (5.18 ± 0.12)	14.41 ± 0.13 <sup>б</sup> (14.86 ± 0.07)
Z, 0.50	5.91 ± 0.09 (5.82 ± 0.12)	4.55 ± 0.21 <sup>a</sup> (5.09 ± 0.09)	14.32 ± 0.12 <sup>б</sup> (14.77 ± 0.08)
T-2, 0.01	5.64 ± 0.15 (5.91 ± 0.09)	4.91 ± 0.09 (5.18 ± 0.12)	14.45 ± 0.16 <sup>a</sup> (14.91 ± 0.09)
T-2, 0.05	5.41 ± 0.09 <sup>a</sup> (5.82 ± 0.12)	4.64 ± 0.15 <sup>a</sup> (5.18 ± 0.12)	11.91 ± 0.21 <sup>б</sup> (14.91 ± 0.09)
T-2, 0.10	5.45 ± 0.16 <sup>a</sup> (5.91 ± 0.09)	4.45 ± 0.16 <sup>б</sup> (5.09 ± 0.09)	11.00 ± 0.24 <sup>б</sup> (14.82 ± 0.10)
T-2, 0.25	5.27 ± 0.12 <sup>б</sup> (5.73 ± 0.14)	4.00 ± 0.13 <sup>б</sup> (5.18 ± 0.12)	10.55 ± 0.11 <sup>б</sup> (14.86 ± 0.07)
T-2, 0.50	5.23 ± 0.10 <sup>б</sup> (5.82 ± 0.12)	3.91 ± 0.16 <sup>б</sup> (5.09 ± 0.09)	10.41 ± 0.06 <sup>б</sup> (14.77 ± 0.08)
Z + T-2 (по 0.01)	5.55 ± 0.16 (5.91 ± 0.09)	4.73 ± 0.14 <sup>a</sup> (5.18 ± 0.12)	14.27 ± 0.24 <sup>a</sup> (14.91 ± 0.09)
Z + T-2 (по 0.05)	5.27 ± 0.10 <sup>б</sup> (5.82 ± 0.12)	3.91 ± 0.09 <sup>б</sup> (5.18 ± 0.12)	10.05 ± 0.13 <sup>б</sup> (14.91 ± 0.09)
Z + T-2 (по 0.10)	5.18 ± 0.18 <sup>б</sup> (5.91 ± 0.09)	3.55 ± 0.16 <sup>б</sup> (5.09 ± 0.09)	9.14 ± 0.14 <sup>б</sup> (14.82 ± 0.10)
Z + T-2 (по 0.25)	5.09 ± 0.16 <sup>б</sup> (5.73 ± 0.14)	3.18 ± 0.18 <sup>б</sup> (5.18 ± 0.12)	8.77 ± 0.08 <sup>б</sup> (14.86 ± 0.07)
Z + T-2 (по 0.50)	4.91 ± 0.09 <sup>б</sup> (5.82 ± 0.12)	3.09 ± 0.16 <sup>б</sup> (5.09 ± 0.09)	8.68 ± 0.08 <sup>б</sup> (14.77 ± 0.08)
<b>Спермии после замораживания—оттаивания</b>			
Z, 0.01	3.82 ± 0.12 (3.91 ± 0.09)	3.91 ± 0.09 (4.18 ± 0.12)	13.14 ± 0.21 (13.21 ± 0.17)
Z, 0.05	3.45 ± 0.16 <sup>a</sup> (3.91 ± 0.09)	3.64 ± 0.15 <sup>a</sup> (4.09 ± 0.09)	10.05 ± 0.33 <sup>б</sup> (13.32 ± 0.14)
Z, 0.10	3.27 ± 0.14 <sup>б</sup> (3.82 ± 0.12)	3.55 ± 0.16 <sup>б</sup> (4.18 ± 0.12)	7.41 ± 0.25 <sup>б</sup> (13.05 ± 0.11)
Z, 0.25	2.95 ± 0.05 <sup>б</sup> (3.36 ± 0.15)	3.00 ± 0.13 <sup>б</sup> (4.09 ± 0.09)	6.59 ± 0.11 <sup>б</sup> (12.18 ± 0.27)
Z, 0.50	2.86 ± 0.10 <sup>б</sup> (3.55 ± 0.16)	2.82 ± 0.18 <sup>б</sup> (3.91 ± 0.16)	6.45 ± 0.08 <sup>б</sup> (12.05 ± 0.24)
T-2, 0.01	3.45 ± 0.45 <sup>a</sup> (3.91 ± 0.09)	3.64 ± 0.15 <sup>a</sup> (4.18 ± 0.12)	10.32 ± 0.10 <sup>б</sup> (13.21 ± 0.17)
T-2, 0.05	2.27 ± 0.14 <sup>б</sup> (3.91 ± 0.09)	2.73 ± 0.14 <sup>б</sup> (4.09 ± 0.09)	5.32 ± 0.18 <sup>б</sup> (13.32 ± 0.14)
T-2, 0.10	1.73 ± 0.12 <sup>б</sup> (3.82 ± 0.12)	2.41 ± 0.15 <sup>б</sup> (4.18 ± 0.12)	4.23 ± 0.21 <sup>б</sup> (13.05 ± 0.11)
T-2, 0.25	1.59 ± 0.11 <sup>б</sup> (3.36 ± 0.15)	1.95 ± 0.05 <sup>б</sup> (4.09 ± 0.09)	3.73 ± 0.10 <sup>б</sup> (12.18 ± 0.27)
T-2, 0.50	1.41 ± 0.06 <sup>б</sup> (3.55 ± 0.16)	1.86 ± 0.07 <sup>б</sup> (3.91 ± 0.16)	3.59 ± 0.09 <sup>б</sup> (12.05 ± 0.24)
Z + T-2 (по 0.01)	3.36 ± 0.15 <sup>a</sup> (3.91 ± 0.09)	3.55 ± 0.16 <sup>б</sup> (4.18 ± 0.12)	10.09 ± 0.06 <sup>б</sup> (13.21 ± 0.17)
Z + T-2 (по 0.05)	1.50 ± 0.12 <sup>б</sup> (3.91 ± 0.09)	1.73 ± 0.12 <sup>б</sup> (4.09 ± 0.09)	3.45 ± 0.16 <sup>б</sup> (13.32 ± 0.14)
Z + T-2 (по 0.10)	0.95 ± 0.08 <sup>б</sup> (3.82 ± 0.12)	1.41 ± 0.11 <sup>б</sup> (4.18 ± 0.12)	2.77 ± 0.16 <sup>б</sup> (13.05 ± 0.11)
Z + T-2 (по 0.25)	0.77 ± 0.08 <sup>б</sup> (3.36 ± 0.15)	1.18 ± 0.12 <sup>б</sup> (4.09 ± 0.09)	2.09 ± 0.15 <sup>б</sup> (12.18 ± 0.27)
Z + T-2 (по 0.50)	0.59 ± 0.06 <sup>б</sup> (3.55 ± 0.16)	1.09 ± 0.09 <sup>б</sup> (3.91 ± 0.16)	1.86 ± 0.07 <sup>б</sup> (12.05 ± 0.24)

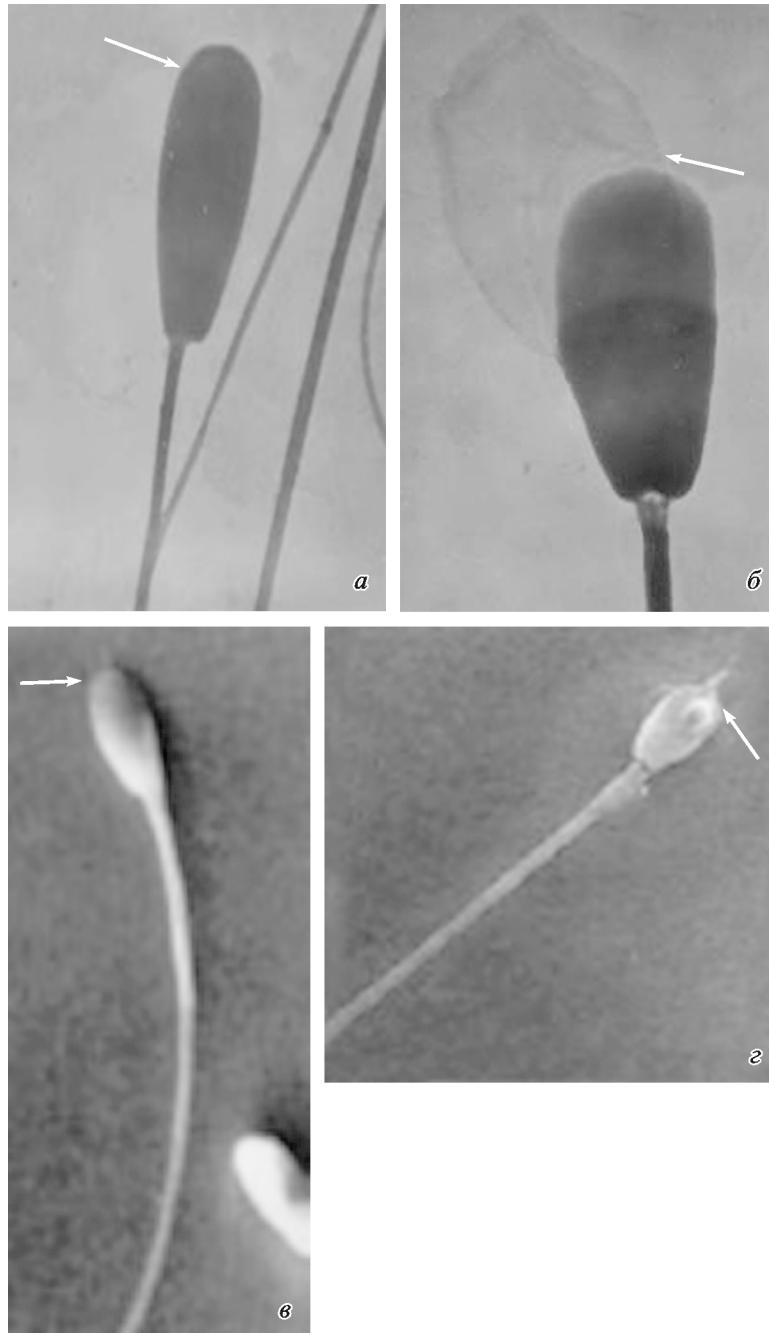
Примечание. Здесь и в табл. 1 и 2 даны средние значения и их ошибки (n = 11); в скобках для каждого эксперимента даны контрольные величины. АПП — абсолютный показатель переживаемости; различия с контролем достоверны при: <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>б</sup>P < 0.01, <sup>в</sup>P < 0.001.

шадей. Данные представлены в табл. 1. Было установлено, что при добавлении в состав разбавителя спермы 0.5 мМ зearаленона активность нативных спермиев через 1 ч после его добавления не изменялась, а активность спермиев после оттаивания снижалась на 0.69 балла (P < 0.01) в сравнении с контролем. В то же время переживаемость нативной спермы уменьшалась на 0.54 (P < 0.05), а размороженной — на 1.09 ч (P < 0.001). АПП нативных сперматозоидов уменьшался на 0.45 (P < 0.01), размороженной — на 5.6 усл. ед. (P < 0.001). Токсин Т-2 в концентрации 0.5 мМ снижал активность нативной спермы через 1 ч на 0.59 балла (P < 0.01), а активность спермиев после деконсервирования уменьшалась на 2.14 балла (P < 0.001) в сравнении с контролем; переживаемость нативных сперматозоидов лошадей снижалась на 1.18 (P < 0.05), а после размораживания — на 2.05 ч

(P < 0.001); добавление в состав разбавителя токсина Т-2 способствовало снижению АПП нативных спермиев на 6.09 (P < 0.001), а после размораживания — на 10.19 усл. ед. (P < 0.001).

При одновременном добавлении в разбавитель по 0.5 мМ зearаленона и токсина Т-2 перед замораживанием происходило снижение активности нативной спермы через 1 ч на 0.91 (P < 0.001), а размороженной — на 2.9 балла (P < 0.001) в сравнении с контролем. Переживаемость нативной спермы уменьшилась на 2 (P < 0.001), размороженной — на 2.82 ч (P < 0.001). АПП нативной спермы снизился на 6.09 (P < 0.001), размороженной — на 10.19 усл. ед. (P < 0.001).

Зearаленон в концентрации 0.25 мМ в составе разбавителя в течение 1 ч не влиял на активность нативных сперматозоидов, но при этом активность после заморажи-



Спермии жеребца (а, б) и быка (в, г) после размораживания. Световая микроскопия.

а, в — контроль (без токсинов); б, г — измененная форма головки и разрушенная акросома спермиев (стрелка), в среду которых перед замораживанием добавляли по 0.5 мМ зеараленона и токсина Т-2. Об. 100×.

вания—оттаивания уменьшалась на 0.41 балла ( $P < 0.05$ ) в сравнении с контролем. Переживаемость нативных спермиев снижалась на 0.54, а размороженных — на 0.41 ч ( $P < 0.001$ ). АПП нативных сперматозоидов снижался на 0.45 ( $P < 0.01$ ), а размороженных — на 5.59 усл. ед. ( $P < 0.001$ ). Т-2 в концентрации 0.25 мМ снижал активность нативной спермы за 1 ч на 0.46 балла ( $P < 0.05$ ), при этом активность после деконсервации ухудшалась на 1.77 балла ( $P < 0.001$ ) в сравнении с контролем. Переживаемость нативных спермиев уменьшалась на 1.18 ( $P < 0.001$ ), размороженных — на 2.14 ч ( $P < 0.001$ ). АПП нативных сперматозоидов ухудшился на 4.31 ( $P < 0.001$ ), а размороженных — на 8.45 усл. ед. ( $P < 0.001$ ).

При одновременном добавлении в разбавитель по 0.25 мМ зеараленона и токсина Т-2 активность нативной спермы за 1 ч ухудшалась на 0.64 ( $P < 0.01$ ), а активность после размораживания снижалась на 2.59 балла ( $P < 0.001$ ) в сравнении с контролем. При этом переживаемость нативной спермы ухудшилась на 2 ч ( $P < 0.001$ ), а размороженной — на 2.91 ч ( $P < 0.001$ ). АПП нативных сперматозоидов снижался на 6.09 ( $P < 0.001$ ), а размороженных — на 10.09 усл. ед. ( $P < 0.001$ ).

При уменьшении дозы зеараленона до 0.1 мМ перед замораживанием активность нативной свежеразбавленной спермы в течение 1 ч не ухудшалась, а активность спермиев после размораживания снижалась на



Цитотоксическое действие зеараленона (Z) и токсина Т-2 на нативные и размороженные сперматозоиды быков

Токсин и его концентрация, мМ	Показатель		
	активность, баллы	переживаемость, ч	АПП, усл. ед.
Нативные спермии			
Z, 0.01	8.10 ± 0.18 (8.10 ± 0.18)	8.30 ± 0.15 (8.30 ± 0.15)	42.00 ± 0.45 (42.00 ± 0.45)
Z, 0.05	7.90 ± 0.10 (7.90 ± 0.10)	8.20 ± 0.13 (8.20 ± 0.13)	40.40 ± 0.40 (40.40 ± 0.40)
Z, 0.10	7.30 ± 0.15 (7.30 ± 0.15)	9.10 ± 0.10 (9.10 ± 0.10)	39.45 ± 0.43 (39.45 ± 0.43)
Z, 0.25	7.80 ± 0.13 (7.80 ± 0.13)	7.80 ± 0.13 (7.80 ± 0.13)	40.40 ± 0.40 (40.40 ± 0.40)
Z, 0.50	6.10 ± 0.07 (6.20 ± 0.13)	7.80 ± 0.13 (7.80 ± 0.13)	31.40 ± 0.07 (31.40 ± 0.07)
T-2, 0.01	8.00 ± 0.21 (8.10 ± 0.18)	7.50 ± 0.22 <sup>b</sup> (8.30 ± 0.15)	40.00 ± 0.52 <sup>b</sup> (42.00 ± 0.45)
T-2, 0.05	7.60 ± 0.16 (7.90 ± 0.10)	6.90 ± 0.01 <sup>b</sup> (8.20 ± 0.13)	36.40 ± 0.30 <sup>b</sup> (40.40 ± 0.40)
T-2, 0.10	6.40 ± 0.16 <sup>a</sup> (7.30 ± 0.15)	6.30 ± 0.15 <sup>b</sup> (9.10 ± 0.10)	22.60 ± 0.12 <sup>b</sup> (39.45 ± 0.43)
T-2, 0.25	6.80 ± 0.02 <sup>a</sup> (7.80 ± 0.13)	6.90 ± 0.13 <sup>b</sup> (7.80 ± 0.13)	23.40 ± 0.27 <sup>b</sup> (40.40 ± 0.40)
T-2, 0.50	5.60 ± 0.07 <sup>a</sup> (6.20 ± 0.13)	5.80 ± 0.10 <sup>b</sup> (7.80 ± 0.13)	16.60 ± 0.07 <sup>b</sup> (31.40 ± 0.07)
Z + T-2 (по 0.01)	5.40 ± 0.07 <sup>a</sup> (8.10 ± 0.18)	7.60 ± 0.22 <sup>a</sup> (8.30 ± 0.15)	40.40 ± 0.58 <sup>a</sup> (42.00 ± 0.45)
Z + T-2 (по 0.05)	7.60 ± 0.16 (7.90 ± 0.10)	6.50 ± 0.01 <sup>b</sup> (8.20 ± 0.13)	35.90 ± 0.10 <sup>b</sup> (40.40 ± 0.40)
Z + T-2 (по 0.10)	7.30 ± 0.15 (7.30 ± 0.15)	6.80 ± 0.13 <sup>b</sup> (9.10 ± 0.10)	25.50 ± 0.18 <sup>b</sup> (39.45 ± 0.43)
Z + T-2 (по 0.25)	7.10 ± 0.15 <sup>a</sup> (7.80 ± 0.13)	6.20 ± 0.13 <sup>b</sup> (7.80 ± 0.13)	20.20 ± 0.13 <sup>b</sup> (40.40 ± 0.40)
Z + T-2 (по 0.50)	5.40 ± 0.07 <sup>a</sup> (6.20 ± 0.13)	5.00 ± 0.00 <sup>b</sup> (7.80 ± 0.13)	15.50 ± 0.11 <sup>b</sup> (31.40 ± 0.07)
Спермии после замораживания—оттаивания			
Z, 0.01	4.10 ± 0.10 (4.10 ± 0.10)	5.20 ± 0.13 (5.20 ± 0.13)	16.90 ± 0.28 (16.90 ± 0.28)
Z, 0.05	3.90 ± 0.10 (3.90 ± 0.10)	5.10 ± 0.10 (5.10 ± 0.10)	12.10 ± 0.07 <sup>b</sup> (15.40 ± 0.07)
Z, 0.10	3.90 ± 0.10 (3.90 ± 0.10)	4.80 ± 0.13 (5.10 ± 0.10)	13.10 ± 0.05 <sup>b</sup> (15.10 ± 0.05)
Z, 0.25	3.70 ± 0.13 (3.80 ± 0.13)	3.40 ± 0.16 <sup>b</sup> (4.20 ± 0.13)	6.80 ± 0.13 <sup>b</sup> (7.80 ± 0.13)
Z, 0.50	3.10 ± 0.07 <sup>a</sup> (3.80 ± 0.13)	3.20 ± 0.13 <sup>b</sup> (5.20 ± 0.13)	6.40 ± 0.07 <sup>b</sup> (12.60 ± 0.07)
T-2, 0.01	3.70 ± 0.15 <sup>a</sup> (4.10 ± 0.10)	4.80 ± 0.13 <sup>a</sup> (5.20 ± 0.13)	15.80 ± 0.33 <sup>a</sup> (16.90 ± 0.28)
T-2, 0.05	3.10 ± 0.10 <sup>a</sup> (3.90 ± 0.10)	4.80 ± 0.10 (5.10 ± 0.10)	9.90 ± 0.01 <sup>b</sup> (15.40 ± 0.07)
T-2, 0.10	3.20 ± 0.13 <sup>b</sup> (3.90 ± 0.10)	4.60 ± 0.16 (5.10 ± 0.10)	12.40 ± 0.07 <sup>b</sup> (15.10 ± 0.05)
T-2, 0.25	1.90 ± 0.07 <sup>b</sup> (3.80 ± 0.13)	1.60 ± 0.07 <sup>b</sup> (4.20 ± 0.13)	2.40 ± 0.07 <sup>b</sup> (7.80 ± 0.13)
T-2, 0.50	0.60 ± 0.07 <sup>b</sup> (3.80 ± 0.13)	1.40 ± 0.07 <sup>b</sup> (5.20 ± 0.13)	1.60 ± 0.07 <sup>b</sup> (12.60 ± 0.07)
Z + T-2 (по 0.01)	4.00 ± 0.15 (4.10 ± 0.10)	4.90 ± 0.10 (5.20 ± 0.13)	16.50 ± 0.34 (16.90 ± 0.28)
Z + T-2 (по 0.05)	2.90 ± 0.02 <sup>a</sup> (3.90 ± 0.10)	4.60 ± 0.20 <sup>a</sup> (5.10 ± 0.10)	8.40 ± 0.07 <sup>b</sup> (15.40 ± 0.07)
Z + T-2 (по 0.10)	3.20 ± 0.13 <sup>a</sup> (3.90 ± 0.10)	4.40 ± 0.16 (5.10 ± 0.10)	12.40 ± 0.07 <sup>b</sup> (15.10 ± 0.05)
Z + T-2 (по 0.25)	2.10 ± 0.07 <sup>a</sup> (3.80 ± 0.13)	2.00 ± 0.00 <sup>b</sup> (4.20 ± 0.13)	3.60 ± 0.07 <sup>b</sup> (7.80 ± 0.13)
Z + T-2 (по 0.50)	1.40 ± 0.07 <sup>a</sup> (3.80 ± 0.13)	1.90 ± 0.07 <sup>b</sup> (5.20 ± 0.13)	1.80 ± 0.08 <sup>b</sup> (12.60 ± 0.07)

0.55 балла ( $P < 0.01$ ). При такой дозе зеараленона выживаемость нативной спермы снижалась на 0.18, а размороженной — на 0.63 ч ( $P < 0.01$ ). Что касается АПП, то он снижался у нативной спермы на 0.27, а у размороженной — на 5.64 усл. ед. ( $P < 0.001$ ). Один токсин Т-2 в дозе 0.1 мМ снижал активность нативной спермы за 1 ч на 0.46 балла ( $P < 0.05$ ), а размороженной — на 2.09 балла ( $P < 0.001$ ) в сравнении с контролем. Действие 0.1 мМ токсина Т-2 снижало переживаемость нативной спермы на 0.64 ( $P < 0.01$ ), а размороженной — на 1.77 ч ( $P < 0.001$ ); АПП тоже снижался: нативной спермы — на 3.82 ( $P < 0.001$ ), а размороженной — на 8.82 усл. ед. ( $P < 0.001$ ). Одновременное добавление в состав разбавителя по 0.1 мМ зеараленона и токсина Т-2 имело более выраженное цитотоксическое влияние, чем действие одного токсина Т-2 в той же дозе: активность нативной спермы за 1 ч снижалась на 0.73 ( $P < 0.01$ ), а после размораживания — на 2.87 балла ( $P < 0.001$ ); при этом пережи-

ваемость нативной спермы снижалась на 1.54 ( $P < 0.001$ ), а размороженной — на 2.77 ч ( $P < 0.001$ ); АПП снижался на 5.68 ( $P < 0.001$ ), а после размораживания — на 10.28 усл. ед. ( $P < 0.001$ ).

При дальнейшем снижении концентраций токсинов при их добавлении в состав разбавителя перед замораживанием тенденция к снижению их цитотоксического действия на половые клетки лошадей сохранялась. Наименьшей концентрацией зеараленона и токсина Т-2, добавленных перед замораживанием, дающей снижение изучаемых биологических показателей сперматозоидов лошадей и быков, оказалась концентрация 0.01 мМ. При таком количестве зеараленона его цитотоксическое действие на нативные сперматозоиды лошадей отсутствовало, а у размороженных лишь незначительно снижались активность и переживаемость спермиев на 0.09 балла и 0.28 ч соответственно. При одновременном добавлении зеараленона и токсина Т-2 (по 0.01 мМ) переживаемость

и АПП нативных сперматозоидов снижались на 0.45 ч и 0.64 усл. ед. ( $P < 0.05$ ) соответственно.

На рисунке показаны сперматозоиды жеребца и быка после размораживания в контроле без добавления токсинов (а, в) и размороженные спермии, в среду которых перед замораживанием одновременно добавляли по 0.5 мМ зеараленона и токсина Т-2 (б, г). Рисунок наглядно демонстрирует разрушение акросомы спермиев под одновременным действием зеараленона и токсина Т-2, а также изменение формы головки спермия жеребца (б). Видно, что микотоксины обладают сильным цитотоксическим действием в отношении половых клеток самцов, что подтверждается не только большим повреждением плазматической мембраны в виде разрушения акросомы спермиев лошадей, но и изменением формы головки спермиев, что, возможно, является причиной снижения комплекса биологических показателей сперматозоидов после размораживания. Обнаруженная особенность микотоксинов разрушать акросомы спермиев может снижать оплодотворяющую способность спермы при экстракорпоральном оплодотворении у человека и искусственном осеменении у животных из-за снижения уровня гиалуронидазы, необходимой для процесса оплодотворения.

Влияние этих же микотоксинов на биологические показатели сперматозоидов быков аналогично описанному для зеараленона и Т-2 (табл. 2). Из данных табл. 2 видно, что при сохранении общей тенденции есть особенность, которая заключается в том, что действие одного токсина Т-2 более токсично, чем его совместное действие с зеараленоном.

### Обсуждение

В настоящей работе нам удалось показать различие цитотоксического влияния зеараленона и токсина Т-2 на основные биологические показатели спермы жеребцов и быков после криоконсервирования. Практическая необходимость проведения такого исследования вызвана резким снижением эффективности криоконсервирования спермы как у животных, так и у людей. Из данных литературы известно, что сперма 50 % жеребцов в мире не выдерживает процесса замораживания—оттаивания (Mottershead, 2000; Katila, 2001; Ткачев, 2013а). Основываясь на ранее проведенных нами исследованиях по цитотоксическому влиянию микотоксинов корма на увеличение хромосомных aberrаций в соматических клетках лошадей и на наших данных о том, что длительное кормление лошадей кормами, содержащими даже допустимый уровень микотоксинов, вызывает снижение тестостерона и увеличение эстрадиола в крови жеребцов (Ткачев, 2014а), мы предположили, что эффективность криоконсервирования спермы животных может зависеть от присутствия зеараленона и токсина Т-2 в корме даже в допустимых концентрациях. Ведь широко известно, что переживаемость спермы опосредованно зависит от уровня тестостерона в крови. Чем меньше тестостерона, тем меньше в сперме сахаров и тем меньше будет переживаемость и оплодотворяющая способность сперматозоидов.

Некоторые исследователи показали, что при добавлении зеараленона и его производных в свежеполученную сперму жеребца увеличивается ее активность и снижается переживаемость *in vitro*, возможно из-за более быстрого расхода питательных веществ (Filannino et al., 2011), однако в наших экспериментах действие токсинов дли-

лось не более 2 ч. Другие исследователи показали, что микотоксины, поступающие с кормом, даже в допустимых санитарными нормами концентрациях накапливаются в простате, семенниках, яичниках и даже в гипоталамусе, взаимодействуя с глюкуроновой кислотой (Gromadzka et al., 2008). Поэтому можно предположить, что они могут снижать изначальные показатели сперматозоидов животных и человека и влиять на снижение эффективности спермы при ее замораживании—оттаивании предположительно из-за разрушения структуры хроматина спермиев (López-Fernández et al., 2007). А при накоплении в гипоталамусе микотоксины могут вызвать глубокое нарушение гормональной регуляции организма в целом. Выделение большого количества микотоксинов (до 7 мМ) с мочой у лошадей (Erasmuson et al., 1994) позволяет предполагать возможность попадания их в сперму при эякуляции. Представленные данные из литературы показывают необходимость выяснения минимальных концентраций микотоксинов, которые снижают основные биологические показатели спермы жеребцов и быков при криоконсервировании и в дальнейшем снижают оплодотворяемость у животных и человека.

Обнаруженное нами принципиальное отличие цитотоксического действия микотоксина Т-2 при криоконсервировании заключается в том, что по отношению к спермиям быка он более токсичен, чем при его совместном действии с зеараленоном. По отношению к сперматозоидам лошадей, наоборот, одновременное действие этих двух токсинов более токсично, чем одного Т-2. Мы предполагаем, что это может быть связано в первую очередь с различием биохимических процессов метаболизма спермиев жеребца (преобладает дыхание) и быка (преобладает гликолиз). Возможно, при преобладающем гликолизе и большем количестве спермиев у быка (800—1200 против 100—200 млн спермиев в 1 см<sup>3</sup> эякулята у жеребца) синергизма действия зеараленона и Т-2 нет. Полученные данные (табл. 1 и 2) позволяют предположить, что синергическое действие зеараленона и Т-2 наблюдается в случае преобладания процессов дыхания у спермиев в присутствии проникающего криопротектора глицерина в разбавителе для спермы. Косвенно эту гипотезу подтверждают данные, описывающие конкурентное связывание зеараленона с рецепторами гормонов клеток (López-Fernández et al., 2007), и данные о том, что эстрогеноподобное действие зеараленона может быть связано с усилением активности ароматазы, которая превращает андрогены в эстрогены (Sanderson, van den Berg, 2003).

Нам удалось впервые показать, что цитотоксические свойства микотоксинов резко увеличиваются именно при криоконсервировании сперматозоидов лошадей и быков. Рисунок показывает цитотоксичность микотоксинов при криоконсервировании спермы, за счет чего, по нашему мнению, и снижается эффективность замораживания—оттаивания. А разрушение микотоксинами акросомы спермиев (см. рисунок) фактически лишает их важнейших ферментов (гиалуронидаза, акрозин), необходимых для оплодотворения яйцеклетки как *in vitro*, так и *in vivo*. Мы предполагаем, что это может быть связано еще и с тем, что зеараленон и Т-2 в присутствии глицерина усиливают интенсивность процессов перекисного окисления липидов, увеличивая количество диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, которые и повреждают липидный бислой мембраны и способствуют разрушению акросом. Эта гипотеза основывается на полученных нами ранее данных об увеличении в крови у лошадей диеновых

конъюгатов и малонового диальдегида под действием допустимых уровней микотоксинов корма (Ткачев, 2015б).

Настоящая работа открывает перспективу для поиска веществ, способных нейтрализовать цитотоксическое действие микотоксинов при криоконсервировании спермы животных и человека. К настоящему времени мы проводим поисковые исследования по обнаружению такого вещества, которое способно нейтрализовать цитотоксическое действие зearаленона и токсина Т-2 (по 0.5 мМ), находящихся одновременно в разбавителе для спермы, возможно, за счет стабилизации целостности плазмалеммы, акросомы и сохранения активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы.

**Заключение.** Впервые исследовано цитотоксическое действие микотоксинов зearаленона и Т-2 на сперматозоиды лошадей и быков *in vitro* после их криоконсервирования. Впервые показано, что минимальной цитотоксической дозой зearаленона и Т-2 для спермиев при криоконсервировании является 0.01 мМ. Впервые показаны видовые различия чувствительности сперматозоидов лошадей и быков к цитотоксическому действию зearаленона и Т-2, выражающиеся в том, что по отношению к спермиям быка (но не лошадей) комплексное действие зearаленона и Т-2 менее токсично, чем действие одного токсина Т-2.

#### Список литературы

- Диаз Д. 2006. Микотоксины и микотоксикозы. М.: Печатный город. 384 с. (Diaz D. 2006. Mikotoksin i mikotoksikozy. Moscow: Printing City. 384 p.)
- Плохинский Н. А. 1969. Руководство по биометрии для зоотехников. М.: Колос. 256 с. (Plokhinskiy N. A. 1969. Manual in biometry for zootechnicians. Moscow: Kolos, 256 p.)
- Савченко И. П., Васильева С. А. 2016. Культивирование сперматогоний хряка на клетках Сертоли. Цитология. 58 (2) : 135—142. (Savchenko I. P., Vasil'eva S. A. 2016. Co-culture of boar spermatogonial cell with Sertoli cells. Tsitologiya. 58 (2) : 135—142.)
- Ткачев А. В. 2013а. Эффективность искусственного осеменения лошадей в зависимости от степени повреждения мембран сперматозоидов. Фундаментальные исследования. 10 (1) : 145—148. (Tkachev A. V. 2013a. Efficiency of horses artificial insemination of depending of spermatozoa membranes damage rate. Fundamental Res. 10 (1) : 145—148.)
- Ткачев А. В. 2013б. Влияние иммуногенетических факторов на эффективность искусственного осеменения и естественной случки лошадей на Украине. Фундаментальные исследования. 10 (2) : 371—374. (Tkachev A. V. 2013b. Influence of immunogenetic factors on artificial insemination efficiency and natural copulation of horses in Ukraine. Fundamental Res. 10 (2) : 371—374.)
- Ткачев А. В. 2014а. Гормональный фон жеребцов под влиянием максимально допустимых уровней микотоксинов корма в Украине. Вестн. НГАУ. 4 (33) : 115—119. (Tkachev A. V. 2014a. Hormonal background of stallions exposed to maximal permissible levels of feed mycotoxins in Ukraine. Vestnik of Novosibirsk Agricultural Univ. 4 (33) : 115—119.)
- Ткачев А. В. 2014б. Влияние допустимых концентраций микотоксинов корма на резистентность и контаминацию спермы жеребцов-производителей в Украине. Животноводство и ветеринарная медицина. 3 (14) : 3—7. (Tkachev A. V. 2014b. Effect of acceptable levels of forage micotoxins on the resistance and contamination of studhorse semen in Ukraine. Animal Agriculture and Veterinary Medicine. 3 (14) : 3—7.)
- Ткачев А. В. 2015а. Эффективность искусственного осеменения кобыл в зависимости от схем санации жеребцов перед получением спермы. Вестн. НГАУ. 4 (37) : 95—101. (Tkachev A. V. 2015a. Efficiency of artificial insemination in respect to the schemes of males sanitation before getting sperm. Vestnik of Novosibirsk Agricultural Univ. 4 (37) : 95—101.)
- Ткачев А. В. 2015б. Цитогенетический статус жеребцов под влиянием допустимых уровней микотоксинов корма. Молекулярная и прикладная генетика. 19 : 79—84. (Tkachev A. V. 2015b. The cytogenetic status of stallions under the influence of permissible mycotoxin levels in feed. Mol. Applied Genet. 19 : 79—84.)
- Arvidson G., Ronquist G., Wikander G., Ojteg A. C. 1989. Human prostatesome membranes exhibit very high cholesterol/phospholipid ratios yielding high molecular ordering. Biochim. biophys. acta. 984 : 167—173.
- Carlini E., Palmerini C. A., Cosmi E. V., Arienti G. 1997. Fusion of sperm with prostatesomes: effects on membrane fluidity. Arch. Biochem. Biophys. 343 : 6—12.
- Casey P. J., Gravance J. C., Davis R. O., Chabot D. D., Liu I. K. M. 1997. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. Theriogenol. 47 : 575—582.
- Erasmuson A., Scahill B. G., West D. M. 1994. Natural zearanol ( $\alpha$ -zearalanol) in urine of pastured animals. J. Agric. Food. Chem. 42 : 2721—2725.
- Farnworth E. R., Trenholm H. L. 1983. The metabolism of the mycotoxin zearalenone and its effects on the reproductive tracts of young male and female pigs. Can. J. Anim. Sci. 63 : 967—975.
- Filannino A., Stout T., Gadella B. M. 2011. Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. Reprod. Biol. Endocrinol. 9 : 134—140.
- Francavilla F., Romano R., Pandolfi C., Macerola B., Santucci R., Necozone S., Francavilla S. 2003. Evaluation of the effect of 17 $\alpha$ OH-progesterone and 17 $\beta$ -oestradiol on human sperm ability to fuse with oocytes: comparison and possible interference with the effect of progesterone. Int. J. Androl. 26 (6) : 342—347.
- Graham J. K. 1996. Cryopreservation of stallion semen and its relation to fertility. Vet. Clin. North Amer. Equine Pract. 12 : 119—130.
- Gromadzka K., Waskiewicz A., Chelkowski J., Goliski P. 2008. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. World Mycotoxin J. 1 : 209—220.
- Katila T. 2001. *In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. Acta vet. Scand. 42 : 199—217.
- López-Fernández C., Crespo F., Arroyo F. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals. II. The stallion. Theriogenology. 68 (9) : 1240—1250.
- Luconi M., Francavilla F., Porazzi I., Macerola B., Forti G., Baldi E. 2004. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. Steroids. 69 (8—9) : 553—559.
- Luconi M., Muratori M., Forti G., Baldi E. 1999. Identification and characterization of a novel functional estrogen receptor on human sperm membrane that interferes with progesterone effects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 84 (5) : 1670—1678.
- Lukoseviciute K., Bizokas V., Zilinskas H., Januskauskas A. 2007. Effect of progesterone and oestradiol on sperm-zona binding and acrosome reaction in bovine spermatozoa after thawing. Reprod. Domest. Anim. 42 (3) : 320—325.
- Magistrini M., Vidament M., Clement F., Palmer E. 1996. Fertility prediction in stallions. Anim. Reprod. Sci. 42 : 181—188.
- Milano G. D., Odriozola E., Lopez T. A. 1991. Lack of effect of a diet containing zearalenone on spermatogenesis in rams. Vet. Rec. 129 (2) : 33—35.
- Mottershead J. 2000. Frozen semen preparation and use. Part 1. Can. Morgan Magazine. Nov/Dec : 32—43.
- Ronquist G., Brody I. 1985. The prostatesome: its secretion and function in man. Biochim. biophys. acta. 822 : 203—218.
- Sanderson T., van den Berg M. 2003. Interaction of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. Pure Appl. Chem. 75 : 1957—1971.
- Sousa M., Cremades N., Alves C., Silva J., Barros A. 2002. Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. Hum. Reprod. 17 : 161—172.

Tesarik J., Mendoza C., Anniballo R., Greco E. 2000. *In vitro* differentiation of germ cells from frozen testicular biopsyspecimens. Hum. Reprod. 15 : 1713—1716.

Tsakmakidis I. A., Lymberopoulos A. G., Alexopoulos C. 2006. *In vitro* effect of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in boar sperm cha-

racteristics and acrosome reaction. Reprod. Domest. Anim. 41 (5) : 394—401.

Поступила 20 VI 2016

COMPARISON OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF ZEARALENON AND T-2 TOXIN ON THE HORSES AND OXEN GERM CELL *IN VITRO* BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION

A. V. Tkachev,<sup>1</sup> O. L. Tkacheva

National University of Pharmacy, Kharkov, 61002, Ukraine;

<sup>1</sup> e-mail: sasha\_sashaola@mail.ru

The article presents the results of the studies of cytotoxic effect of zearalenone and T-2 toxin on sperm of horses and bulls during incubation and after thawing according to the technology of sperm obtaining and cryopreservation in Kharkov. We first have shown *in vitro* toxic effects of different concentrations of zearalenone and T-2 toxin (from 0.5 to 0.01 mM) on the membrane stability, as well as quantitative and qualitative indicators of semen in stallions and bulls before and after freezing and thawing. It has been found that the biological activity of the native sperm in 1 h after addition of 0.5 mM zearalenone is not changed, and after thawing is reduced by 19.4 %, or 0.69 ball ( $P < 0.01$ ) compared to control without toxin. T-2 toxin at a concentration of 0.5 mM reduced the activity of the native sperm after an hour of incubation by 0.59 ball ( $P < 0.01$ ) and decreased it after thawing decreased by 60.28 %, or 2.14 ball ( $P < 0.001$ ). 1 h of incubation with zearalenone at concentration of 0.25 mM did not affect the activity of the native sperm, but the activity after freeze—thaw deteriorated by 12.2 %, or 0.41 ball ( $P < 0.05$ ). T-2 toxin at a concentration of 0.25 mM reduced activity of native sperm after 1 h exposure by 0.46 ball ( $P < 0.05$ ), and after thawing spermatozoa degrade it by 1.77 ball ( $P < 0.001$ ) compared to control without toxins. In our study, the lowest concentration giving a significant decrease in sperm parameters was 0.01 mM. The negative impact of zearalenone in such a dose on the native sperm was absent, and sperm after thawing only slightly reduced activity and perezhivayemost by 0.09 points and 0.27 hours, respectively. The simultaneous addition of zearalenone and T-2 toxin at the same dose of 0.01 mM resulted in a decrease in biological perezhivayemost and absolute indicator of native sperm perezhivayemost by 0.36 points and 0.64 hours ( $P < 0.05$ ), respectively.

Key words: zearalenone, T-2 toxin, biotechnology suitability sperm, stallions.