

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

ПУГОВКІН АНТОН ЮРІЙОВИЧ

УДК 591.463.11–7:577.352.462:57.043

**ОСМОТИЧНА РЕАКЦІЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРІСНОВОДНИХ РИБ
НА ДІЮ ФАКТОРІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ**

03.00.19 – кріобіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Харків – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Копейка Євгеній Федорович,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
м. Харків, виконуючий обов'язки завідувачу відділу
кріобіології систем репродукції.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Жегунов Геннадій Федорович,
Харківська державна зооветеринарна академія МОН України,
завідувач кафедри хімії та біології;

доктор біологічних наук, професор
Бучацький Леонід Петрович,
ІНЦ «Інститут біології та медицини» Київського
національного університету імені Тараса Шевченка МОН
України, старший науковий співробітник лабораторії
фармакології і експериментальної патології.

Захист дисертації відбудеться « 20 » березня 2018 р. о 13:30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розіслано « 13 » лютого 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Кріоконсервування є пріоритетним методом довгострокового зберігання статевих продуктів рідкісних і зникаючих видів риб в умовах погіршення екологічної ситуації у світі та, зокрема, в Україні. Крім того, даний метод дозволяє проводити селекцію цінних промислових видів для підвищення рентабельності рибництва (Вепринцев Б. Н., 1978, Curry M. R., 2000; Gwo J.-C., 2009; Копейка Е. Ф., 2011).

Роботи з кріоконсервування сперматозоїдів виконувались більше ніж з двомастами видами риб (Fuller B. J., 2004), в основному з прісноводними видами, які мають промислове значення (Zhang T. T., 2004). Ефективність кріоконсервування сперматозоїдів риб видоспецифічна (Vobe J., 2010). При цьому результати кріоконсервування сперми морських видів риб виявилися більш успішними, ніж прісноводних (Suquet M., 2000, Koreika E., 2007, Cabrita E., 2009). Показник запліднення кріоконсервованою спермою морських видів риб може бути порівняний з відповідним показником у ссавців, тоді як для сперми прісноводних риб характерна значно нижча кріорезистентність. Так, високий рівень запліднення свіжоотриманих ооцитів кріоконсервованою спермою був досягнутий лише у декількох видів риб за рахунок модифікації методики запліднення.

Відомо, що якість сперми істотно знижується в процесі кріоконсервування, тому для запліднення відігрітою спермою її запаси повинні бути значно більшими, ніж свіжоотриманої. Внаслідок високої варіабельності якості сперми риб той самий метод кріоконсервування може бути неефективним для сперми риб іншої популяції (Koreika E. F., 2007).

Кріорезистентність сперматозоїдів пов'язана з умовами розмноження риб, перш за все, з певною температурою води під час нересту та її солоністю (Labbe S., 2001; Копейка Е. Ф., 2014). Відомо, що кріорезистентність сперматозоїдів риб, які нерестяться в прісній воді, нижча за цей показник сперматозоїдів морських риб. Проте причини різної внутрішньовидової кріорезистентності сперматозоїдів риб на даний час не визначено (Dzuba V. B., 2002; Zhang T. T., 2004; Vobe J., 2010).

Через нестачу інформації щодо характеристик стійкості мембран сперматозоїдів риб до чинників кріоконсервування методики охолодження-відігрівання удосконалюються переважно емпіричним шляхом – підбором складу кріозахисних середовищ або режимів охолодження-відігрівання. У зв'язку із цим важливо розробити теоретично обґрунтований підхід до кріоконсервування сперматозоїдів, який полягатиме у визначенні причин внутрішньо- та міжвидових відмінностей кріорезистентності сперматозоїдів та властивостей, які пов'язані зі стійкістю сперматозоїдів до факторів кріоконсервування.

Витримка клітин у гіпертонічних розчинах кріопротекторів, навіть без заморожування, здатна викликати значні флуктуації клітинного об'єму (Cabrita E., 1999), що може пошкоджувати клітини або впливати на їх чутливість до факторів кріоконсервування. Відомо, що одним з основних факторів пошкодження клітин під час заморожування є температурно-осмотичний шок (Mazur P., 1972). Зважаючи на те, що перепад осмотичного тиску є однією з причин активації руху сперматозоїдів

риб, зміна осмотичності мікрооточення клітин у процесі кріоконсервування за стандартними швидкостями охолодження-відігрівання може призводити до ініціації рухливості сперматозоїдів, що негативно впливає на результати запліднення відталою спермою після кріоконсервування (Boryshpolets S., 2009).

Отже, актуальним є вивчення осмотичної чутливості сперматозоїдів риби та її зміни під впливом факторів кріоконсервування. Для вибору режимів і середовищ кріоконсервування необхідно враховувати параметри сперматозоїдів, що характеризують їх осмотичну резистентність, тобто властивість клітин зберігати життєздатність внаслідок змін осмотичного тиску зовнішнього середовища.

Проникність плазматичних мембран до молекул води і кріопротекторів є важливим параметром для визначення швидкостей охолодження у процесі кріоконсервування генетичного матеріалу риби (Petrunkina A. M., 2007).

На сьогодні відомі лише поодинокі результати дослідження проникності мембран сперматозоїдів риби до води і кріопротекторів (Pinisetty D., 2005; Hagedorn M., 2009). Це пов'язано з видовою специфікою сперматозоїдів риби і відсутністю зручних методів, які дозволили б визначити осмотичні характеристики сперматозоїдів безпосередньо перед кріоконсервуванням та провести експерименти в польових умовах (Fauvel S., 2010). Розробка таких методів може бути інструментальною базою для дослідження і сприяти розвитку цієї області кріобіологічної науки.

Актуальним лишається дослідження біофізичних характеристик (осмотичної реакції клітин, транспорту води через мембрани) у фізіологічних умовах (Verma D. K., 2009; Alavi S. M. H., 2009; Bondarenko O., 2013) і протягом кріоконсервування (Li P., 2010; Spindler R., 2012; Dzyuba B., 2013), а також розробка і застосування теоретичних моделей (Santos M. V., 2013).

Таким чином, узагальнюючи вищенаведені міркування, можна стверджувати, що розробка відповідної інструментальної бази та подальше вивчення осмотичної реакції сперматозоїдів риби на дію факторів кріоконсервування є актуальними і перспективними для розуміння механізмів кріорезистентності сперми риби, створення нових, більш ефективних технологій кріоконсервування їх генетичного матеріалу та, відповідно, вирішення екологічних і загальнобіологічних проблем сучасності.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану НДР Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України і тем відділу кріоконсервування системи репродукції «Вивчення змін репродуктивної функції тварин і людини під впливом кріоконсервованих клітинних препаратів та фізико-хімічних факторів» (2011–2015 рр.) шифр теми 2.2.6.58, № державної реєстрації 0111U001197) та «Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів» (2016 р, шифр теми 2.2.6.108, № державної реєстрації 0116U003498).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є встановлення взаємозв'язку між осмотичною реакцією сперматозоїдів прісноводних риби на дію факторів кріоконсервування та їхньою кріорезистентністю. Для досягнення поставленої мети розв'язано такі наукові завдання:

1. Розробити спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів прісноводних риб до молекул води.

2. Вивчити вплив осмолярності та температури середовища інкубації на кінетику клітинного об'єму сперматозоїдів прісноводних риб.

3. Вивчити вплив гормональної стимуляції дозрівання сперми прісноводних риб на осмотичну резистентність сперматозоїдів.

4. Дослідити проникність мембран сперматозоїдів прісноводних риб до молекул води і кріопротекторів.

5. Дослідити осмотичну реакцію сперматозоїдів прісноводних риб після охолодження-відігрівання.

Об'єкт дослідження. Кріорезистентність сперматозоїдів прісноводних риб.

Предмет дослідження. Осмотична реакція сперматозоїдів прісноводних риб та її зміна під впливом факторів кріоконсервування.

Методи дослідження. Під час виконання роботи використовували такі методи: ЕПР-спектроскопію для визначення зміни вмісту вільної внутрішньоклітинної води в сперматозоїдах прісноводних риб; спектрофотометрію для вивчення осмотичної реакції та визначення концентрації сперматозоїдів прісноводних риб; фізико-математичне моделювання для розрахунку коефіцієнтів проникності плазматичних мембран сперматозоїдів прісноводних риб до молекул води та кріопротекторів; світлову мікроскопію для визначення параметрів рухливості сперматозоїдів прісноводних риб; гормональну стимуляцію дозрівання плідників для отримання сперми; кріоконсервування сперми прісноводних риб, а також методи статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. У роботі розроблено новий спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів прісноводних риб для молекул води, використання якого можливе в умовах, наближених до польових, що є надзвичайно важливим для дослідження такого об'єкту як сперма риб.

Вперше визначено кількісні значення коефіцієнтів проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа, щуки і стерляді до молекул води, а також проникності мембран сперматозоїдів коропа до етиленгліколю (ЕГ), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), диметилсульфоксиду (ДМСО) та гліцерину й енергії активації процесів переносу цих речовин через клітинну мембрану.

Показано, що проникність плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для молекул води зростає з часом витримки між її отриманням та кріоконсервуванням, а також із часом після відігрівання.

Вперше показано, що проникність плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для молекул води після кріоконсервування зростає зі зменшенням кінцевої температури охолодження.

У роботі розроблено новий спосіб визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів риб. Набуло подальшого розвитку дослідження зміни осмотичної резистентності сперматозоїдів риб під впливом температури та гормональної стимуляції дозрівання плідників.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи дозволяють розширити уявлення про кріорезистентність сперматозоїдів риб.

Розроблено спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води, який полягає в інкубації сперматозоїдів у гіпотонічному сольовому розчині відомої осмолярності і реєстрації оптичної характеристики суспензії за допомогою фотоелектроколориметра (Патент України №104809). Цей спосіб використовували під час дослідження взаємодії фармацевтичних препаратів із ліпідними мембранами для визначення зміни проникності мембран, що відображає перспективність його використання як інформативного тесту, а сперматозоїди коропа – як модельний об'єкт.

Одержані в роботі дані про транспортні характеристики плазматичних мембран сперматозоїдів риб можуть бути використані під час розробки методичних підходів кріоконсервування сперматозоїдів риб.

Розроблений спосіб оцінки якості сперматозоїдів коропа (Патент України №83803) дозволяє оцінювати осмотичну резистентність сперматозоїдів риб.

Розроблений спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб (Патент України №115006) може бути використаний при штучному заплідненні та збереженні генофонду осетрових риб.

Результати роботи можуть бути рекомендовані для використання в учбовому процесі в навчальних закладах для підготовки спеціалістів у різних галузях біології, зокрема кріобіології, та сільськогосподарських наук.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним науковим дослідженням. Основні результати роботи одержані здобувачем особисто. Автор дисертаційної роботи разом із науковим керівником провів патентно-інформаційне дослідження наукової проблеми, визначив тему, мету та завдання роботи, а також методи досліджень. Здобувач брав безпосередню участь у проведенні експериментів, результати яких представлено в роботі. Статистична обробка, аналіз, інтерпретація та узагальнення одержаних результатів, формулювання основних положень і висновків проведено автором самостійно.

У роботах, опублікованих у співавторстві, особистий внесок здобувача полягає:

у роботах [1, 3–6, 11, 12, 14–20, 23–25, 27, 29] – у пошуці й аналізі даних джерел літератури, участі в плануванні експериментів, проведенні експериментів, обробці даних експериментального дослідження, участі в інтерпретації результатів дослідження і формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

у роботах [2, 7, 21, 22, 26] – у пошуці й аналізі даних джерел літератури, участі в плануванні експериментів, проведенні експериментів з визначення концентрації сперматозоїдів риб, їхньої осмотичної резистентності після дії різних гормональних препаратів, обробці даних експериментального дослідження, участі в інтерпретації результатів дослідження і формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

у роботах [8, 28, 31] – у пошуці й аналізі даних джерел літератури, участі в плануванні експериментів, проведенні експериментів з визначення впливу фармацевтичних препаратів на проникність мембран сперматозоїдів коропа до молекул води, обробці даних експериментального дослідження, участі в

інтерпретації результатів дослідження і формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

у роботах [9, 10, 13, 30, 32, 33] – у пошуці й аналізі даних джерел літератури, участі в плануванні експериментів, проведенні експериментів з оптимізації умов кріоконсервування сперми стерляді, обробці даних експериментального дослідження, участі в інтерпретації результатів дослідження і формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

Апробація матеріалів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на IV та VI міжнародних іхтіологічних науково-практичних конференціях (м. Одеса, 2011 р. та м. Тернопіль, 2013 р.); на міжнародних науково-технічних конференціях «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» (м. Севастополь, 2012 та 2013 рр.); на 36, 37, 38, 39, 40, 41-й конференціях молодих учених ІПКіК НАН України спільно з кафедрою UNESCO «Холод в біології і медицині» (м. Харків, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017 рр.); на міжнародній конференції Товариства низькотемпературної біології «SLTB – 2013» (м. Ганновер, Німеччина, 2013 р.); на міжнародній заочній науково-практичній конференції «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (м. Сиктивкар, Росія, 2014 р.); на міжнародній конференції Товариства низькотемпературної біології (SLTB) «Freezing biological time» (м. Лондон, Великобританія, 2014 р.); на міжнародній конференції «Консервация генетических ресурсов» (м. Пушино, Росія, 2014 р.); на міжнародній конференції Товариства кріобіології Annual meeting of the Society for Cryobiology «CRYO – 2015» (м. Острава, Чехія, 2015 р.); на X міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (м. Харків, 2015 р.); на VI міжнародній науково-практичній конференції вчених, аспірантів «Наукові здобутки у вирішенні актуальних проблем виробництва та переробки сировини, стандартизації і безпеки продовольства» (м. Київ, 2016 р.); на 20-й міжнародній Пущинській школі-конференції молодих учених «Биология – наука XXI века» (м. Пушино, Росія, 2016 р.).

Публікації. Основні положення дисертації викладені в 33 наукових роботах, з них 10 статей у зарубіжних та вітчизняних спеціалізованих наукових виданнях, 20 публікацій тез доповідей на міжнародних і національних конференціях, 2 патенти України на винаходи та 1 патент України на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, основної частини, до якої входить п'ять розділів (огляд літератури, матеріали і методи дослідження, отримані результати і їх обговорення, що викладено в трьох розділах), аналізу і узагальнення результатів, висновків, списку цитованої літератури. Дисертація містить 31 рисунок і 7 таблиць. Повний обсяг дисертації 161 сторінка. Список використаних джерел містить 257 найменувань на 30 сторінках друкованого тексту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** подано сучасні уявлення щодо кріоконсервування сперми прісноводних риб, обґрунтовано актуальність теми, зв'язок роботи з науковими програмами і темами, сформульовано мету і задачі дослідження, показано новизну і практичну значимість одержаних результатів та особистий внесок здобувача в опублікованих із співавторами роботах, наведено відомості про апробацію результатів.

У розділі 1 «Огляд літератури» представлено аналітичний огляд експериментальних і теоретичних даних літератури, які стосуються сучасних уявлень про осмотичну реакцію сперматозоїдів риб та фізіологічне значення механізмів регуляції клітинного об'єму. Приділено увагу виключному значенню осмотичного чинника для активації рухливості сперматозоїдів риб. Висвітлено основні теоретичні підходи до дослідження клітинного об'єму сперматозоїдів риб і визначення проникності мембран цих клітин до молекул води та кріопротекторів. Розглянуто сучасні явлення про причини різної кріорезистентності сперматозоїдів риб та виділено основні напрямки удосконалення методів їх кріоконсервування.

В огляді літератури критично проаналізовані результати багатьох дослідників і зроблено висновок, що сучасні дослідження необхідно зосередити на забезпеченні однорідних і оптимальних результатів кріоконсервування сперматозоїдів прісноводних риб.

У розділі 2 «Матеріали і методи дослідження» дано загальну характеристику об'єктів, методів і матеріалів досліджень.

В роботі досліджували сперму риб: з родини корошових – коропа (*Cyprinus carpio*, L., 1758), білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, V., 1844), з родини щукових – щуки (*Esox lucius*, L., 1758), з родини осетрових – стерлядь (*Acipenser ruthenus*, L., 1758).

Експерименти на тваринах проводили у відповідності до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Перед отриманням сперми самці риб, що досліджувались, не менше 7 днів містилися при нерестових температурах у риборозводних басейнах. Сперму збирали в сухі і чисті ємкості методом зціджування. Сперму коропа отримували з використанням прийнятої в рибоводній практиці методики гіпофізарних ін'єкцій із розрахунку 2 мг/кг маси одноразово (Гербільський Н. Л., 1947). Сперму товстолобика отримували із застосуванням ін'єкцій препарату «Овопель» («InterSh», Угорщина) із розрахунку 0,5 гранул/кг або суміші сурфагону (Сурф) і метоклопраміду (Мет) із розрахунку 1 мкг/кг Сурф («МосАгроГен», Росія) та 5 мг/кг Мет (ПАТ «Дарниця», Україна) за методикою (Буцький К. І., 2014). Сперму щуки отримували із застосуванням ін'єкцій Сурф із розрахунку 0,2 мкг/кг маси. Сперму стерляді отримували із застосуванням суміші Сурф і Мет із розрахунку 1 мкг/кг Сурф та 10 мг/кг Мет (Буцький К. І., 2014).

У роботі використовували наступні реактиви: NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃, KHCO₃, MgSO₄×7H₂O, фруктоза, сахароза, манітол, трис(гідроксиметил)амінометан, HCl, EG, ДМСО, 1,2-ПД, метанол, гліцерин. Усі реактиви фірми «Sigma-Aldrich», США, та «Реахим», Росія, марки «х.ч.» або «ч.д.а.».

Рівень рухливості сперматозоїдів виражали як відношення клітин, що рухаються прямолінійно, поступально, до загальної кількості сперматозоїдів у полі зору мікроскопа, і виражали у відсотках. Тривалість руху вимірювали за допомогою секундоміру як час від моменту активації сперматозоїдів на предметному склі до припинення поступового руху принаймні 90% клітин (Billard R., 1995).

Для визначення кількісної зміни вмісту вільної внутрішньоклітинної води в сперматозоїдах коропа застосовували метод ЕПР з використанням водорозчинного

зонду ТЕМПОН (2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил) фірми «Aldrich» на спектрометрі «Bruker» ER 100D (Німеччина) зі стандартною термоприставкою за методом (Du L., 1994). Вимірювання проводили за температури 20 °С. Спектри ЕПР отримували через 3 хв після додавання сперми в середовище інкубації.

Осмолярність активуючих розчинів і спермальної плазми визначали за допомогою автоматичного кріоскопічного осмометра OSMOMAT 030 (Gonotec GmbH, Німеччина).

Осмотичні реакції сперматозоїдів досліджували за допомогою фотоелектроколориметра KF-77 (Польща), обладнаного магнітним перемішувачем і термостатованим кюветним відділенням за розробленою нами методикою (Патент України №104809).

Осмотичну резистентність сперматозоїдів визначали за розробленою нами методикою (Патент України №83803) як час лізису 50% сперматозоїдів під час інкубації в дистильованій воді.

Коефіцієнт проникності плазматичних мембран сперматозоїдів (L_p) для молекул води визначали, апроксимуючи експериментальні залежності відносних об'ємів клітин від часу з рішеннями рівнянь теоретичної моделі (Гордиенко Е. А., 1994). Енергію активації (E_a) процесу перенесення речовин через мембрани клітин розраховували із залежностей $\ln L_p(1/T)$, нахил яких згідно з рівнянням Ареніуса дорівнює E_a/R , де R – універсальна газова постійна.

Для кріоконсервування сперми коропа застосовували методику (Копейка Е. Ф., 1986), яка передбачає трьохетапну програму охолодження: від 0 °С до -15 °С зі швидкістю 3–5 °С/хв, від -15 °С до -70 °С зі швидкістю 15–20 °С/хв, від -70 °С до -196 °С зануренням у рідкий азот. Відігрівали сперму на водяній бані за температури 40 °С до появи рідкої фази.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Origin 8.5» («OriginLab Corporation», США) та «Microsoft Office Excel» (США). Дані на рисунках і в таблицях наведено як середнє значення \pm стандартне відхилення. При порівнянні двох вибірок застосовували u -тест Мана-Уїтні. Ступінь кореляції визначали за коефіцієнтом кореляції Пірсона. Статистично значимими вважали розходження при $p < 0,05$.

У розділах 3-5 представлені результати власних досліджень та їх обговорення.

Розробка способів визначення осмотичної резистентності та проникності плазматичних мембран сперматозоїдів риб до молекул води.

Розроблено спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води, який включає інкубацію клітин у гіпотонічному розчині NaCl, реєстрацію залежності світлопропускання суспензії сперматозоїдів від часу та апроксимацію отриманої залежності рішеннями модифікованої фізико-математичної моделі трансмембранного масопереносу Кедем-Качальського. Цей спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів до молекул води базується на тому явищі, що під час інкубації клітин в гіпотонічному розчині непроникної до клітини речовини збільшення об'єму клітин за рахунок позаклітинної води призводить до збільшення світлопропускання суспензії, яке, в свою чергу, характеризує кінетику відносного об'єму клітин.

Розроблено спосіб визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів коропа, який включає інкубацію клітин у дистилаті та реєстрацію залежності світлопропускання суспензії сперматозоїдів від часу, відокремлення залежності пошкодження сперматозоїдів з часом, при цьому час пошкодження 50% клітин визначає осмотичну резистентність сперматозоїдів.

Вивчення впливу осмолярності та температури середовища інкубації на кінетику клітинного об'єму сперматозоїдів риб.

Для вивчення осмотичної реакції сперматозоїдів коропа визначали зміну вмісту внутрішньоклітинної вільної води в сперматозоїдах, інкубованих у середовищах NaCl методом ЕПР. На рис. 1 відображена залежність відносного вмісту вільної внутрішньоклітинної води (V/V_0) сперматозоїдів коропа від відношення осмотичності внутрішньо- і позаклітинного середовища (π_0/π_{out}). Таким чином, за середньої осмотичності плазми 250 мОсмоль/кг, в діапазоні осмотичності позаклітинного середовища від 100 до 400 мОсмоль/кг спостерігається залежність, що є близькою до лінійної. Це свідчить про те, що сперматозоїди коропа за осмотичними властивостями близькі до «ідеальних осмометрів», фізичні основи яких визначаються законом Бойля – Вант-Гоффа.

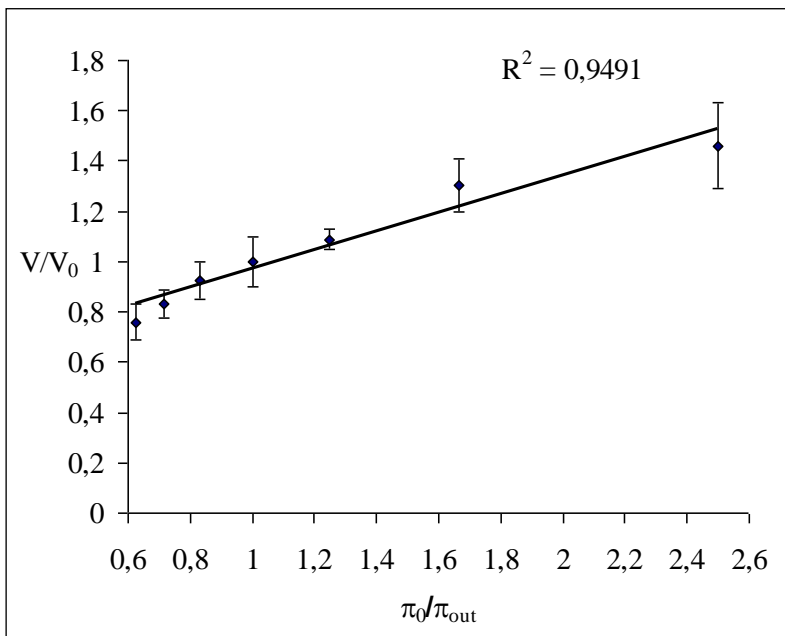


Рис. 1. Осмотична реакція сперматозоїдів коропа за температури 20 °С. Значення осмолярності нормовані до 250 мОсм/кг (середнє значення \pm С.В., n=5)

Попередні експерименти показали, що основна зміна об'єму сперматозоїдів відбувається протягом 2–3 хвилин після поміщення їх у неізотонічне середовище. Оскільки підготовка реєстрації спектру ЕПР займає такий самий час, то визначення кінетики об'єму сперматозоїдів коропа даним способом було неможливим.

Натомість використання розробленого нами спектрофотометричного методу дозволило отримати дані про кінетику зміни об'єму і цей метод виявився зручним та достатньо чутливим. На рис. 2 наведені залежності нормованого світлопропускання (ΔT , норм) у розчинах різної осмолярності. Так, через одну хвилину в розчині 200 мОсм/кг, де клітини зазнають незначного перепаду осмотичного тиску на мембранах, урівноваження внаслідок осмотичної реакції майже завершене, а в розчині 40 мОсм/кг урівноваження відбулось менш ніж на половину.

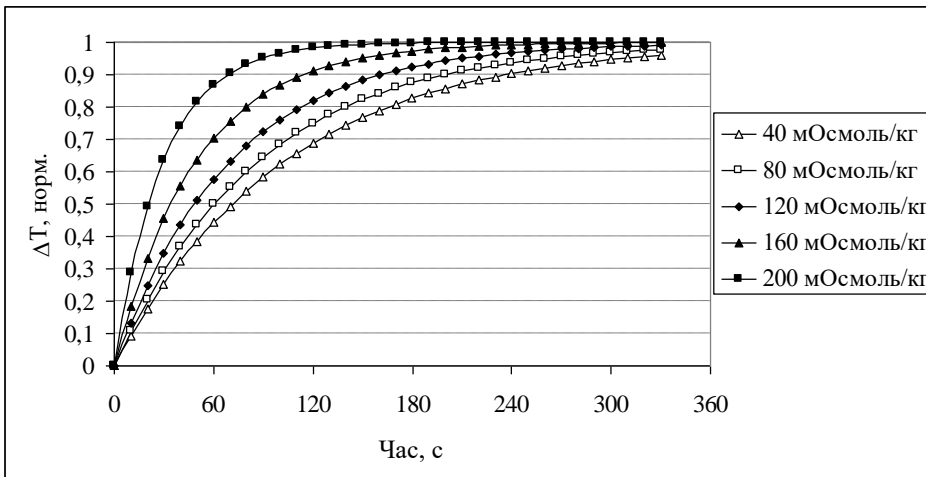


Рис. 2. Кінетика нормованого світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа в розчинах різної осмолярності за температури 20 °C (n=6)

На рис. 3 представлена кінетика нормованого світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа за різної температури середовища інкубації. Показано, що вплив температури на кінетику світлопропускання вагомий: зміна температури від 12 до 27 °C призводить до такого ж ефекту на кінетику світлопропускання, як і зміна осмотичної концентрації середовища інкубації з 200 до 40 мОсмоль/кг.

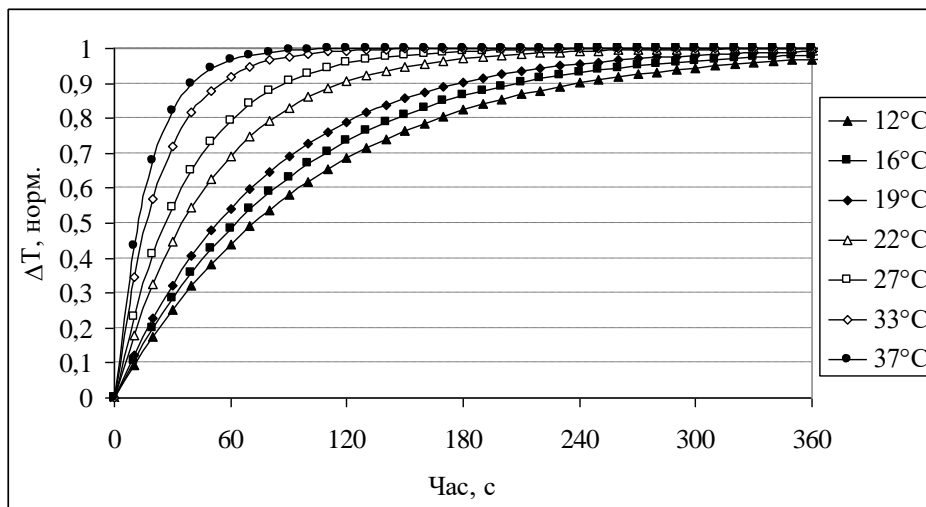


Рис. 3. Кінетика нормованого світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа за різної температури середовища інкубації осмолярністю 100 мОсмоль/кг (n=6)

На рис. 4 наведені дані про відносну зміну вмісту води V/V_0 в сперматозоїдах коропа та значення відносного світлопропускання T/T_0 , які отримані в умовах однакової осмолярності середовищ інкубації, що дає змогу побудувати їх наведеним чином.

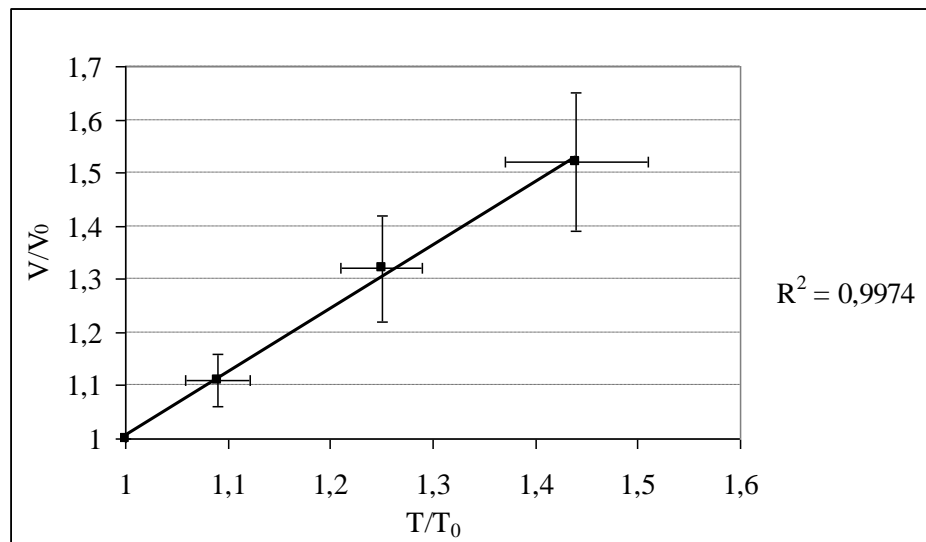


Рис. 4. Порівняння зміни вмісту води V/V_0 в сперматозоїдах коропа (ЕПР-спектроскопія) та відносного світлопропускання T/T_0 суспензії сперматозоїдів (спектрофотометрія)

Обидві залежності добре апроксимуються лінійними функціями, що свідчить про високий ступінь додатної лінійної кореляції. Коефіцієнт кореляції Пірсона складає $R^2 = 0,9974$, що є статистично значущим при рівні значимості $p = 0,01$.

Таким чином, можна зробити висновок, що дані спектрофотометричного методу відображають як абсолютну зміну об'єму клітин, так і характеризують сам процес набухання сперматозоїдів.

Вивчення впливу гормональної стимуляції дозрівання сперми риб на осмотичну чутливість сперматозоїдів.

Гормональна стимуляція риб є обов'язковою при отриманні гамет для штучного запліднення. Для дослідження впливу гіпофізарної стимуляції дозрівання експеримент проводили наступним чином: вивчали осмотичні характеристики сперматозоїдів, які були отримані від самців без попередньої гормональної стимуляції, а потім за відомою методикою робили ін'єкції та отримували сперму через 24 години після стимуляції і знову досліджували параметри осмотичної чутливості сперматозоїдів. Результати експерименту наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив гіпофізарної стимуляції дозрівання на сперму коропа

Характеристика	Сперма, яка отримана без гормональної стимуляції	Сперма, яка отримана після гормональної стимуляції
Концентрація сперми, млрд/мл	26,4±3,5	24,0±3,4
Маса еякуляту, г	0,29±0,19*	1,76±1,25*
Осмотична резистентність, с	269±28	273±16
Ширина розподілу, с	42,8±7,1*	52,6±8,9*
Час руху сперматозоїдів, с	97±18*	68±14*

Примітка. * – відмінність статистично значуща між двома вибірками, $p < 0,05$, $n=6$.

Як впливає з проведеного експерименту, гормональна стимуляція сперматогенезу не мала істотного впливу на концентрацію клітин, однак отримання великих об'ємів сперми в результаті гормональної стимуляції часто асоціюється з дещо меншою концентрацією сперматозоїдів за рахунок більшого розведення клітин порожнинної рідиною. Середня осмотична резистентність сперматозоїдів, отриманих з використанням гіпофізарних ін'єкцій і без гормональної стимуляції, значуще не відрізняється. При цьому більша ширина розподілу динаміки пошкодження клітин після гормональної стимуляції свідчить про збільшення ступеня гетерогенності суспензії сперматозоїдів, тобто наявності в еякуляті клітин з більш вираженою різницею осмотичної резистентності. Також статистично значущі відмінності мали час руху сперматозоїдів та середня маса отриманих еякулятів.

Дослідження проникності мембран сперматозоїдів риб до молекул води і кріопротекторів.

Проникність плазматичних мембран до молекул води і кріопротекторів є важливим параметром для визначення швидкостей охолодження у процесі кріоконсервування генетичного матеріалу риб.

Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів різних видів риб спектрофотометричним методом дозволило встановити наступні значення проникності мембран до води та відповідні енергії активації перенесення води. Найнижчу проникність мембран мали сперматозоїди щуки, дещо більшу – коропа і найбільшу – стерляді (таблиця 2).

Таблиця 2

Проникність мембран сперматозоїдів щуки, стерляді і коропа до молекул води

Параметр	Щука (<i>Esox lucius</i> L.)	Стерлядь (<i>Acipenser ruthenus</i> L.)	Короп (<i>Cyprinus carpio</i> L.)
Температура нересту, °С	4–13	11–16	18–22
Коефіцієнт проникності мембран, м ³ /Н·с, 20 °С	1,13±0,24×10 ⁻¹⁴ a	5,96±0,83×10 ⁻¹³ b	3,05±0,40×10 ⁻¹⁴ c
Коефіцієнт проникності мембран, м ³ /Н·с	5,43±1,15×10 ⁻¹⁵ d (12 °С)	3,52±0,49×10 ⁻¹³ e (15 °С)	3,05±0,40×10 ⁻¹⁴ c (20 °С)
Енергія активації переносу води, кДж/моль	64±5 ^f	74±17 ^f	53,9±3,8 ^g

Примітка. Позначені різними символами значення мають статистично значущі відмінності, $p < 0,05$, $n=6$.

У таблиці 3 наведено коефіцієнти проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для досліджуваних кріопротекторів за температури 20 °С та відповідні енергії активації. Зазначені кріопротектори обрані для дослідження через те, що вони найчастіше використовуються для кріоконсервування сперми риб. Розраховані значення E_a для молекул води, ДМСО, ЕГ та 1,2-ПД свідчать про те, що проникнення досліджених речовин у сперматозоїд відбувається шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар, тоді як більш низька енергія активації процесу переносу гліцерину вказує на каналний механізм (полегшену дифузію).

Таблиця 3

Коефіцієнти проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа до досліджуваних кріопротекторів за температури 20 °С та відповідна енергія активації

Кріопротектор	Коефіцієнт проникності $K_p \times 10^8$ м/с, 20 °С	Енергія активації E_a , кДж/моль
ДМСО	1,33±0,08 ^a	78,6±3,9 ^c
ЕГ	1,43±0,13 ^a	73,2±5,4 ^c
1,2-ПД	1,43±0,08 ^a	73,6±4,1 ^c
Гліцерин	0,50±0,13 ^b	16,5±9,6 ^d

Примітка. Позначені різними літерами значення мають статистично значущі відмінності, $p < 0,05$, $n=6$.

Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів прісноводних риб після охолодження-відігрівання.

За результатами дослідження сперми, охолодженої до різних температур і відігрітої відповідно до стандартних режимів, визначено критичні температурні діапазони, за яких гине частина сперматозоїдів.

У експерименті з вимірювання проникності мембран сперматозоїдів на окремих етапах охолодження-відігрівання сперму розбавляли 1:1 кріозахисним середовищем, що містить 0,15 М NaCl і 16% (V/V) ЕГ, і розливали в ампули об'ємом 0,5 мл. В ампулу з охолоджуваною спермою поміщали термопару і охолоджували до температури -10, -30, -50 і -100 °С у парах рідкого азоту за такою програмою: зі швидкістю 3–5 град/хв до температури -15 °С і 15–25 град/хв до температури -100 °С. Ампули відігрівали на водяній бані з температурою 40 °С до появи рідкої фази. Проникність мембран відігрітих сперматозоїдів до молекул води визначали фотометричним способом.

У експерименті з дослідження рухливості сперматозоїдів у процесі охолодження-відігрівання сперму розбавляли 1:1 модифікованим кріозахисним середовищем складу: NaCl – 71,8 мМ, KCl – 0,8 мМ, CaCl₂ – 0,66 мМ, NaHCO₃ – 21,3 мМ, MgSO₄×7H₂O – 5,1 мМ, сахароза – 4,4 мМ, маніт – 15,9 мМ, трис-НСl – 118 мМ рН – 8,0, ЕГ– 3,5 М. Ампули зі спермою (об'ємом 0,5 мл) охолоджували в парах азоту за трьохетапною програмою через 10 хв після змішування з кріозахисним середовищем. Досягнув температур -3, -20, -50, -80, -196 °С ампули витягували по одній і відігрівали на водяній бані за температури 40 °С. Рівень і час рухливості сперматозоїдів визначали за допомогою мікроскопа.

Контролем в обох експериментах була оброблена кріозахисним середовищем сперма, яка зберігалася протягом досліду за температури 20 °С. Показник рухливості сперматозоїдів у цьому зразку після закінчення експериментів зменшився на 8%.

Після охолодження сперми до температур -10, -30 або -50 °С за програмою охолодження 3–5 град/хв до -15 °С та 15–20 град/хв до -100 °С і подальшого відігрівання ми не виявили значних змін коефіцієнта проникності мембран клітин до води (рис. 5).

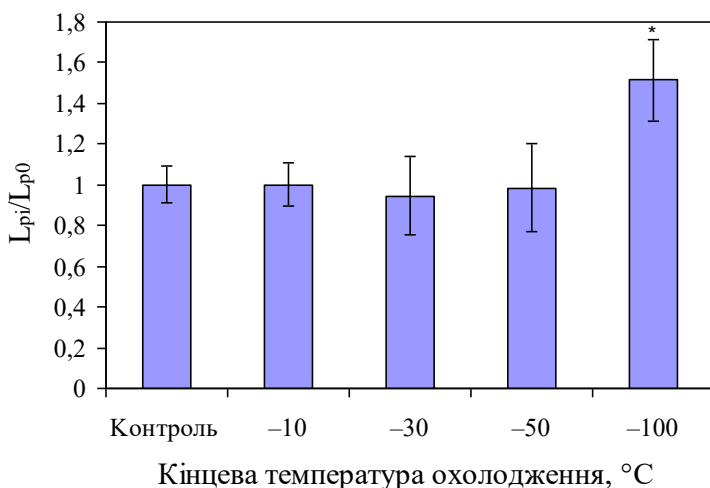


Рис 5. Зміна коефіцієнту проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води після охолодження-відігрівання в порівнянні з контролем (n=6). Наведено середнє значення ± С.В.

L_{p0}, L_{pi} – коефіцієнти проникності в контролі та дослідах відповідно, за 20 °С.

* – відмінність статистично значуща відносно контролю, p < 0,05, n=6

Сперматозоїди, що були охолоджені до $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ і відігріті, мали значуще більшу порівняно з контролем проникність мембран до молекул води.

Рівень рухливості сперматозоїдів, охолоджених до $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ і відігрітих, значуще не відрізнявся від контрольного значення. Зазначена кінцева температура охолодження була обрана тому, що за цієї температури кристалізація ще не відбулася. Охолодження до температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і подальше відігрівання призвели до статистично значущого зменшення кількості клітин, які рухаються, на 20% в порівнянні з контролем (рис. 6).

Таким чином, у проведеному нами експерименті значне пошкодження клітин відбувалося за температури $-3\text{...}-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і пов'язано, ймовірно, з позаклітинної кристалізацією. Під час охолодження сперми до температур -50 , -80 або $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ і подальшого відігрівання показник рухливості сперматозоїдів не змінювався і дорівнював 60%, що свідчить про відсутність негативного впливу у відповідних температурних діапазонах.

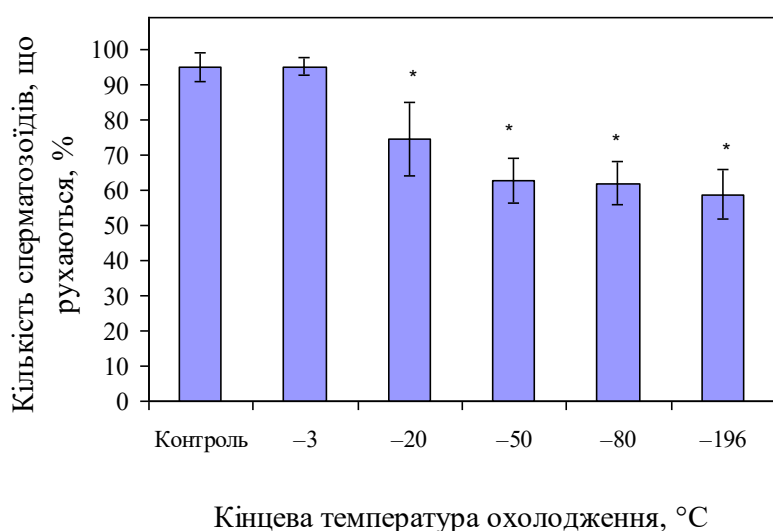


Рис. 6. Зміна кількості рухливих сперматозоїдів коропа після охолодження-відігрівання в порівнянні з контролем ($n=6$). Наведено середнє значення \pm С.В.

* – відмінність статистично значуща відносно контролю, $p < 0,05$, $n=6$

Після кріоконсервування спостерігалось істотне збільшення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води як відносно контролю (тобто без охолодження-відігрівання), так і з витримкою після відігрівання, що свідчить про зростання осмотичної чутливості клітин (рис. 7).

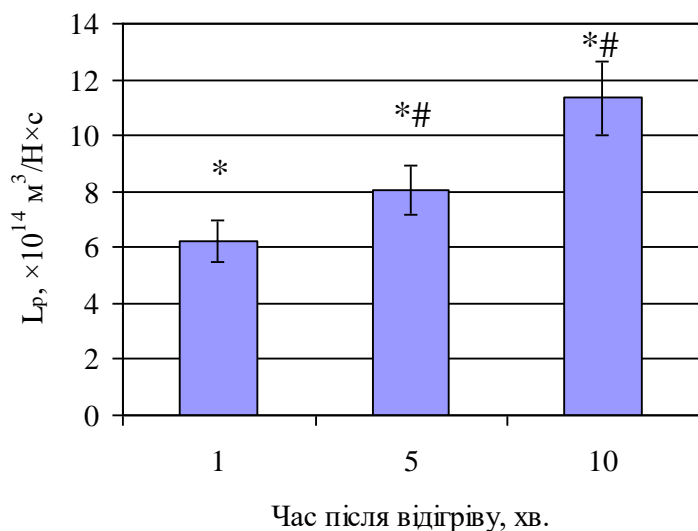


Рис. 7. Зміна проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води після кріоконсервування (за $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Дані представлені як середнє значення \pm С.В.

* – відмінність статистично значуща по відношенню до контролю, # – відмінність статистично значуща по відношенню до першого виміру, $p < 0,05$, $n=6$

Спираючись на експериментальні дані, отримані під час дисертаційного дослідження, проведено оптимізацію умов кріоконсервування сперми стерляді (*Acipenser ruthenus*, L. 1758) та запропоновано новий спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб.

ВИСНОВКИ

Проведено теоретичне і експериментальне узагальнення і представлено новий підхід до вирішення задачі, спрямованої на пошук причин різної кріорезистентності сперматозоїдів прісноводних риб та встановлення взаємозв'язку кріорезистентності з осмотичною реакцією сперматозоїдів.

1. Розроблено спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води, який полягає в інкубації сперматозоїдів у гіпотонічному сольовому розчині і реєстрації оптичної характеристики суспензії за допомогою фотоелектроколориметра. Модифікацією цього способу є спосіб визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів. Використання запропонованої в дисертаційній роботі методики дозволяє отримувати транспортні характеристики мембран сперматозоїдів різних видів риб.

2. Встановлено, що відносна зміна вмісту вільної внутрішньоклітинної води в сперматозоїдах коропа, що відображається в зміні клітинного об'єму, варіює в межах 0,8–1,6 при зміні відношення осмолярності сім'яної плазми до осмолярності позаклітинного середовища в межах 0,6–2,5.

3. Встановлено, що гіпоосмотична резистентність сперматозоїдів коропа, отриманих до і після гіпофізарної гормональної стимуляції не має статистично значущих відмінностей і становить близько 273 ± 22 с, проте після гормональної стимуляції суспензія сперматозоїдів коропа стає більш гетерогенною, що відображається в наявності в суспензії клітин істотно різної гіпоосмотичної резистентності в порівнянні зі спермою, яка отримана без гормональної стимуляції.

4. В роботі вперше визначені коефіцієнти проникності мембран сперматозоїдів коропа, стерляді та щуки до молекул води, що складають $(3,05 \pm 0,40) \times 10^{-14}$, $(5,96 \pm 0,83) \times 10^{-13}$, $(1,13 \pm 0,24) \times 10^{-14}$ м³/Н·с (20 °С) відповідно, та енергії активації переносу води через мембрани сперматозоїдів – 53,9±3,8, 74±17, 64±5 кДж/моль.

5. Встановлено, що коефіцієнт проникності мембран сперматозоїдів коропа до кріопротекторів ДМСО, ЕГ, 1,2-ПД та гліцерину складає $1,33 \pm 0,08 \times 10^{-8}$; $1,43 \pm 0,13 \times 10^{-8}$; $1,43 \pm 0,08 \times 10^{-8}$; $0,50 \pm 0,13 \times 10^{-8}$ м/с (20 °С) відповідно, а енергія активація переносу молекул кріопротекторів через мембрану – 78,6±3,9, 73,2±5,4, 73,6±4,1, 16,5±9,6 кДж/моль відповідно.

6. Встановлено, що проникність мембран сперматозоїдів коропа зазнає змін на різних етапах охолодження-відігрівання. При підготовці сперми до кріоконсервування проникність мембран сперматозоїдів до молекул води зростає при достатньо довгій витримці (8 годин) – в 1,5 рази. При охолодженні до температури -100 °С та відігріванні проникність мембран відігрітих сперматозоїдів в 1,4 рази більша, ніж при охолодженні до температур -10 °С, -30 °С, -50 °С і подальшому відігріванні. Після кріоконсервування осмотична чутливість відігрітих

сперматозоїдів різко зростає, що відображається в швидкому збільшенні проникності мембран до молекул води.

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Исследование проницаемости мембран сперматозоидов для молекул воды / А. Ю. Пуговкин, Е. Ф. Копейка, О. А. Нардид, Я. О. Черкашина // Биофизика. 2014. Т. 59, № 3. С. 481–487.

2. Буцький К. І., Пуговкін А. Ю., Копейка Є. Ф. Вплив гормональних ін'єкцій на параметри якості та кріорезистентність сперматозоїдів білого товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val. 1844) // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 24, № 2. С. 140–148.

3. Проникність мембран сперматозоїдів стерляді (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) для молекул води / А. Ю. Пуговкін, І. С. Кононенко, В. О. Черепнін, І. І. Грициняк, Є. Ф. Копейка // Рибогосподарська наука України. 2016. № 1/2016 (35). С. 70–77.

4. Пуговкін А. Ю., Копейка Є. Ф. Проникність плазматичних мембран сперматозоїдів коропа (*Suprinus carpio*, L., 1758) для молекул води та кріопротекторів на різних етапах кріоконсервування // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26, № 4. С. 340–348.

5. Дослідження осмотичної чутливості сперматозоїдів щуки (*Esox lucius*, L., 1758) для оптимізації їх кріоконсервування / А. Ю. Пуговкін, Є. Ф. Копейка, К. Б. Міксон, В. О. Черепнін, І. І. Грициняк // Рибогосподарська наука України. 2016. № 4/2016. С. 103–112.

6. Пуговкин А. Ю., Буцкий К. И., Копейка Е. Ф. Осмотическая толерантность сперматозоидов некоторых пресноводных рыб // Биофизика живой клетки. 2014. № 10. С. 149–151.

7. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Развитие методов гормональной стимуляции рыб и их влияние на качество и криорезистентность спермы // Биофизика живой клетки. 2014. № 10. С. 54–56.

8. Some Characteristics of Interactions of Pharmaceuticals and Their Active Pharmaceutical Ingredients with Lipid Membranes / А. О. Sadchenko, О. V. Vashchenko, А. Yu. Puhovkin, Е. F. Kopeika, N. A. Kasian, L. V. Budianska, А. V. Maschenko, Ya. M. Al-Mughrabi, D. S. Sofronov, L. N. Lisetski // Biophysics. 2017. Vol. 62, № 4. P. 570–579.

9. Оптимізація умов кріоконсервування сперми стерляді (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) для запліднення ікри в умовах рибних господарств / І. С. Кононенко, А. Ю. Пуговкін, Р. В. Кононенко, В. О. Черепнін, К. І. Буцький, Є. Ф. Копейка // Рибогосподарська наука України. 2017. № 3(41). С. 83–97.

10. Оптимізація кріозахисного середовища для заморожування сперми стерляді (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) / І. С. Кононенко, А. Ю. Пуговкін, Р. В. Кононенко, В. О. Черепнін, Є. Ф. Копейка // Наукові доповіді НУБіП України. Серія «Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва». 2017. № 2(66) [електронне фахове видання].

Патенти України

11. Спосіб визначення якості сперматозоїдів коропа: пат. № 83803 Україна, МПК G01N 33/48, G01N 15/14 (2006.01) / Є. Ф. Копейка, А. Ю. Пуговкін, К. І. Буцький; заявл. 29.04.2013 з. и 201305510; опубл. 25.09.2013. Бюл. № 18.

12. Спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води: пат. № 104809 Україна, МПК G01N 33/48, G01N 15/00 (2006.01) / А. Ю. Пуговкін, Є. Ф. Копейка, Є. О. Гордієнко, О. А. Нардід; заявл. 27.12.2012 з. а 201215035; опубл. 11.03.2014. Бюл. № 5.

13. Спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб: пат. № 115006 Україна, МПК A01K 61/00, A01K 61/10 (2017.10) / А. Ю. Пуговкін, І. С. Кононенко, Р. В. Кононенко, В. О. Черепнін, Є. Ф. Копейка; заявл. 17.10.2016 з. а 201610472; опубл. 28.08.2017. Бюл. № 16.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

14. Реакция спермиев карпа на солевые среды как тест на криорезистентность / А. Ю. Пуговкин, Е. Ф. Копейка, С. И. Дрокин, Е. А. Гордиенко, В. А. Черепнин, И. И. Грициняк // IV Международная ихтиологическая научно-практическая конференция, 7–11 сент. 2011 г.: тезисы докл. Одесса, 2011. С. 185–186.

15. Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф., Дрокин С. И. Фотометрический способ описания динамики клеточного объема сперматозоидов карпа // VIII Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии, 23–27 апр. 2012 г.: сборник тезисов. Севастополь, 2012. С. 74–75.

16. Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Фотометрический метод оценки качества спермы карпа // Проблемы криобиологии. 2012. Т. 22, № 2. С. 197.

17. Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Гипоосмотическая устойчивость сперматозоидов карпа // IX Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии, 22–26 апр. 2012 г.: сборник тезисов. Севастополь, 2013. С. 44–45.

18. Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Осмотическая резистентность сперматозоидов карпа *Cyprinus carpio* // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2013. Т. 23, № 2. С. 190.

19. Puhovkin A. Y., Kopeika E. F. The use of some photometric analysis techniques in fish sperm cryobiology // SLTB – 2013 conference, 6–9 Oct. 2013: book of abstracts. Hannover, Germany, 2013. P. 51.

20. Пуговкин А. Ю., Буцький К. И. Исследование сохранности сперматозоидов карпа (*Cyprinus carpio*) на разных стадиях охлаждения-отогрева // VI Международная ихтиологическая научно-практическая конференция «Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии, 9–11 окт. 2013: сборник тезисов. Тернополь, 2013. С. 228–230.

21. Буцький К. И., Пуговкин А. Ю. Изменение качества нативной и кріоконсервированной спермы белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*) при различной гормональной стимуляции // VI Международная ихтиологическая научно-практическая конференция «Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии, 9–11 окт. 2013: сборник тезисов. Тернополь, 2013. С. 44–47.

22. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю. Криорезистентность спермы белого толстолобика после стимуляции его широко используемыми гормональными препаратами // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 24, № 2. С. 177.

23. Пуговкин А. Ю., Буцкий К. И. Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди (*Acipenser ruthenus* L) и карпа (*Cyprinus carpio* L) // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 24, № 2. С. 178.

24. Puhovkin A. Y., Kopeika E. F. Temperature dependence of carp (*Cyprinus carpio*, L.) spermatozoa membranes permeability for molecules of water and cryoprotectants // SLTB – 2014 conf. «Freezing biological time» 8–10 Oct. 2014: book of abstracts. London, United Kingdom, 2014. P. 39.

25. Пуговкин А. Ю., Буцкий К. И., Копейка Е. Ф. Исследование влияния гипофизарной стимуляции сперматогенеза на осмотическую резистентность сперматозоидов карпа // Международная заочная научно-практическая конференция «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии», 24 марта 2014 г.: материалы конференции. Сыктывкар, Россия, 2014. С. 304–310.

26. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю. Изменение содержания АТФ в сперме белого толстолобика после различной гормональной стимуляции и его влияние на криорезистентность спермы // Международная заочная научно-практическая конференция «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии», 24 марта 2014 г.: материалы конференции. Сыктывкар, Россия, 2014. С. 249–253.

27. Puhovkin A. Y., Kopeika E. F. Investigation of water and cryoprotectants molecules transfer through common carp (*Cyprinus carpio*, L.) spermatozoa membranes (CRYO conference of the Society for Cryobiology, Ostrava, Czech Republic, 2015) // Cryobiology. 2015. Vol. 71, № 3. P. 567.

28. Некоторые аспекты мембранотропного действия лекарственных средств нообута и амиксина / А. О. Садченко, А. Ю. Пуговкин, Л. В. Будянская, А. В. Мащенко // «Біологія: від молекули до біосфери», Матеріали Х Міжнародної конференції молодих учених, 2–4 грудня 2015 р. Харків, 2015. С. 26.

29. Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Исследование процесса переноса молекул воды через мембраны сперматозоидов щуки (*Esox lucius* L) // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015. Т. 25, № 2. С. 165.

30. Оптимізація складу криозахисних середовищ для низькотемпературного консервування сперми стерляді (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) / І. С. Кононенко, А. Ю. Пуговкін, Є. Ф. Копейка, В. О. Черепнін, Р. В. Кононенко // VI міжнародна науково-практична конференція вчених, аспірантів «Наукові здобутки у вирішенні актуальних проблем виробництва та переробки сировини, стандартизації і безпеки продовольства»: збірник праць. Київ, 2016. С. 164–166.

31. Некоторые аспекты взаимодействия лекарственных средств с липидными мембранами / Л. В. Будянская, А. О. Садченко, А. Ю. Пуговкин, Н. А. Касян, О. В. Ващенко // 20-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», 18–22 апр. 2016 г.: сборник тезисов. Пущино, Россия, 2016. С. 306.

32. Криоконсервирование спермы стерляди: оптимизация состава криозащитной среды / А. Ю. Пуговкин, И. С. Кононенко, Р. В. Кононенко,

К. И. Буцкий, В. А. Черепнин, Е. Ф. Копейка // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016. Т. 26, № 2. С. 160.

33. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Криоконсервирование спермы стерляди (*Acipenser ruthenus*) с использованием криозащитной среды на основе ДМСО // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017. Т. 27, № 2. С. 174.

АНОТАЦІЯ

Пуговкін А. Ю. Осмотична реакція сперматозоїдів прісноводних риб на дію факторів криоконсервування. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – криобіологія. – Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, Харків – 2018.

Дисертаційна робота присвячена встановленню взаємозв'язку між осмотичною реакцією сперматозоїдів прісноводних риб і їхньою криорезистентністю.

Розроблено спосіб визначення проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води. Методом ЕПР встановлено, що відносна зміна вмісту вільної внутрішньоклітинної води в сперматозоїдах коропа, варіює в межах 0,8–1,6 при зміні відношення осмолярності сім'яної плазми до осмолярності позаклітинного середовища в межах 0,6–2,5.

В роботі вперше спектрофотометричним методом визначені коефіцієнти проникності мембран сперматозоїдів коропа, стерляді та щуки до молекул води, а також коефіцієнти проникності мембран сперматозоїдів коропа до криопротекторів етиленгліколю, 1,2-пропандіолу, диметилсульфоксиду і гліцерину та відповідні енергії активації переносу цих речовин через мембрани сперматозоїдів.

При охолодженні до температури $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ та відігріванні проникність мембран відігрітих сперматозоїдів в 1,4 рази більша, ніж при охолодженні до температур -10 , -30 , $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ і подальшому відігріванні. Після криоконсервування осмотична чутливість відігрітих сперматозоїдів різко зростає, що відображається в швидкому збільшенні проникності мембран до молекул води.

Ключові слова: криоконсервування, сперматозоїди, прісноводні риби, проникність мембран, криопротектори, осмотична реакція, криорезистентність.

АННОТАЦИЯ

Пуговкин А. Ю. Осмотическая реакция сперматозоидов пресноводных рыб на действие факторов криоконсервирования. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – криобиология. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков – 2018.

Диссертационная работа посвящена установлению взаимосвязи между осмотической реакцией сперматозоидов пресноводных рыб и их криорезистентностью.

Разработан способ определения проницаемости мембран сперматозоидов карпа для молекул воды. Методом ЭПР установлено, что относительное изменение содержания свободной внутриклеточной воды в сперматозоидах карпа варьирует в пределах 0,8–1,6 при изменении относительной осмолярности в диапазоне 0,6–2,5.

В работе впервые спектрофотометрическим методом определены коэффициенты проницаемости мембран сперматозоидов карпа, стерляди и щуки для молекул воды, а также коэффициенты проницаемости мембран сперматозоидов карпа для криопротекторов этиленгликоля, 1,2-пропандиола, диметилсульфоксида и глицерина и соответствующие энергии активации переноса этих веществ через мембраны сперматозоидов.

При охлаждении до температуры $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ и отогреве проницаемость мембран сперматозоидов в 1,4 раза больше, чем при охлаждении до температур -10 , -30 , $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ и последующем отогреве. После криоконсервирования осмотическая чувствительность отогретых сперматозоидов резко возрастает, что отражается в быстром увеличении проницаемости их мембран для молекул воды.

Ключевые слова: криоконсервирование, сперматозоиды, пресноводные рыбы, проницаемость мембран, криопротекторы, осмотическая реакция, криорезистентность.

ANNOTATION

Puhovkin A.Yu. Osmotic response of freshwater fish spermatozoa to the action of cryopreservation factors. – The qualifying research paper as a manuscript.

The dissertation for the candidate of biological sciences (PhD) degree in specialty 03.00.19 – Cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv – 2018.

This thesis deals with the investigation of relationship between the osmotic response of freshwater fish spermatozoa and their cryoresistance. The theoretical and experimental generalization has been carried out and a new approach to solving a task aimed at determining the causes of freshwater fish spermatozoa cryoresistance varying has been outlined.

The method of determining the permeability of the carp spermatozoa membranes to water molecules has been designed. It includes the incubation of cells in hypotonic NaCl solution, the recording of the dependence of light transmission of spermatozoa suspension on time and the approximation of the obtained dependence by solutions of the modified physical and mathematical model of the transmembrane mass transfer of Kedem-Kachalsky. The use of the method proposed in this thesis allows to determine the transport characteristics of spermatozoa membranes for various fish species.

To study an osmotic response of carp spermatozoa, the changes in the content of intracellular free water in spermatozoa, incubated in NaCl media, were determined with EPR method. A relative change in the content of free intracellular water in carp spermatozoa, reflected in a changed cell volume, was established to vary within the range of 0.8–1.6 when changing the relative osmolarity within 0.6–2.5.

The kinetics of normalized light transmission of carp spermatozoa suspensions in solutions of different osmolarity and at various temperatures of incubation medium was examined. The effect of temperature on kinetics of light transmission was shown to be

significant: the temperature change from 12 up to 27°C caused the same effect on light transmission kinetics as the change in osmotic concentration of incubation medium from 200 to 40 mOsmol/kg.

The average osmotic resistance of spermatozoa obtained with the usage of pituitary injections and without hormonal stimulation did not significantly differ: 273±16 s and 269±28 s, respectively. In this case, a wider range of dynamics distribution of cell damage after hormonal stimulation indicated an increase in the degree of heterogeneity of spermatozoa suspension, *i.e.* the presence in ejaculate of cells with a more pronounced difference in osmotic resistance.

The research of osmotic response of spermatozoa of different fish species by spectrophotometric method allowed for the first time to determine the coefficients of membrane permeability of carp, sterlet and pike spermatozoa to water molecules, that were $(3.05 \pm 0.40) \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{N}\cdot\text{s}$, $(5.96 \pm 0.83) \times 10^{-13} \text{ m}^3/\text{N}\cdot\text{s}$, $(1.13 \pm 0.24) \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{N}\cdot\text{s}$ (20°C), respectively, and the activation energy values of water transfer through the spermatozoa membranes, which were 53.9 ± 3.8 , 74 ± 17 , 64 ± 5 kJ/mol, correspondingly.

The permeability coefficient of carp spermatozoa membranes to dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), 1,2-propanediol (1,2-PD) and glycerol (Gl) cryoprotectants was determined to be $1.33 \pm 0.08 \times 10^{-8}$; $1.43 \pm 0.13 \times 10^{-8}$; $1.43 \pm 0.08 \times 10^{-8}$; $0.50 \pm 0.13 \times 10^{-8} \text{ m/s}$ (20°C), respectively. Activation energy of cryoprotectant molecule transfer through the membrane was 78.6 ± 3.9 ; 73.2 ± 5.4 ; 73.6 ± 4.1 ; 16.5 ± 9.6 kJ/mol, respectively.

According to the findings of the sperm cooled down to different temperatures and thawed according to the standard regimens, there were determined the critical temperatures, when a part of spermatozoa was lost.

The permeability of carp spermatozoa was established to change at different stages of cooling-thawing. When preparing sperm for cryopreservation, the permeability of spermatozoa membranes to water molecules increased with a quite long exposure (8 hours) in 1.5 times.

When cooled down to -100°C with further thawing the membrane permeability of carp spermatozoa was 1.4 times higher than those cooled down to -10, -30, -50°C and warmed up afterwards.

For the first time the permeability of carp spermatozoa plasma membranes to water molecules after cryopreservation was demonstrated to increase with a decrease in final cooling temperature, both as regards the control (*i.e.* without cooling-thawing), and with exposure after thawing, indicating thereby an increase in osmotic sensitivity of cells.

The findings enable to expand the understanding of the cryoresistance of fish spermatozoa. The data on transport characteristics of fish spermatozoa plasma membranes can be used in the development of methodical approaches to cryopreservation of fish spermatozoa.

Key words: cryopreservation, spermatozoa, freshwater fish, membrane permeability, cryoprotectants, osmotic response, cryoresistance.