

Проникність плазматичних мембран сперматозоїдів коропа (*Cyprinus carpio*, L., 1758) для молекул води та кріопротекторів на різних етапах кріоконсервування

UDC 577.352.4:547.42:591.463.11.–755.43

A.Yu. Puhovkin*, E.F. Kopeika

Plasma Membrane Permeability of Carp (*Cyprinus carpio*, L., 1758) Spermatozoa for Water and Cryoprotectants Molecules at Different Stages of Cryopreservation

Реферат: Проникність клітинних мембран для молекул води та кріопротекторів є важливим параметром для визначення швидкостей охолодження під час кріоконсервування генетичного матеріалу риб. У роботі використовували спектрофотометричний метод для дослідження кінетики клітинного об'єму, апроксимували експериментальні залежності відносних об'ємів клітин від часу рішеннями рівнянь теоретичної моделі та вперше визначили коефіцієнти проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул води та певних кріопротекторів. Встановлено, що за температури 20°C коефіцієнт проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для молекул води складає $(3,05 \pm 0,40) \times 10^{-14}$ м³/Н·с, а при його зменшенні в діапазоні температур 35–15°C енергія активації дорівнює $(53,9 \pm 3,8)$ кДж/моль. Зниження проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул кріопротекторів диметилсульфоксиду, етиленгліколю та 1,2-пропандіолу у зазначеному температурному діапазоні характеризується енергією активації 70–80 кДж/моль. Цей факт свідчить про те, що молекули досліджених речовин проникають у сперматозоїд шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар. Отримані дані можуть бути використані для визначення оптимального режиму кріоконсервування сперматозоїдів коропа.

Ключові слова: сперматозоїди коропа, проникність мембрани, енергія активації, кріоконсервування, етиленгліколь, гліцерин, 1,2-пропандіол, диметилсульфоксид.

Реферат: Проницаемость клеточных мембран для молекул воды и крiopротекторов является важным параметром для определения скоростей охлаждения при крiopонсервировании генетического материала рыб. В работе использовали спектрофотометрический метод для исследования кинетики клеточного объема, аппроксимировали экспериментальные зависимости относительных объемов клеток от времени решением уравнений теоретической модели и впервые определили коэффициенты проницаемости мембран сперматозоидов карпа для молекул воды и определенных крiopротекторов. Установлено, что при температуре 20°C коэффициент проницаемости плазматических мембран сперматозоидов карпа для молекул воды составляет $(3,05 \pm 0,40) \times 10^{-14}$ м³/Н·с, а при его уменьшении в диапазоне температур 35–15°C энергия активации составляет $(53,9 \pm 3,8)$ кДж/моль. Снижение проницаемости мембран сперматозоидов карпа для молекул крiopротекторов диметилсульфоксида, этиленгликоля и 1,2-пропандиола в указанном диапазоне характеризуется энергией активации 70–80 кДж/моль. Этот факт свидетельствует о том, что молекулы исследованных веществ в сперматозоид проникают путем пассивной диффузии через липидный двойной слой. Полученные данные могут быть использованы для определения оптимального режима крiopонсервирования сперматозоидов карпа.

Ключевые слова: сперматозоиды карпа, проницаемость мембраны, энергия активации, крiopонсервирование, этиленгликоль, глицерин, 1,2-пропандиол, диметилсульфоксид.

Abstract: Cell membrane permeability for water and cryoprotectant molecules is an important parameter to determine cooling rates during fish genetic material cryopreservation. Cell volume kinetics was assessed spectrophotometrically, the resulted experimental dependences of relative cell volume vs. time were fitted with solutions of theoretical model equations that allowed us to calculate the membrane permeability coefficients of carp spermatozoa for molecules of water and several cryoprotectants. The plasma membrane permeability coefficient of carp spermatozoa at 20°C was established to be $(3.05 \pm 0.40) \times 10^{-14}$ m³/N·s, but when it decreased within 35...15°C temperature range the activation energy equaled to (53.9 ± 3.8) kJ/mol. A decreased membrane permeability of carp spermatozoa for dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and 1,2-propanediol molecules within the mentioned range was characterized by the activation energy of 70–80 kJ/mol. This fact indicated that molecules of the studied substances penetrated into spermatozoon via a passive diffusion through a lipid bilayer. Our findings could be used to determine the optimal cryopreservation regimen for carp spermatozoa.

Key words: carp spermatozoa, membrane permeability, activation energy, cryopreservation, ethylene glycol, glycerol, 1,2-propanediol, dimethyl sulfoxide.

Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Department of Reproduction System Cryobiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
електронна пошта: antonpuhovkin@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: antonpuhovkin@gmail.com

Надійшла 18.10.2016
Прийнята до друку 28.10.2016

Received October, 18, 2016
Accepted October, 18, 2016

© 2016 A. Yu. Puhovkin et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Кріоконсервування є пріоритетним методом довгострокового зберігання статевих продуктів рідкісних і зникаючих видів риб в умовах погіршення екологічної ситуації у світі та, зокрема, в Україні [25]. Крім того, даний метод дозволяє проводити селекцію цінних промислових видів для підвищення рентабельності риборозведення.

Роботи з кріоконсервування сперматозоїдів виконувалися більше ніж з 200 видами риб [22], в основному з прісноводними, які мають промислове значення [25]. Ефективність кріоконсервування сперматозоїдів риб видоспецифічна [11]. При цьому результати кріоконсервування сперми морських видів риб виявилися більш успішнішими, ніж прісноводних [16, 23]. 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 свіжої ікри кріоконсервованою спермою був досягнутий лише у декількох видів риб за рахунок модифікації методики запліднення.

Відомо, що якість сперми риб істотно знижується в процесі кріоконсервування, тому для запліднення відталою спермою її запаси повинні бути значно більшими, ніж свіжої. Внаслідок високої варіабельності якості сперми риб той самий метод кріоконсервування може бути неефективним для сперми риб іншої популяції [17].

Кріорезистентність сперматозоїдів пов'язана з умовами розмноження риб, перш за все, з певною температурою води під час нересту та її солоністю [5]. Відомо, що кріорезистентність сперматозоїдів риб, які нерестяться в прісній воді, нижча за цей показник сперматозоїдів морських риб. Проте причини різної внутрішньовидової кріорезистентності сперми риб на даний час не визначено [25].

Через нестачу інформації щодо характеристик стійкості та параметрів проникності мембран сперматозоїдів риб методики кріоконсервування удосконалюються переважно емпіричним шляхом – підбором складу кріозахисних середовищ або режимів охолодження-відігрівання.

У зв'язку з цим важливо розробити теоретично обґрунтований підхід до кріоконсервування сперматозоїдів риб, 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 розчинах кріопротекторів, навіть без заморожування, здатна викликати значні флуктуації клітинного об'єму [13], що може пошкоджувати клітини або впливати на їх чутливість до факторів кріоконсервування. Відомо, що одним

Cryopreservation is a high-priority method for long-term storage of sexual products of rare and endangered fish species as a result of worsening of environmental pollution worldwide and in Ukraine, in particular [25]. In addition, this method enables selecting the commercially valuable species to enhance the performance indices in fish farming.

The spermatozoa cryopreservation was investigated in more than 200 fish species [22], mostly in freshwater ones, being important for food industry [25]. The fish spermatozoa cryopreservation efficiency is species-specific [1]. Herewith the results of marine fish species spermatozoa cryopreservation occurred to be more successful than freshwater ones [13, 23]. The cryopreserved sperm fertilization for marine fish species could be compared to that in mammals, whereas the freshwater fish sperm is characterized by much lower cryoresistance. For example, a high level of fresh egg fertilization with cryopreserved sperm was achieved only in a few fish species and only after modifying fertilization technique.

The fish sperm quality is known to significantly reduce during cryopreservation, therefore for fertilization with frozen-thawed sperm its amount should be significantly higher than for fresh one. Due to a high variability of fish sperm quality the same cryopreservation method may be inefficient for fish sperm of other population [12].

The spermatozoa cryoresistance is associated to fish reproduction features, first of all, a certain water temperature during spawning and its salinity [10]. For example, the spermatozoa cryoresistance of fish species, spawning in fresh water, is lower as compared to this index in marine fish species. However, the causes of different intraspecific cryoresistance of fish sperm have still remained undisclosed [25].

The cryopreservation techniques have been improved mainly empirically, *i. e.* by selecting either cryoprotective media composition or freeze-thawing regimens, that is caused by lack of an information on resistance characteristics and membrane permeability parameters for fish spermatozoa.

In this regard of importance is to design a theoretically approved approach to fish spermatozoa cryopreservation, which will utilize the determination of the causes of intra- and interspecific differences in spermatozoa cryoresistance and the properties, associated with spermatozoa resistance to cryopreservation factors.

Cell exposure in cryoprotectant solutions, even without freezing may result in significant fluctuations in cell volume [3], that can either damage cells or affect their sensitivity to cryopreservation factors. Temperature and osmotic stresses are known to be one of the main factors of cell damage in freezing [14]. Change in cell microenvironment osmolality during cryopreser-



із основних факторів пошкодження клітин під час заморожування є температурно-осмотичний шок [18]. 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 [12].

Отже, актуальним є вивчення осмотичної чутливості сперматозоїдів риб та її зміни під впливом факторів кріоконсервування. Проникність плазматичних мембран для молекул води і кріопротекторів – важливий параметр для визначення швидкостей охолодження у процесі кріоконсервування генетичного матеріалу риб [20].

На сьогодні відомі лише поодинокі результати дослідження проникності мембран сперматозоїдів риб для води і кріопротекторів [15, 21]. Це пов'язано з видовою специфікою сперматозоїдів риб і відсутністю зручних методів, які дозволили б визначити осмотичні характеристики сперматозоїдів безпосередньо перед кріоконсервуванням та провести експерименти в польових умовах [11, 14].

Метою роботи є визначення коефіцієнтів проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул води і кріопротекторів (етиленгліколь, 1,2-пропандіол, диметилсульфоксид, гліцерин), а також дослідження рухливості відігрітих сперматозоїдів коропа та їхньої осмотичної чутливості після охолодження до температур, які забезпечують процес кріоконсервування.

Матеріали і методи

Сперму отримували від 2–3-річних самців коропа ($n = 6$), пересаджених до басейну з температурою води 22°C. Для стимуляції дозрівання сперми самцям внутрішньом'язово вводили суспензію гіпофіза у розрахунок 3 мг/кг маси. Сперму отримували через 24 години після ін'єкцій, виконуючи абдомінальний масаж.

Осмотичну реакцію сперматозоїдів коропа досліджували за допомогою фотоелектроколориметра KF-77 («ZALIMP», Польща), обладнаного магнітним перемішувачем і термостатованим кюветним відділенням, за розробленою нами методикою [7, 10].

Сперму додавали до кювети, заповненої 0,05 М водним розчином NaCl або 0,8 М розчинами 1,2-пропандіолу (1,2-ПД), гліцерину, етиленгліколю (ЕГ) та диметилсульфоксиду (ДМСО), виготовленими на основі 0,12 М розчину NaCl. Суміш швидко струшували, кювету ставили в кюветне відділення і фіксували динаміку світлопропускання за допомогою самописця «TZ 4601» («Laboratorni pristroje», Чехія) при температурі 20°C.

Коефіцієнти проникності плазматичних мембран сперматозоїдів для молекул води (L_p) або кріопротекторів

using the conventional cooling rates may result in spermatozoa motility initiation, which adversely affects the fertilization outcome using the frozen-thawed sperm after cryopreservation [2].

Thus, of special interest is to study an osmotic sensitivity of fish spermatozoa and its changes under cryopreservation influence. Plasma membrane permeability for water and cryoprotectant molecules is an important parameter to determine cooling rates during fish genetic material cryopreservation [16].

Today only single reports on fish sperm membrane permeability for water and cryoprotectants are known [9, 17]. This is due to a species specificity of fish spermatozoa and absence of proper methods, which would enable determining osmotic characteristics of spermatozoa immediately prior to cryopreservation and experiment performance in the field [1, 5].

This research aim was to determine the permeability coefficients of carp spermatozoa membranes for molecules of water and cryoprotectants, as well as to investigate the motility of frozen-thawed carp spermatozoa and their osmotic sensitivity after cooling down to the temperatures used during cryopreservation.

Materials and methods

The sperm was procured from 2–3-year-old male carp ($n = 6$), placed into the tank with 22°C water temperature. To stimulate sperm maturation the males were intramuscularly injected with pituitary suspension, assumed as 3 mg/kg body weight. Sperm was obtained 24 hrs later injection, by abdominal massage.

Osmotic response of carp spermatozoa was studied using photoelectric colorimeter KF-77 (ZALIMP, Poland), equipped with a magnetic mixer and thermostated cuvette compartment, according to the technique we designed [19, 20].

The sperm was added to the cuvette, filled either with 0.05 M NaCl aqueous solution or 0.12 M NaCl-based 0.8 M solutions of 1,2-propanediol (1,2-PD), glycerol, ethylene glycol (EG) and dimethyl sulfoxide (DMSO). The mixture was stirred shortly, then placed into cuvette compartment and the light transmission dynamics was recorded using the TZ 4601 recorder (Laboratorni pristroje, Czech Republic).

Permeability coefficients of spermatozoa plasma membranes for either water (L_p) or cryoprotectant (K_p) molecules were determined by fitting the experimental dependences of relative cell volumes *versus* time and the solutions of theoretical model equations [7, 8]. The activation energy (E_a) of substance transfer through cell membranes was calculated from the $\ln L_p$ or $\ln K_p$ dependencies *versus* reciprocal temperature, the slope of those according to the Arrhenius equation was E_a/R , where R was the universal gas constant.

In the experiment on determining the spermatozoa membrane permeability coefficients at the certain sta-



текторів (K_p) визначали, апроксимуючи експериментальні залежності відносних об'ємів клітин від часу з рішеннями рівнянь теоретичної моделі [1, 2]. Енергію активації (E_a) процесу перенесення речовин через мембрани клітин розраховували із залежностей $\ln L_p$ або $\ln K_p$ від зворотної температури. Нахил кривих цих залежностей згідно з рівнянням Ареніуса дорівнював E_a/R , де R – універсальна газова постійна.

У експерименті з визначення коефіцієнтів проникності мембран сперматозоїдів на окремих етапах охолодження-відігрівання сперму розбавляли 1:1 криозахисним середовищем, яке містило 0,15 М NaCl і 16% (v/v) EG, і розливали в ампули об'ємом 0,5 мл. В ампулу зі спермою поміщали термопару і охолоджували до температури -10 , -30 , -50 і -100°C у парах рідкого азоту за такою програмою: швидкість $3-5$ град/хв до температури -15°C і швидкість $15-25$ град/хв до температури -100°C . Ампули відігрівали на водяній бані з температурою 40°C до появи рідкої фази. Коефіцієнт проникності мембран відігрітих сперматозоїдів для молекул води визначали за допомогою способу, який описано вище.

У експерименті з дослідження рухливості сперматозоїдів у процесі охолодження-відігрівання сперму розбавляли 1:1 модифікованим криозахисним середовищем [4] без жовтка і антиоксиданту, розливали в ампули об'ємом 0,5 мл. Ампули зі спермою охолоджували в парах азоту за трьохетапною програмою [4] через 10 хв після змішування з криозахисним середовищем. Після досягнення температур -3 , -20 , -50 , -80 , -196°C ампули витягували по одній і відігрівали на водяній бані (40°C) до появи рідкої фази. Рівень і час рухливості сперматозоїдів визначали за допомогою мікроскопа.

Контролем в обох останніх експериментах була оброблена криозахисним середовищем сперма, яка зберігалася протягом досліджу за температури 20°C . Показник рухливості сперматозоїдів у цьому зразку після закінчення експерименту зменшився на 8%.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Origin 8.5» («OriginLab Corporation», США) та «Excel» («Microsoft», США). Дані на рисунках і в таблицях наведено як середнє значення \pm стандартне відхилення. Для порівняння двох виборок застосовували u -тест Манна-Уїтні. Статистично значущими вважали розходження при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Пошук оптимальних рішень для розробки методів криоконсервування виконували на основі експериментально-теоретичного підходу із застосуванням модифікованої фізико-математичної моделі Кедем-Качальського [1].

ges of freeze-thawing the sperm was diluted 1:1 with cryoprotective medium, containing 0.15 M NaCl and 16% (v/v) EG and placed into 0.5 ml vials. The thermocouple was placed into the vial with sperm and cooled down to -10 , -30 , -50 and -100°C in liquid nitrogen vapors according to the following program: $3-5$ deg/min rate down to -15°C and $15-25$ deg/min down to -100°C . The vials were thawed in 40°C water bath up to lipid phase appeared. The membrane permeability coefficient of frozen-thawed spermatozoa for water molecules was determined as described above.

In the experiment on studying the spermatozoa motility during freeze-thawing the sperm was diluted 1:1 with the modified yolk- and antioxidant-free cryoprotective medium [11], then placed into 0.5 ml vials. The vials with sperm were frozen in nitrogen vapors by a three-stage program [11] 10 min later mixing with cryoprotective medium. By reaching -3 , -20 , -50 , -80 , -196°C the vials were taken out one by one and thawed in a water bath (40°C) up to the liquid phase appeared. The level and time of spermatozoa motility were determined microscopically.

The sperm, treated with cryoprotective medium, and stored throughout the experiment at 20°C , served as the control in both last experiments. The spermatozoa motility in this sample decreased by 8% to the end of experiment.

Our findings were statistically processed using the Origin 8.5 software (OriginLab Corporation, USA) and Excel (Microsoft, USA). The data in figures and tables are given as the mean \pm standard deviation. When comparing the two samples we used the U-Mann-Whitney test. As statistically significant the differences were considered at $p < 0.05$.

Results and discussion

Combination of experimental and theoretical assessments using modified physico-mathematical Kedem-Katchalsky formalism [7] could be successfully applied to search the optimal parameters of cryopreservation.

A relative change in cell volume with time after its transfer into either hypo- or hypertonic substance solution is described by the following relation [8],

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

where V is value of cell volume with respect to time t ; V_0 is value of cell volume in isotonic solution; α is osmotically inactive cell volume; π^{out} is osmotic pressure of substance solution, where the cell was placed; π_0^{in} is osmotic pressure of sperm plasma (intracellular osmotic pressure); γ is cell surface-to-volume ratio; L_p is permeability coefficient of cell membrane for water molecules (cell membrane filtration coefficient).

Відносна зміна об'єму клітини з часом після її перенесення в гіпо- або гіпертонічний розчин речовини описується наступним співвідношенням [2]:

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

де V – значення об'єму клітини в залежності від часу t ; V_0 – значення об'єму клітини в ізотонічному розчині; α – частина осмотично неактивного об'єму клітини; π^{out} – осмотичний тиск розчину речовини, в який поміщали клітину; π_0^{in} – осмотичний тиск спермальної плазми (внутрішньоклітинний осмотичний тиск); γ – поверхнево-об'ємне відношення клітини; L_p – коефіцієнт проникності клітинної мембрани для молекул води (коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани).

У зв'язку з цим вираз $\frac{1 - \alpha}{\pi^{out}} (\pi_0^{in} - \pi^{out})$ характеризує величину зміни об'єму (закон Вант-Гоффа), а експоненціальний член $1 - \exp(-\gamma L_p \pi^{out} t)$ визначає, за який час відбудеться ця зміна.

Якщо припустити, що голівка сперматозоїда коропа має сферичну форму, а середній радіус дорівнює 1,3 мкм [24], то поверхнево-об'ємне відношення клітини γ повинно складати 2,3 мкм⁻¹.

Розрахований згідно з цією моделлю коефіцієнт проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул води L_p при 20°C становить $(3,05 \pm 0,40) \times 10^{-14}$ м³/Н·с, а при його зниженні в діапазоні температур 35–15°C енергія активації складає $(53,9 \pm 3,8)$ кДж/моль.

Коефіцієнт проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул води є більшим, ніж сперматозоїдів даніо-періо (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) та щуки (*Esox lucius*, L., 1758): $(3,45 \pm 0,16) \times 10^{-15}$ м³/Н·с (21...23°C) [15] та $(5,43 \pm 1,15) \times 10^{-15}$ м³/Н·с (12°C) [6] відповідно. В свою чергу, даний показник був на порядок меншим порівняно зі сперматозоїдами стерляді (*Acipenser ruthenus*, L., 1758), у яких він дорівнював $(3,52 \pm 0,49) \times 10^{-13}$ м³ Н·с (15°C) [8].

Безсумнівно, коефіцієнт L_p залежить від температури, і порівняння його значень для різних видів риб за відмінних температур є некоректним. Ми використовували температури, за яких відбувається нерест кожного з видів, тобто «фізіологічні», а результати порівняння L_p за однакових температур свідчать про аналогічну тенденцію.

The expression $\frac{1 - \alpha}{\pi^{out}} (\pi_0^{in} - \pi^{out})$ in this case describes the value of volume change (Van't Hoff law), and an exponential term $1 - \exp(-\gamma L_p \pi^{out} t)$ determines the time for which this change will occur.

Assuming the carp spermatozoon head to be of spherical shape, and an average radius to be 1.3 μm [24], the cell surface-to-volume ratio γ should make 2.3 μm^{-1} .

Using the formalism we calculated the carp spermatozoa plasma membrane permeability for water molecule L_p at 20°C: $(3.05 \pm 0.40) \times 10^{-14}$ м³/N·s, and its decrease within 35...15°C temperature range the is characterized with an activation energy of (53.9 ± 3.8) kJ/mol.

The permeability coefficient of carp spermatozoa plasma membrane for water molecules was higher than in zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) and pike (*Esox lucius*, L., 1758) spermatozoa: $(3.45 \pm 0.16) \times 10^{-15}$ м³/N·s (21...23°C) [9] and $(5.43 \pm 1.15) \times 10^{-15}$ м³/N·s (12°C) 10^{-15} [21], respectively. This index was much lower as compared to sturgeon (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) spermatozoa: *i. e.* $(3.52 \pm 0.49) \times 10^{-13}$ м³/N·s (15°C) [18].

It is of no doubt that the coefficient L_p depends on temperature and the comparison of its values for various fish species at different temperatures is incorrect. We used the temperatures corresponding to the spawning conditions for each species, *i. e.* 'physiological' ones; and the comparison of L_p values at the same temperatures could show a similar tendency.

Коефіцієнти проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для досліджуваних криопротекторів за температури 20°C та відповідна енергія активації

Permeability coefficients of carp spermatozoa plasma membranes for the studied cryoprotectants at 20°C and the corresponding activation energy

Кріопротектор Cryoprotectant	Коефіцієнт проникності $K_p \times 10^8$ м/с, 20°C Permeability coefficient $K_p \times 10^8$ m/s, 20°C	Енергія активації E_a , кДж/моль Activation energy E_a , kJ/mol
ДМСО DMSO	1,33 ± 0,08 ^a	78,6 ± 3,9 ^c
ЕГ EG	1,43 ± 0,13 ^a	73,2 ± 5,4 ^c
1,2-ПД 1,2-PD	1,43 ± 0,08 ^a	73,6 ± 4,1 ^c
Гліцерин Glycerol	0,50 ± 0,13 ^b	16,5 ± 9,6 ^d

Примечание: позначені різними символами значення мають статистично значущі відмінності, $p < 0,05$.

Note: The values denoted with different symbols have statistically significant differences, $p < 0.05$.



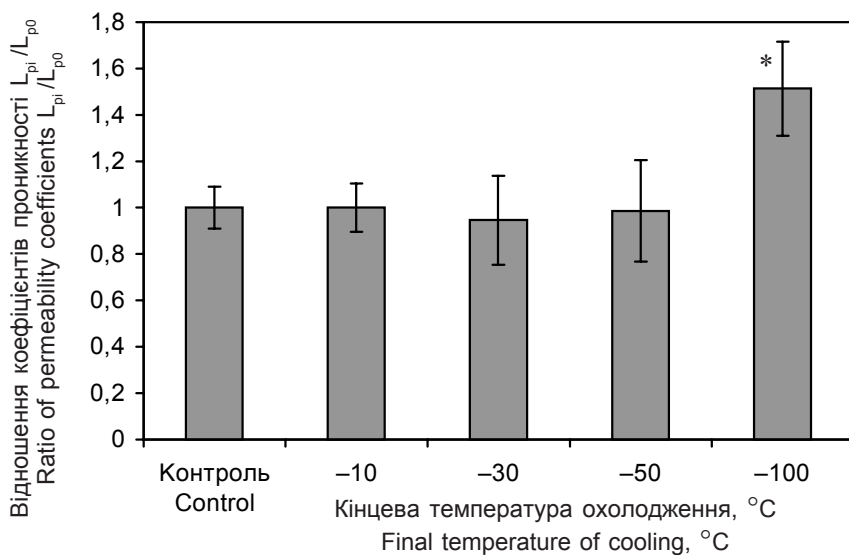


Рис. 1. Зміна проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул води після охолодження-відігрівання; наведено середнє значення \pm стандартне відхилення; L_{po} , L_{pi} – коефіцієнти проникності в контролі та досліді відповідно; * – відмінність статистично значуща відносно контролю, $p < 0,05$.

Fig. 1. Change in carp spermatozoa membrane permeability for water molecules after freeze-thawing; an average value \pm SD is shown; L_{po} , L_{pi} are permeability coefficients in the control and experiments, respectively; * is statistically significant difference relative to the control, $p < 0.05$.

У таблиці наведено коефіцієнти проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для досліджуваних кріопротекторів за температури 20°C та відповідні значення енергії активації їх проникності. Зазначені кріопротектори обрані для дослідження через те, що вони найчастіше використовуються під час кріоконсервування сперми риб [25]. Розраховані значення E_a для ДМСО, ЕГ та 1,2-ПД свідчать про те, що проникнення досліджуваних речовин у сперматозоїд відбувається шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар, тоді як більш низька енергія активації процесу переносу гліцерину вказує на каналний механізм проникнення [3].

Менше значення енергії активації перенесення гліцерину порівняно з іншими кріопротекторами також відзначено Н.О. Чернобай та співавторами [9]. Повідомлялося [19], що гліцерин не запобігає дегідратації сперматозоїдів жеребців, викликаної охолодженням, однак швидкість дегідратації в його присутності була меншою.

За результатами дослідження сперми, охолодженої до різних

температур, дегідратація в його присутності була меншою.

Using the results obtained by us in the sperm, cooled down to various temperatures and thawed by the standard regimens, we determined the critical temperatures, reaching those resulted in the damage

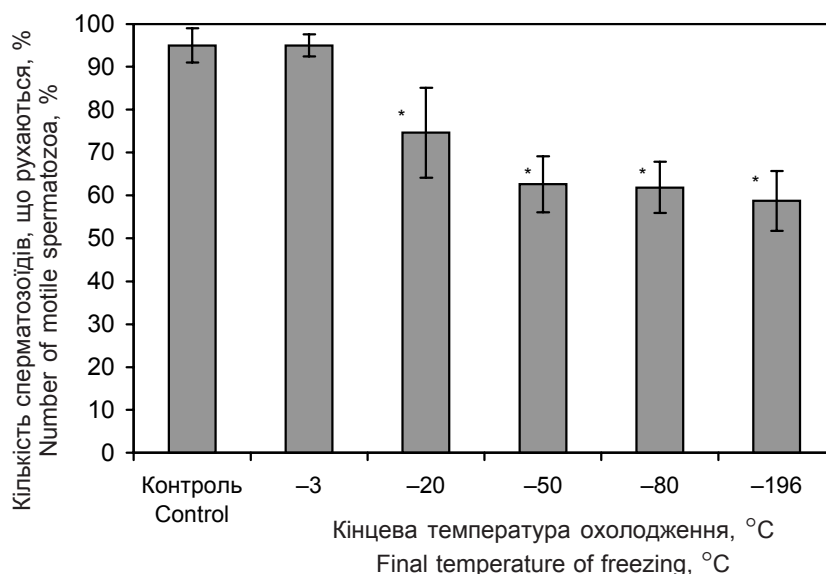


Рис. 2. Зміна рухливості сперматозоїдів коропа після охолодження-відігрівання; наведено середнє значення \pm стандартне відхилення; * – відмінність статистично значуща відносно контролю, $p < 0,05$.

Fig. 2. Change in carp spermatozoa motility after freeze-thawing; an average value \pm SD is shown; * – statistically significant difference relative to the control, $p < 0.05$.

The Table shows the permeability coefficients of carp spermatozoa plasma membranes for the studied cryoprotectants at 20°C and the corresponding values of activation energy of their permeability. These cryoprotectants were selected for study since they are more often used for fish sperm cryopreservation [25]. The calculated values E_a for DMSO, EG and 1,2-PD testify to the fact, that the penetration of the studied substances into a spermatozoon occurs by a passive diffusion through lipid bilayer, while a lower activation energy of glycerol transfer indicates a channel mechanism of penetration [6].

Chernobay N.O. *et al.* [4] have noted also a much lower value of activation energy of glycerol transfer as compared to other cryoprotectants. The glycerol was reported [15] as not preventing cell dehydration, caused by cooling, but

температур і відігрітої відповідно до стандартного режиму, визначено критичні температури, за яких гине частина сперматозоїдів. Одержані дані можуть бути корисними для розробки оптимальних режимів кріоконсервування сперми певного виду риб.

Після охолодження сперми до температур -10 , -30 або -50°C за програмою охолодження: $3-5$ град/хв до -15°C та $15-20$ град/хв до -100°C і подальшого відігрівання ми не виявили значних змін коефіцієнта проникності мембран клітин для води (рис. 1). Сперматозоїди, які були охолоджені до -100°C і відігріті, мали значуще більшу порівняно з контролем проникність мембран для молекул води.

Після охолодження сперми до температури -10°C з більшою швидкістю ($8-10$ град/хв) коефіцієнт L_p у відігрітих сперматозоїдів був значуще більшим порівняно з контролем. Проникність мембран клітин для молекул води може змінюватися внаслідок їх механічного пошкодження та зміни структури мембран сперматозоїдів.

Рівень рухливості сперматозоїдів, охолоджених до -3°C і відігрітих, значуще не відрізнявся від контрольного значення. Така кінцева температура охолодження була обрана тому, що при ній кристалізація ще не відбулася. Охолодження до температури -20°C і подальше відігрівання призвели до статистично значущого зменшення кількості рухливих клітин на 20% порівняно з контролем (рис. 2).

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

Висновки

1. Коефіцієнт проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для молекул води складає $(3,05 \pm 0,40) \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н}\cdot\text{с}$, а його зниження в діапазоні температур $35...15^{\circ}\text{C}$ характеризується енергією активації $(53,9 \pm 3,8) \text{ кДж/моль}$.

2. Зменшення показника проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул кріопротекторів ДМСО, ЕГ та 1,2-ПД у діапазоні $35...15^{\circ}\text{C}$ характеризується енергією активації $70-80 \text{ кДж/моль}$. Отримані дані можуть бути використані для визначення оптимального режиму кріоконсервування сперматозоїдів коропа.

3. У разі використання стандартного режиму охолодження-відігрівання сперми коропа значне пошкодження клітин відбувалося за температури

of some spermatozoa. These findings may be useful in designing the optimal regimen for certain fish species sperm cryopreservation.

After sperm freezing down to either -10 , -30 or -50°C by the following cooling program: $3-5 \text{ deg/min}$ down to -15°C and $15-20 \text{ deg/min}$ down to -100°C and further thawing, we found no significant changes in cell membrane permeability coefficient for water (Fig. 1). The spermatozoa, frozen down to -100°C and then thawed, had much higher membrane permeability for water molecules, than the control.

After sperm freezing down to -10°C with a higher rate ($8-10 \text{ deg/min}$) the coefficient L_p in the thawed spermatozoa was much higher as compared to the control. The cell membrane permeability for water molecules may change as a result of their mechanical damage and a change in spermatozoa membrane structure.

The motility level of spermatozoa, cooled down to -3°C and then warmed, did not significantly differ from the control value. We selected namely this final freezing temperature because no crystallization to be occurred yet at this temperature. Cooling down to -20°C and following thawing resulted in a statistically significant reduction of a number of motile cells by 20% as compared to the control (Fig. 2).

Thus, in our experiment a significant cell damage occurred within a range of $-3...-20^{\circ}\text{C}$, that was probably due to extracellular crystallization. After sperm freezing down to either -50 , -80 or -196°C and subsequent thawing the index of spermatozoa motility remained unchanged and made 60% , testifying to the absence of negative impact within the corresponding temperature ranges.

Conclusions

1. The permeability coefficient of carp spermatozoa plasma membranes for water molecules was $(3.05 \pm 0.40) \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{N}\cdot\text{s}$, and its decrease within the temperature range of $35...15^{\circ}\text{C}$ was characterized by the activation energy of $(53.9 \pm 3.8) \text{ kJ/mol}$.

2. A decrease in membrane permeability of carp spermatozoa for DMSO, EG and 1,2-PD molecules within the range of $35...15^{\circ}\text{C}$ was featured by the activation energy of $70-80 \text{ kJ/mol}$. These findings could be used to determine the optimal cryopreservation regimen for carp spermatozoa.

3. When using the standard freeze-thawing regimen for carp sperm cells a significantly cell damage occurred at $-3...-20^{\circ}\text{C}$; the membrane permeability was significantly augmented after freezing down to -100°C and subsequent thawing. After freezing down to $-10...-50^{\circ}\text{C}$ and further thawing no statistically significant changes in permeability coefficient were found as compared to the control.



–3...–20°C; показник проникності мембран суттєво збільшувався після охолодження до –100°C і подальшого відігрівання. Після охолодження до температур –10...–50°C і подальшого відігрівання статистично значущих змін коефіцієнта проникності порівняно з контролем не виявлено.

Література

1. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий – К.: Наук. думка, 1994. – 140 с.
2. Гордієнко Є.О., Товстяк В.В. Фізика біомембран. – К.: Наук. думка, 2009. – 272 с.
3. Гордієнко О.І., Коваленко С. Є., Коваленко І. Ф. Механізми проникання гліцерину крізь мембрани еритроцитів людини // Проблеми криобіології.– 2012. – Т. 22, №4. – С. 389–397.
4. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа – М.: Изд-во ВНИИПРХ, 1986. – 9 с.
5. Копейка Е.Ф. Экологическая ниша как фактор, определяющий криорезистентность сперматозоидов рыб // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №4. – С. 302–311.
6. 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.
7. Пуговкин А.Ю., Копейка Е.Ф., Нардид О.А., Черкашина Я.О. Исследование проницаемости мембран сперматозоидов для молекул воды // Биофизика. – 2014. – Т. 59, №3. – С. 481–487.
8. Пуговкін А.Ю., Кононенко І.С., Черепнін В.О. та ін. Проникність мембран сперматозоїдів стерляді (*Acipenser ruthenus*, L., 1758) для молекул води // Рибогосподарська наука України. – 2016. – №1/2016 (35). – С. 70–77.
9. Чернобай Н.А., Коваленко И.Ф., Кошый С.В. и др. Зависимость проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул криопротекторов от температуры // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 46–51.
10. 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; заявл. 27.12.2012; опубл. 11.03.2014. Бюл. №5.
11. Bobe J., Labbe C. Egg and sperm quality in fish // *General. Comp. Endocrinol.* – 2010. – Vol. 165, №3. – P. 535–548.
12. Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M. et al. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.) // *Cryobiology.* – 2009. – Vol. 59, №3. – P. 291–296.
13. Cabrita E., Alvarez R., Anel E., Herraes M.P. The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout // *Anim. Reprod. Sci.* – 1999. – Vol. 55, №3–4. – P. 279–287.
14. Fauvel C., Suquet M., Cosson J. Evaluation of fish sperm quality // *J. Appl. Ichthyol.* – 2010, №5. – Vol. 26. – P. 636–643.
15. Hagedorn M., Ricker J., McCarthy M. et al. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm // *Cryobiology.* – 2009. – Vol. 58, №1. – P. 12–19.
16. Kopeika E., Kopeika J., Zhang T. Cryopreservation of fish sperm // *Cryopreservation and freeze-drying protocols* / Ed. by J.G. Day and G.N. Stacey. – Totowa: Humana Press, 2007. – P. 203–217.
17. Kopeika E.F., Kopeika J.E. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish // *Fish spermatology* / Ed. by S.H.M. Alavi, J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee. – Oxford: Alpha Science International Ltd., 2007. – P. 347–396.

References

1. Bobe J., Labbe C. Egg and sperm quality in fish. *Gen Comp Endocrinol* 2010; 165: 535–548.
2. Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M. et al. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cryobiology* 2009; 59: 291–296.
3. Cabrita E., Alvarez R., Anel E., Herraes M.P. The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Anim Reprod Sci* 1999; 55: 279–287.
4. Chernobay N.A., Kovalenko I.F., Koschiy S.V. et al. Temperature dependence of SPEV cell membranes permeability for molecules of cryoprotectants. *Problems of Cryobiology* 2011; 21(1): 46–51.
5. Fauvel C., Suquet M., Cosson J. Evaluation of fish sperm quality. *Appl Ichthyol* 2010; 26: 636–643.
6. Gordiyenko O.I., Kovalenko S.Ye., Kovalenko I.F. Mechanisms of glycerol permeability through the membrane of human erythrocytes. *Probl Cryobiol* 2012; 22(4): 389–397.
7. Gordiyenko Ye.A., Pushkar N.S. Physical basis of low temperature preservation of cell suspensions. Kyiv: Naukova dumka; 1994.
8. Gordiyenko Ye.A., Tovstyak V.V. Physics of biomembranes. Kyiv: Naukova dumka; 2009.
9. Hagedorn M., Ricker J., McCarthy M. et al. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Cryobiology* 2009; 58: 12–19.
10. Kopeika E.F. Ecological niche as the factor determining cryoresistance in fish spermatozoa. *Probl Cryobiol Cryomed* 2014; 24(4): 302–311.
11. Kopeika E.F. Manual on carp sperm low temperature preservation. Moscow: VNIIPRH; 1986.
12. Kopeika E.F., Kopeika J.E. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish. In: Alavi S.H.M., Cosson J., Coward K., Rafiee G., editors. *Fish spermatology*. Oxford: Alpha Science International Ltd; 2007. p. 347–396.
13. Kopeika E., Kopeika J., Zhang T. Cryopreservation of fish sperm In: Day J.G. Stacey G.N., editors. *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007. p. 203–217.
14. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology* 1971; 8(5): 489–500.
15. Oldenhof H., Friedel K., Sieme H. et al. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology* 2010; 61: 115–122.
16. Petrunkina A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. *J Reprod Med Endocrinol* 2007; 4: 78–91.
17. Pinisetty D., Huang C., Dong Q. et al. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cryobiology* 2005; 50: 250–263.
18. Puhovkin A.Yu., Kononenko I.S., Cherepnin V.O. et al. Permeability of sterlet sperm membranes (*Acipenser ruthenus* L., 1758) for water molecules. *Fisheries Science of Ukraine* 2016; 35(1): 70–77.
19. Puhovkin A.Yu., Kopeika E.F., Gordiyenko E.A., Nardid O.A., inventors. The method for determining the permeability of membranes of common carp sperm to the water molecules. Patent of Ukraine № 104809 IPC G01N 33/48, G01N 15/00. 2014 March 11.
20. Puhovkin A.Yu., Kopeika E.F., Nardid O.A., Cherkashina Ya.O. Investigation of membrane permeability of carp spermatozoa for water molecules. *Biophysics* 2014; 59(3): 481–487.
21. Puhovkin A.Yu., Kopeika E.F. Study of water molecules transfer through pike (*Esox lucius* L) spermatozoa membranes. *Probl Cryobiol Cryomed* 2015; 25(2): 165.
22. Rana K.J., Gilmour A. Cryopreservation of fish spermatozoa: effect of cooling methods on the reproducibility of cooling rates and viability. In: *Refrigeration and Aquaculture Conference*, Bordeaux, 20–22 March 1996.

18. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // *Cryobiology*. – 1971. – Vol. 8, №5. – P. 489–500.
19. Oldenhof H., Friedel K., Sieme H. et al. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy // *Cryobiology*. – 2010. – Vol. 61, №1. – P. 115–122.
20. Petrunkina A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology // *J. Reprod. Med. Endocrinol.* – 2007. – Vol. 4, №2. – P. 78–91.
21. Pinisetty D., Huang C., Dong Q. et al. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus* // *Cryobiology*. – 2005. – Vol. 50, №3. – P. 250–263.
22. Rana K.J., Gilmour A. Cryopreservation of fish spermatozoa: Effect of cooling methods on the reproducibility of cooling rates and viability // *Refrigeration and Aquaculture Conference, Bordeaux, 20–22 March 1996*. – P. 3–12.
23. Suquet M., Dreanno C., Fauvel C. et al. Cryopreservation for sperm in marine fish // *Refrigeration and Aquaculture Conference, Bordeaux, 2000*. – Vol. 31, №3. – P. 231–243.
24. Verma D.K., Routray P., Dash C. et al. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species // *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* – 2009. – Vol. 9, №1. – P. 67–76.
25. Zhang T.T. Cryopreservation of gametes and embryos of aquatic species // *Life in the Frozen State* / Ed. by B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson. – Florida: CRC Press LLC, 2004. – P. 415–436.

