

СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

Ribogospod. nauka Ukr., 2016; 4(38): 103-112

DOI: <https://doi.org/10.15407/fsu2016.04.103>

УДК 591.463.11-755.63:577.352.462:57.043

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ ЧУТЛИВОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ЩУКИ (*ESOX LUCIUS L., 1758*) ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ ЇХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

А. Ю. Пуговкін, antonpuhovkin@gmail.com, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Є. Ф. Копейка, cryo@online.kharkov.ua, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

К. Б. Міксон, cryo@online.kharkov.ua, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

В. О. Черепнін, info@if.org.ua, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

І. І. Грициняк, info@if.org.ua, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

Мета. Вивчення осмотичної чутливості сперматозоїдів щуки (*Esox lucius L., 1758*).

Методика. Осмотичні реакції сперматозоїдів досліджували методом спектрофотометрії на підставі даних про кінетику світлопропускання суспензій клітин, додаванням у дистильовану воду або розчини NaCl осмолярністю 10–200 мОсм/кг. Вимірювання зміни світлопропускання проводили за допомогою фотоелектроколориметра KF-77 (Польща), обладнаного магнітним перемішувачем і термостатованим кюветним відділенням. Коефіцієнт проникності плазматичних мембран сперматозоїдів для молекул води (L_p) визначали, апроксимуючи експериментальні залежності відносних об'ємів клітин від часу розв'язуванням рівнянь теоретичної моделі. Енергію активації (E_a) процесу перенесення речовин через мембрани клітин розраховували із залежностей $\ln L_p$ від зворотної температури.

Результати. Характерний час проникнення води складає 40–50 с в діапазоні осмолярності 100–200 мОсмоль/кг (12°C). Проникність мембран сперматозоїдів щуки до води дорівнює $5,43 \pm 1,15 \times 10^{-15} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$ (12°C). Енергія активації перенесення води через мембрани клітин становить 64 ± 5 кДж/моль, що свідчить про проникнення води всередину сперматозоїдів шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар. Осмотична резистентність сперматозоїдів щуки може бути визначена за допомогою фотометричного аналізу. Розроблені підходи є простими і швидкими тестами функціонального стану клітинних мембран.

Наукова новизна. Вперше визначений коефіцієнт проникності плазматичних мембран сперматозоїдів щуки та його температурна залежність.

Практична значимість. Результати роботи використовуються при розробленні середовищ і режимів кріоконсервування сперматозоїдів щуки.

Ключові слова: сперматозоїди, щука (*Esox lucius, L. 1758*), осмотична чутливість, проникність мембран, Арреніусові залежності.

© А. Ю. Пуговкін, Є. Ф. Копейка, К. Б. Міксон, В. О. Черепнін, І. І. Грициняк, 2016



ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

Перевагами кріоконсервування сперми є: синхронізація наявності гамет обох статей (сперма може бути збережена і використана, коли отримана ікра), економія сперми (дозволяє використовувати загальний об'єм наявної сперми, що особливо важливо, коли важко її отримати або є можливість отримати лише малі об'єми), спрощення управління племінним стадом (нерест поза сезоном може бути викликаний лише у самиць, і при цьому використовується кріоконсервована сперма), транспортування гамет між різними рибними господарствами (без перевезення тварин для запобігання інфікуванню) та можливість збереження генофонду рідкісних і цінних видів [1, 2].

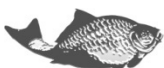
Характеристики сперматозоїдів варіюють серед видів, в межах одного виду і навіть у зразках від однієї тварини в залежності від періоду збору протягом репродуктивного сезону [3]. Тому аналіз якості сперми та розроблення нових інструментів для її характеризувати вважається пріоритетним напрямом. Також, добре відомо, що зразки сперми мають різну чутливість до заморожування відповідно до їх якості [4, 5]. Таким чином, оцінка сперми відіграє вирішальне значення для того, щоб відібрати кращі за якістю зразки до заморожування або для використання при заплідненні [6].

Збереження клітинної структури і функціональності залежить від протоколу кріоконсервування. Для того, щоб запліднити ікру, сперматозоїди мають зберігати цілісність плазматичних мембран і підтримувати осмотичну рівновагу. Крім того, сперматозоїди повинні активуватись та зберігати свою рухову здатність при потрапленні у воду, щоб досягти яйцеклітини. Рухливість сперматозоїдів має вирішальне значення і залежить від різних характеристик клітин, таких як мітохондріальний статус, біосинтез АТФ, активність каналів плазматичної мембрани, будова флагели. Рухливість є найбільш поширеним параметром для характеризувати якості сперми [7].

Безсумнівно, одним з найпростіших способів перевірки успішності протоколу кріоконсервування сперми є аналіз цілісності і проникності клітинної мембрани. Цілісність і проникність плазматичної мембрани в першу чергу необхідні для функціонування клітини.

Кріоконсервування, як відомо, викликає значні зміни осмолярності середовища, які істотно відрізняються від фізіологічного діапазону клітин прісноводних видів. Сперматозоїди прісноводних риб, які не піддавалися широкому діапазону осмотичних коливань протягом розвитку, не здатні до збереження критичного об'єму клітини, і тому мають нижчу кріорезистентність, ніж клітини морських видів [5, 8].

Процес кріоконсервування веде до морфологічних та функціональних пошкоджень клітин, оскільки він асоціюється зі значними осмотичними змінами: в процесі заморожування клітини стають дегідратованими, а при розморожуванні, вони піддаються гіпотонічним впливам, оскільки вода в результаті еквілібрації займає своє місце. Фаза переходу води в лід — один з найважливіших критичних чинників, що впливають на виживання клітин. Існує критична межа температур, за якої клітини можуть незворотно пошкоджуватися [8].



Стиснення і набухання клітин обмежені їхньою фізичною здатністю протистояти таким змінам. Пошкодження відбувається поза певних рівнів стиснення або набухання (повний діапазон між цими рівнями відомий як максимальна зміна об'єму клітини). Оптимальна рівноважна швидкість заморожування, знайдена для даного типу клітини, передбачає допустимі зміни об'єму, тобто діапазони набухання і стиснення, які не призводять до втрати цілісності мембран й ослаблення функцій клітини (наприклад, рухливості сперматозоїдів та їх запліднювальної здатності). Допустимі варіації об'єму видоспецифічні, залежать від типу клітини, температури нересту та інших чинників [5, 9].

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРІШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ

Проникність мембран і енергія активації процесу перенесення речовин через мембрани сперматозоїдів риб досі залишаються маловивченими параметрами, незважаючи на те, що їх необхідно враховувати для обґрунтованого вибору режимів і середовищ кріоконсервування, і, отже, для ефективного збереження генетичного матеріалу риб [10–12].

Метою даної роботи є вивчення осмотичної чутливості сперматозоїдів шуки (*Esox lucius* L., 1758). Для цього були поставлені такі завдання: визначити осмотичну резистентність сперматозоїдів шуки, коефіцієнт проникності мембран для молекул води і енергію активації процесу переносу молекул води через мембрани клітин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Сперма була отримана від самців шуки (*Esox lucius* L., 1758) масою 1,0–1,5 кг протягом нерестового періоду.

Осмотичні реакції сперматозоїдів досліджували методом спектрофотометрії [13, 14] на підставі даних про кінетику світлопропускання суспензій клітин, додаванням у дистильовану воду або розчини NaCl осмолярністю від 10 до 200 мОсм/кг.

Вимірювання зміни світлопропускання проводили за допомогою фотоелектроколориметра KF-77 (Польща), обладнаного магнітним перемішувачем і термостатованим кюветним відділенням, за довжини хвилі світла 610 нм. Сперму шуки додавали в кювету, заповнену дистиллятом або водним розчином NaCl, швидко розмішували вміст струшуванням, ставили кювету у кюветне відділення і фіксували динаміку світлопропускання за допомогою самописця.

Коефіцієнт проникності плазматичних мембран сперматозоїдів для молекул води (L_p) визначали, апроксимуючи експериментальні залежності відносних об'ємів клітин від часу, розв'язуванням рівнянь теоретичної моделі. Енергію активації (E_a) процесу перенесення речовин через мембрани клітин розраховували із залежностей $L_p L_p (1/T)$, нахил яких згідно з рівнянням Арреніуса дорівнює E_a/R , де R — універсальна газова стала.



РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що швидкість і тривалість руху, а також відносне число рухливих сперматозоїдів залежить від осмолярності, іонного складу та рН середовища активації [15]. У цьому контексті, підтримання осмотичної рівноваги є однією з найбільш важливих функцій мембран сперматозоїдів, оскільки в процесі кріоконсервування виникають значні перепади осмотичного тиску на мембрані.

Осмотичність розчину для проведення дослідження розробленим способом зазвичай визначається такою, щоб у цих розчинах не відбувалося пошкодження клітин, але зміна об'єму була достатньою для його реєстрації.

За допомогою спектрофотометрії (нефелометрії) можна визначити кінетику об'єму сперматозоїдів у розчинах будь-якої осмолярності з високою чутливістю до незначних змін об'єму. Дані, що отримані цим методом, як правило, добре корелюють з даними світлової мікроскопії; використання спектрофотометрії дозволяє кількісно описати зміну об'єму сперматозоїдів. Однак, те, що спектрофотометрія дає інформацію про загальну зміну клітинного об'єму, має як свої переваги, так і недоліки [16].

Відносна зміна об'єму клітини з часом після переміщення її в гіпо- або гіпертонічний розчин описується наступним співвідношенням [17]:

$$\frac{V - V_0}{V_0} = \frac{1 - \alpha}{\pi^{out}} (\pi_0^{in} - \pi^{out}) [1 - \exp(-\gamma L_p \pi^{out} t)],$$

де V — поточне значення об'єму клітини в момент часу (t);

π_0^{in} — осмотичний тиск спермальної плазми (внутрішньоклітинний осмотичний тиск);

π^{out} — осмотичний тиск розчину, в якому знаходиться клітина;

α — частина осмотично неактивного об'єму клітини;

γ — поверхнево-об'ємне відношення клітини;

L_p — проникність клітинної мембрани для молекул води (коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани).

При цьому вираз $\frac{1 - \alpha}{\pi^{out}} (\pi_0^{in} - \pi^{out})$ характеризує величину зміни об'єму (закон Вант-Гоффа), а експоненціальне значення $1 - \exp(-\gamma L_p \pi^{out} t)$ визначає, як швидко ця зміна відбудеться, тобто описує швидкість зміни об'єму клітини.

Таким чином, відносна зміна клітинного об'єму описується залежністю виду $1 - \exp(-t/\tau)$, де $\tau = \gamma L_p \pi^{out}$ — характерний час проникнення молекул води у клітину.

Залежність характерного часу проникнення молекул води до сперматозоїдів щуки від осмолярності позаклітинного середовища представлена на рисунку 1.

Експериментально встановлено (див. рис. 1), що характерний час проникнення води до сперматозоїдів щуки складає близько 40–50 с за інкубації клітин в гіпотонічному розчині непроникної речовини осмолярністю 100–200 мОсмоль/кг (за температури +12°C). При зниженні осмолярності середовища інкубації характерний час проникнення молекул води до сперматозоїдів



збільшується, тобто в цих умовах клітина зазнає більшої зміни об'єму. Відповідна залежність характерного часу проникнення води в клітину від осмолярності середовища інкубації вказує на те, що сперматозоїди шуки за реакцією на середовища різної осмолярності близькі до «ідеальних осмометрів» [13].

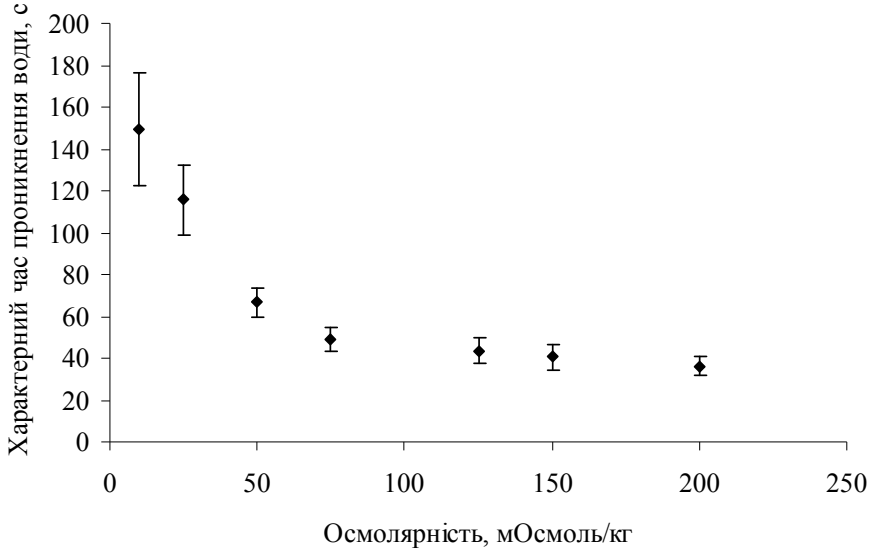


Рис. 1. Залежність характерного часу проникнення молекул води в сперматозоїди шуки від осмолярності позаклітинного середовища (за температури +12°C)

Застосування модифікованої фізико-математичної моделі Кедем-Качальського [17] дозволяє розрахувати коефіцієнт проникності мембран (L_p) сперматозоїдів для молекул води. Якщо відома кінетика відносного об'єму клітини (характерний час проникнення води до клітини в середовищі певної осмолярності), то для розрахунку L_p необхідне врахування морфометричних характеристик клітин. Припускаючи форму голівки сперматозоїда шуки сферичною та враховуючи середній радіус 0,7 мкм [15], поверхнево-об'ємне відношення клітини γ складає $4,2 \pm 0,2 \text{ мкм}^{-1}$.

Розрахована згідно з цією моделлю проникність мембран сперматозоїдів шуки для молекул води становить $5,43 \pm 1,15 \times 10^{-15} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$ (12°C). Як відомо, проникність мембран є функцією від температури [17], тому, варіюючи температуру середовища інкубації сперматозоїдів при фіксованій осмолярності, отримуємо температурну залежність проникності мембран сперматозоїдів шуки для молекул води. Зниження L_p в діапазоні температур 25–10°C характеризується енергією активації переносу води, що дорівнює $64 \pm 5 \text{ кДж/моль}$ (рис. 2). Таке значення E_a свідчить про проникнення води в клітину шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар.

Гіпоосмотична резистентність, яку визначали як час лізису 50% інкубованих в дистилаті сперматозоїдів, становить 70–110 с (12°C).

Розроблені нами підходи дозволяють досліджувати осмотичну толерантність сперматозоїдів деяких прісноводних риб [18–20], можуть бути використані як



прості і швидкі тести функціонального стану клітинних мембран. Отримані результати сприяють теоретично обґрунтованому вибору кріозахисних середовищ і режимів кріоконсервування сперматозоїдів шляхом залучення визначених параметрів сперматозоїдів до фізико-математичних моделей охолодження-відігріву.

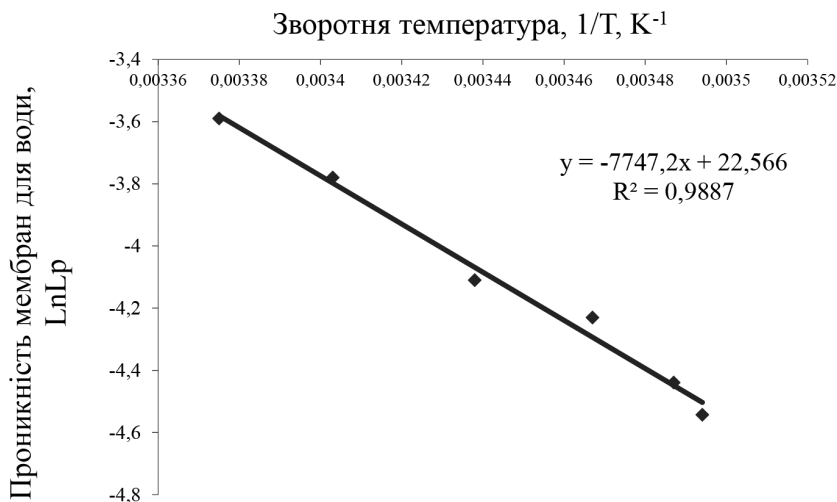


Рис. 2. Арреніусова залежність коефіцієнта проникності плазматичних мембран сперматозоїдів щуки

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

Осмотична резистентність сперматозоїдів щуки може бути визначена за допомогою фотометричного аналізу. Розроблені підходи є простими і швидкими тестами функціонального стану клітинних мембран.

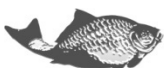
Досліджено характерний час проникнення води, що складає 40–50 с в діапазоні осмолярності 100–200 мОсмоль/кг (12°C). Коефіцієнт проникності мембран для води дорівнює $5,43 \pm 1,15 \times 10^{-15} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$.

Встановлена енергія активації перенесення води через мембрани сперматозоїдів щуки, яка дорівнює 64 ± 5 кДж/моль, свідчить про проникнення води всередину клітини шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар.

Подальше вивчення осмотичної чутливості сперматозоїдів риб сприятиме підвищенню ефективності кріоконсервування сперми.

ЛІТЕРАТУРА

1. Fuller B. J. Life in the frozen stage / Fuller B. J., Lane N., Benson E. E. — CRC Press, 2004. — 663 p.
2. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives / E. Cabrita, C. Sarasquete, S. Martínez-Páramo [et al.] // J. Appl. Ichthyol. — 2010. — Vol. 26. — P. 623—635.
3. Williot P. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) /



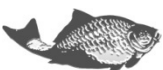
- P. Williot, E. F. Kopeika, B. F. Gontcharov // *Aquaculture*. — 2000. — Vol. 189. — P. 53—61.
4. The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout / E. Cabrita, R. Alvarez, E. Anel [et al.] // *Animal Reproduction Science*. — 1999. — Vol. 55. — P. 279—287.
 5. Kopeika E. F. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish / E. F. Kopeika, J. E. Kopeika // *Fish spermatology* / [eds. S. H. M. Alavi, J. Cosson, K. Coward et al.]. — Oxford : Alpha Science International Ltd., 2007. — P. 347—396.
 6. Fauvel C. Evaluation of fish sperm quality / C. Fauvel, M. Suquet, J. Cosson // *Appl. Ichthyol.* — 2010. — Vol. 26. — P. 636—643.
 7. Billard R. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish / R. Billard, M. P. Cosson // *Journal of Experimental Zoology*. — 1992. — Vol. 261. — P. 122—131.
 8. Kopeika E. Cryopreservation of fish sperm / E. Kopeika, J. Kopeika, T. Zhang // *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Eds. J. G. Day, G. N. Stacey. New Jersey : Humana Press, Totowa, 2007. — P. 203—217.
 9. Копейка Е. Ф. Экологическая ниша как фактор, определяющий криорезистентность сперматозоидов рыб / *Проблемы криобиологии и криомедицины*. — 2014. — Т. 24, № 4. — С. 302—311.
 10. Petrunkina A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology / A. M. Petrunkina // *Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*. — 2007. — Vol. 4. — P. 78—91.
 11. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus* / D. Pinisetty, C. Huang, Q. Dong [et al.] // *Cryobiology*. — 2005. — Vol. 50. — P. 250—263.
 12. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm / M. Hagedorn, J. Ricker, M. McCarthy [et al.] // *Cryobiology*. — 2009. — Vol. 58. — P. 12—19.
 13. Исследование проницаемости мембран сперматозоидов карпа для молекул воды / А. Ю. Пуговкин, Е. Ф. Копейка, О. А. Нардид [и др.] // *Биофизика*. — 2014. — Т. 59, № 3. — С. 481—487.
 14. Пат. № 104809, Україна, МПК G01N 33/48, G01N 15/00 (2006.01) Спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води / А. Ю. Пуговкін, Є. Ф. Копейка, Є. О. Гордієнко, О. А. Нардід ; заявл. 27.12.2012 ; опубл. 11.03.2014, Бюл. № 5.
 15. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius*) / S. M. H. Alavi, M. Rodina, T. M. Viveiros [et al.] // *Theriogenology*. — 2009. — Vol. 72. — P. 32—43.
 16. 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.
 17. Гордієнко Є. О. Фізика біомембран / Є. О. Гордієнко, В. В. Товстяк. — К. : Наук. думка, 2009. — 272 с.
 18. Пуговкин А.Ю. Осмотическая толерантность сперматозоидов некоторых пресноводных рыб / А. Ю. Пуговкин, К. И. Буцкий, Е. Ф. Копейка // *Биофизика живой клетки*. — 2014. — № 10. — С. 149—151.



19. Проникність мембран сперматозоїдів стерляді (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) для молекул води / А. Ю. Пуговкін, І. С. Кононенко, В. О. Черепнін [та ін.] // Рибогосподарська наука України. — 2016. — № 1. — С. 70—77.
20. Puhovkin A. Y. Investigation of water and cryoprotectants molecules transfer through common carp (*Cyprinus carpio*, L.) spermatozoa membranes / A. Y. Puhovkin, E. F. Kopeika // Cryobiology. — 2015. — Vol. 71, № 3. — P. 567.

REFERENCES

1. Fuller, B. J., Lane, N., & Benson, E. E. (2004). *Life in the frozen stage*. CRC Press.
2. Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., & Herráez, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol.*, 26, 623-635.
3. Williot, P., Kopeika, E. F., & Gontcharov, B. F. (2000). Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture*, 189, 53-61.
4. Cabrita, E., Alvarez, R., Anel, E., & Herraez, M. P. (1999) The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Animal Reproduction Science*, 55, 279-287.
5. Kopeika, E. F., & Kopeika, J. E. (2007). Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. *Fish spermatology*. Oxford : Alpha Science International Ltd.
6. Fauvel, C., Suquet, M., & Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. *Appl. Ichthyol.*, 26, 636-643.
7. Billard, R., & Cosson, M. P. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261, 122-131.
8. Kopeika, E., Kopeika, J., & Zhang, T. (2007). *Cryopreservation of fish sperm Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Totowa, New Jersey : Humana Press.
9. Kopeika, E. (2014). Ekologicheskaya nisha kak faktor, opredelyayushchiy kriorezistentnost' spermatozoidov ryb. *Problemy kriobiologii i kriomeditsiny*, 24, 4, 302-311.
10. Petrunkina, A. M. (2007). Fundamental aspects of gamete cryobiology. *Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*, 4, 78-91.
11. Pinisetty, D., Huang, C., & Dong, Q. et al. (2005). Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cryobiology*, 50, 250-263.
12. Hagedorn, M., Ricker, J., & McCarthy, M. et al. (2009). Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Cryobiology*, 58, 12-19.
13. Puhovkin, A. Yu., Kopeika, E. F., Nardid, O. A., & Cherkashyna, Ya. O. (2014). Issledovanie pronitsaemosti membran spermatozoidov carpa dlia molekul vody. *Biofizika*, 59, 3, 481-487.
14. Puhovkin, A. Yu., Kopeika, Ye. F., Hordiienko, Ye. O. et al. *Sposib vyznachennia pronyknosti membran spermatozoidiv koropa do molekul vody*. ;Patent of Ukraine № 104809.
15. Alavi, S. M. H., Rodina, M., Viveiros, T. M., & Cosson, J. et al. (2009). Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius*). *Theriogenology*, 72, 32-43.



16. Bondarenko, O., Dzyuba, B., & Cosson, J. et al. (2013). Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: Interspecies differences. *Theriogenology*, 79, 872-881.
17. Hordiienko, Ye. O., & Tovstiyak, V. V. (2009). *Fizyka biomembran*. Kyiv : Nauk. dumka.
18. Puhovkin, A. Yu., Butskiy, K. I., & Kopeika, E. F. (2014). Osmotycheskaia tolerantnost spermatozoidov nekotorykh presnovodnykh ryb. *Vyofyzyka zhyvoi kletki*, 10, 149-151.
19. Puhovkin, A. Yu., Kononenko, I. S., Cherepnin, V. O., Hrytsyniak, I. I., & Kopeika Ye. F. (2016). Pronyknist membran spermatozoidiv sterliadi (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) dlia molekul vody. *Rybohospodarska nauka Ukrainy*, 1, 70-77.
20. Puhovkin, A. Y., & Kopeika, E. F. (2015). Investigation of water and cryoprotectants molecules transfer through common carp (*Cyprinus carpio*, L.) spermatozoa membranes. *Cryobiology*, 71, 3, 567.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЩУКИ (*ESOX LUCIUS* L., 1758) ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ИХ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

А. Ю. Пуговкин, antonpuhovkin@gmail.com, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Е. Ф. Копейка, cryo@online.kharkov.ua, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

К. Б. Миксон, cryo@online.kharkov.ua, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

В. А. Черепнин, info@if.org.ua, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

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

Цель. Изучение осмотической чувствительности сперматозоидов щуки (*Esox lucius* L., 1758).

Методика. Осмотические реакции сперматозоидов исследовали методом спектрофотометрии на основании данных о кинетике светопропускания суспензий клеток, помещенных в дистиллированную воду или растворы NaCl осмолярностью 10–200 мОсм/кг. Измерения изменений светопропускания проводили с помощью фотоэлектроколориметра КФ-77 (Польша), оборудованного магнитной мешалкой и термостатированным кюветным отделением. Коэффициент проницаемости плазматических мембран сперматозоидов для молекул воды (L_p) определяли, аппроксимируя экспериментальные зависимости относительных объемов клеток от времени решениями уравнений теоретической модели. Энергию активации (E_a) процесса переноса веществ через мембраны клеток рассчитывали из зависимостей $\ln L_p$ от обратной температуры.

Результаты. Характерное время проникновения воды составляет 40–50 с в диапазоне осмолярности 100–200 мОсмоль/кг (12°C). Проницаемость мембран сперматозоидов щуки для воды составляет $5,43 \pm 1,15 \times 10^{-15} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$.

Энергия активации переноса воды через мембраны клеток составляет 64 ± 5 кДж/моль, что свидетельствует о проникновении воды внутрь сперматозоидов путем пассивной диффузии через липидный бислой. Осмотическая резистентность сперматозоидов щуки может быть определена с помощью фотометрического анализа. Разработанные подходы являются простыми и быстрыми тестами функционального состояния клеточных мембран.



Научная новизна. Впервые определен коэффициент проницаемости плазматических мембран сперматозоидов щуки и его температурная зависимость.

Практическая значимость. Результаты работы используются при разработке сред и режимов криоконсервирования сперматозоидов щуки.

Ключевые слова: сперматозоиды, щука (*Esox lucius L., 1758*), осмотическая чувствительность, проницаемость мембран, Аррениусовы зависимости.

A STUDY OF THE OSMOTIC SENSITIVITY OF PIKE (*ESOX LUCIUS L., 1758*) SPERMATOZOA FOR THE OPTIMIZATION OF THEIR CRYOPRESERVATION

A. Puhovkin, antonpuhovkin@gmail.com, Institute for problems of cryobiology and cryomedicine NAS, Kharkiv

E. Kopeika, cryo@online.kharkov.ua, Institute for problems of cryobiology and cryomedicine NAS, Kharkiv

K. Mikson, cryo@online.kharkov.ua, Institute for problems of cryobiology and cryomedicine NAS, Kharkiv

V. Cherepnin, info@ifr.com.ua, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

I. Hrytsyniak, info@ifr.com.ua, Institute of Fisheries NAAS, Kyiv

Purpose. The study of the osmotic sensitivity of pike (*Esox lucius L., 1758*) spermatozoa.

Methodology. The osmotic response of pike spermatozoa was investigated by spectrophotometry method based on the kinetics of light transmission of cells suspensions, which were placed in distilled water and 10–200 mOsm/kg solutions of NaCl.

Measurements of light transmittance were carried out using photoelectrocolorimeter KF-77 (ZALIMP, Poland), equipped with a magnetic stirrer and thermostatted sample compartment. The coefficient of permeability of spermatozoa plasma membrane for water molecules (L_p) was determined by approximation of the experimental time dependences of the relative volume by solutions of the equations of modified Kedem-Kachalsky physical-mathematical model of transmembrane mass transport. The activation energy (E_a) of the substances transfer across the cell membrane was calculated taking into account $\ln L_p(1/T)$ dependencies.

Findings. The characteristic time of water penetration is about 40–50 s within 100–200 mOsm/kg range (12 °C). Membrane permeability coefficient of pike spermatozoa for water molecules is $5.43 \pm 1.15 \times 10^{-15} \text{ m}^3/\text{N}\cdot\text{s}$. The decline in coefficient of membrane permeability for water molecules in the range of 25–10 °C is characterized by the activation energy of water transfer, which is $64 \pm 5 \text{ kJ/mol}$, that indicates about water molecules penetration into spermatozoa via a passive diffusion through the lipid bilayer. Hypoosmotic resistance of pike spermatozoa, estimated as time before lysis of 50% cells incubated in distilled water, is 70–110 s (12 °C).

Developed approaches also can be used as simple and quick tests of the functional state of cell membranes.

Originality. The coefficient of plasma membranes permeability of pike spermatozoa and its temperature dependence were defined for the first time.

Practical value. The results are used in the design of media and modes of pike sperm cryopreservation.

Keywords: sperm, pike (*Esox lucius L., 1758*), osmotic sensitivity, membrane permeability, Arrhenius dependencies.

