

Ribogospod. nauka Ukr., 2016; 1(35): 70-77
DOI: <http://dx.doi.org/10.15407/fsu2016.01.070>
УДК 576.08

ПРОНИЦАЕМОСТЬ МЕМБРАН СПЕРМАТОЗОИДОВ СТЕРЛЯДИ (*ACIPENSER RUTHENUS* L., 1758) ДЛЯ МОЛЕКУЛ ВОДЫ

А. Ю. Пуговкин, lima@online.ua, Институт криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

И. С. Кононенко, kononenkois@mail.ru, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

В. А. Черепнин, diglador@ukr.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

И. И. Грициняк, info@if.org.ua, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

Е. Ф. Копейка, ekopeik@yahoo.com, Институт криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Цель. На основе анализа результатов криоконсервирования спермы разных видов рыб выявлено варьирование показателя выживаемости сперматозоидов в процессе замораживания-размораживания. Поэтому, целью проведенной работы было исследование и установление причин различной степени криоустойчивости сперматозоидов рыб. Также изучалась возможность определения оптимальных путей повышения эффективности выживания дефростированных сперматозоидов разных видов рыб для их дальнейшего использования с целью получения жизнеспособного потомства.

Методика. Определение проницаемости мембран сперматозоидов стерляди осуществлялось после проведения всех необходимых рыбоводных манипуляций с производителями, которые включают: преднерестовое выдерживание, гормональную стимуляцию, определение степени созревания половых продуктов, получение спермы путем отцеживания. Измерения проницаемости мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды проводились по методике, аналогичной применяемой ранее для спермы карпа, при этом учитывались специфические свойства, присущие сперме стерляди.

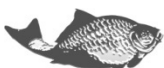
Результаты. На основании проведенных измерений была определена проницаемость мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды с использованием фотометрического метода. Полученные в результате эксперимента данные свидетельствуют о высшей степени проницаемости мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды по сравнению с проницаемостью мембран сперматозоидов карпа.

Научная новизна. В результате проведения данного эксперимента впервые было определено абсолютное значение проницаемости мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды с использованием фотометрического способа и проведение сравнения результатов с полученными при работе со спермой карпа.

Практическое значение. Данные, полученные в результате проведенных экспериментальных исследований, могут использоваться в практике криоконсервации для повышения эффективности результатов низкотемпературного замораживания спермы разных видов рыб.

Ключевые слова: стерлядь, сперматозоиды, криоконсервирование, мембрана сперматозоида, проницаемость мембран, молекулы воды, фотометрический метод, выживаемость сперматозоидов.

© А. Ю. Пуговкин, И. С. Кононенко, В. А. Черепнин, И. И. Грициняк,
Е. Ф. Копейка, 2016



ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМЫ И АНАЛИЗ ПОСЛЕДНИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПУБЛИКАЦИЙ

Ныне криоконсервирование спермы рыб — это направление, благодаря которому удается сохранить генетический материал множества ценных видов рыб с целью последующего его использования. Проведя анализ многочисленных литературных источников установлено, что для каждого вида рыб свойственна различная устойчивость сперматозоидов к процессам охлаждения-отогрева и как результат — различная эффективность криоконсервирования.

Так, для таких промысловых видов рыб как лососевые и карповые выживаемость сперматозоидов в процессе криоконсервирования обычно не превышает 25–70% в зависимости от температуры их нереста [2, 7, 9]. В то же время, результаты исследований показывают, что эффективность криоконсервирования спермы такого представителя осетровых видов рыб как стерляди может достигать в отдельных случаях и 100% [6, 8].

Есть предположения, что различная криорезистентность сперматозоидов рыб может быть связана со степенью проницаемости мембран клеток, что лимитирует потоки веществ через мембрану, в частности воды.

ВЫДЕЛЕНИЕ НЕРЕШЕННЫХ РАНЕЕ ЧАСТЕЙ ОБЩЕЙ ПРОБЛЕМЫ. ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Была поставлена задача определить проницаемость мембран сперматозоидов стерляди и сравнить полученные значения с ранее определенной проницаемостью мембран сперматозоидов карпа.

Проницаемость мембран сперматозоидов карпа для молекул воды (коэффициент фильтрации — L_p) была ранее определена фотометрическим способом [1]. Поскольку в основе фотометрического способа для вычисления проницаемости мембран лежит регистрация динамики объема сперматозоидов, фотометрическое определение этого показателя для сперматозоидов стерляди сопряжено с некоторыми трудностями. Результатами некоторых исследований установлено, что на протяжении периода движения сперматозоидов стерляди их клеточный объем практически не изменяется [11]. На основании этого предполагалось, что мембраны сперматозоидов практически не имеют аквапоринов (мембранные водные каналы), и вода медленно проникает через мембрану путем диффузии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для экспериментальных исследований служила сперма 5 самцов стерляди индивидуальной массой 1,7–2,3 кг. Преднерестовое содержание производителей проходило в условиях, приближенных к природным, при температуре 15°C. В качестве стимулятора созревания половых продуктов использовался препарат «Нерестин-5а». Инъекции самцов стерляди проводилось по стандартной для рыбоводства методике с соблюдением всех правил и норм. Получение половых продуктов от самцов стерляди проводили через 24 часа после гормональной инъекции. Объем полученных молок от каждого производителя в среднем составлял 20–30 мл. Оценка качества половых



продуктов проводилась с помощью микроскопа по 5-бальной шкале Г. М. Персова [4]. Вся полученная сперма по качеству была оценена на 5 баллов.

Измерения проницаемости мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды проводили с помощью фотоэлектрического колориметра Zalimp KF-77 (Польша), оборудованного магнитной мешалкой и термостатированным кюветным отделением.

Исследования проводились по следующей схеме: полученную сперму добавляли в кювету, заполненную водным раствором NaCl, куда погружали специальную магнитную мешалку, размешивая содержимое путем интенсивного встряхивания. Далее кювету помещали в кюветное отделение и с помощью самописца фиксировали динамику светопропускания. Для измерения использовался световой диапазон 610 нм при температуре кюветного отделения +20°C [1].

Измерения проницаемости сперматозоидов стерляди производили методом, аналогичным для спермы карповых [3] с отличиями, учитывающими специфические свойства спермы данного вида рыб:

1) более низкая по сравнению с карповыми рыбами осмотичность семенной жидкости, которая определила среду инкубации, а именно дистиллированную воду или низкоосмотичные солевые среды. Если для карпа осмотичность семенной плазмы, как правило, составляет 250–300 мОсмоль/кг, то для сперматозоидов стерляди — примерно 100–150 мОсмоль/кг;

2) различная форма сперматозоидов, которая может вносить ограничения в использование принятой в основе способа модели. Однако для изменения светопропускания суспензии рассеивающих частиц соответствующего размера характерна незначительная чувствительность к их форме;

3) существенно более низкая концентрация спермы стерляди (0,5–2 млрд/мл) по сравнению со спермой карповых рыб (10–20 млрд/мл). Исходя из этого, отношение спермы к среде инкубации в случае спермы стерляди было существенно выше: если в случае карповых рыб сперма составляет 1–2%, то для стерляди это 15–20%;

4) сильно варьирующая концентрация спермы между различными эякулятами. Для каждого измерения была подобрана такая концентрация спермы, которая бы приводила к наибольшему сигналу (рис. 1, 2).

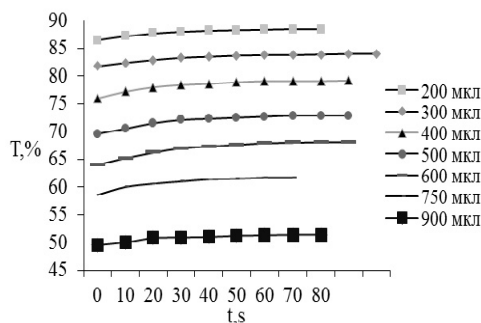


Рис. 1. Зависимость динамики светопропускания от концентрации инкубируемой спермы



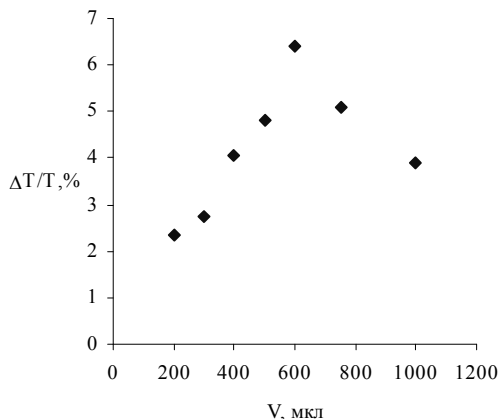


Рис. 2. Зависимость относительного светопропускания от концентрации инкубируемой спермы

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что в условиях гипотонической среды происходит увеличение объема сперматозоидов стерляди. Этот процесс происходит за счет проникающих внутрь клетки молекул воды. Данный факт позволяет определить проницаемость мембран сперматозоидов с использованием фотометрического способа (рис. 3).

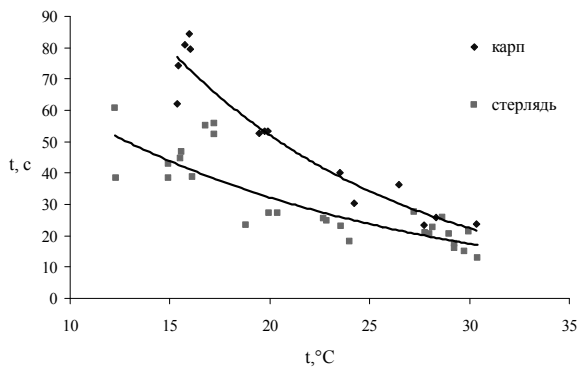
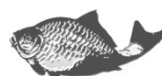


Рис. 3. Зависимость характерного времени проникновения молекул воды в клетку (L_p) от температуры инкубации сперматозоидов.

Как видно из данных рисунка 2, относительное изменение объема сперматозоидов стерляди меньше, чем сперматозоидов карпа в идентичных условиях. В то же время, у сперматозоидов стерляди скорость установления равновесного значения объема выше, что говорит о более высокой проницаемости для молекул воды. При температуре воды 20°C L_p мембран сперматозоидов стерляди составляет около 0,3 мкм/(атм.×мин), тогда как при аналогичных условиях этот показатель для сперматозоидов карпа составляет 0,17 мкм/(атм.×мин).



Известен тот факт, что проницаемость мембран связана с криоустойчивостью сперматозоидов, о чем свидетельствуют исследования в некоторых научных работах [5, 10]. Так, в работе Дзюбы Б. Б. с соавторами показано, что кратковременная экспозиция сперматозоидов карпа в гипотонической среде перед добавлением криозащитной среды существенно увеличивает эффективность результатов криоконсервирования за счет повышения проницаемости мембран сперматозоидов [10]. Повышение проницаемости мембран половых клеток себрюги изучала Пономарева Е. Н. с коллегами. Для этого ими использовался метод электростимуляции с частотой сигнала 20 Гц. В результате применения указанного метода наблюдалось повышение проницаемости мембран сперматозоидов себрюги и впоследствии увеличение их выживаемости на 30% [5].

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕГО РАЗВИТИЯ

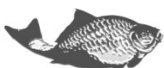
Подтверждена возможность определения проницаемости мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды с использованием фотометрического метода.

Степень проницаемости мембран сперматозоидов влияет на результаты криоконсервирования половых продуктов рыб.

Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди для молекул воды является более высокой по сравнению с таковой у сперматозоидов карпов. Более высокая водопроницаемость мембран сперматозоидов является одной из причин высокой выживаемости сперматозоидов стерляди после её дефростации по сравнению со сперматозоидами карпа.

ЛИТЕРАТУРА

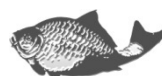
1. Исследование проницаемости мембран сперматозоидов карпа для молекул воды / А. Ю. Пуговкин, Е. Ф. Копейка, О. А. Нардид [и др.] // Биофизика. — 2014. — Т. 59, вып. 3. — С. 481—487.
2. Копейка Е. Ф. Экологическая ниша как фактор, определяющий криорезистентность сперматозоидов рыб / Е. Ф. Копейка // Проблемы криобиологии и криомедицины. — 2014. — № 24, 4. — С. 302—311.
3. Пат. № 104809. Україна, МПК G01N 33/48 G01N 15/00. Спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води / [Пуговкін А. Ю., Копейка Є. Ф., Гордієнко Є. О., Нардід О. А.]. — № 2012 15035 ; заяв. 27.12.2012 ; опубл. 11.03.2014, Бюл. № 5.
4. Персов Г. М. Дозирование спермиев как способ управления оплодотворением яйцеклеток осетровых / Г. М. Персов // Докл. АН СССР. — 1953. — Т. 90, № 6. — С. 1183—1185.
5. Повышение эффективности криоконсервации половых клеток себрюги с помощью электростимуляции / Е. Н. Пономарева, М. М. Богатырева, Н. В. Болонина [и др.] // Вестник АГТУ. — 2009. — № 1. — С. 100—103. — (Серия : Рыбное хозяйство).
6. Butskiy K. Obtaining high quality sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm after freezing and influence of hormonal stimulations / K. Butskiy // SLTB Conference, London, UK, October, 08–10, 2014 : book of abstracts. — London, 2014. — P. 90.



7. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) / O. Linhart, S. M. H. Alavi, M. Rodina [et al.] // J. Appl. Ichthyol. — 2008. — Vol. 24. — P. 386—392.
8. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review / R. Billard, J. Cosson, S. B. Noveiri [et al.] // Aquaculture. — 2004. — Vol. 236. — P. 1—9.
9. Horvath A. Cryopreservation of common carp sperm / A. Horvath // Aquatic Living Resources. — 2003. — Vol. 16. — P. 457—460.
10. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa / B. Dzyuba, J. Cosson, G. Yamaner [et al.] // Cryobiology. — 2013. — Vol. 66. — P. 192—194.
11. Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: interspecies differences / O. Bondarenko, B. Dzyuba, J. Cosson [et al.] // Theriogenology. — 2013. — Vol. 79. — P. 872—881.

REFERENCES

1. Pugovkin, A. Ju., Kopejka, E. F., Nardid, O. A., & Cherkashina Ja. O. (2014). Issledovanie pronicaemosti membran spermatozoidov karpa dlja molekul vody. *Biofizika*, 59, 3, 481-487.
2. Kopejka, E. F. (2014). Jekologicheskaja nisha kak faktor, opredelajushhij kriorezistentnost' spermatozoidov ryb. *Problemy kriobiologii i kriomediciny*, 24, 4, 302-311.
3. Puhovkin, A. Iu., Kopieika, Ye. F., Hordiienko, Ye. O., & Nardid, O. A. (2014). *Sposib vyznachennia pronyknosti membran spermatozoidiv koropa do molekul vody*. Patent № 104809. Ukraina, MPK G01N 33/48 G01N 15/00. №2012 15035; Zaiavleno 27.12.2012; Opublikovano 11.03.2014. 5.
4. Ponomareva, E. N., Bogatyreva, M. M., Bolonina, N. V., & Tihomirov, A. M. (2009). Povyshenie jeffektivnosti kriokonservacii polovyh kletok sevrjugi s pomoshh'ju jelektrostimuljacii. *Vestnik AGTU. Ser.: Rybnoe hozjajstvo*, 1, 100-103.
5. Persov, G. M. (1953). Dozirovanie spermiev kak sposob upravlenija oplodotvorenijem jajcekletok osetrovyh. *Dokl. AN SSSR*, 90, 6, 1183-1185.
6. Butskiy, K. (2014). Obtaining high quality sterlet (*Acipenser ruthenus*) sperm after freezing and influence of hormonal stimulations. *SLTB Conference*. London, UK, 90.
7. Linhart, O., Alavi, S. M. H., Rodina, M., Gela, D., & Cosson, J. (2008). Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Appl. Ichthyol.*, 24, 386-392.
8. Billard, R., Cosson, J., Noveiri, S. B., & Pourkazemi, M. (2004). Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review. *Aquaculture*, 236, 1-9.
9. Horvath, A. (2003). Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources*, 16, 457-460.



10. Dzyuba, B., Cosson, J., Yamaner, G., Bondarenko, O., Rodina, M., Gela, D. et al. (2013). Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Cryobiology*, 66, 192-194.
11. Bondarenko, O., Dzyuba, B., Cosson, J., Yamaner, G., Prokopchuk, G., Psenicka, M., & Linhart, O. (2013). Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: interspecies differences. *Theriogenology*, 79, 872-881.

ПРОНИКНІСТЬ МЕМБРАН СПЕРМАТОЗОЇДІВ СТЕРЛЯДІ (*ACIPENSER RUTHENUS* L., 1758) ДЛЯ МОЛЕКУЛ ВОДИ

- А. Ю. Пуговкін**, lima@online.ua, Інститут кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків
- І. С. Кононенко**, kononenkois@mail.ru, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
- В. О. Черепнін**, diglador@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
- І. І. Грициняк**, info@if.org.ua, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
- Є. Ф. Копе́йка**, ekopeik@yahoo.com, Інститут кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Мета. На підставі аналізу результатів кріоконсервування сперми різних видів риб виявлено варіювання показника виживання сперматозоїдів в процесі заморожування-розморожування. Саме тому метою проведеної роботи було дослідження і встановлення причин різного ступеня кріостійкості сперматозоїдів риб. Також вивчалася можливість визначення оптимальних шляхів підвищення ефективності виживання дефростованих сперматозоїдів різних видів риб для їх подальшого використання з метою отримання життєстійкого потомства.

Методика. Визначення проникності мембран сперматозоїдів стерляді здійснювалося після проведення всіх необхідних рибницьких маніпуляцій з плідниками, які включають: переднерестове витримування, гормональне стимулювання, визначення стадії зрілості статевих продуктів, отримання сперми шляхом відціджування. Вимірювання проникності мембран сперматозоїдів стерляді для молекул води проводилося за методикою, аналогічною тій, що застосовувалася раніше для сперми коропа, але з урахуванням специфічних особливостей, характерних для сперми стерляді.

Результати. На підставі проведених вимірювань була визначена проникність мембран сперматозоїдів стерляді для молекул води з використанням фотометричного методу. Отримані в результаті експерименту дані свідчать про вищий ступінь проникності мембран сперматозоїдів стерляді для молекул води в порівнянні з проникністю мембран сперматозоїдів коропа.

Наукова новизна. В результаті проведення даного експерименту вперше було визначено абсолютне значення проникності мембран сперматозоїдів стерляді для молекул води з використання фотометричного способу і проведено порівняння результатів з отриманими в процесі роботи з спермою коропа.

Практичне значення. Дані, отримані в результаті проведених експериментальних досліджень, можуть використовуватися в практиці кріоконсервування для підвищення ефективності результатів низькотемпературного заморожування сперми різних видів риб.

Ключові слова: стерлядь, сперматозоїди, кріоконсервування, мембрана сперматозоїда, проникність мембран, молекули води, фотометричний метод, виживання сперматозоїдів.



PERMEABILITY OF STERLET SPERM MEMBRANES (*ACIPENSER RUTHENUS* L., 1758) FOR WATER MOLECULES

A. Puhovkin, lima@online.ua, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

I. Kononenko, kononenkois@mail.ru, National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev

V. Cherepnin, diglador@ukr.net, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

I. Hrytsyniak, info@if.org.ua, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

E. Kopeika, ekopeik@yahoo.com, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

Purpose. *The literature analysis of the results cryopreservation of different fish species highlights a variation of many parameters, in particular the sperm survival rate during the freezing and unfreezing process. The survival capability of spermatozoa may be called the main parameter, which identifies the efficiency of the entire process of low temperature freezing of reproductive products. Therefore, the goal of this work was to investigate and find the causes of different degrees of fish sperm cryoimmunity, in particular that of sterlet, which is a valuable of sturgeon (*Acipenser*) species. We also studies the possibility to find the optimum ways to improve the efficiency of the survival rate of the defrosted spermatozoa of different fish species for their further use to produce viable offspring.*

Methodology. *The determination of sterlet sperm membrane permeability was performed after carrying out all necessary manipulations with brood males which included: prespawning incubation, hormonal stimulation, determination of sperm maturity degree, obtaining the sperm by stripping. The measurement of sperm membrane permeability for water molecules was performed based on the technique, which had been used earlier to measure carp sperm permeability, but taking account the specific peculiarities inherent to sterlet sperm.*

Findings. *Based on the performed measurements, we determined the sterlet sperm membrane permeability for water molecules with the use of photometric method. The received experimental data show the highest degree of sterlet sperm membrane permeability for water molecules as compared to carp sperm membrane permeability.*

Originality. *As a result of this experiment, we determined for the first time the absolute value of sterlet sperm membrane permeability for water molecules with the use of photometric method as well as compared the results with those obtained during our work with the carp sperm.*

Practical value. *The data obtained during the experimental studies can be used in the practice of sperm cryopreservation for improving the efficiency of the sperm different of fish species during the process of low temperature freezing especially for such commercially valuable fish species as sturgens.*

Keywords: *sterlet, spermatozoa, cryopreservation, sperm membrane, low temperature freezing, membrane permeability, water molecules, photometric method, spermatozoa survival rate.*

