

Національна академія наук України  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Національна академія наук України  
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Пуговкін Антон Юрійович**

УДК 591.463.11-7:577.352.462:57.043

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

### **Осмотична реакція сперматозоїдів прісноводних риб на дію факторів кріоконсервування**

03.00.19 – кріобіологія

09 – біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

 А.Ю. Пуговкін  
(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Копейка Євгеній Федорович, кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник

Харків – 2018

## АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків – 2018.

Дисертаційна робота присвячена встановленню взаємозв'язку між осмотичною реакцією сперматозоїдів прісноводних риб і їхньою кріорезистентністю. Проведено теоретичне і експериментальне узагальнення і представлено новий підхід до вирішення задачі, спрямованої на пошук причин різної кріорезистентності сперматозоїдів прісноводних риб.

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.

Використання запропонованої в дисертаційній роботі методики дозволяє отримувати транспортні характеристики мембран сперматозоїдів різних видів риб. Розроблений спосіб використовували при дослідженні взаємодії фармацевтичних препаратів з ліпідними мембранами для визначення зміни проникності мембран, що відображає перспективність його

використання як інформативного тесту. Крім того, розроблений спосіб можна використовувати в умовах, наближених до польових, що є надзвичайно важливим для дослідження такого об'єкту як сперма риб.

Розроблено спосіб визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів коропа, який включає інкубацію клітин у дистильованій воді та реєстрацію залежності світлопропускання суспензії сперматозоїдів від часу, визначення залежності пошкодження сперматозоїдів від часу, при цьому час пошкодження 50% клітин визначає осмотичну резистентність сперматозоїдів. Розроблені способи захищені патентами України на винахід та корисну модель.

Для вивчення осмотичної реакції сперматозоїдів коропа визначали зміну вмісту внутрішньоклітинної вільної води в сперматозоїдах, інкубованих у середовищах NaCl, методом ЕПР. Установлено, 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. 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.

Досліджена кінетика нормованого світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа у розчинах різної осмолярності та 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.

Залежності відносної зміни вмісту води  $V/V_0$  в сперматозоїдах коропа та значення відносного світлопропускання  $T/T_0$ , які отримані в умовах

однакової осмолярності середовищ інкубації, 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.

Встановлено, що 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, значимо не відрізняється:  $273 \pm 16$  с та  $269 \pm 28$  с відповідно.

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 ( $68 \pm 14$  с та  $97 \pm 18$  с відповідно) та середня маса отриманих еякулятів.

Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів різних видів риб спектрофотометричним методом дозволило вперше визначити коефіцієнти проникності мембран сперматозоїдів коропа, стерляді та щуки до молекул води, що складають  $3,05 \pm 0,40 \times 10^{-14}$  м<sup>3</sup>/Н·с,  $5,96 \pm 0,83 \times 10^{-13}$  м<sup>3</sup>/Н·с,  $1,13 \pm 0,24 \times 10^{-14}$  м<sup>3</sup>/Н·с (20 °С), відповідно, та енергії активації переносу води через мембрани сперматозоїдів:  $53,9 \pm 3,8$ ,  $74 \pm 17$ ,  $64 \pm 5$  кДж/моль.

Встановлено, що коефіцієнт проникності мембран сперматозоїдів коропа до кріопротекторів диметилсульфоксиду (ДМСО), етиленгліколю (ЕГ), 1,2-пропандіолу (1,2-ПД) та гліцерину (Гл) 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 °C) відповідно, а енергія активація переносу молекул кріопротекторів через мембрану –  $78,6 \pm 3,9$ ;  $73,2 \pm 5,4$ ;  $73,6 \pm 4,1$ ;  $16,5 \pm 9,6$  кДж/моль відповідно.

Знайдені значення проникності мембран до молекул води та кріопротекторів ДМСО, ЕГ, 1,2-ПД вказують на перенос молекул шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар, тоді як більш низька енергія активації процесу переносу Гл вказує на каналний механізм (полегшену дифузію).

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

Рівень рухливості сперматозоїдів, охолоджених до  $-3$  °C і відігрітих, значуще не відрізнявся від контрольного значення. Охолодження до температури  $-20$  °C і подальше відігрівання призвели до статистично значущого зменшення кількості клітин, які рухаються, на 20% в порівнянні з контролем. Під час охолодження сперми до температур  $-50$ ,  $-80$  або  $-196$  °C і подальшого відігрівання показник рухливості сперматозоїдів дорівнював 60%, що свідчить про те, що режим охолодження-відігрівання у відповідному температурному діапазоні негативно не впливає на клітини.

Таким чином, у проведеному нами експерименті значне пошкодження клітин відбувалося за температури  $-3 \dots -20$  °C і пов'язано, ймовірно, з позаклітинної кристалізацією.

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  $-100$  °C за програмою охолодження 3–5 град/хв до  $-15$  °C та 15–20 град./хв. до  $-100$  °C і подальшого відігрівання проникність мембран відігрітих сперматозоїдів в 1,4 рази більша, ніж при охолодженні до температур  $-10$ ,  $-30$ ,  $-50$  °C і подальшому відігріванні.

Вперше показано, що проникність плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для молекул води після кріоконсервування зростає зі зменшенням кінцевої температури охолодження, як відносно контролю (тобто без охолодження-відігрівання), так і з витримкою після відігрівання, що свідчить про зростання осмотичної чутливості клітин. Коефіцієнт проникності мембран до молекул води за 20 °C складав  $6,2 \pm 0,6 \times 10^{-14}$ ;  $8,1 \pm 0,9 \times 10^{-14}$ ;  $11,4 \pm 1,4 \times 10^{-14} \text{ м}^3/(\text{Н} \times \text{с})$  через 1, 5 та 10 хв. після відігрівання сперми відповідно.

Результати роботи дозволяють розширити уявлення про кріорезистентність сперматозоїдів риб. Одержані в роботі дані про транспортні характеристики плазматичних мембран сперматозоїдів риб можуть бути використані під час розробки методичних підходів кріоконсервування сперматозоїдів риб.

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

Розроблений спосіб кріоконсервування сперми осетрових риб, що захищений патентом України на винахід, може бути використаний при штучному заплідненні та збереженні генофонду осетрових риб.

*Ключові слова:* кріоконсервування, сперматозоїди, прісноводні риби, проникність мембран, кріопротектори, осмотична реакція, кріорезистентність.

Список публікацій здобувача:

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 (*Cyprinus 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 / A. O. Sadchenko, O. V. Vashchenko, A. Yu. Puhovkin, E. F. Kopeika, N. A. Kasian, L. V. Budianska, A. 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].

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.

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., Буцкий 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. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю. Изменение качества нативной и криоконсервированной 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. Машенко // «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 кріозахисних 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.

## 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. This method of determining the permeability of spermatozoa membranes to water molecules is based on the phenomenon that when cells are incubated in a hypotonic solution of a cell-non-permeable substance, the cell volume increases due to extracellular water and leads to an increase of light transmission of a suspension, which, in turn, characterizes the kinetics of relative volume of cells.

The use of the method proposed in this thesis allows to determine transport characteristics of spermatozoa membranes for various fish species. The designed technique was used to determine the change in membrane permeability when studying the interaction of pharmaceutical drugs with lipid membranes, reflecting thereby the prospect of its usage as an informative test. In addition, the designed

method can be used under conditions close to the field ones, that is of great importance in studying such an object as fish sperm.

The way to determine an osmotic resistance of carp spermatozoa has been designed. This method includes the cell incubation in distilled water, the recording of light transmission of a spermatozoa suspension changing with time, and determination of dependency of spermatozoa damage on time. Herewith the damage time of 50% of cells determines an osmotic resistance of the sperm. The designed ways are protected with the patents of Ukraine for invention and utility model.

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 ratio of seminal plasma osmolarity to osmolarity of extracellular medium within 0.6–2.5. If an average osmotic plasma was 250 mOsmol/kg, a relationship close to the linear one was observed within the range of osmotic extracellular medium from 100 to 400 mOsmol/kg. This suggested the carp sperm to be close to the "perfect osmometers" by osmotic properties, which physical basis was determined by the Boyle – vant' Hoff law.

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 dependencies of a relative change in water content of  $V/V_0$  in carp spermatozoa and the relative light transmission  $T/T_0$ , obtained under the same osmolarity of incubation media are well approximated by linear functions, testifying to a high degree of positive linear correlation. The Pearson correlation

coefficient is ( $R^2$ ) = 0.9974, being statistically significant at the significance level of  $p=0.01$ . Thus, the data of spectrophotometric method may be concluded to reflect both the absolute change in cell volume and characterize the process of spermatozoa swelling itself.

Hormonal stimulation of spermatogenesis was established to not significantly affect the concentration of cells, but getting the large volumes of sperm as a result of hormonal stimulation was often associated with a slightly lower concentration of spermatozoa due to greater dilution of cells with the cavity fluid. The average osmotic resistance of spermatozoa obtained with the usage of pituitary injections and without hormonal stimulation did not significantly differ:  $273 \pm 16$  s and  $269 \pm 28$  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. Also, statistically significant differences were observed in the time sperm motility ( $68 \pm 14$  s and  $97 \pm 18$  s, respectively) and the mean weight of the ejaculates.

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  $3.05 \pm 0.40 \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{N}\cdot\text{s}$ ,  $5.96 \pm 0.83 \times 10^{-13} \text{ m}^3/\text{N}\cdot\text{s}$ ,  $1.13 \pm 0.24 \times 10^{-14} \text{ m}^3/\text{N}\cdot\text{s}$  ( $20^\circ\text{C}$ ), respectively, and the activation energy of water transfer through the spermatozoa membranes, which were  $53.9 \pm 3.8$ ,  $74 \pm 17$ ,  $64 \pm 5$  kJ/mol, correspondingly.

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

The found values of membrane permeability to water molecules and such cryoprotectants as DMSO, EG, 1,2-PD indicated the transport of molecules via passive diffusion through a lipid bilayer, while the lower activation energy of the Gl transfer process suggested a channel mechanism (light diffusion).

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

The motility of spermatozoa, cooled down to  $-3^{\circ}\text{C}$  and warmed up, did not significantly differ from the control value. Cooling down to  $-20^{\circ}\text{C}$  and subsequent warming up led to a statistically significant decrease in the number of moving cells by 20% compared to the control. When the spermatozoa were cooled down to  $-50$ ,  $-80$  or  $-196^{\circ}\text{C}$ , and warmed up subsequently, the sperm motility was 60%, testifying thereby to no negative effect of cooling-thawing regimen on cells within the appropriate temperature regimen.

Thus, during our experiment a significant cellular damage occurred at  $-3 \dots -20^{\circ}\text{C}$  and it was probably due to extracellular crystallization.

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  $-100^{\circ}\text{C}$  with cooling program of  $3\text{--}5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  down to  $-15^{\circ}\text{C}$  and  $15\text{--}20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  down to  $-100^{\circ}\text{C}$  and with further warming, the membrane permeability of thawed spermatozoa was 1.4 times higher than those cooled down to  $-10$ ,  $-30$ ,  $-50^{\circ}\text{C}$  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 the exposure after thawing, indicating thereby an increase in osmotic sensitivity of cells. The permeability coefficient of membranes

to water molecules at 20 °C was  $6.2 \pm 0.6 \times 10^{-14}$ ;  $8.1 \pm 0.9 \times 10^{-14}$ ;  $11.4 \pm 1.4 \times 10^{-14}$  m<sup>3</sup>/(N·s) in 1, 5 and 10 min after warming the sperm, respectively.

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.

The findings can be recommended for usage in educational process at universities for training the specialists in various fields of biology, cryobiology in particular, and agricultural sciences.

The designed method for sturgeon sperm cryopreservation protected with the patent of Ukraine for invention may be used in artificial insemination and preservation of sturgeon gene pool.

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



## ЗМІСТ

|                                                                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....                                                                                          | 20  |
| ВСТУП .....                                                                                                              | 22  |
| РОЗДІЛ 1. ОСМОТИЧНА РЕАКЦІЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ                                                                               |     |
| ПРІСНОВОДНИХ РИБ НА ДІЮ ФАКТОРІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ                                                                       |     |
| (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ) .....                                                                                                 | 31  |
| 1.1. Фізіологічне значення механізмів регулювання клітинного об'єму ...                                                  | 31  |
| 1.2. Активація руху сперматозоїдів риб .....                                                                             | 33  |
| 1.3. Дослідження змін клітинного об'єму сперматозоїдів риб .....                                                         | 38  |
| 1.4. Кріоконсервування сперми риб .....                                                                                  | 422 |
| 1.5. Підвищення кріорезистентності сперматозоїдів тварин за рахунок<br>модифікації їхніх мембран .....                   | 46  |
| 1.6. Висновки .....                                                                                                      | 48  |
| РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....                                                                           | 51  |
| 2.1. Матеріал, який використовувався у роботі .....                                                                      | 51  |
| 2.2. Методи гормональної стимуляції дозрівання плідників .....                                                           | 52  |
| 2.3. Методи кріоконсервування сперми прісноводних риб .....                                                              | 53  |
| 2.3.1. Підготовка сперми до охолодження .....                                                                            | 53  |
| 2.3.2. Кріоконсервування сперми .....                                                                                    | 54  |
| 2.3.3. Відігрівання сперми .....                                                                                         | 55  |
| 2.4. Методи визначення ефективності кріоконсервування сперми риб .....                                                   | 55  |
| 2.5. Методи визначення осмолярності сім'яної плазми сперматозоїдів риб<br>та розчинів для інкубації сперматозоїдів ..... | 56  |
| 2.6. Метод дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів риб .....                                                       | 57  |
| 2.7. Методи дослідження рухливості сперматозоїдів на різних етапах<br>кріоконсервування .....                            | 59  |
| 2.8. Метод ЕПР для визначення зміни вмісту вільної внутрішньоклітинної<br>води .....                                     | 60  |
| 2.9. Статистичний аналіз .....                                                                                           | 61  |

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА СПОСОБІВ ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ПРОНИКНОСТІ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН СПЕРМАТОЗОЇДІВ РИБ ДО МОЛЕКУЛ ВОДИ..... | 62 |
| 3.1. Фізичні основи фотометричного способу визначення проникності плазматичних мембран сперматозоїдів риб до молекул води .....              | 62 |
| 3.2. Експериментальне обладнання для визначення коефіцієнта проникності мембран сперматозоїдів риб до молекул води .....                     | 65 |
| 3.3. Методика визначення проникності мембран сперматозоїдів риб до молекул води .....                                                        | 66 |
| 3.4. Методика визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів прісноводних риб .....                                                     | 68 |
| РОЗДІЛ 4. ДОСЛІДЖЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ РЕАКЦІЇ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРІСНОВОДНИХ РИБ .....                                                               | 72 |
| 4.1. Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів коропа в гіпо- і гіперосмотичних умовах методом ЕПР-спектроскопії.....                    | 72 |
| 4.2. Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів коропа в гіпоосмотичних умовах методом спектрофотометрії .....                            | 75 |
| 4.2.1. Вплив осмолярності середовища інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа .....                           | 75 |
| 4.2.2. Вплив температури середовища інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа .....                            | 79 |
| 4.2.3. Вплив концентрації сперматозоїдів в середовищі інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа.....           | 80 |
| 4.2.4 Порівняння даних, що отримані методом спектрофотометрії та ЕПР-спектроскопією. ....                                                    | 82 |
| 4.3. Визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів коропа.....                                                                         | 83 |
| 4.4. Вплив гормональної стимуляції на осмотичну резистентність сперматозоїдів коропових риб.....                                             | 89 |

|                                                                       |     |
|-----------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів риб               |     |
| до молекул води .....                                                 | 97  |
| 4.5.1. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів коропа          |     |
| до молекул води .....                                                 | 97  |
| 4.5.2. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів щуки            |     |
| до молекул води .....                                                 | 98  |
| 4.5.3. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів стерляді        |     |
| до молекул води .....                                                 | 101 |
| 4.5.4. Проникність мембран сперматозоїдів риб до молекул води:        |     |
| порівняльний аналіз.....                                              | 103 |
| 4.6. Зміна проникності мембран клітин для води у присутності          |     |
| лікарських речовин. ....                                              | 107 |
| РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ РЕАКЦІЇ СПЕРМАТОЗОЇДІВ               |     |
| ПРІСНОВОДНИХ РИБ НА ОКРЕМИХ ЕТАПАХ                                    |     |
| КРІОКОНСЕРВУВАННЯ .....                                               | 109 |
| 5.1. Вплив часу зберігання сперми до кріоконсервування на осмотичну   |     |
| реакцію сперматозоїдів коропа .....                                   | 109 |
| 5.2. Проникність мембран сперматозоїдів коропа до кріопротекторів.... | 111 |
| 5.3. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів коропа            |     |
| до молекул води на окремих етапах кріоконсервування .....             | 112 |
| 5.4. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів коропа            |     |
| до молекул води після повного циклу кріоконсервування.....            | 114 |
| 5.5. Оптимізація умов кріоконсервування сперми стерляді               |     |
| ( <i>Acipenser ruthenus</i> , L. 1758) .....                          | 116 |
| АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....                                | 119 |
| ВИСНОВКИ.....                                                         | 125 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....                                       | 127 |
| ДОДАТОК.....                                                          | 156 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЦП – аналогово-цифровий перетворювач

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ЕГ – етиленгліколь

ДМСО – диметилсульфоксид

Гл – гліцерин

Ме – метанол

1,2-ПД – 1,2-пропандіол

ФЕК – фотоелектроколориметр

ЕПР – електронний парамагнітний резонанс

АФІ – активні фармацевтичні інгредієнти

ФП – фармацевтичні препарати

ФЛ – фосфоліпіди

Хол. – холестерин

Хол.:ФЛ – співвідношення холестерину та фосфоліпідів

$\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФаза – натрій-калієва аденозинтрифосфатаза

Мет. – метоклопрамид

Сурф. – сурфагон

С. В. – стандартне відхилення

$V_0$  – значення об'єму клітини в ізотонічному розчині

$\pi_0^{in}$  – внутрішньоклітинний осмотичний тиск

$\pi^{out}$  – осмотичний тиск зовнішнього середовища

$\alpha$  – частина осмотично неактивного об'єму клітини

$\gamma$  – поверхнево-об'ємне відношення клітини

$L_p$  – коефіцієнт проникності клітинної мембрани для молекул води  
(коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани)

$\tau$  – характерний час проникнення молекул води до клітини

$E_a$  – енергія активації процесу переносу молекул води через плазматичну мембрану

$I_0$  – інтенсивність пучка падаючого світла

$a$  – радіус клітини

$N$  – концентрація клітин

$\chi$  – коефіцієнт ослаблення падаючого світла

$Q_{осл}$  – функція ослаблення падаючого світла

$\lambda$  – довжина хвилі світла у вакуумі

$m$  – відносний показник заломлення світла

$m_{1,2}$  – показник заломлення світла поза- і внутрішньоклітинного середовища.

$\varepsilon$  – коефіцієнт екстинкції

$D$  – оптична густина

$T$  – світлопропускання

АТФ – аденозинтрифосфат

цАМФ – циклічний аденозинмонофосфат

## ВСТУП

### **Обґрунтування вибору теми дослідження**

Кріоконсервування є пріоритетним способом довгострокового зберігання статевих продуктів рідкісних і зникаючих риб в умовах погіршення екологічної ситуації у світі та, зокрема, в Україні [1–5]. Крім того, даний метод дозволяє проводити селекцію цінних промислових видів для підвищення рентабельності рибництва [6–8].

Роботи з кріоконсервування сперматозоїдів виконувались більше ніж з двомастами видами риб [5, 9], в основному з прісноводними, які мають промислове значення [10]. Ефективність кріоконсервування сперматозоїдів риб видоспецифічна [11, 12]. При цьому результати кріоконсервування сперми морських видів риб виявилися більш успішнішими, ніж прісноводних [13–15]. 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 свіжо отриманих 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 відталою 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 [12, 16, 17].

Кріорезистентність сперматозоїдів пов'язана з умовами розмноження риб, перш за все, з певною температурою води під час нересту та її солоністю [13, 18–20]. 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 [11, 21].

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 [22], що може пошкоджувати клітини або впливати на їх чутливість до факторів кріоконсервування. Відомо, що одним із основних факторів пошкодження клітин під час заморожування є температурно-осмотичний шок [23, 24]. 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 [25].

Отже, актуальним є вивчення осмотичної чутливості сперматозоїдів риб 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 риб [26].

На сьогодні відомі лише поодинокі результати дослідження проникності мембран сперматозоїдів риб для води і кріопротекторів [27, 28]. 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, 29]. Розробка таких методів може бути інструментальною базою для дослідження і сприяти розвитку цієї області кріобіологічної науки.

Актуальним лишається дослідження біофізичних характеристик клітинних мембран (осмотичної реакції клітин, транспорту води через мембрани) у фізіологічних умовах [30–35] і протягом кріоконсервування [36–41], а також розробка і застосування теоретичних моделей (розрахунків) [42–48].

Таким чином, узагальнюючи вищенаведені міркування, можна стверджувати, що розробка відповідної інструментальної бази та подальше вивчення осмотичної реакції сперматозоїдів риб на дію факторів кріоконсервування є актуальними і перспективними для розуміння механізмів кріорезистентності сперми риб, 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 кріобіології систем репродукції «Вивчення змін репродуктивної функції тварин і людини під впливом кріоконсервованих клітинних препаратів та фізико-хімічних факторів» (шифр теми 2.2.6.58, № держ. реєстрації 0111U001197) та «Вивчення впливу факторів кріоконсервування при вітрифікації на



морфофункціональні характеристики репродуктивних клітин та ембріонів» (шифр теми 2.2.6.108, № держ. реєстрації 0116U003498), де автор самостійно виконував окремі розділи як відповідальний виконавець, отримані результати були включені до звіту відділу.

### **Мета і завдання дослідження**

**Метою** роботи є встановлення взаємозв'язку між осмотичною реакцією сперматозоїдів прісноводних риб 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 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

модельовання 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 сперми прісноводних риб; кріоконсервування сперми прісноводних риб, а також методи статистичного аналізу.

Інформаційну базу дослідження становили фундаментальні та прикладні результати наукових пошуків зарубіжних і вітчизняних фахівців, висвітлені в монографіях, періодичних виданнях, інтернет-джерелах, матеріалах науково-практичних конференцій, нормативні документи за профілем дисертаційної роботи.

### **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 кріопротекторів етиленгліколя, 1,2-пропандіола, диметилсульфоксида та гліцерину й енергії активації процесів переносу цих речовин через клітинну мембрану. Встановлено, що молекули води, етиленгліколя, 1,2-пропандіола, диметилсульфоксида проникають до сперматозоїдів коропа шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар, а гліцерин – полегшеною дифузією (канальним механізмом).

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

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 був використований нами 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 навчальному 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 задачі 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.

В опублікованих із співавторами роботах особистий вклад здобувача полягає в плануванні та проведенні експерименту, обговоренні отриманих результатів та підготовці матеріалів до публікації. Зокрема в роботах

[49–67] – у пошуці й аналізі даних літератури, участі в плануванні експериментів, проведенні експериментів, обробці даних експериментального дослідження, участі в інтерпретації результатів дослідження і формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

[68–72] – у пошуці й аналізі даних літератури, участі в плануванні експериментів, проведенні експериментів із 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.

[73–75] – у пошуці й аналізі даних літератури, участі в плануванні експериментів, проведенні експериментів із 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.

[76–81] – 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 результатів дисертації**

Матеріали дисертаційної роботи 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. Пущино, 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.

### **Структура дисертації**

Дисертація 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. Повний обсяг дисертації 161 сторінка, обсяг основного тексту 126 сторінок. Дисертація містить 31 рисунок, 7 таблиць, 1 додаток. Список використаних джерел містить 257 найменувань.

## РОЗДІЛ 1.

### ОСМОТИЧНА РЕАКЦІЯ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРІСНОВОДНИХ РИБ НА ДІЮ ФАКТОРІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

#### 1.1. Фізіологічне значення механізмів регулювання клітинного об'єму

Прісноводними називають риб, що все життя або його більшу частину проводять у прісних водоймищах з мінералізацією менше 0,05%; вони складають майже половину відомих видів риб. У більшості риб запліднення ікри відбувається поза материнським організмом, тобто на відміну від наземних тварин сперматозоїди та ооцити риб до запліднення деякий час знаходяться поза батьківським організмом у воді [82, 83].

У зв'язку з низьким вмістом солі в середовищі, де відбувається запліднення, функції сперматозоїдів прісноводних риб обмежені досить вузьким діапазоном солоності [84]. У результаті адаптації риб до існування в умовах прісної води, чутливість їх сперматозоїдів до осмотичних стресів сильно зросла. Нездатність клітин зберігати внутрішньоклітинний вміст іонів під час тривалої експозиції у прісній воді робить сперматозоїди прісноводних риб більш уразливими у порівнянні з клітинами організму [85]. Адаптація сперматозоїдів до прісної води призвела до зменшення осмолярності плазми сперми порівняно з морськими видами риб [86]. Наприклад, для сибірського осетра осмолярність сім'яної плазми варіює в межах від 20 до 90 мОсмоль/кг, для коропа становить в середньому 250 мОсмоль/кг, у той час як для морських видів риб вона лежить між 300 і 350 мОсмоль/кг [16].

Мембрани клітин тварин, зокрема сперматозоїдів риб, не можуть бути толерантними до істотних градієнтів гідростатичного тиску, і рух води через мембрани в значній мірі визначається градієнтами осмотичного тиску. Таким чином, будь-яка зміна позаклітинної або внутрішньоклітинної осмолярності викликає відповідний рух води через мембрану клітини з подальшою зміною об'єму клітини [87]. Навіть за постійної осмотичної концентрації позаклітинного середовища, сталість об'єму клітини порушується змінами

внутрішньоклітинної осмолярності. Широка різноманітність метаболічних шляхів веде до утворення або до розпаду в клітині осмотично активних речовин. Крім того, транспорт речовин через мембрани клітини змінює внутрішньоклітинну осмолярність і, таким чином, об'єм клітини.

Для того щоб уникати надмірних змін об'єму, клітини розвинули і використовують безліч механізмів регуляції об'єму, включаючи транспорт через мембрани і метаболізм [88]. Ці механізми служать не тільки для того, щоб коригувати об'єм клітини, але й істотно змінюють широку різноманітність її функцій. Таким чином, об'єм клітини – це інтегральний елемент клітинного механізму, що регулює роботу клітини [87].

Зміна об'єму клітини впливає на метаболічні функції. Збільшення об'єму сприяє синтезу і перешкоджає руйнуванню білків, вуглеводів і меншою мірою ліпідів. Стиснення клітини має протилежний результат. Таким чином, набухання клітини може розглядатися як анаболічний сигнал, в той час як її стиснення – як катаболічний [87].

Резистентність до анізоосмолярності істотно важлива для запобігання клітинного лізису і загибелі клітин. Здатність сперматозоїдів реагувати зміною клітинного об'єму визначається декількома факторами, включаючи фосфоліпідний склад мембран, їх проникність до молекул води, температуру фазового переходу ліпідів, активність  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  АТФази, іонних каналів, елементів цитоскелета [89]. Morita M. і співавт. [90] виявили, що сперматозоїди евригалінної тиліпії (*Oreochromis mossambicus*, P., 1852), які пристосовані до прісної і до солоної води, адаптуються до різних осмотичних умов за рахунок відмінностей у фосфорилуванні білків.

Швидкі зміни об'єму клітини зазвичай викликані рухом води через її мембрани ( $J$ ), що призводить до гідростатичного ( $\Delta p$ ) і осмотичного ( $\Delta \pi$ ) градієнтів тиску і залежить від гідравлічної провідності мембрани клітини – проникності до молекул води ( $L_p$ ) [26]:

$$J = L_p (\Delta p - \Delta \pi) \quad (1.1)$$



Проникність мембран для молекул води залежить від присутності водних каналів (аквапоринів) в мембрані клітини. Механізми регуляції об'єму клітини найкраще виявляються під час експозиції клітин у середовищі з позаклітинною осмолярністю, що різко відрізняється від фізіологічної. Якщо клітини експонуються в гіпотонічному розчині, вони спочатку збільшуються, як більш або менш досконалі осмометри, але потім значення об'єму клітини може наближатися до початкового. Необхідно також зазначити, що витримка клітин у неізотонічному позаклітинному середовищі змінює не тільки об'єм клітини, але також і об'єм внутрішньоклітинних органел, таких, як мітохондрії [87].

Транспорт іонів через мембрани клітини має першорядну важливість для регулювання об'єму клітини [91–95]. Існують різноманітні іонні канали, які активізуються внаслідок розтягування клітинної мембрани, тобто внаслідок збільшення напруженості мембрани клітини. Активізовані розтягуванням канали можуть бути вибіркові для  $K^+$  або для аніонів і таким чином безпосередньо регулювати об'єм клітини. Більшість цих каналів, однак, є невибілковими для катіонів, дозволяючи прохід  $K^+$ ,  $Na^+$  і  $Ca^{2+}$  [96, 97].

Іонний потік через клітинну мембрану регулює метаболізм, биття флагели, акросомну реакцію сперматозоїдів [98]. Значну роль у регуляції активності сперми тварин відіграють  $Na^+/Ca^{2+}$  обмінники [99]. Golpour та співавтори [100] встановили, що час рухливості сперматозоїдів плотви залежить від співвідношення  $Na^+/K^+$ ,  $Na^+/Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ . На функціональну активність сперми тварин завдають впливу іони  $Na^+$  [101],  $Ca^{2+}$  [92, 102–104] та ін.

## 1.2. Активація руху сперматозоїдів риб

Механізми активації сперматозоїдів та вплив різних факторів на рухливість сперматозоїдів риб інтенсивно вивчалися наприкінці минулого століття, але їх дослідження є актуальним і досі.

Сперматозоїди риб нерухомі в сім'яному каналі на відміну від сперматозоїдів рептилій і ссавців. Під час нересту сперматозоїди виділяються в навколишнє середовище з осмотичним тиском та іонним складом, що відрізняються від сім'яної плазми. Як наслідок, сперматозоїди стають тимчасово рухливими. Тривалість рухливої фази залежить від багатьох факторів навколишнього середовища: іонного складу, осмотичного тиску, температури, тощо [93, 94, 105–115]. Тривалість рухливості сперматозоїдів зазвичай коротше у прісноводних видів риб, ніж у морських. Низька резистентність сперматозоїдів до гіпотонічного шоку, зростання концентрації позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$  і зменшення внутрішньоклітинного  $\text{H}^+$  розглядаються як фактори, що лімітують тривалість рухливості сперматозоїдів прісноводних видів риб [116–118]. Такаї Н. та співавтори [119] повідомили, що зміна концентрації внутрішньоклітинного  $\text{K}^+$ , яка викликана зміною зовнішньої осмолярності, регулює рухливість сперматозоїдів морських та прісноводних риб.

Важливою характерною властивістю сперматозоїдів риб є те, що сперма прісноводних видів риб активується внаслідок зменшення осмотичного тиску середовища, в той час як у морських видів активація відбувається після збільшення осмотичності середовища до 600–1000 мОсмоль/кг. Сперматозоїди прісноводних риб зовсім нерухомі в середовищах, що містять відносно високі концентрації  $\text{K}^+$  [120]. Зменшення позаклітинної концентрації  $\text{K}^+$  є істотним фактором для ініціації рухливості сперматозоїдів лососевих [119, 121]. Зменшення позаклітинної осмолярності є сигналом для ініціації рухливості сперматозоїдів корошових риб, в той час як гіперосмолярність і зміни концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  є сигналами, що забезпечують ініціацію рухливості сперматозоїдів морських риб [105, 120, 122, 123]. До процесу активації сперматозоїдів риб можуть бути залучена активність іонних каналів [124], зміна рН [116, 125–127], тощо.

Механізм, за яким гіпоосмотичний шок індукує рухливість сперматозоїдів коропа (*Cyprinus carpio*, L. 1756) вивчали Perches Roupard G.

та співавт. Вони показали, що механізм активації може включати котранспорт іонів або специфічні канали, які чутливі до осмотичного тиску та активуються розтягуванням [123]. Krasznai Z. та співавт. показали, що після перенесення сперматозоїдів коропа до гіпоосмотичного середовища їхні флагели набувають рухливості в залежності від внутрішньоклітинної концентрації кальція [128, 129]. Більш того, їхні дослідження встановили, що окрім калієвих та кальцієвих каналів, конформаційні зміни мембранних ліпідів, що викликані розтягуванням мембрани, також залучені до механізмів активації рухливості сперми коропа. Linhart O. та співавтори показали, що рухливість сперматозоїдів коропових залежить як від осмотичного тиску позаклітинного середовища, так і впливу іонів [130]. Рухливість сперматозоїдів вогняного барбуса (*Puntius conchoni*us, Н. 1822) – представника родини коропових – активується через зміну позаклітинної осмолярності [131].

Транспорт  $K^+$  і  $Ca^{2+}$  через іонні канали є першим фактором, залученим до процесу ініціації рухливості сперми лососевих [132, 133]. Morita M. та співавт. встановили, що сперматозоїди лососевих риб, які нерухомі в присутності мілімолярних концентрацій позаклітинного  $K^+$  та набувають рухливості при їх перенесенні до середовищ без  $K^+$ , також стають рухомими навіть у середовищах з великою концентрацією  $K^+$  після попередньої обробки інтактної сперми гліцерином. Автори прийшли до висновку, що органічні спирти, зокрема гліцерин, індукують фосфорилювання, що призводить до ініціації рухливості сперматозоїдів через зростання внутрішньоклітинного цАМФ у результаті зменшення концентрації позаклітинного  $K^+$ . Kho та співавтори [134] показали, що вихід  $K^+$  через  $K^+$ – канали назовні та потік  $Ca^{2+}$  через  $Ca^{2+}$  – канали до клітини викликають зміни мембранного потенціалу та ведуть до синтезу цАМФ [135], що призводить до ініціації рухливості сперми форелі. Voitano S. та Omoto C. повідомили, що гіперполяризація мембран сперматозоїдів форелі призводить до активації без зростання внутрішньоклітинного рН [136]. Дослідники показали, що сперма форелі

може бути активована із додаванням двовалентних катіонів у присутності  $K^+$ , який у звичайних умовах інгібує рухливість. Активацію у присутності двовалентних іонів вони пояснили здатністю катіонів маскувати поверхневий потенціал та запропонували модель, в якій гіперполяризація мембрани є тригером, що запускає ланцюг подій, які призводять до активації сперми форелі. При цьому зміни у внутрішньоклітинному рН не регулюють рухливість сперматозоїдів форелі.

Zilli L. та співавтори вивчали молекулярні механізми, що залучені до активації рухливості сперматозоїдів морського карася та атлантичного землероя [137]. Результати їх досліджень демонструють, що осмолярність є ключовим сигналом для ініціації рухливості сперматозоїдів обох видів, тоді як  $K^+$  та  $Ca^{2+}$  не мають ніякого впливу. Ініціація сперматозоїдів обох видів залежить від цАМФ-залежного фосфорилування білків. Zilli L. та співавтори [97] припустили, що в результаті витримки сперматозоїдів у гіперосмотичних умовах, через зменшення клітинного об'єму відбувається зростання внутрішньоклітинної концентрації іонів. Це зростання може приводити до активації аденілицклази і цАМФ-залежного фосфорилування білків. Пізніше вони дослідили фізіологічну роль аквапоринів у ініціації рухливості сперми [88].

Сперматозоїди прісноводних риб адаптувалися до зниження осмолярності позаклітинного середовища і розтягування мембрани, а сперматозоїди морських риб – до збільшення осмотичного тиску, отже, стиснення мембран і дегідратації [16, 138, 139]. Відомо, що клітинний об'єм сперматозоїдів певних морських риб залишається сталим під час інкубації сперматозоїдів у середовищах різної осмолярності, тоді як здебільшого об'єм сперматозоїдів прісноводних риб зазнає змін відповідно до перепаду осмотичного тиску [140]. Існує думка, що внутрішньовидові відмінності не визначаються індивідуальними характеристиками зміни об'єму сперматозоїдів риб в період руху [141], хоча, відомо, що сперматозоїди можуть сильно

різнитися за іншими характеристиками, такими як ступінь рухливості, запліднююча здатність, цілісність мембран, тощо [100, 142–154].

Сперматозоїди риб мають видоспецифічну осморезистентність. Дистильована вода індукує морфологічні ушкодження сперматозоїдів морських видів риб, які супроводжуються руйнуванням плазматичної мембрани та мембран мітохондрій. Сперматозоїди коропа змінюють форму та зазнають ушкоджень у дистильованій або прісній воді [155]. Натомість, відомо, що в райдужної форелі і деяких інших видів риб хроматин головки сперматозоїдів підтримує їх природну форму навіть у дистильованій воді [126].

Відомі роботи, в яких демонструється можливість повторної активації сперматозоїдів коропа [156–158] за рахунок витримки їх у збагаченому на  $K^+$  розчині та подальшого перенесення до активуючого середовища з меншою концентрацією  $K^+$ . Як приклад, можна зазначити ефект активації сперматозоїдів у власній плазмі [159].

Отже, зниження осмолярності і зміна іонної концентрації навколишніх середовищ є тригерами для активації сперматозоїдів прісноводних риб. Реакція сперматозоїдів на осмотичний шок варіює серед видів риб, в першу чергу, в залежності від того морський це або прісноводний вид. У прісноводних видів риб дуже низький рівень осмолярності навколишнього середовища безпосередньо бере участь у активації рухливості сперматозоїдів, як наприклад, у коропових. В осетрових і лососевих риб активація може відбутись без зміни осмолярності (порівняно зі сім'яною рідиною) через зміну іонного складу навколишнього середовища. Тому, загалом, механізми активації руху сперматозоїдів прісноводних риб можна класифікувати як осмотичний або іонний (за сталої осмотичності) стимул.

Механізм активації рухливості сперматозоїдів через осмотичний стимул повністю не встановлено. Припускають [128], що збільшення об'єму клітин сперми може генерувати сигнал, відповідальний за зміну активності

механочутливих кальцієвих каналів, тобто осмолярність впливає опосередковано через механочутливі кальцієві канали. В залежності від виду риб набряк сперматозоїдів може грати різну роль в ініціації руху [160].

### 1.3. Дослідження змін клітинного об'єму сперматозоїдів риб

Інформації про дослідження клітинного об'єму сперматозоїдів риб замало. Відомо лише декілька спроб оцінити зміну об'єму у відповідь на різну осмолярність позаклітинного середовища з використанням таких методів, як спермакрит [123], світлова мікроскопія [123], спектрофотометрія [140, 161], електронний лічильник часток [28], спектроскопія імпульсів опору [22]. Використання будь-якого з цих методів дозволяє виявити збільшення об'єму сперматозоїдів коропа під час періоду їхньої рухливості. Відомо, що клітинний об'єм змінюється в залежності від осмолярності навколишнього середовища і його зміна, як правило, відбувається не тільки під час активації сперматозоїдів, але і протягом усього періоду руху [140, 161]. Натомість сперматозоїди райдужної форелі (*Oncorhynchus mykiss*, W., 1792) збільшують свій об'єм одразу (тобто набухання відбувається протягом декількох секунд) після потрапляння в гіпотонічні не активуючі середовища, однак рівень збільшення клітинного об'єму не залежить від осмолярності оточуючого середовища і періоду інкубації [22].

Через короткий період рухливості сперматозоїдів риб вивчення змін їхніх об'ємів протягом руху технічно ускладнене. Тому доцільним є поєднання методів дослідження кінетики об'єму. Зміну об'єму під час періоду рухливості сперматозоїдів риб з осмотичним та іонним стимулом активації досліджували в роботі [160]. Так, було встановлено високий коефіцієнт кореляції між зміною об'єму, виміряною за допомогою різних методів: спермакриту, методу оптичної мікроскопії та нефелометрії.

Через те, що використання методу спермакриту призводило до утворення великої кількості пошкоджених сперматозоїдів коропа за

осмотичності менш ніж 150 мОсмоль/кг, цей спосіб розцінили як недостатньо інформативний та незадовільний [160].

Використання методу світлової мікроскопії для визначення об'єму клітин також має свої обмеження. Через складну форму сперматозоїдів, малий діаметр клітин, а тим паче їхніх флагел, достовірно можна розрахувати лише об'єм голівки сперматозоїда. В деякому наближенні форму голівок сперматозоїдів коропа можна вважати сферичною, але, наприклад, голівки сперматозоїдів стерляді або форелі мають більш складну несферичну форму. За свідченням авторів [160], на відміну від сперматозоїдів коропа, які змінювали об'єм в залежності від осмотичності навколишнього середовища, голівки сперматозоїдів стерляді і форелі підтримували об'єм постійним за різних осмотичних умов: як у гіпотонічних, так і гіпертонічних середовищах.

За допомогою нефелометрії можна визначити кінетику об'єму сперматозоїдів в розчинах будь-якої осмолярності з високою чутливістю до незначних змін об'єму. Дані, що отримані цим методом, добре корелюють з даними світлової мікроскопії; використання нефелометрії дозволяє кількісно описати зміну об'єму сперматозоїдів. Однак, те, що нефелометрія дає інформацію про загальну зміну клітинного об'єму має як свої переваги, так і недоліки. До останніх можна віднести те, що під час інкубації сперматозоїдів, зокрема коропа, в гіпотонічних умовах можливо утворення пухирців на флагелах сперматозоїдів, що може призводити до похибок вимірювань [123]. При цьому, автори [160] зазначають, що вплив цих утворень на оптичну густину незначний, тим паче, що утворення пухирців та інших можливих ефектів є зворотним.

Головною перевагою методу спектроскопії імпульсів опору є те, що він може бути використаний для визначення клітинного об'єму окремих сперматозоїдів, а велика кількість клітин може бути проаналізована протягом короткого періоду часу. Використання методу спектроскопії імпульсів опору дозволяє чітко вказати на кількісні характеристики зміни об'єму сперматозоїдів. Цей метод передбачає отримання гістограми розподілу

кількості сперматозоїдів за значенням клітинного об'єму. Метод полягає в побудові послідовності гістограм розподілу сперматозоїдів за значенням об'єму після активації сперми в гіпотонічному розчині. Недолік цього способу полягає в тому, що виникає необхідність у попередньому калібруванні з використанням сферичних частинок. Отже, через те що форма сперматозоїдів зазвичай не ідеально сферична, дані, що отримані спектроскопією імпульсів опору можуть містити похибку.

Метод електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) дозволяє проводити вимірювання зміни об'єму клітин побічно через вимірювання змін об'єму вільної внутрішньоклітинної води [162]. Існують докази того, що об'єм вільної внутрішньоклітинної води деяких клітин (зокрема, еритроцитів) може змінюватися не впливаючи на об'єм клітини в цілому [163], тому метод ЕПР може бути недостатньо точним [160]. При цьому слід зазначити, що інформації про подібні ефекти у сперматозоїдів риб немає. До того ж, цей метод не застосовували для дослідження сперматозоїдів риб, або таких робіт замало.

Враховуючи, що зміна об'єму клітини у відповідь на позаклітинну осмолярність відбувається через трансмембранне надходження води, було зроблено припущення [160], що міжвидові відмінності кінетики об'єму можуть пояснюватись різними темпами проникання води. Це проникання може відбуватись за рахунок пасивної дифузії, через каналні білки (аквапоріни), або шляхом активного транспорту [164].

Існує декілька підходів до визначення проникності мембран. Так, проникність мембран сперматозоїдів до молекул води може бути розрахована, якщо відома кінетика клітинного об'єму в неізотонічних умовах. Відомий спосіб визначення кінетики об'єму за допомогою електронного лічильника часток, який дозволяє розрахувати діаметри клітин. Зокрема, цим методом визначали проникність до води плазматичних мембран сперматозоїдів кабана [165, 166], мавпи [167], миші [168–170], бика [171].



Спосіб визначення проникності мембран клітин до води, який включає оцінку критичної осмолярності та часу проникнення води, використовували для визначення проникності до води мембран сперматозоїдів півня і бика [172].

Відомі роботи, в яких коефіцієнти проникності плазматичних мембран клітин оцінювали шляхом відеоаналізу осмотичної відповіді клітин під час кріоконсервування [173].

Devireddy і співавт. [174–179] застосували диференціальну скануючу калориметрію для дослідження водного транспорту сперматозоїдів коня, миші, бика, людини. Цей метод розрахунку коефіцієнтів проникності мембран базується на визначенні різниці у виділенні тепла кристалізації в процесі заморожування між осмотично активними і неактивними (мертвими) клітинами. Таким чином, за допомогою цього методу коефіцієнти проникності мембран знаходяться побічно. Як певний недолік, можна зазначити технологічну складність цього методу.

Oldenhof Н. та співавтори [180] запропонували використовувати інфрачервону Фур'є-спектроскопію для вивчення водного транспорту під час охолодження клітин (зокрема, сперматозоїдів жеребців), що є, на їхню думку, дуже інформативним способом.

Отже, на відміну від мембран ембріонів [181, 182], дослідження проникності мембран сперматозоїдів риб ускладнене, в першу чергу через малий розмір клітин. Розробка та застосування оптимальних способів визначення проникності плазматичних мембран сприятиме вивченню транспортних характеристик мембран сперматозоїдів риб. Важливого значення набуває можливість проведення досліджень за принципом розташування об'єкту, в польових умовах.

#### 1.4. Кріоконсервування сперми риб

Перші роботи з кріоконсервування сперматозоїдів тварин відносяться до середини ХХ ст. [183].

Перевагами кріоконсервування сперми риб є: синхронізація наявності гамет обох статей (сперма може бути збережена для використання до того часу, коли буде отримана ікра), економія сперми (дозволяє ефективно використовувати загальний об'єм наявної сперми, що особливо важливо, коли важко її отримати або є можливість отримати лише малі об'єми), спрощення управління племінним стадом (оскільки нерест поза сезону може бути викликаний лише у самок, використовується кріоконсервована сперма), транспорт гамет між різними рибними господарствами (для запобігання інфікування під час транспортування тварин) та можливість зберігання генофонду рідкісних і цінних видів [184, 185].

Передові методи штучного відтворення риб передбачають гормональну стимуляцію плідників для отримання репродуктивних клітин. Гормональна індукція нересту дозволяє синхронізувати процес отримання гамет, що сприяє підвищенню ефективності роботи рибних господарств. Проте замало даних про вплив гормональної стимуляції на характеристики сперматозоїдів до та після кріоконсервування [186–189].

Характеристики сперматозоїдів варіюють серед видів, в межах одного виду і навіть у зразках від однієї тварини в залежності від періоду збору протягом репродуктивного сезону [190]. Тому аналіз якості сперми та розробка нових інструментів для її характеризувannya має бути пріоритетним напрямком. Також, добре відомо, що зразки сперми мають різну чутливість до заморожування, відповідно до їх якості. Таким чином, оцінка функціональних характеристик сперми має вирішальне значення для того, щоб відібрати кращі за якістю зразки для заморожування або для використання під час запліднення [16, 22].

Взагалі процес кріоконсервування сперми риб складається із наступних етапів: відбір сперми та оцінка її якості, еквілібрація сперми із середовищем,

що містить кріопротектор, охолодження суспензії сперми із використанням контрольованих програм, як правило, повільного заморожування, зберігання за температури рідкого азоту та відігрівання сперми у певних умовах [191–206].

Найчастіше використовують такі кріопротектори: ДМСО, гліцерин, етиленгліколь та метанол. Дещо менше використовуються 1,2-пропандіол та діметилацетамід. Найпоширенішими об'ємними концентраціями кріопротекторів є від 5 до 15%, причому 10% є використовувється найчастіше [10].

Зазвичай сперматозоїди витримуються у розчинах кріопротекторів протягом 10–15 хв за температури  $+4^{\circ}\text{C}$ . Це дозволяє кріопротектору проникнути до клітини перед охолодженням. У деяких випадках, коли проникність плазматичної мембрани сперматозоїда вважається високою, період еквілібрації зменшується, аби попередити токсичні ефекти кріопротектора [48]. Після змішування з кріозахисним середовищем, суспензію розливають у пластикові ампули об'ємом 0,25–5 мл. В залежності від об'єму ампул та інших факторів обирають режим охолодження.

Відігрівання ампул здійснюють на водяній бані з температурою до  $80^{\circ}\text{C}$ , в залежності від розміру тари, протягом 5–60 с. Відігріту сперму негайно використовують для штучного запліднення, оскільки рухливість та запліднююча здатність зменшуються з часом [10].

Кріоконсервування призводить до пошкоджень плазматичних мембран, мітохондрій і структури хроматину в сперматозоїдах. Механічне пошкодження клітин може відбутись через утворення кристалів льоду всередині клітини або у зовнішньому середовищі, за рахунок осмотичного та оксидативного стресів [154, 207–209]. Збереження клітинної структури та її функціональності залежить від протоколу кріоконсервування. Очевидно, що сперматозоїди повинні зберігати цілісність плазматичних мембран і підтримувати осмотичну рівновагу, а також набуті рухливості під час потрапляння у воду, щоб досягти яйцеклітин та запліднити їх. Рухливість

сперматозоїдів має вирішальне значення і залежить від різних характеристик клітин, таких як мітохондріальний статус, виробництво АТФ, активність каналів плазматичної мембрани, будова флагели.

Найбільш поширеним параметром для опису якості сперматозоїдів є їх рухливість [10]. Крім того, одним із найпростіших способів перевірки успішності протоколу кріоконсервації сперми є аналіз цілісності і проникності клітинної мембрани. Розроблено декілька тестів для аналізу життєздатності кріоконсервованих сперматозоїдів. Зокрема, для оцінки мембранної цілісності використовувалися біохімічні тести та електронна мікроскопія. Однак часто інформація тестів свідчить про ступінь руйнування мембрани, але не про її функціональність [22].

Базових знань про те, як кріоконсервування сперми риб впливає на мітохондрії і структури, що відповідальні за рухливість, досі замало.

Кріоконсервування, як відомо, викликає значні зміни осмолярності середовища, яка істотно відрізняється від фізіологічного діапазону для клітин прісноводних видів [109]. Сперматозоїди прісноводних риб не здатні до збереження об'єму клітини і тому мають кріорезистентність нижчу, ніж клітини морських видів [4, 15]. У кожному окремому специфічному випадку (вид риби, температура нересту, солоність води, тощо) важливість факторів, які визначають кріорезистентність сперматозоїдів, може змінюватися [29, 144, 210]. Порівняння чинників, пов'язаних із середовищем мешкання риби, показує, що в процесі довгострокового розвитку, сперматозоїди морських риб набули такі властивості, як здатність протистояти високим або низьким значенням осмолярності середовища, що безпосередньо корелює з високою кріорезистентністю [14–16].

Це пояснює, чому гіперосмотичні кріозахисні середовища незначно впливають на сперматозоїди морських видів риб [15, 29, 36, 37, 86]. Під час кріоконсервування сперми осмотичність кріозахисного середовища може досягати 1500–3000 мОсмоль/кг в залежності від кріопротектора і його концентрації. Підвищення осмотичного тиску на мембрани сперматозоїдів

прісноводних риб під час змішування сперми з кріозахисним середовищем є одним з основних пошкоджуючих чинників, що впливають на результат кріоконсервування [37]. Відмінності осмотичної стійкості сперматозоїдів риб та проникності їхніх плазматичних мембран до води та кріопротекторів пояснюються різною молекулярною структурою мембран [14].

Процес кріоконсервування веде до морфологічних та функціональних пошкоджень клітин, оскільки він асоціюється зі значними осмотичними змінами. В процесі охолодження клітини дегідратують, а на етапі відігрівання вони піддаються гіпотонічним впливам, оскільки вода в результаті еквілібрації заміщує кріопротектор. Фаза переходу води в лід – один з найважливіших критичних факторів, що впливають на виживаність клітин. Існують критичні температури, що обумовлюють фазові переходи ліпідів мембран, за яких клітини можуть незворотно пошкоджуватися [11–14, 19, 20, 32, 33, 38, 82].

Стиснення і набухання клітин обмежені фізичною здатністю клітин протистояти таким змінам. Їх пошкодження відбувається поза певних рівнів стиснення або набухання. Повний діапазон між цими рівнями відомий як максимальна зміна об'єму клітини. Оптимальна рівноважна швидкість охолодження, яка знайдена для певного типу клітин, передбачає деяку допустиму зміну клітинного об'єму, тобто діапазони набухання і стиснення, які не призводять до втрати мембранної цілісності й ослаблення функцій клітини (наприклад, рухливості сперматозоїдів та запліднюючої здатності) [211, 212]. Допустимі варіації об'єму видоспецифічні, залежать від типу клітини, температури нересту та інших факторів [13, 14, 16, 213].

Отже, однією з причин внутрішньо- і міжвидових відмінностей кріорезистентності сперматозоїдів прісноводних риб може бути їх різна осмотична реакція на дію факторів кріоконсервування.

### 1.5. Підвищення кріорезистентності сперматозоїдів тварин за рахунок модифікації їхніх мембран

Доведено, що присутність у кріозахисному середовищі певних сполук може чинити позитивний вплив на стійкість сперми до чинників кріоконсервування, або іншими словами, ці сполуки захищають клітини від кріопошкоджень [185, 214]. Модифікація мембран сперматозоїдів може сприяти запобіганню пошкоджень, впливаючи також на їхній фізіологічний стан, а не тільки на процес охолодження/відігрівання. Сперматозоїди можуть бути модифіковані з використанням різних речовин та різними методологічними підходами: шляхом відповідного харчування тварин з переважанням білкової долі в раціоні, додаванням певних середовищ, вбудовуванням компонентів в плазматичну мембрану, навіть після кріоконсервування, за умов витримки у середовищах зі сполуками, що підвищують фізіологічні функції [185, 215–217].

Під час кріоконсервування плазматична мембрана є найбільш схильною до ушкоджень структурою, що часто проявляється у зміні вмісту фосфоліпідів і холестерину. Один із основних механізмів уникнення кріопошкоджень – збільшення гідрофобності клітинної мембрани, тобто модифікації структури плазматичної мембрани клітини методом виключення деяких гідрофільних компонентів ліпідів [218, 219]. Інший механізм уникнення кріопошкоджень сперматозоїдів – це зміна текучості мембран, що регулюється співвідношенням Хол.:ФЛ [220]. Високий рівень холестерину робить мембрану більш жорсткою і непроникною структурою.

Загалом, ті види, сперматозоїди яких більш стійкі до холодового шоку, мають сперму з більшим співвідношенням Хол.:ФЛ, ніж ті, що більш чутливі до низьких температур. Однак позитивний зв'язок між вмістом холестерину в мембрані та кріорезистентністю не з'ясований. У деяких видів це сприяє кріозахисту, а в інших виявлена зворотна залежність [221]. Хоча у ссавців цьому питанню приділяється велика увага, з дослідження сперми риб було виконано дуже мало робіт [222].

Під час осмотичного стресу ділянки з вищими показниками пластичності або текучості зазнають більшої напруженості, і мембрани таких клітин можуть бути більш чутливими до факторів ушкодження тоді, коли мають нижчий вміст холестерину відносно фосфоліпідів. Однак результати робіт, пов'язаних із вивченням впливу холестерину і фосфоліпідів на кріореزистентність сперматозоїдів є суперечливими [19, 143, 222–234].

Підтримка відповідного складу ліпідів мембран сперматозоїдів є важливою для риб із зовнішнім заплідненням, оскільки сперма має бути резистентною до різних змін осмолярності під час кріоконсервування і в процесі запліднення, під час контакту із морською чи прісною водою.

Стійкість сперми до чинників кріоконсервування можна також збільшити шляхом відповідного харчування тварин. Цей зв'язок, безумовно, є непрямим, але було показано, що присутність певних сполук у мембранах сперматозоїдів або сім'яній плазмі впливає на функції сперматозоїдів і таким чином краще захищає клітини від кріопошкоджень. Тому доречно, що режим харчування самців також впливає на якість сперматозоїдів, що безпосередньо пов'язано із здатністю клітин протистояти факторам заморожування. Наприклад, у райдужної форелі якість сперми покращували за допомогою збагаченого фосфоліпідами раціону, що впливало на склад фосфоліпідів у плазматичних мембранах [143].

За даними деяких авторів, стійкість мембрани сперматозоїдів до перепадів напруги на мембрані і механічних пошкоджень збільшується зі збільшенням вмісту поліненасичених жирних кислот [226, 227, 235]. Кілька досліджень підтвердили роль фосфатидилхоліну як захисного засобу під час кріоконсервування. Так, в спермі морських риб цього компонента більше, ніж у прісноводних, і він, захищаючи від осмотичного і холодового стресів, є однією з причин більшої кріорезистентності перших.

Розробка методів включення фосфоліпідів і холестерину безпосередньо в мембрану клітини може бути простим способом поліпшення кріорезистентності сперматозоїдів. З цією метою використовується яєчний

жовток, який також грає роль зовнішнього кріопротектора, але кращим способом є інкубація сперматозоїдів із холестерин-завантаженими циклодекстринами. Така процедура зі спермою форелі призвела до збільшення стійкості сперматозоїдів до гіпоосмотичного стресу [222].

Білки також можуть взаємодіяти з цитоплазматичною мембраною, позитивно впливаючи на кріорезистентність сперматозоїдів. Додавання БСА (бичачого сироваткового альбуміну) захищає мембрани від кріопошкоджень. Декілька протоколів, розроблених для сперми риб, включають цю сполуку до кріозахисного середовища [236, 237]. Механізми захисту клітин БСА невідомі; припускають, що цьому сприяє агрегація БСА в компонентах плазматичних мембран. Білки-антифризи теж можуть бути використані для підвищення кріорезистентності сперми шляхом їхньої асоціації з кристалами льоду та плазматичною мембраною [238]. У ссавців додавання до складу кріозахисних середовищ деяких інших білків, що були виділені з жіночого яйцепроводу, було дуже результативним [239]. Було показано, що деякі сполуки, присутні в оваріальній рідині, підвищують рухливість сперматозоїдів деяких риб.

Таким чином, модифікація мембран сперматозоїдів риб розглядається як інструмент суттєвого підвищення кріорезистентності сперматозоїдів.

## 1.6. Висновки

Спираючись на проведений огляд літератури, можна зробити висновок, що сучасні дослідження необхідно зосередити на забезпеченні однорідних і оптимальних результатів кріоконсервування сперматозоїдів прісноводних риб. Одним із напрямків, де дослідження набувають вагомого значення, є виявлення причин різної стійкості сперматозоїдів до факторів кріоконсервування. Крім того, мають бути визначені певні критерії відбору кращих зразків сперми до охолодження.

Ефективному кріоконсервуванню сперматозоїдів прісноводних риб сприятиме вивчення різних підходів до підвищення кріорезистентності



сперматозоїдів до і після охолодження/відігрівання через їх модифікацію шляхом інкубації з певними сполуками та під впливом фізико-хімічних факторів.

Дослідження мембран сперматозоїдів риб важливо у зв'язку з тим, що мембрана залучена в такі процеси, як обмін із оточуючим середовищем і розпізнавання сигналів, а окрім того грає роль бар'єру для підтримки форми та цілісності клітини. У цьому контексті, однією з найважливіших функцій є підтримання осмотичної рівноваги. Функціональність мембран сперматозоїдів риб істотно важлива для підтримки рухливості, регулювання клітинного об'єму та процесів, пов'язаних із заплідненням. Отже, осмотична реакція сперматозоїдів прісноводних риб може характеризувати цілісність і функціональний стан їхніх мембран.

Відомі спроби оцінки транспортних характеристик мембран сперматозоїдів риб із використанням різних методичних підходів, проте кожний із них має певні недоліки. Серед головних варто зазначити складність проведення вимірювань протягом відносно швидкої осмотичної реакції, низьку чутливість до специфічної форми сперматозоїдів. Крім того, враховуючи невеликий період збереженості функціональних характеристик нативної сперми після отримання еякуляту, специфікою досліджень є їх проведення поза обладнаною лабораторією, за принципом розташування об'єкту, в умовах, наближених до польових, що, відповідно, ставить низку вимог до методів.

Отже, в дисертаційній роботі поставлено наукове завдання розробити ефективну методику, що дозволяє дослідити осмотичну реакцію сперматозоїдів прісноводних риб на дію факторів кріоконсервування. Дослідження має за мету встановлення взаємозв'язку між осмотичною реакцією сперматозоїдів риб на дію чинників кріоконсервування і їхньою кріорезистентністю. Відповідно, осмотична резистентність сперматозоїдів розглядається як фактор, що може обумовлювати їх стійкість до

охолодження-відігрівання, а відтоді як параметр оцінки якості сперми і її придатності до кріоконсервування.

Зважаючи на відсутність відповідних даних в науковій літературі та безперечну необхідність таких досліджень, поставлене наукове завдання є своєчасним і актуальним.

## РОЗДІЛ 2.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

## 2.1. Матеріал, який використовувався у роботі

В роботі досліджували сперму риб: з родини коропових – 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).

Зазначені види риб були обрані для дослідження через їхню цінність як промислових риб, або статус зникаючих (стерлядь), що в обох випадках обумовлює необхідність розвитку методів кріоконсервування їх сперми. Крім того, нерест у представників із вказаних родин відбувається за різних температурних діапазонів, що може розглядатися як один із факторів, які впливають на кріореزистентність сперматозоїдів.

Дослідження виконували в 2011 – 2016 рр. на таких базах:

- 1) Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків;
- 2) Інституту рибного господарства НААН України, м. Київ;
- 3) Національного університету біоресурсів і природокористування України (навчально-науково-виробничої лабораторії рибництва кафедри аквакультури), м. Київ;
- 4) Миронівського рибгоспу Донрибкомбінату, смт. Миронівський Бахмутського району Донецької обл.;
- 5) Інституту рибного господарства і екології моря, с. Ботієво Приазовського району Запорізької обл.

Експерименти проведені відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», які схвалені І Національним конгресом з біоетики (Київ, 20.09.01) та узгоджені з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в

експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1985) та дозволу комітету з біоетики ІПКіК НАН України [240, 241].

В якості кріопротекторів вивчені 1,2-пропандіол, етиленгліколь, гліцерин, диметилсульфоксид. Усі речовини кваліфікації «х.ч.» або «ч.д.а.» («Sigma – Aldrich», США та «Реахим», Росія).

## 2.2. Методи гормональної стимуляції дозрівання плідників

Перед отриманням сперми самців риб, що досліджувались, не менше 7 днів утримували за нерестових температур у риборозводних басейнах. Сперму збирали в сухі і чисті ємкості методом зчіджування.

Сперму коропа отримували з використанням прийнятої в рибоводній практиці методики гіпофізарних ін'єкцій із розрахунку 2 мг екстракту гіпофізу сазана на 1 кг маси одноразово. Самців зчіджували через 24 години після ін'єкцій.

При приготуванні суспензії гіпофізів для ін'єкцій їх зважували, подрібнювали, поміщали у порцелянову ступку і старанно розтирали товкачем до порошкоподібного стану. Потім, помішуючи, поступово додавали необхідну кількість фізіологічного розчину, виходячи з норми 0,5 або 1 мл на одного самця. Суспензію гіпофізів повільно вводили в м'язи спини вище бічної лінії в першу третину тіла риби (під лусочку). Місце проколу при цьому дотримували пальцем і після видалення голки декілька секунд масажували, щоб введена суспензія не вилилася назад.

Сперму товстолобика отримували із застосуванням ін'єкцій препарату «Овопель» («InterSh», Угорщина) із розрахунку 0,5 гранул/кг або суміші сурфагону і метоклопраміду із розрахунку 1 мкг/кг Сурф. («МосАгроГен», Росія) та 5 мг/кг Мет (ПАТ «Дарниця», Україна).

Сперму щуки отримували із застосуванням ін'єкцій сурфагону із розрахунку 0,2 мл/кг маси.

Сперму стерляді отримували із застосуванням ін'єкцій суміші сурфагону і метоклопраміду із розрахунку 1 мкг/кг Сурф. та 10 мг/кг Мет.

У експериментах з оптимізації кріоконсервування сперми стерляді використовували самців віком 8-9 років середньою масою  $1,1 \pm 0,02$  кг. Вік самиць, що увійшли до нерестової групи, становив у середньому 9 років, середня маса –  $1,6 \pm 0,1$  кг.

Витримування плідників проводили в басейнах з установками замкнутого водопостачання за температури води  $14^{\circ}\text{C}$ . Для отримання сперми та ооцитів плідників стимулювали дворазовою ін'єкцією суспензії гіпофіза ляща *Abramis brama* в розрахунку 3 мг/кг маси самця та 5 мг/кг маси самиці. Репродуктивні клітини отримували на наступний день.

Всі маніпуляції із плідниками стерляді (стимулювання дозрівання, отримання статевих продуктів та оцінка їх якості) проводилися згідно з технологіями проведення робіт в осетрівництві [242].

### 2.3. Методи кріоконсервування сперми прісноводних риб

#### 2.3.1. Підготовка сперми до охолодження

Отриману від плідників сперму охолоджували в холодильнику до  $0-5^{\circ}\text{C}$  і повільно, по стінці склянки, додавали охолоджене до тієї ж температури кріозахисне середовище у співвідношенні 1:1. При цьому вміст склянки обережно перемішували для виключення осмотичного шоку. Отриману суспензію розливали в конічні ампули об'ємом 0,5 мл і витримували 10 хв на льоду.

Для кріоконсервування сперми коропа використовували кріозахисне середовище наступного складу [236]:

NaCl – 71,8 мМ, KCl – 0,8 мМ,  $\text{CaCl}_2$  – 0,66 мМ,  $\text{NaHCO}_3$  – 21,3 мМ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 5,1 мМ, сахароза – 4,4 мМ, маніт – 15,9 мМ, трис-HCl – 118 мМ рН – 8,0, етиленгліколь – 3,5 М.

У експериментах з оптимізації кріоконсервування сперми стерляді охолоджену до  $4^{\circ}\text{C}$  сперму розводили 1:1 ізотермічними кріозахисними розчинами такого складу:

№1.  $\text{KHCO}_3$  – 8,9 мМ, креатин моногідрат – 3,8 мМ, сахароза – 11,7 мМ, фруктоза – 5,6 мМ, метанол – 3,75 М, дистильована вода.

№2.  $\text{KHCO}_3$  – 8,9 мМ, креатин моногідрат – 7,6 мМ, сахароза – 11,7 мМ, фруктоза – 5,6 мМ, метанол – 3,75 М, плазма крові карася 1:800 (v/v), дистильована вода.

Після цього суспензію клітин накрапували на фторопластову пластину по 100 мкл.

Для виготовлення середовищ використовували реактиви ступеня очищення «ч. д. а.» і «х. ч.».

### 2.3.2. Кріоконсервування сперми

Сперму охолоджували за трьохетапною програмою [236]:

1 етап: від 0 °С до -15 °С зі швидкістю 3–5 °С/хв із затравкою кристалізації вологим повітрям або вібрацією.

2 етап: від -15 °С до -70 °С зі швидкістю 15–20 °С/хв.

3 етап: від -70 °С до -196 °С зануренням у рідкий азот.

Програму охолодження реалізовували за допомогою пристрою, що складається з термоелектричного перетворювача, посудини Дьюара і лабораторного штативу із закріпленням на ньому стрижнем із металевим колом (рис. 2.1). Пластину з отворами для ампул пересували в посудині Дьюара, заповненій на одну третину рідким азотом. В залежності від відстані між пластиною і поверхнею рідкого азоту охолодження зразків, розміщених на пластині, здійснювалося з потрібною швидкістю.

Температуру гранули або ампули контролювали з використанням термопари від цифрового термометра UT320 (Digital Thermometer UT320 series) з реєстрацією на комп'ютері.

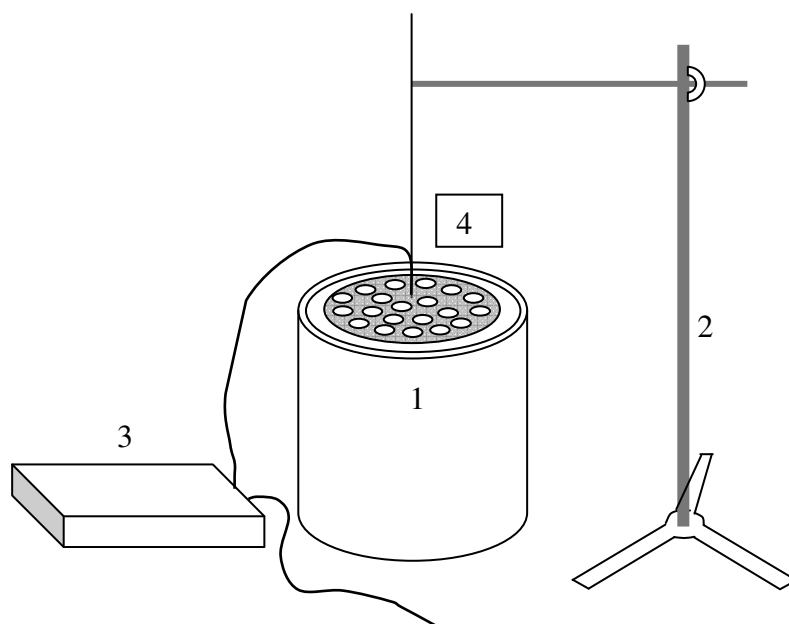


Рис. 2.1. Пристрій для кріоконсервування

1 – посудина Дьюара, 2 – лабораторний штатив, 3 – термометр (термоелектричний перетворювач), 4 – пластина з отворами для ампул.

### 2.3.3. Відігрівання сперми

Відігрівали сперму на водяній бані за температури 40 °С. Ампулу із замороженими сперматозоїдами опускали на 30 секунд в баню, постійно перемішуючи воду для поліпшення теплообміну. За цей час в ампулах з'являвся тонкий шар рідкої фази. Подальше відігрівання здійснювали на повітрі, до повного зникнення льоду.

Сперму, кріоконсервовану в гранулах інтенсивно перемішували у ставковій воді за 15 °С і додавали по 1 мл в кожную чашку Петрі з 2 г ікри.

### 2.4. Методи визначення ефективності кріоконсервування сперми риб

Загальноприйнятими експрес-тестами якості сперми риб є визначення відсотку клітин, що рухаються після активації, часу руху та концентрації сперматозоїдів в еякуляті.

Сперматозоїди активували на предметному склі мікроскопа додаванням 1 мкл сперми до 50 мкл активуючого розчину. В якості активуючих розчинів використовували ставкову воду, водні розчини 25 і 50 мМ NaCl, трис-гліциновий активатор у залежності від виду риб, умов експерименту, нативна чи кріоконсервована сперма.

Рівень рухливості виражали як відношення сперматозоїдів, що рухаються прямолінійно, поступально, до загальної кількості клітин у полі зору мікроскопа, у відсотках.

Тривалість руху вимірювали за допомогою секундоміра як час від моменту активації сперматозоїдів на предметному склі до припинення поступового руху принаймні 90% клітин.

Концентрацію сперматозоїдів визначали за допомогою лічильної камери Горяєва. Для цього сперматозоїди розбавляли ізотонічним розчином NaCl. У деяких експериментах концентрацію сперматозоїдів визначали на фотоелектроколориметрі KF-77 (Польща) за попередньо побудованою калібрувальною кривою.

Оцінку якості процесу кріоконсервування також здійснювали за показниками відсотку запліднення ікри (на стадії 4-х бластомерів) та кількості ембріонів, що розвиваються (до стадії гаструли) шляхом порівняння отриманих результатів із контролем. Інкубація ікри проходила в апаратах Вейса.

## 2.5. Методи визначення осмолярності сім'яної плазми сперматозоїдів риб та розчинів для інкубації сперматозоїдів

Осмолярність активуючих розчинів і спермальної плазми визначали за допомогою осмометра OSMOMAT 030 («Gonotec», Німеччина). Попереднє калібрування осмометра виконували за допомогою стандартних розчинів NaCl осмолярністю 300 мОсмоль/кг і 800 мОсмоль/кг.

Для визначення осмолярності спермальної плазми, сперму переливали в ампули об'ємом 1,5 мл, центрифугували протягом 5 хвилин при 7000g на



центрифузі СМ-50 («ELMI», Латвія). Надосадову рідину за допомогою мікродозатора розливали об'ємом по 50 мкл в ампули і проводили вимірювання.

Вимірювання осмолярності для кожного активуючого розчину або спермальної надосадової рідини проводили не менш, ніж тричі, і брали середнє значення.

## 2.6. Метод дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів риб

Осмотичні реакції сперматозоїдів досліджували за допомогою фотоелектроколориметра KF-77 («ZALIMP», Польща), додатково обладнаного магнітним перемішувачем і термостатованим кюветним відділенням. Вимірювання виконували за розробленою нами методикою, яка детально представлена у розділі III дисертаційної роботи.

Сперму додавали в кювету, заповнену досліджуваним розчином або дистильованою водою, занурювали в кювету магнітний перемішувач, швидко розмішували вміст струшуванням, ставили кювету у кюветне відділення і фіксували динаміку світлопропускання за допомогою самописця TZ 4601 («Laboratorni pristroje», Чехія).

Діапазон осмолярності розчинів для проведення тесту визначали таким, щоб у цих розчинах не відбувалося пошкодження клітин, але зміна об'єму була достатньою для її реєстрації.

У експерименті з визначення впливу осмолярності середовища інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа використовували водні розчини NaCl осмолярної концентрації 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 мОсмоль/кг. Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів виконували за постійної температури середовища інкубації +20 °C та однакової концентрації сперматозоїдів у кюветі  $200 \pm 15$  млн/мл, для чого визначали концентрацію сперматозоїдів у досліджуваному еякуляті та відповідний ступінь розведення цієї сперми середовищем інкубації.

У експерименті з визначення впливу температури середовища інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа використовували водний розчин 100 мОсмоль/кг NaCl. Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів виконували за температури середовища інкубації від 12 до 37 °C із кроком 3–4 °C та за однакової концентрації сперматозоїдів у кюветі  $200 \pm 10$  млн/мл.

У експерименті з визначення впливу концентрації сперматозоїдів у середовищі інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа використовували водний розчин 100 мОсмоль/кг NaCl. Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів виконували за температури середовища інкубації 20 °C. Концентрацію сперматозоїдів у кюветі змінювали від  $60 \pm 3$  до  $600 \pm 30$  млн/мл.

У експерименті з дослідження впливу гормональної стимуляції на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа використовували водні розчини NaCl осмолярної концентрації 20, 40, ..., 200 мОсмоль/кг. Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів виконували за постійної температури середовища інкубації +20 °C.

У експерименті з визначення впливу осмолярності середовища інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів щуки використовували водні розчини NaCl осмолярної концентрації 10, 25, 50, 75, 125, 150, 200 мОсмоль/кг за постійної температури середовища інкубації +12 °C.

У експерименті з дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів стерляді використовували водний розчини NaCl осмолярної концентрації 10 мОсмоль/кг за постійної температури середовища інкубації +15 °C.

Осмотичну резистентність визначали як час лізису 50% сперматозоїдів під час інкубації в дистильованій воді.

Для визначення коефіцієнта проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа до молекул кріопротекторів сперматозоїди інкубували

в 0,8М розчинах етиленгліколя, диметилсульфоксида, 1,2-пропандіола або гліцерина, виготовлених на 0,12 М водному розчині NaCl.

Коефіцієнт проникності плазматичних мембран сперматозоїдів ( $L_p$ ) для молекул води або кріопротекторів визначали, апроксимуючи експериментальні залежності відносних об'ємів клітин від часу з рішеннями рівнянь теоретичної моделі [243]. 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.

## 2.7. Методи дослідження рухливості сперматозоїдів на різних етапах кріоконсервування

У експерименті з дослідження рухливості сперматозоїдів коропа в процесі охолодження-відігрівання сперму розбавляли 1:1 модифікованим кріозахисним середовищем [236] без жовтка і антиоксиданту, розливали в ампули об'ємом 0,5 мл. Ампули зі спермою охолоджували в парах азоту за трьохетапною програмою [236] через 10 хв після змішування з кріозахисним середовищем. При досягненні 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.

У експерименті з визначення коефіцієнтів проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул води на окремих етапах охолодження-відігрівання сперму розбавляли 1:1 кріозахисним середовищем, яке містило 0,15 М NaCl і 16% (v/v) етиленгліколю, і розливали в ампули об'ємом 0,5 мл. В ампулу зі спермою поміщали термopару і охолоджували до температур -10, -30, -50 и -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 фотометричним способом.

Контролем в обох останніх експериментах була оброблена криозахисним середовищем сперма, яка зберігалася протягом досліду за температури 20 °С впродовж 2–3 годин. Показник рухливості сперматозоїдів у цьому зразку після закінчення експерименту зменшився на 8%.

## 2.8. Метод ЕПР для визначення зміни вмісту вільної внутрішньоклітинної води

Для визначення кількісної зміни вмісту вільної внутрішньоклітинної води застосовували метод ЕПР із використанням водорозчинного зонду ТЕМПОН (2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил) фірми «Aldrich» (США). Даний іміноксильний радикал добре розчинний у воді та інших полярних розчинниках. Кінцева концентрація зонда в зразках становила  $10^{-3}$  моль/л.

Спектри ЕПР реєстрували на спектрометрі «Bruker» ER 100D (Німеччина) зі стандартною термоприставкою. Розгортка магнітного поля становила 100 Гс. Постійна часу дорівнювала 0,5 с. Час розгортки становив 100 с. У дослідженнях використовували скляні капіляри з внутрішнім діаметром 500 мкм і об'ємом 0,1 мл. Контрольні досліди показали, що за описаних умов не відбувається спотворення спектрів у результаті перемодуляції або інерційних ефектів. Для стандартизації умов експерименту одночасно з ЕПР-сигналом зонда реєстрували сигнал стандарту, який представляє собою кристал, що містить Сг. Вимірювання проводили за температури 20 °С. Спектри ЕПР отримували через 3 хв після додавання сперми в середовище інкубації.

## 2.9. Статистичний аналіз

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали з використанням програмного пакету Origin 8.5 (OriginLab Corporation, США). Дані на рисунках і в таблицях наведено як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення. Ступінь кореляції визначали за коефіцієнтом кореляції Пірсона. При порівнянні двох вибірок застосовували t-критерій Фішера – Стьюдента при рівні вірогідності  $P \leq 0,05$  з використанням програм Excel.

### РОЗДІЛ 3.

## РОЗРОБКА СПОСОБІВ ВИЗНАЧЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ПРОНИКНОСТІ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН СПЕРМАТОЗОЇДІВ РИБ ДО МОЛЕКУЛ ВОДИ

### 3.1. Фізичні основи фотометричного способу визначення проникності плазматичних мембран сперматозоїдів риб до молекул води

Раніше було показано, що зміна оптичної густини суспензії сперматозоїдів коропа або товстолобика, яку інкубують у гіпоосмотичних сольових розчинах, свідчить про зміну їхнього клітинного об'єму [140, 141, 160, 161]. Це дозволило встановити той факт, що при інкубації сперми в ідентичних умовах, сперматозоїди прісноводних видів риб змінюють об'єм, тоді як сперматозоїди морських видів риб залишають об'єм сталим [141].

Зважаючи на переваги застосування фотометричних методів для дослідження зміни клітинного об'єму [160], при розробці способу визначення проникності плазматичних мембран сперматозоїдів риб до молекул води нами за основу була взята залежність оптичної густини (або світлопропускання) суспензії сперматозоїдів від зміни їхнього клітинного об'єму.

Як відомо, при попаданні клітини в гіпотонічне середовище не проникаючої в клітину речовини її об'єм збільшується за рахунок притоку позаклітинної води. Величина цієї зміни об'єму визначається різницею між осмолярністю внутрішньоклітинного і позаклітинного середовища.

З точки зору оптики, головки сперматозоїдів деяких видів риб, зокрема коропових, можна вважати кулеподібними частинками з показниками заломлення світла більшими, ніж показник заломлення світла водою. З часом інкубації в гіпотонічному середовищі в процесі осмотичної реакції сперматозоїдів збільшується розмір клітини. Одночасно із цим спостерігається зменшення показника заломлення світла клітиною, що відбувається за рахунок притоку позаклітинної води і розведення

внутрішньоклітинного вмісту. На ослаблення потоку падаючого світла, а, відповідно, і на світлопропускання суспензії впливає як збільшення розміру часток, так і зміна показника заломлення. При цьому основний внесок у зміну світлопропускання вносить зменшення відносного показника заломлення світла клітиною, що і характеризує набухання клітини.

Таким чином, світлопропускання суспензії клітин збільшується одночасно зі збільшенням клітинного об'єму. Слід зауважити, що світлопропусканню суспензії клітин такого розміру, який є характерним для сперматозоїдів коропа, властива незначна чутливість до форми клітин як частинок, що розсіюють світло [244–248]. Тому відхилення форми голівок сперматозоїдів риб від сферичної не спотворює результати дослідів.

Зміна об'єму клітини з часом після її переміщення в гіпо- або гіпертонічний розчин не проникної речовини описується наступним співвідношенням [243] (3.1):

$$V - V_0 = V_0 \frac{1 - \alpha}{\pi^{out}} (\pi_0^{in} - \pi^{out}) [1 - \exp(-\gamma L_p \pi^{out} t)] \quad (3.1)$$

де  $V$  – поточне значення об'єму клітини в момент часу  $t$ ,

$V_0$  – значення об'єму клітини в ізотонічному розчині,

$\pi_0^{in}$  – осмотичний тиск спермальної плазми (внутрішньоклітинний осмотичний тиск),

$\pi^{out}$  – осмотичний тиск розчину речовини, в який поміщається клітина,

$\alpha$  – частина осмотично неактивного об'єму клітини,

$\gamma$  – поверхнево-об'ємне відношення клітини,

$L_p$  – коефіцієнт проникності клітинної мембрани для молекул води (коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани),

Відносна зміна об'єму описується наступним рівнянням (3.2):

$$\frac{V - V_0}{V_0} = \frac{1 - \alpha}{\pi^{out}} (\pi_0^{in} - \pi^{out}) [1 - \exp(-\gamma L_p \pi^{out} t)] \quad (3.2)$$

При цьому 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, як швидко ця зміна відбудеться, тобто описує швидкість зміни об'єму клітини.

Рівняння (3.1) можна представити у вигляді (3.3)

$$V - V_0 = (V_\infty - V_0)[1 - \exp(-\gamma L_p \pi^{out} t)] \quad (3.3)$$

де  $V_\infty$  – граничне значення об'єму.

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

Розсіювання світла суспензією визначається кількістю, розмірами, формою, орієнтацією та показниками заломлення частинок.

Відповідно до закону Бугера – Ламберта

$$I = I_0 e^{-\chi l} \quad (3.4)$$

на відстані  $l$  інтенсивність  $I_0$  пучка світла, що розповсюджується, зменшується в  $e^{-\chi l}$  разів, де коефіцієнт ослаблення  $\chi$  незалежно від стану поляризації падаючого світла обчислюється за формулою:

$$\chi = N\pi a^2 Q_{осл} \quad (3.5)$$

У формулі (3.5)  $N$  – концентрація частинок,  $a$  – радіус частинки.

Функція ослаблення  $Q_{осл}$  може бути записана (3.6) [247]:

$$Q_{осл}(\rho) = 2 - \frac{4}{\rho} \sin \rho + \frac{4}{\rho^2} (1 - \cos \rho) \quad (3.6)$$

У виразі (3.6)  $\rho = 2x(m-1)$ ,

причому  $x = \frac{2\pi a}{\lambda}$ ,  $m = \frac{m_1}{m_2}$ , де  $\lambda$  – довжина хвилі світла у вакуумі,  $m$  –

відносний показник заломлення світла,  $m_{1,2}$  – показник заломлення світла поза- і внутрішньоклітинного середовища.

Формула (3.6) в теорії Мі визначає характерні особливості кривої ослаблення при значеннях  $m$  в досить широких межах [247].



### 3.2. Експериментальне обладнання для визначення коефіцієнта проникності мембран сперматозоїдів риб до молекул води

Вимірювання коефіцієнта проникності мембран сперматозоїдів риб до молекул води здійснювали на пристрої (рис. 3.1), що складається з фотоелектроколориметра KF-77 («ZALIMP», Польща), який додатково обладнаний термостатованою кюветною камерою і магнітним перемішувачем, та самописця TZ 4601 («Laboratorni pristroje», Чехія). Довжина хвилі, на якій виконували вимірювання, становила 610 нм.

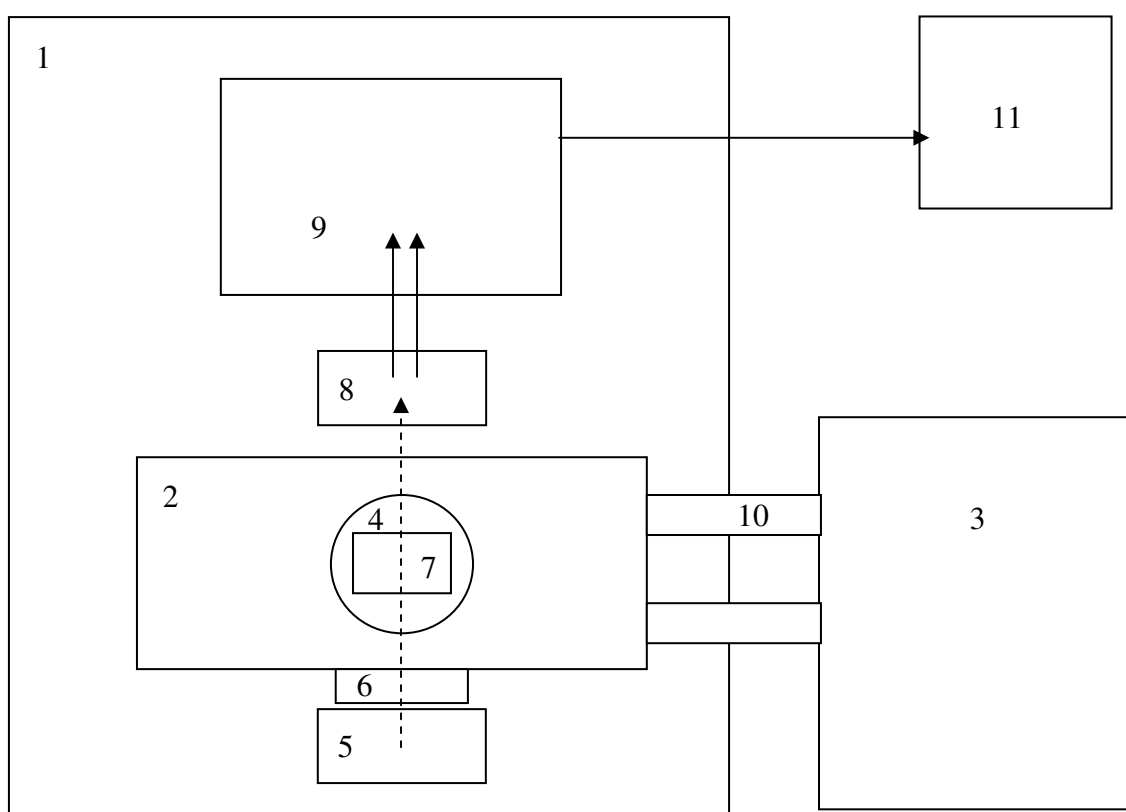


Рис. 3.1. Структурна схема вимірювальної установки. Позначення:

1. Фотоелектроколориметр KF-77
2. Кюветне відділення (термостатоване)
3. Термостат
4. Магнітний перемішувач
5. Джерело світла
6. Світлофільтр

7. Кювета з термopарою
8. Світлоприймач
9. Перетворювач сигналу
10. Трубки для подачі води
11. Самописець

Для визначення температури суспензії, що досліджується, в кюветі використовували термометр із термopарою, яку занурювали в кювету на глибину, за якої термopара не перешкоджала розповсюдженню світлового потоку від джерела світла до світлоприймача. Використання вказаного термометра дозволяло реєструвати значення температури протягом вимірювання і одночасно заносити їх на ПК за допомогою спеціальної програми.

Зазначене експериментальне обладнання, крім всього, відповідає такій вимозі, як можливість використання в польових умовах рибних господарств через невеликий розмір.

### 3.3. Методика визначення проникності мембран сперматозоїдів риб до молекул води

Для визначення проникності мембран до молекул води кювету ФЕКу заповнювали водним розчином NaCl відомої осмотичності, нижчої за осмотичність плазми, та занурювали в кювету магнітний перемішувач. Після цього виставляли значення світлопропускання досліджуваного розчину рівним 100% та вмикали самописець. Швидкість руху діаграмної стрічки має відповідати швидкості зміни світлопропускання та становити, як правило, не менш ніж 1,5 см/хв. Вимірювання проводили при довжині хвилі світла 610 нм.

Сперму додавали в кювету за допомогою мікродозаторів (Eppendorf, Німеччина) і швидко розмішували зміст струшуванням, потім ставили

кювету в кюветне відділення і фіксували кінетику світлопропускання за допомогою самописця.

За допомогою термопари, яку також занурювали в кювету, паралельно фіксували температуру суспензії, оскільки значення коефіцієнта проникності мембран є залежним від температури середовища інкубації. Термостатування кюветного відділення забезпечували термостатом із робочим діапазоном, принаймні, від 10 до 30 °С.

Об'єм сперми, що додавали в кювету, визначали у відповідності до концентрації сперматозоїдів, а температуру середовищ – згідно з метою вимірювання або властивостями об'єктів дослідження.

Як тільки зміна світлопропускання припинялась, або ставала неістотною, вимірювання закінчували та ретельно промивали кювету.

Вихідними даними є дані про залежність світлопропускання суспензії сперматозоїдів від часу інкубації. Ця залежність може бути представлена відповідною таблицею, яку можна отримати за допомогою АЦП, що підключається до фотоелектроколориметра замість самописця, або шляхом оцифровки даних з діаграмної стрічки.

За допомогою програми OriginPro проводили апроксимацію отриманих значень функцією виду (3.7):

$$T_0 = A - B \exp(-kt) \quad (3.7)$$

у якій коефіцієнти  $A$  і  $B$  мають зміст граничного значення світлопропускання та діапазону його зміни (рис. 3.2), а коефіцієнт  $k$  – швидкості зміни світлопропускання, або  $k=1/\tau$ , де  $\tau$  – характерний час проникнення води до клітини. Знаючи  $\tau$ , розраховували  $L_p$ , яке має значення коефіцієнта фільтрації клітинної мембрани або коефіцієнта проникності мембран до молекул води.

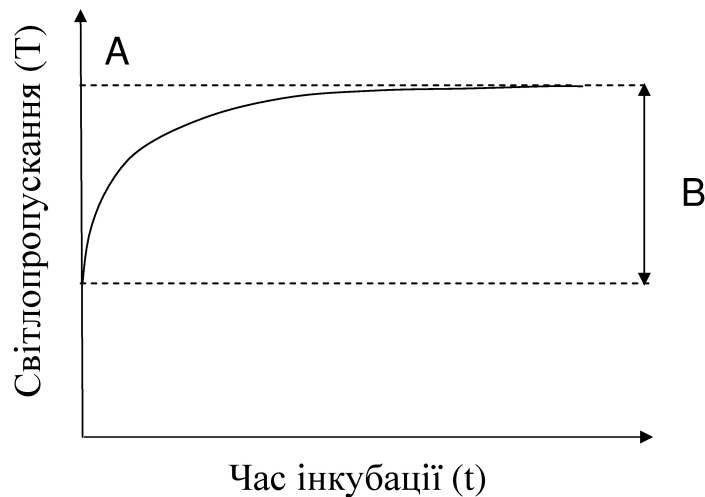


Рис. 3.2. Апроксимуюча функція

#### 3.4. Методика визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів прісноводних риб

Спосіб визначення якості сперми прісноводних риб включає інкубацію клітин у гіпотонічному розчині, зокрема в дистилаті, та реєстрацію залежності світлопропускання суспензії сперматозоїдів від часу, звідки отримують залежність пошкодження сперматозоїдів від часу інкубації, при цьому час пошкодження 50% клітин визначає осмотичну резистентність сперматозоїдів.

Отримана кінетика світлопропускання є суперпозицією двох процесів – процесу набухання клітини, що відображується в зменшенні оптичної густини, і процесу пошкодження клітин (зменшення кількості непошкоджених клітин), що також призводить до зменшення оптичної густини суспензії.

У першому наближенні криву зміни кількості непошкоджених клітин із часом можна отримати, знаючи різницю функцій оптичної густини  $D_0(t)$  і  $D(t)$  від часу. При цьому,  $D(t)$  – кінетика оптичної густини, що отримана експериментально та враховує вклад як набухання, так і зміни концентрації розсіювачів (рис. 3.3), а  $D_0(t)$  – кінетика оптичної густини суспензії, що отримана екстраполяцією  $D(t)$  при  $t < t_0$ , де  $t_0$  – час, при якому починають

пошкоджуватися клітини, тобто кінетика, що враховує тільки набухання клітин. Різниця оптичної густини пропорційна концентрації частинок у середовищі, коефіцієнту екстинкції і ширині кювети.

$D_0(t) - D(t) = \Delta D(t) = C_0(t) \epsilon l$  Вважаючи, що ширина кювети та коефіцієнт екстинкції незмінні,  $\Delta D(t)$  відображає зміну кількості непошкоджених клітин.

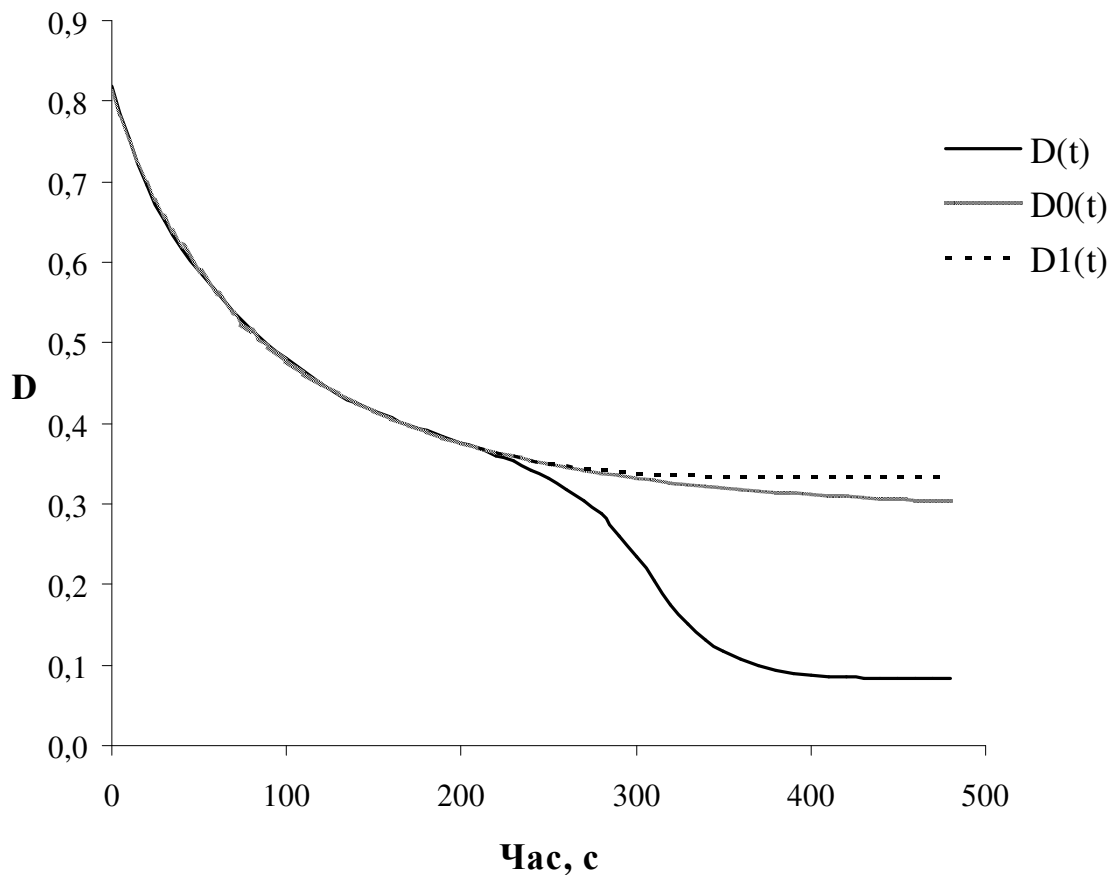


Рис. 3.3. Кінетика оптичної густини: експериментальні значення –  $D(t)$  та екстраполяція –  $D_0(t)$  і  $D_1(t)$

Обробку результатів проводили наступним чином. Вводили значення світлопропускання суспензії  $T$  у таблицю на ПК через кожні 10 с інкубації.

За допомогою програми OriginPro проводили апроксимацію отриманих значень при  $t < 180$  с функцією виду  $T_0 = A - B \exp(-kt)$ , у якій в даному випадку коефіцієнти  $A$  і  $B$  мають зміст граничного значення світлопропускання та діапазону його зміни (рис. 3.2), а коефіцієнт  $k$  – швидкості зміни світлопропускання.

Згідно з формулою  $D=lg(I/T)$  розраховували відповідно  $D$  і  $D_0$ , звідки знаходили  $\Delta D = D_0 - D$  і  $C_0 = \Delta D_i / \Delta D_e \times 100\%$  (де  $\Delta D_i$  – значення різниці оптичної густини в кожний момент часу  $t_i$ , а  $\Delta D_e$  – значення різниці оптичної густини в кінцевий момент часу  $t_e$ , – в даному прикладі при  $t=480$ с інкубації).

Отримані в першому наближенні значення  $C_0(t)$  містять відносно незначну помилку (декілька відсотків), пов'язану з тим, що отримана екстраполяцією функція  $T_0$  (або  $D_0$ ) змінюється при постійних значеннях  $T(t)$  (або  $D(t)$ ), тобто  $T_0$  (або  $D_0$ ) характеризує набухання 100% клітин навіть тоді, коли відбувається їхнє пошкодження.

Для усунення вищезазначеного, у другому наближенні, враховується те, що величина зміни  $T_0$  (або  $D_0$ ) сперматозоїдів залежить від концентрації клітин у кюветі. Так, при  $t > t_0$ , зі зменшенням кількості непошкоджених клітин, величина зміни світлопропускання або оптичної щільності суспензії, отримана екстраполяцією  $D(t)$  має відповідно зменшуватись.

В результаті перетворювань маємо різницю  $D_I(t) - D(t) = \Delta D_I(t) \sim C_I(t)$ . Нормована крива, яка відображає динаміку пошкодження клітин, наведена на рис. 3.4.

Експериментальні значення апроксимували функцією виду (3.8):

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (3.8)$$

де  $A_{1,2}$  – відповідно початкове і кінцеве значення кінетики різниці оптичних густин  $\Delta D_I(t)$ ,  $x_0$  – абсциса центру розподілу,  $dx$  – константа часу.

Спочатку знаходили  $\Delta D_R(t) = D_0(t_0) - D_0(t)$  при  $t > t_0$ . Ця залежність характеризує набухання 100% непошкоджених клітин. Далі знаходили  $\Delta D_{RC}(t)$  як таблично задану функцію за наступним співвідношенням:

$$\Delta D_{RC}(t_i) = \Delta D_{RC}(t_{i-1}) + [\Delta D_R(t_i) - \Delta D_R(t_{i-1})] \frac{D(t_i) - D(t_e)}{D(t_0) - D(t_e)} \text{ за умови } \Delta D_{RC}(t_0) = 0.$$

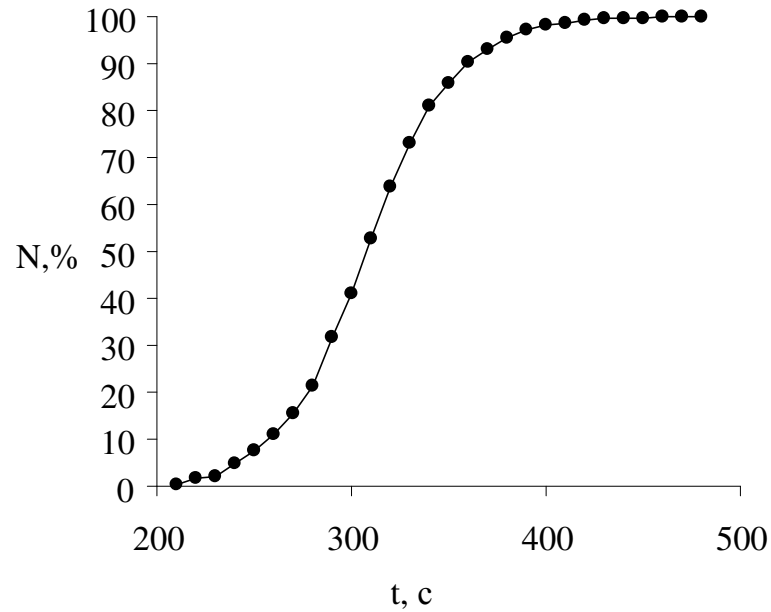


Рис. 3.4. Кінетика пошкодження сперматозоїдів, інкубованих у дистилляті, для визначення їхньої осмотичної резистентності

Залежність  $\Delta D_{RC}(t)$  вже характеризує набухання тільки непошкоджених клітин у кожний окремий момент часу.

Потім отримували  $D_I(t_i) = D_0(t_0) - \Delta D_{RC}(t_i)$ , звідки остаточно знаходили  $D_I(t) - D(t) = \Delta D_I(t)$  та  $C_I = \Delta D_I / \Delta D_{Ie} \times 100\%$ .

Вищезазначені перетворення ілюструють процес обробки експериментальної кривої світлопропускання суспензії інкубованих сперматозоїдів коропа та отримання кривої, що відображає кінетику пошкодження клітин, які виконуються автоматично шляхом завдання їх у розроблених нами комп'ютерних програмах.

Розроблені способи визначення осмотичної резистентності та коефіцієнтів проникності плазматичних мембран сперматозоїдів риб до молекул води захищені патентами України [54, 55], а їх використання відображене в роботах [49, 51–53, 57–69, 74, 75].

## РОЗДІЛ 4.

### ДОСЛІДЖЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ РЕАКЦІЇ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРІСНОВОДНИХ РИБ

#### 4.1. Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів коропа в гіпо- і гіперосмотичних умовах методом ЕПР-спектроскопії

Для опису осмотичної реакції сперматозоїдів коропа методом ЕПР визначали зміну вмісту внутрішньоклітинної вільної води в сперматозоїдах, інкубованих у середовищах NaCl, варіюючи осмотичність від 100 до 400 мОсмоль/кг. Попередні експерименти показали, що основна зміна об'єму сперматозоїдів відбувається протягом 2–3 хв після внесення їх у неізотонічне середовище. Оскільки підготовка реєстрації спектру ЕПР займає такий же час, то визначити кінетику об'єму сперматозоїдів коропа даним способом неможливо. Тим не менш, на підставі спектрів ЕПР можна визначити зміну вмісту внутрішньоклітинної вільної води під час інкубації сперматозоїдів у середовищах різної осмотичності.

Зонд, який використовували в роботі, має ряд переваг у такого роду дослідженнях: він добре розчиняється у воді, при досить невеликих концентраціях має інтенсивний спектр ЕПР, характеризується високою швидкістю дифузії через мембрани клітин ( $<50$  мс), інтенсивність спектру ЕПР в діапазоні концентрацій  $2 \times 10^{-4}$  –  $2 \times 10^{-3}$  моль/л пропорційна кількості зонда в цитозолі клітин. Якщо при цьому в позаклітинному середовищі знаходяться іони, що мають парамагнітні властивості і не проникають в нативному стані через мембрани, то в результаті обмінної взаємодії між цими іонами й зондом в позаклітинному середовищі спектр ЕПР спінових зондів детектувати не буде через значне розширення. Це дає можливість спостерігати сигнал ЕПР тільки від зондів, що знаходяться всередині клітин і пропорційних їх кількості. Як парамагнітний поширювач в роботі використовували  $\text{NiCl}_2$ .



Обробка спектрів ЕПР передбачала віднімання з сигналу ЕПР, отриманого з суспензією клітин, сигналу, отриманого без суспензії клітин (рис. 4.1). Амплітуда сигналу є пропорційною вмісту внутрішньоклітинної вільної води. Знаючи вміст внутрішньоклітинної води в ізоосмотичному середовищі, можна обчислити відносну зміну вмісту внутрішньоклітинної вільної води у гіпо- і гіперосмотичних умовах.

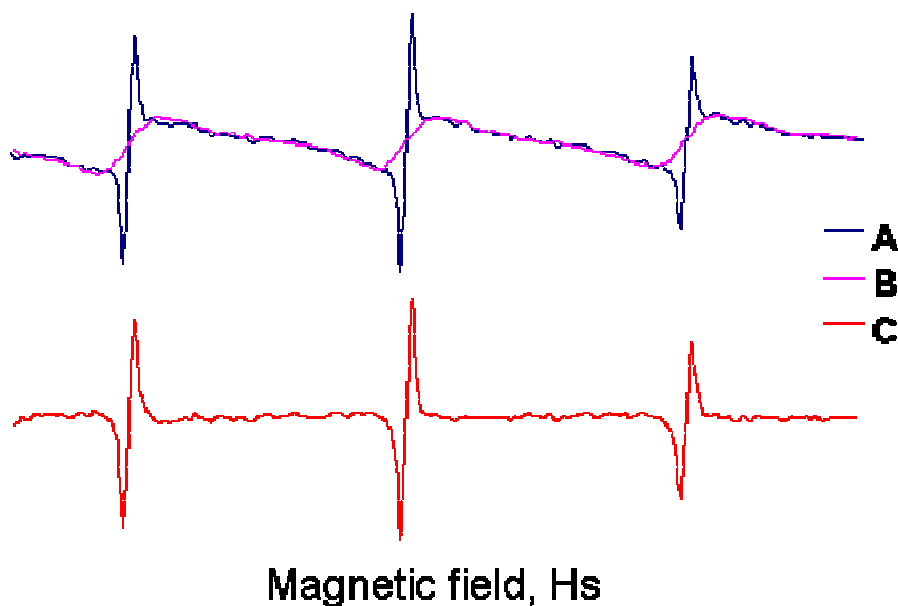


Рис. 4.1. Обробка спектрів ЕПР для визначення вільної внутрішньоклітинної води сперматозоїдів коропа

А – Необроблений спектр суспензії сперматозоїдів коропа у буфері;

В – Фоновий спектр буферу (без клітин);

С – Сигнал внутрішньоклітинної води сперматозоїдів коропа після цифрового віднімання фонового спектру  $C = A - B$ .

Оскільки для розширення сигналу необхідно додавання солі, яка вносить добавку до осмотичності позаклітинної середовища, мінімальною осмолярністю середовища інкубації є 50-100 мОсмоль/кг. При значеннях осмотичності середовищ інкубації понад 450 мОсмоль/кг, при гіпертонічному стисненні клітин і втрати ними частини вільної води, величина сигналу ЕПР незначна, що зумовлює верхню межу концентрації

середовищ інкубації для проведення дослідження сперматозоїдів коропа методом ЕПР.

На рис. 4.2 відображена залежність відносного вмісту вільної внутрішньоклітинної води сперматозоїдів коропа від відносного осмотичного тиску внутрішньо- і позаклітинного середовища. Враховано, що середня осмолярність сім'яної плазми коропа складала  $250 \pm 10$  мОсмоль/кг. Таким чином, у діапазоні осмолярності позаклітинного середовища від 100 до 400 мОсмоль/кг спостерігається залежність відносного вмісту внутрішньоклітинної води, 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.

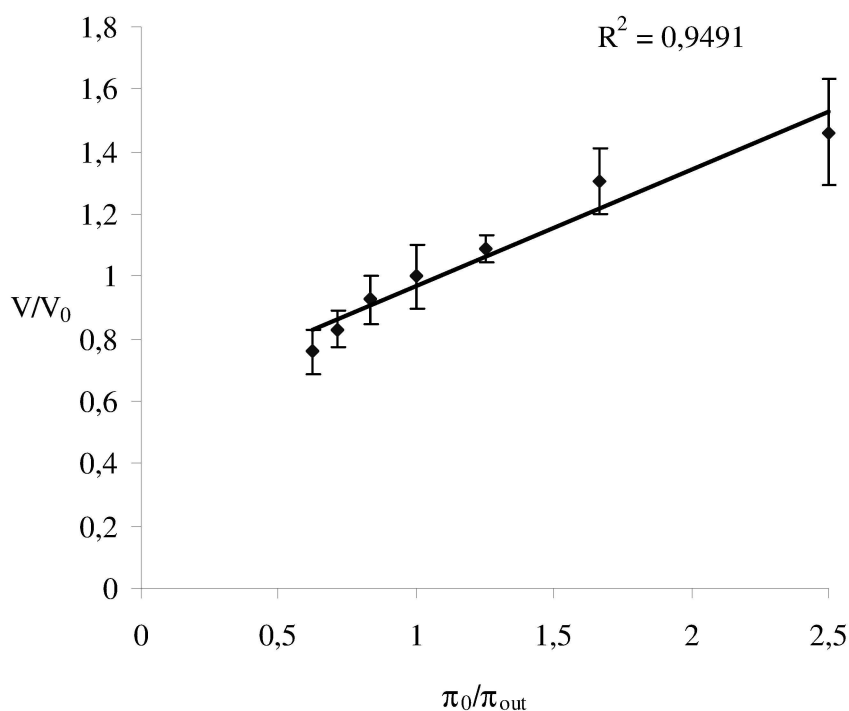


Рис. 4.2. Залежність відносного вмісту ( $V/V_0$ ) вільної внутрішньоклітинної води сперматозоїдів коропа від відносного осмотичного тиску внутрішньо- ( $\pi_0$ ) і позаклітинного ( $\pi_{out}$ ) середовища. Значення осмолярності нормовані до 250 мОсмоль/кг (середнє значення  $\pm$  С.В.,  $n=5$ )

4.2. Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів коропа в гіпоосмотичних умовах методом спектрофотометрії

4.2.1. Вплив осмолярності середовища інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа

За допомогою розробленого нами спектрофотометричного методу, детальний опис якого наведений у підрозділі 3.3, можливе дослідження кінетики клітинного об'єму під час експозиції сперматозоїдів в анізоосмотичних, в першу чергу, гіпоосмотичних середовищах.

Було встановлено, що залежності світлопропускання суспензій інкубованих сперматозоїдів від часу коректно апроксимуються функцією виду  $T = 1 - e^{-kt}$ , де  $T$  – світлопропускання,  $t$  – час інкубації,  $k$  – деякий коефіцієнт. Ця функція цілком відповідає прогнозованій фізико-математичною моделлю функції зміни клітинного об'єму [243].

Враховуючи, що осмотичність плазми досліджуваних сперматозоїдів коропа, становила  $250 \pm 10$  мОсмоль/кг, як гіпоосмотичні по відношенню до сперми середовища інкубації були обрані наступні: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 мОсмоль/кг; точність визначення концентрацій забезпечувалась кріоскопічним осмометром.

Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів виконували за постійної температури середовища інкубації  $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$  та однакової концентрації сперматозоїдів у кюветі  $200 \pm 15$  млн/мл, для чого визначали концентрацію сперматозоїдів у досліджуваному еякуляті за допомогою камери Горяєва та відповідний ступінь розведення цієї сперми середовищем інкубації.

Під час інкубації клітин у водних розчинах NaCl осмолярності 20...200 мОсмоль/кг, було встановлено, що в залежності від осмотичної концентрації середовища інкубації спостерігаються різні значення відносного світлопропускання ( $T_i/T_0$ ) суспензії сперматозоїдів коропа, де  $T_0$  – значення світлопропускання суспензії сперматозоїдів відразу після їх додавання у середовище інкубації,  $T_i$  – значення світлопропускання суспензії

сперматозоїдів через деякий час інкубації ( $t_i$ ). Так, чим менше осмолярність середовища інкубації, тим більша зміна світлопропускання суспензії інкубованих сперматозоїдів спостерігається (рис. 4.3).

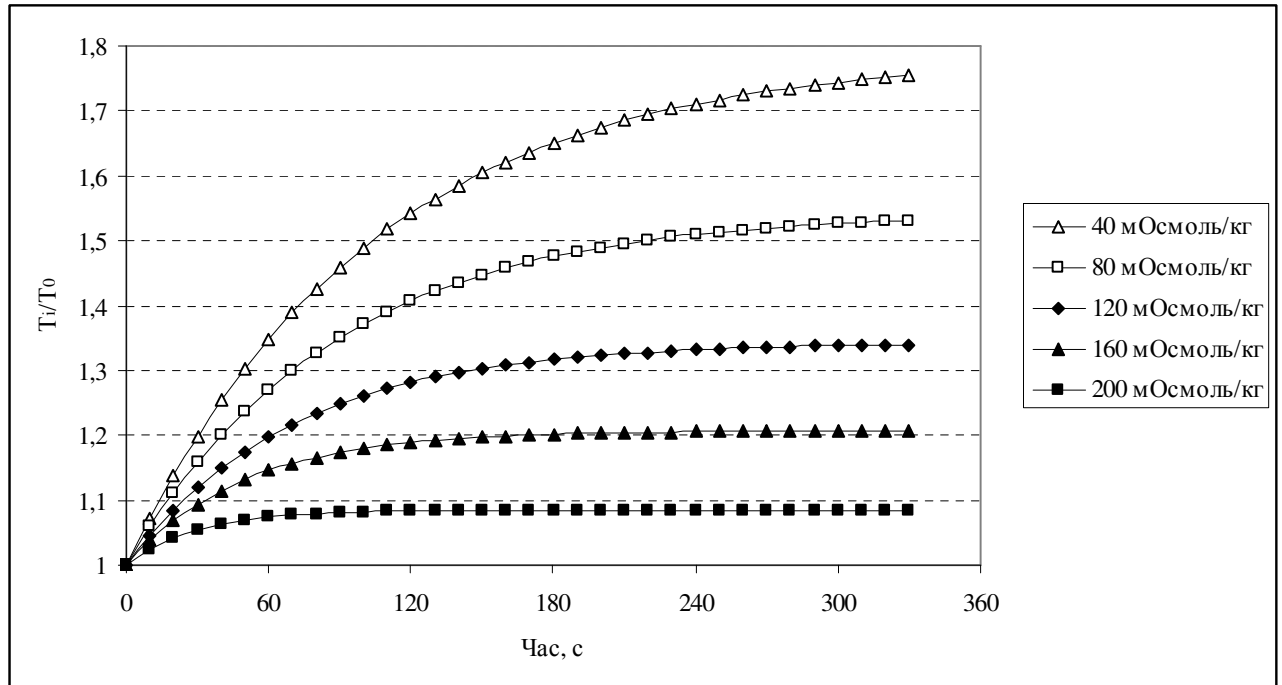


Рис. 4.3 Кінетика відносного світлопропускання ( $T_i/T_0$ ) суспензії сперматозоїдів коропа ( $n=6$  самців) у гіпотонічних розчинах різної осмолярності.  $T_0$  – значення світлопропускання суспензії сперматозоїдів відразу після їх додавання у середовище інкубації,  $T_i$  – значення світлопропускання суспензії сперматозоїдів через деякий час інкубації ( $t_i$ )

Як видно з рис. 4.3 при незначній різниці осмолярності внутрішньо- і позаклітинного середовища, наприклад, як під час інкубації у середовищі 200 мОсмоль/кг NaCl, найбільше значення відносного світлопропускання суспензії сперматозоїдів складає близько 1,1, тоді як за умов істотного перепаду осмолярності, наприклад у середовищі 40 мОсмоль/кг, відношення  $T_i/T_0$  сягає 1,8.

Водночас, у розчині, при зануренні клітин в який вони зазнають меншого перепаду осмотичного тиску внутрішньо- і позаклітинного

середовища, спостерігається більш швидке реагування і досягнення рівноваги (рис. 4.4). Тобто за однаковий період інкубації, наприклад 70 с, у розчині 200 мОсмоль/кг процес урівноваження майже закінчений (90% від максимальної зміни  $T_{\max}-T_0$ ), тоді як у розчині 40 мОсмоль/кг процес урівноваження відбувається менш ніж на половину.

При цьому нормована на 1 відносна зміна світлопропускання визначається  $\Delta T_{\text{норм.}} = \frac{T_i - T_0}{T_{\max} - T_0}$ , де  $T_{\max}$  – найбільше значення світлопропускання суспензії сперматозоїдів, яке відповідає досягненню рівноважного стану, у певному середовищі інкубації.

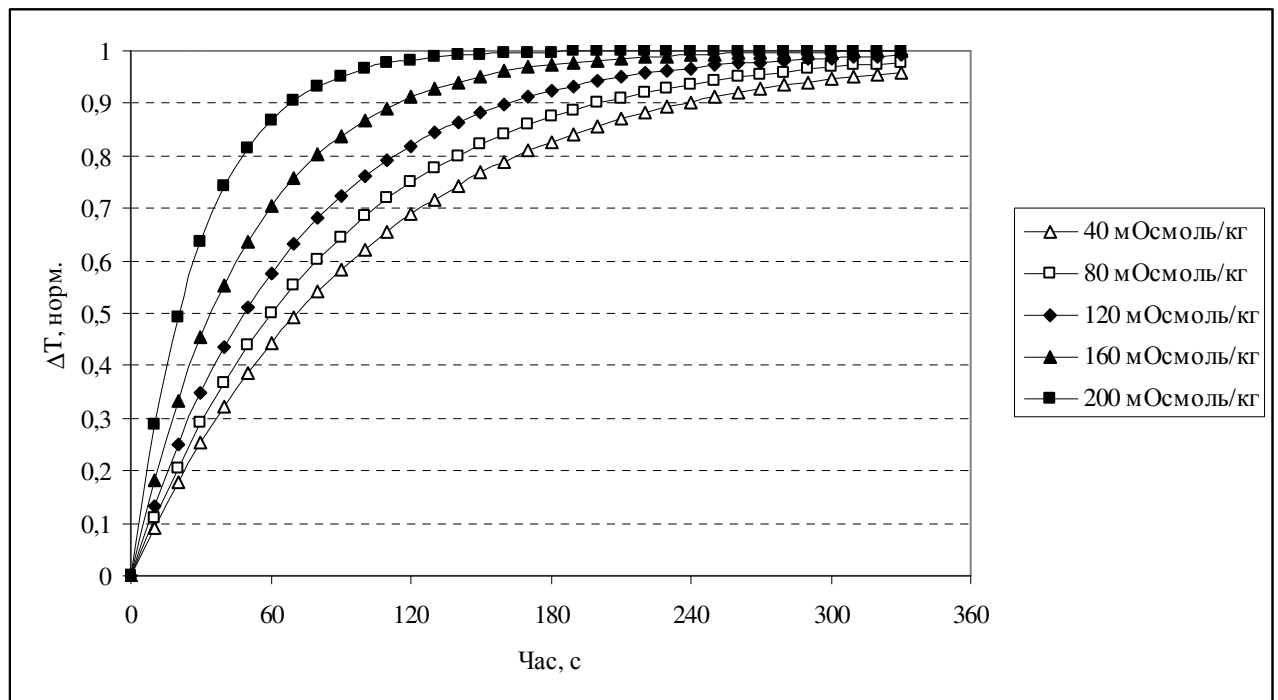


Рис. 4.4. Кінетика нормованої відносної зміни світлопропускання ( $\Delta T_{\text{норм.}}$ ) суспензії сперматозоїдів коропа в гіпотонічних розчинах різної осмолярності ( $n=6$  самців)

Для наочності на рис. 4.3 та 4.4 наведені залежності відносного ( $T_i/T_0$ ) світлопропускання та нормованої відносної зміни світлопропускання ( $\Delta T_{\text{норм.}}$ ) з кроком 40 мОсмоль/кг та без ступеня достовірності даних. Вичерпні ж дані

наведені на рис. 4.5. Відношення  $T_{\max}/T_0$  характеризує максимальну зміну світлопропускання суспензії сперматозоїдів у середовищі певної осмолярності.

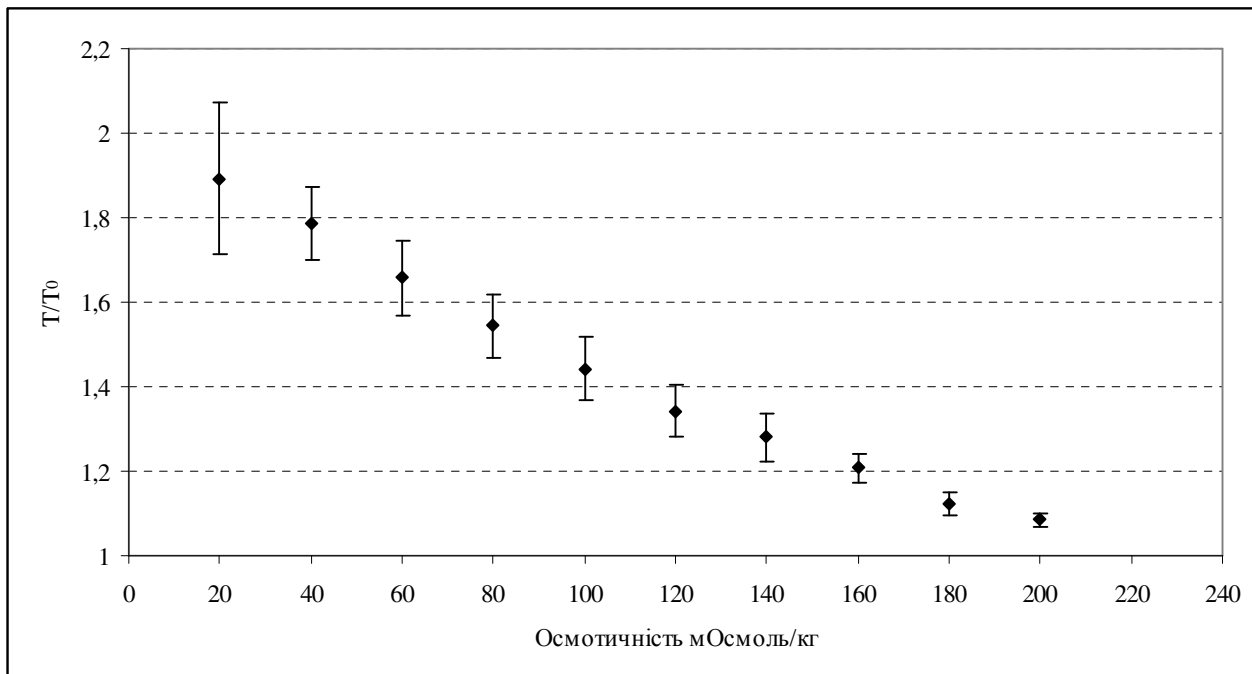


Рис. 4.5 Залежність максимальної зміни світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа ( $T_{\max}/T_0$ ) від осмолярності розчину інкубації

Залежність, що наведена на рис. 4.5, може бути апроксимована лінійною або експоненціальною функцією. Монотонність кривої дає змогу співвіднести дані, що отримані спектрофотометрією та ЕПР-спектроскопією.

#### 4.2.2. Вплив температури середовища інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа

На рис. 4.6 представлена кінетика світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа за різної температури інкубації у водному розчині 100 мОсмоль/кг NaCl. Такі умови експерименту дозволили дослідити вплив температури на осмотичну реакцію сперматозоїдів у діапазоні від 12 до 37 °C із кроком 3-4 град. за однакової концентрації сперматозоїдів у кюветі  $200 \pm 10$  млн/мл.

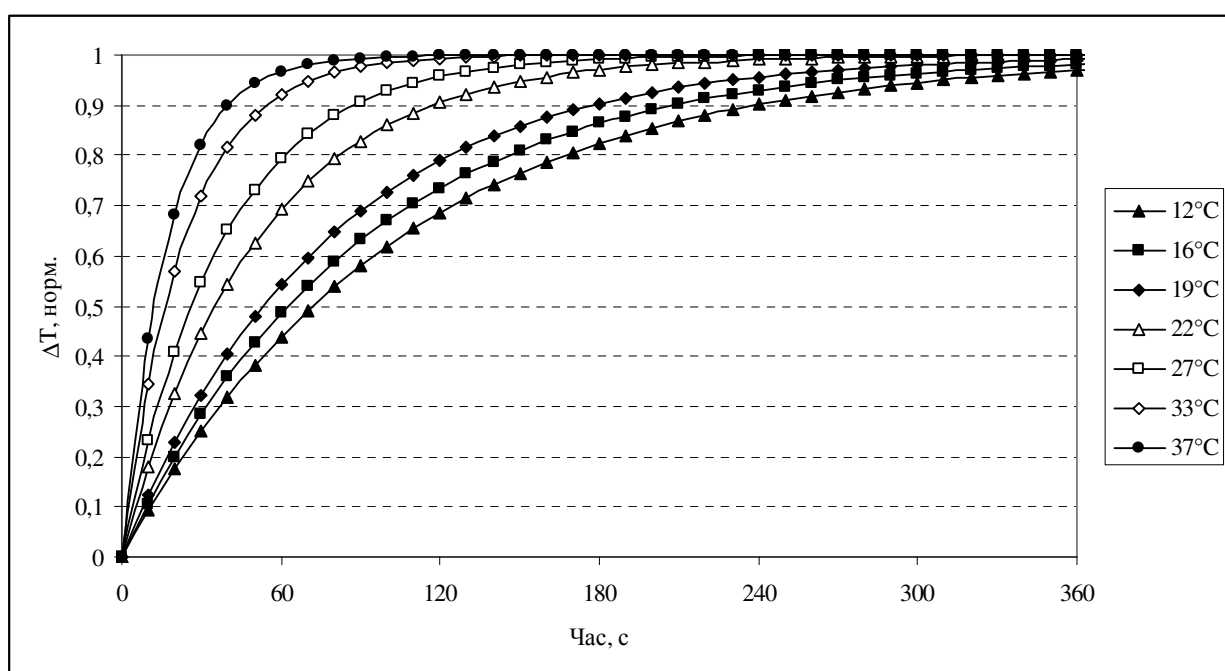


Рис. 4.6. Кінетика світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа за різної температури інкубації у водному розчині 100 мОсмоль/кг NaCl

Таким чином, осмотична реакція сперматозоїдів коропа в значній мірі залежить від температури середовища інкубації, що треба враховувати на різних етапах кріоконсервування.

#### 4.2.3. Вплив концентрації сперматозоїдів в середовищі інкубації на кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа

Оскільки концентрація сперматозоїдів в еякуляті може відрізнятися між різними самцями та навіть у різних еякулятах від однієї тварини (на різних стадіях дозрівання, тощо), то дослідження впливу концентрації сперматозоїдів на кінетику світлопропускання суспензії було досить важливим проміжним завданням.

На рис. 4.7 представлена кінетика світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа під час інкубації у водному розчині 100 мОсоль/кг NaCl за різної концентрації клітин у кюветі.

Дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів виконували за температури середовища інкубації 20 °С. Концентрацію сперматозоїдів у кюветі змінювали від  $60 \pm 3$  до  $600 \pm 30$  млн/мл.

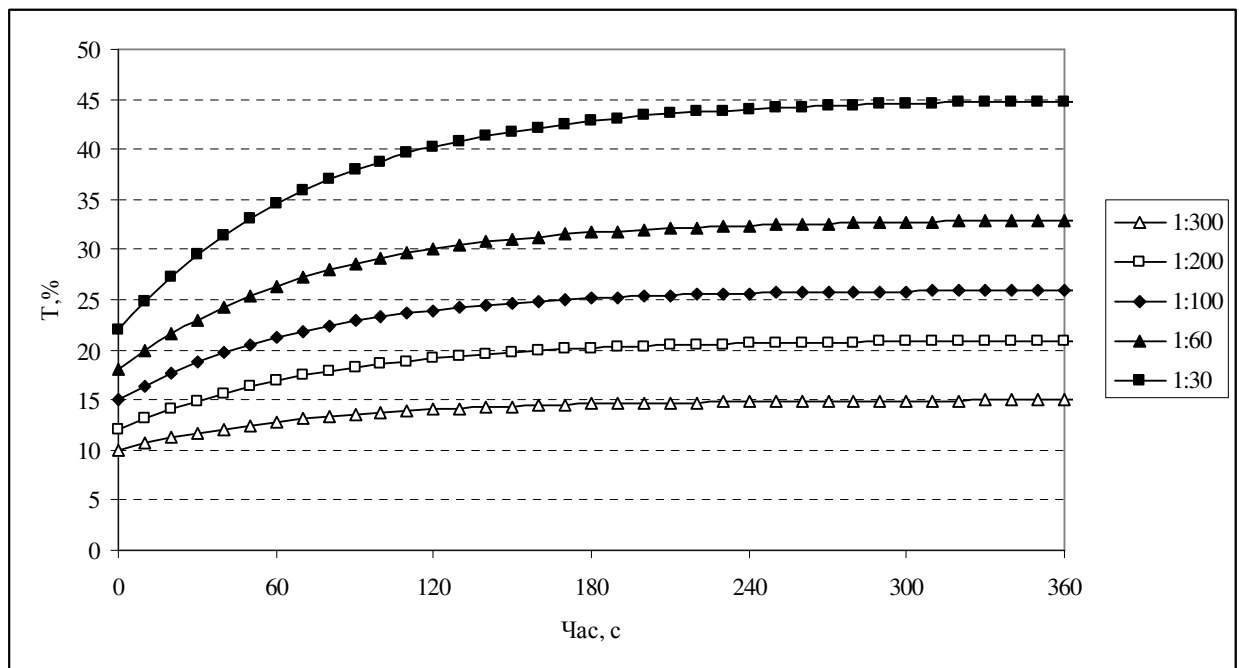


Рис. 4.7. Кінетика світлопропускання суспензії сперматозоїдів коропа за різної концентрації клітин у кюветі, температура +20 °С, осмотична концентрація середовища інкубації 100 мОсоль/кг



Додаючи до кювети спектрофотометра різний об'єм сперми коропа, домагались розведення сперми середовищем інкубації у відношенні 1:30 – 1:300, що відповідає концентрації клітин в кюветі від  $60 \pm 3$  до  $600 \pm 30$  млн/мл. Діапазон зміни світлопропускання становить близько 5% при розведенні 1:30 і більше 20% при розведенні 1:300. Однак, якщо пронормувати дані залежності, то вони виявляються близькими за характером і, відповідно, описуються близькими значеннями коефіцієнтів при показнику експоненти  $k = (13,4 \pm 0,4) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . Тобто параметр, що визначає характер кінетики світлопропускання клітин, не залежить від концентрації клітин у суспензії в достатньо широкому діапазоні. Водночас цей діапазон відповідає конструктивним вимогам приладу при проведенні досліджень.

Слід зауважити, що при використанні відносно невеликих розведень сперми в середовищі інкубації (1:30) спостерігається невелика абсолютна зміна світлопропускання, що вносить більший внесок у похибку вимірювання. Використання відносно великих розведень призводить до того, що фотоелектроколориметр працює в області оптичної густини 0–0,2, і точність вимірювання погіршується у зв'язку з конструктивними особливостями устаткування.

Отже, оптимальними розведенням, тобто таким, що призводить до найменшої похибки вимірювань, для інкубації нативної сперми коропа є 1:50 – 1:100 за осмотичності середовища інкубації 100 мОсмоль/кг та 1:100 – 1:300 за осмотичності 50 мОсмоль/кг (за умов концентрації сперматозоїдів в еякуляті 15-20 млрд/мл).

Відповідно, при вимірюванні світлопропускання сперматозоїдів, змішаних із кріозахисним середовищем, слід також враховувати ступінь розведення кріозахисним середовищем для роботи в діапазоні абсолютних значень світлопропускання 15–60%.

#### 4.2.4 Порівняння даних, що отримані методом спектрофотометрії та ЕПР-спектроскопією

На рис. 4.8 зображена залежність відносної зміни вмісту води  $V/V_0$  в сперматозоїдах коропа від значень відносного світлопропускання  $T/T_0$ , які отримані в умовах однакової осмолярності середовищ (гіпотонічні водні розчини NaCl осмолярністю 100, 150 та 200 мОсоль/кг), що дає змогу побудувати їх наведеним чином.

Як було показано вище, обидві залежності добре апроксимуються лінійними функціями, що свідчить про високий ступінь позитивної лінійної кореляції. Коефіцієнт кореляції Пірсона складає  $(R^2)=0,9974$ , що є статистично значущим при рівні значимості  $p=0,01$ .

За потреби дані, що наведені на рис. 4.8 можуть використовуватись у якості калібрувального графіку щодо співвідношення даних, отриманих спектрофотометричним способом, до значень відносного об'єму.

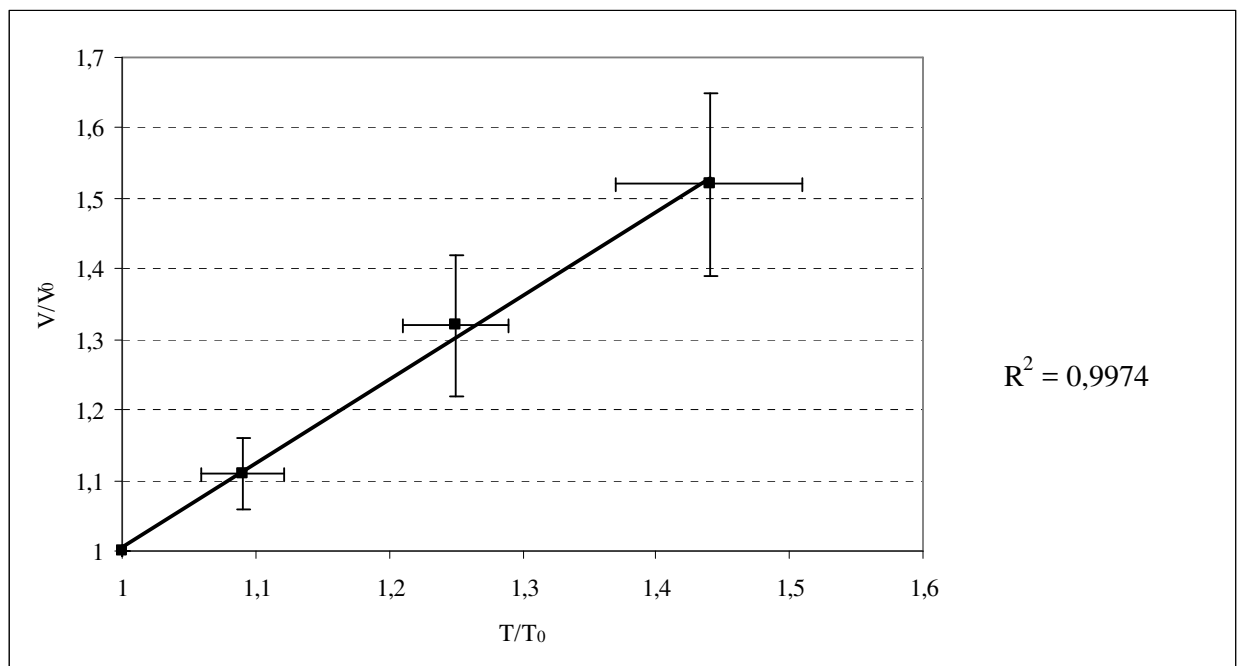


Рис. 4.8. Залежність відносної зміни вмісту води  $V/V_0$  (метод ЕПР) в сперматозоїдах коропа від значень відносного світлопропускання  $T/T_0$ , (метод спектрофотометрії)

#### 4.3. Визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів коропа

Оскільки ініціація рухливості сперматозоїдів коропа відбувається в гіпотонічних умовах, а відповідний перепад осмотичності розглядається як основна причина їх активації, дослідження гіпоосмотичної резистентності сперматозоїдів є важливим для більш якісного відбору матеріалу для подальшого використання після кріоконсервування (наприклад, для штучного відтворення риб).

За достатньо низької осмолярності позаклітинного середовища приток води в клітину, викликаний значним перепадом осмотичного тиску, призводить до критичного збільшення об'єму клітини і розриву її плазматичної мембрани. В силу гетерогенності клітин у суспензії, пошкодження всіх сперматозоїдів у суспензії відбувається не одночасно, а протягом характерного часу, при цьому загибель клітин може бути описана розподілом числа пошкоджених клітин з часом.

Осмотичну резистентність сперматозоїдів оцінювали за часом інкубації в дистильованій воді, при якому відбувалося пошкодження 50% клітин у досліджуваній суспензії. Як додаткову характеристику резистентності клітин використовували ширину диференціальної кривої розподілу сперматозоїдів за стійкістю, виміряну на напіввисоті і виражену в секундах. Для цього будували залежність похідної розподілу числа сперматозоїдів за стійкістю від часу, яка має характерну Л-подібну форму (рис. 4.9).

Для оцінки осмотичної резистентності сперматозоїдів розробленим фотометричним методом необхідно було визначити діапазон їх концентрацій в кюветі. Для цього була вивчена залежність оптичної густини від концентрації клітин (рис. 4.10). Так, при використанні різних об'ємів сперми характер кінетики оптичної густини не змінюється: вона описує спочатку набухання сперматозоїдів, викликане перепадом осмотичного тиску, а потім процес пошкодження клітин, що відображається характерним перегином.

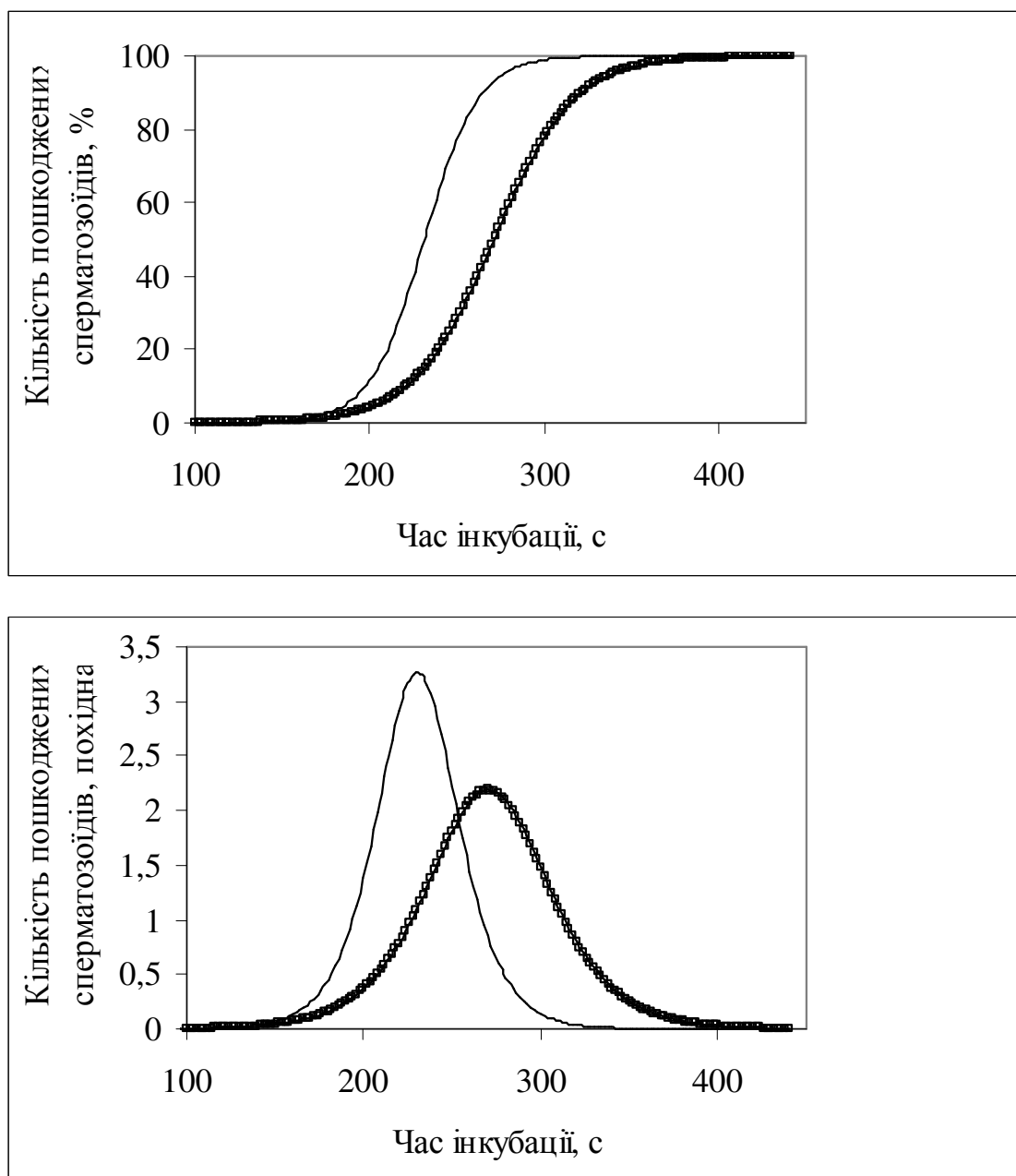


Рис. 4.9. Диференційна та інтегральна криві пошкодження клітин

Оскільки основним етапом обробки даних є відокремлення кінетики пошкодження від експериментальної залежності, то для того, щоб зміна оптичної щільності була найвиразнішою і, відповідно, для зменшення похибки вимірів, оптимальним визначено діапазон об'ємів сперми від 50 до 100 мкл. Враховуючи середньою концентрацією сперматозоїдів в еякуляті  $18 \pm 3$  млрд./мл та об'єм середовища інкубації 3,6 мл, визначений діапазон об'єму сперми відповідає значенням концентрації клітин в кюветі 0,3 – 0,6 млрд./мл.

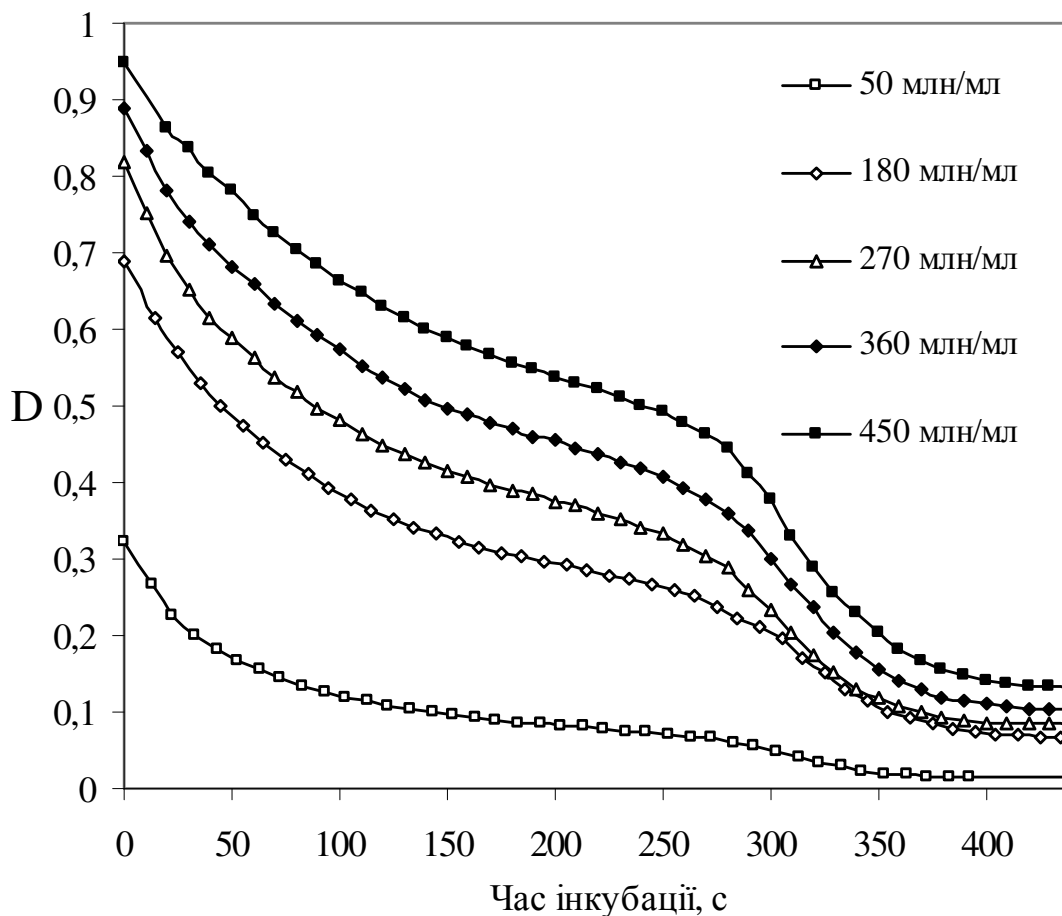


Рис. 4.10. Залежність оптичної густини суспензії від концентрації сперматозоїдів у досліджуваній кюветі

Вищезазначене зручно проілюструвати на рис. 4.11, де побудовані залежності оптичної густини через 100 с після додавання сперми в кювету (які характеризують клітини, що набухають) та граничної оптичної густини (в момент, коли оптична щільність суспензії інкубованих сперматозоїдів не змінюється з часом, що відповідає 100% лізису клітин) від об'єму сперми, що додається в кювету. Як наочно видно, зі збільшенням об'єму сперми збільшується різниця між початковою та граничною оптичними густинами, і відповідно збільшується різниця оптичних густин, що характеризує лізис сперматозоїдів. Дослідження виконували за температури середовища інкубації 20 °С.

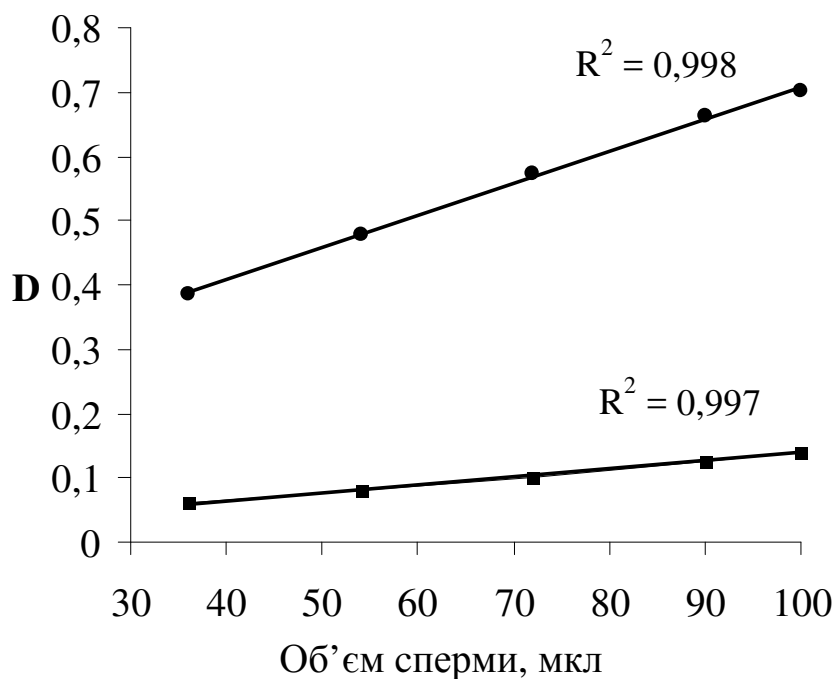


Рис. 4.11. Залежність початкової (●) та граничної (■) густини суспензії сперматозоїдів коропа від об'єму сперми в середовищі інкубації

Важливим етапом розробки способу визначення осмотичної резистентності було зіставлення даних, що отримані прямим способом – шляхом оптичної мікроскопії, та даних, отриманих розробленим фотометричним способом.

Для цього в паралельному експерименті після додавання сперми в кювету з середовищем інкубації за допомогою мікродозатора переносили частину суспензії на предметне скло мікроскопа і визначали залежність кількості пошкоджених клітин від часу.

Визначення кількості пошкоджених клітин за допомогою оптичного мікроскопа, безумовно, містить похибку, пов'язану із суб'єктивною оцінкою дослідника, тому для об'єктивізації вимірів проводили відеозапис осмотичної реакції та визначали кількість пошкоджених клітин за фотографіями в певний момент часу.

На рис. 4.12 наведені мікрофотографії дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів протягом різного часу інкубації в дистильованій воді (в одному досліді).

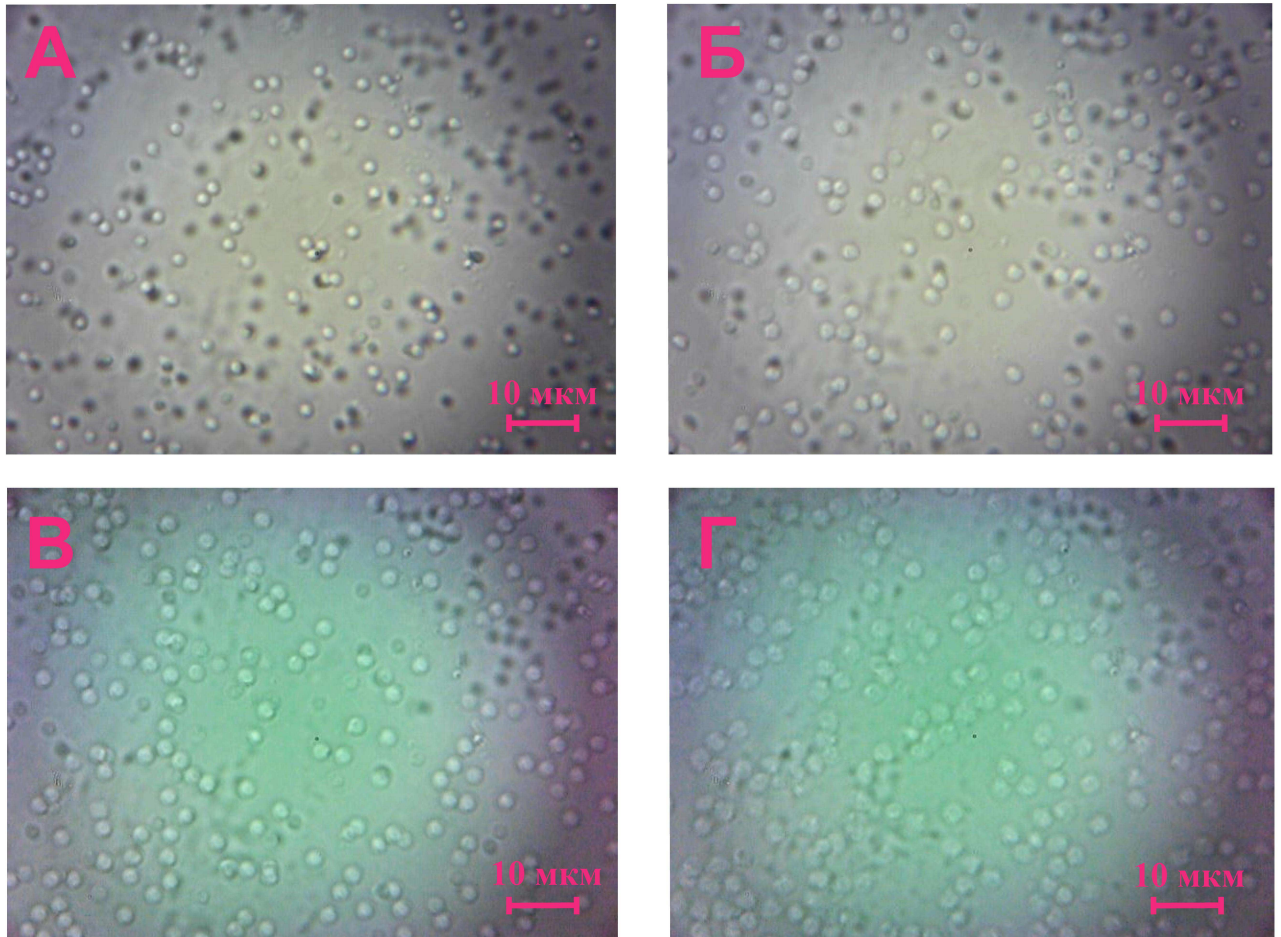


Рис. 4.12. Ікубовані в дистильованій воді сперматозоїди коропа. А – 10 с. інкубації; Б – 2 хв. інкубації; В – 3 хв. інкубації; Г – 5 хв. інкубації

На рис. 4.12, А наведена мікрофотографія інкубованих у дистильованій воді сперматозоїдів коропа через 10 с інкубації. Це сперматозоїди, що рухаються, їхній клітинний об'єм поступово збільшується за рахунок проникаючої позаклітинної води.

На рис. 4.12, Б наведена мікрофотографія сперматозоїдів коропа через 2 хв після початку інкубації. За час інкубації сперматозоїди втратили рухливість, їхній об'єм збільшений в порівнянні з початком інкубації, але ще не досягнуто критичного значення.

На рис. 4.12, В частка сперматозоїдів пошкоджена через розрив плазматичних мембран у результаті збільшення клітинного об'єму понад критичне значення. На рис. 4.12, Г майже всі сперматозоїди суспензії пошкоджені після 5 хв інкубації в дистильованій воді.

На рис. 4.13 зіставлені дані про кількість пошкоджених сперматозоїдів у результаті інкубації в дистильованій воді, що отримані за допомогою методів мікроскопії ( $N_{\text{micro}}$ ) та фотометрії ( $N_{\text{photo}}$ ) у паралельному експерименті (температура середовища інкубації 20 °C). Кожна точка графіку побудована як відповідність відносної кількості загиблених сперматозоїдів, визначеної методом фотометрії, такому ж показнику, визначеному методом мікроскопії, за однакового часу інкубації сперматозоїдів.

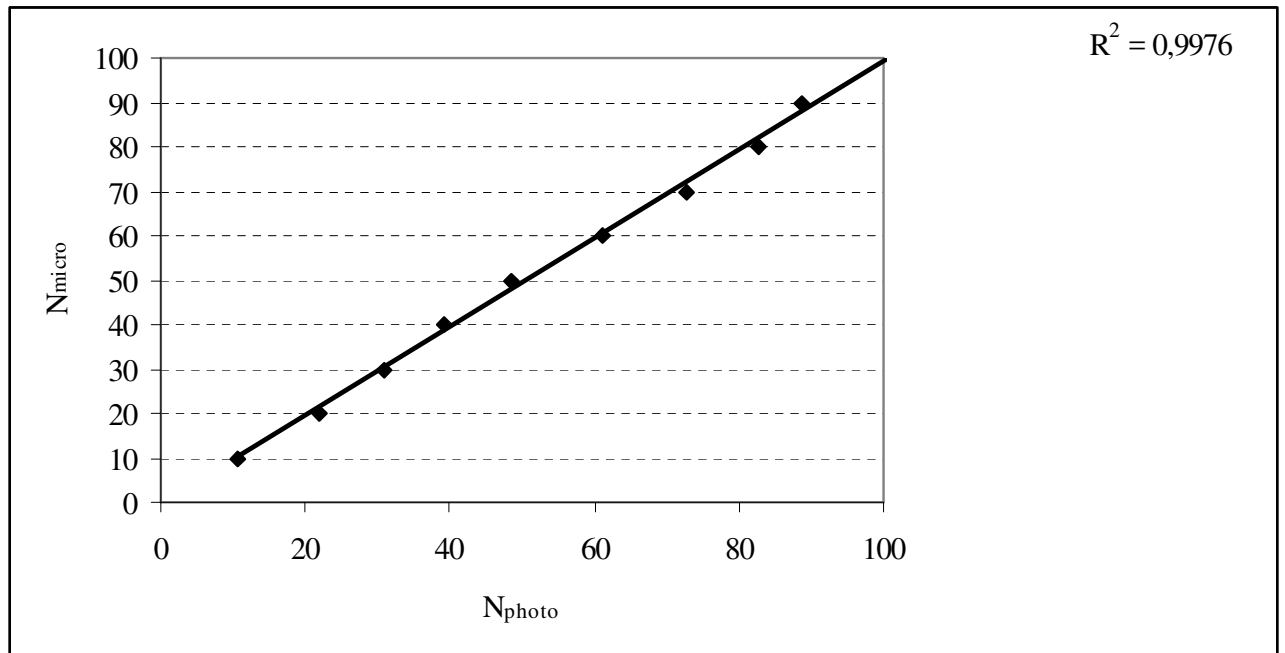


Рис. 4.11. Зіставлення відносної кількості загиблених сперматозоїдів коропа, що отримана за допомогою мікроскопії ( $N_{\text{micro}}$ ) та фотометрії ( $N_{\text{photo}}$ )

Зважаючи на високий ступінь кореляції залежностей (коефіцієнт кореляції Пірсона становить 0,999), можна зробити висновок, що проведення дослідження фотометричним методом є обґрунтованим і, як наслідок, адекватним методом визначення осмотичної резистентності сперматозоїдів.



#### 4.4. Вплив гормональної стимуляції на осмотичну резистентність сперматозоїдів коропових риб

Гормональна стимуляція риб є обов'язковою при отриманні гамет для штучного запліднення. На риборозплідних заводах для дозрівання риб використовують ін'єкцію розтертого гіпофіза, люліберіну, хоріонічного гонадотропіну або гормональні препарати «Сурфагон», «Овопель» та ін.

Метод гіпофізарних ін'єкцій застосовується для більшості риб, які мають нерест навесні-влітку (осетер, короп, лящ, судак, білий амур та ін). Для стимуляції дозрівання плідників риб використовується той же гонадотропний гормон, який міститься в гіпофізі і під час нересту в природних умовах надходить із гіпофіза в кров, викликаючи дозрівання статевих клітин.

При внутрішньом'язових ін'єкціях суспензії гіпофіза самцям риб, гонадотропний гормон надходить у кров і стимулює у них перехід статевих залоз від IV до V стадії зрілості, отримання зрілої, здатної до запліднення ікри у самок і доброякісної сперми у самців. При такій штучній стимуляції дозрівання плідників шляхом введення їм гіпофізів, взятих від інших риб, відбувається збільшення кількості гонадотропного гормону гіпофіза в крові.

При проведенні гіпофізарних ін'єкцій доза введеного препарату, кількість ін'єкцій та тривалість дозрівання самців залежать від температури води та ступеня зрілості риб. За низьких температур води (в межах нерестового діапазону температур) кількість ін'єкцій також може бути збільшено до трьох і більше (застосовується для коропа). Проміжок часу між ін'єкціями може становити від 6 до 12 годин в залежності від температури.

Самці добре дозрівають після одноразової гіпофізарної ін'єкції, тому, наприклад, самцям коропа вводиться доза гіпофізів в два рази менша, ніж самкам. Загальна кількість гіпофіза, необхідного для стимуляції, розраховується виходячи із загальної маси плідників, з урахуванням температури води.

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 резистентності сперматозоїдів.

Результати експерименту наведені в таблиці 4.1 та 4.2. Оскільки спермі риб властива висока варіабельність якості, то дані наведені по кожному самцю.

Таблиця 4.1

## Маса самців та характеристики отриманих еякулятів

| №  | Маса самців, кг | Сперма, отримана без гормональної стимуляції |                        | Сперма, отримана після гормональної стимуляції |                        |
|----|-----------------|----------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------|------------------------|
|    |                 | Маса еякулята, г                             | Концентрація, млрд./мл | Маса еякулята, г                               | Концентрація, млрд./мл |
| 1  | 1,2             | 0,66                                         | 29,55                  | 2,93                                           | 20,75                  |
| 2  | 1,07            | 0,22                                         | 28,4                   | 0,53                                           | 26,35                  |
| 3  | 0,7             | 0,21                                         | 24,2                   | 1,82                                           | 24,52                  |
| 4  | 0,76            | 0,21                                         | 28,95                  | 0,85                                           | 19,6                   |
| 5  | 1,12            | 0,32                                         | 25,0                   | 0,84                                           | 24,0                   |
| 6  | 0,9             | 0,13                                         | 22,25                  | 3,56                                           | 28,56                  |
| <> | 0,96±0,20       | 0,29±0,19                                    | 26,4±3,5               | 1,76±1,25                                      | 24,0±3,4               |

Згідно з даними, наведеними в таблиці 4.1, немає кореляції між масою самця та кількістю отриманою сперми. Можливо, для встановлення відповідної закономірності необхідна більша вибірка тварин, проте це не було завданням дослідження.

Гормональна стимуляція сперматогенезу, як правило, призводить до можливості отримати більший об'єм сперми від самця (таблиця 4.1). Як випливає з проведеного експерименту, гормональна стимуляція

сперматогенезу не зробила 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.

Дані щодо осмотичної резистентності представлені в таблиці 4.2.

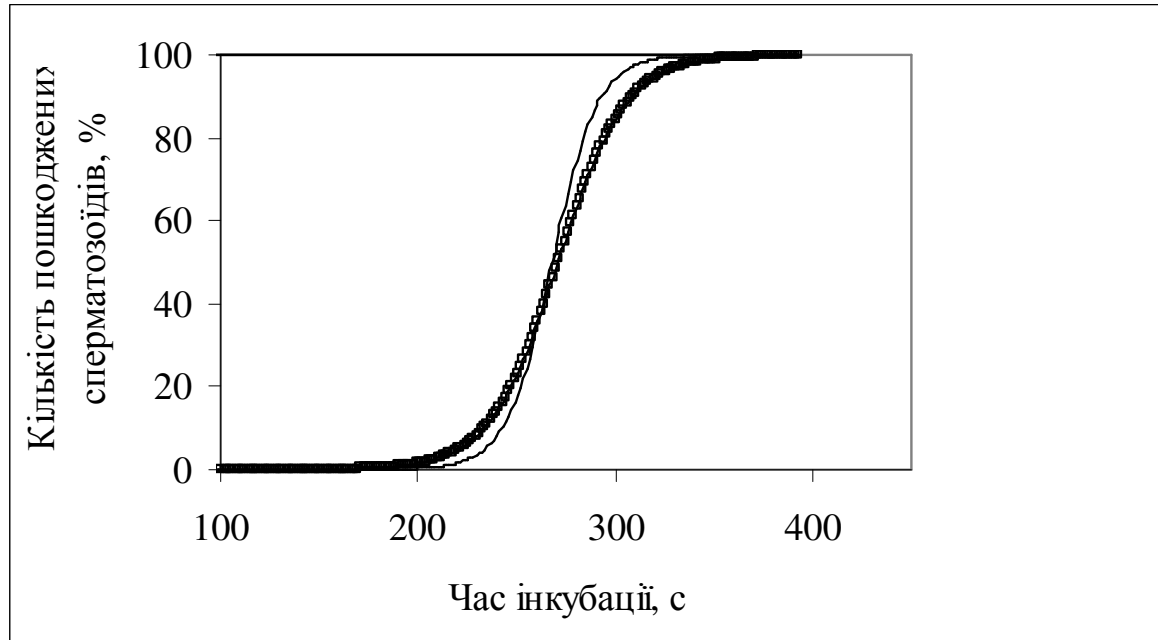
Таблиця 4.2

Параметри осмотичної резистентності сперматозоїдів коропа

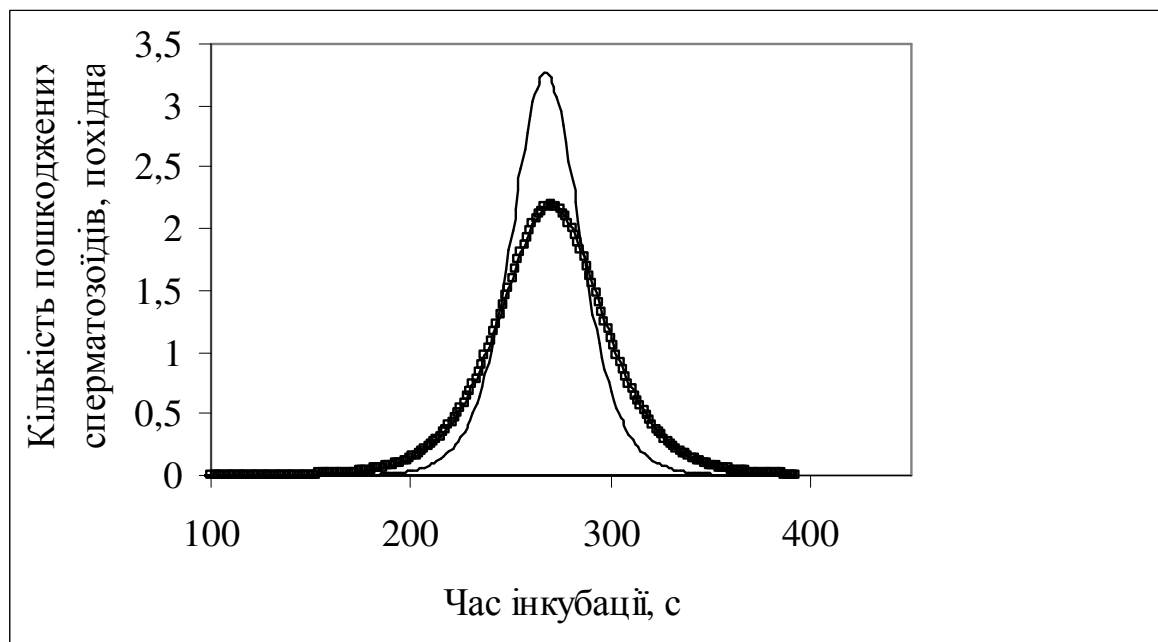
| №  | Сперма, що отримана без гормональної стимуляції |                       | Сперма, що отримана після гормональної стимуляції |                       |
|----|-------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|
|    | Осмотична резистентність, с                     | Ширина розподілу, с   | Осмотична резистентність, с                       | Ширина розподілу, с   |
| 1  | 231                                             | 30,6                  | 271                                               | 45,6                  |
| 2  | 253                                             | 40,4                  | 249                                               | 43,4                  |
| 3  | 251                                             | 41,6                  | 273                                               | 67                    |
| 4  | 297                                             | 45,2                  | 264                                               | 48,6                  |
| 5  | 302                                             | 49,2                  | 283                                               | 60,2                  |
| 6  | 277                                             | 49,6                  | 297                                               | 51                    |
| <> | 269±28 <sup>a</sup>                             | 42,8±7,1 <sup>b</sup> | 273±16 <sup>a</sup>                               | 52,6±8,9 <sup>c</sup> |

Як видно з таблиці 4.2, середня осмотична резистентність сперматозоїдів, отриманих з використанням гіпофізарних ін'єкцій і без гормональної стимуляції, значимо не відрізняється. Це означає, що гормональна стимуляція суттєво не вплинула на реакцію сперматозоїдів на поміщення їх у гіпотонічні умови, а відповідно і на їх стійкість до осмотичного шоку. При цьому більша ширина розподілу динаміки пошкодження клітин після гормональної стимуляції (рис. 4.14) свідчить про те, що гетерогенність суспензії сперматозоїдів зросла, тобто мембрани частини сперматозоїдів пошкоджуються при меншому часу інкубації порівняно зі спермою, отриманою без гормональної стимуляції, і аналогічно

частина сперматозоїдів витримує більш тривалу інкубацію. Зазначений факт, що передбачає наявність в еякуляті декількох популяцій сперматозоїдів, різних по стійкості, обговорювалося в роботах [24]. В першу чергу, він може бути пояснений різним ступенем зрілості сперматозоїдів.



А



Б

Рис. 4.14. Інтегральна (А) та диференційна (Б) криві пошкодження сперматозоїдів коропа під час інкубації у дистильованій воді (типові залежності). Легенда: — — без гормональної стимуляції, -●- — після гормональної стимуляції дозрівання

Кореляцій між масою самця і кількістю отриманої сперми у проведеному експерименті помічено не було. Однак у тих випадках, коли після гіпофізарної ін'єкції був отриманий відносно більший об'єм сперми, показники осмотичної резистентності і ширини розподілу були переважно вище порівняно зі спермою, отриманою без стимуляції. Це також підтверджує припущення про вміст у спермі декількох популяцій сперматозоїдів.

Про відмінності у властивостях сперми, отриманої після гормональної стимуляції і без неї, свідчить різна реакція сперматозоїдів на поміщення їх у гіпотонічні середовища, що полягає в різному характерному часі проникнення води в клітину (рис. 4.15). Так, процес проникнення молекул води в сперматозоїди, отримані після гормональної стимуляції, триває довше при їх інкубації в ідентичних середовищах. Даний факт може пояснюватися підвищенням внутрішньоклітинної осмотичності сперматозоїдів в результаті гормональної стимуляції самців.

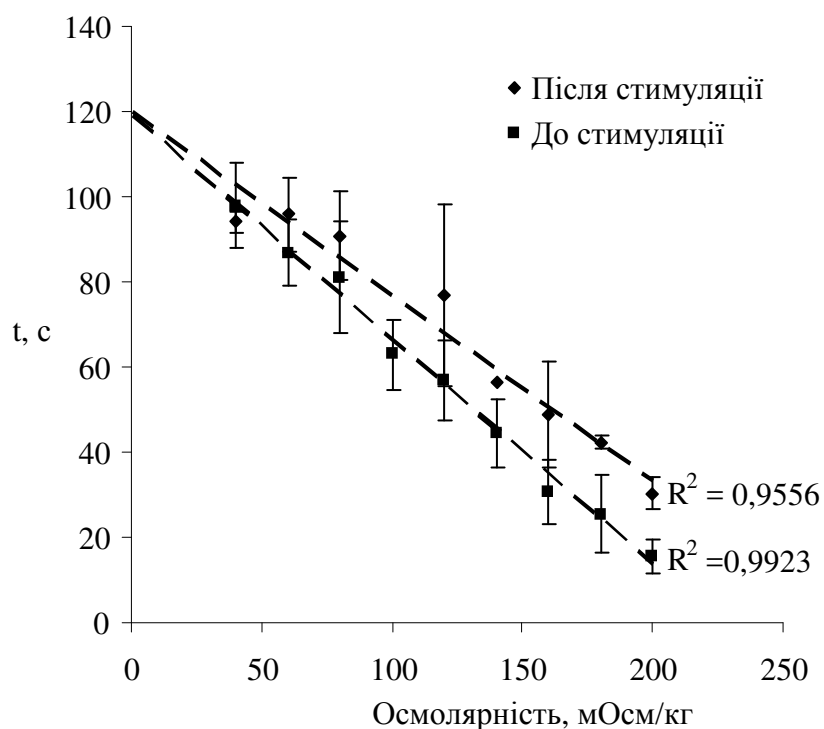


Рис. 4.15. Залежність характерного часу проникнення молекул води в сперматозоїди коропса від осмолярності позаклітинного середовища

Враховуючи, що в досліджуваному діапазоні отримана залежність близька до лінійної, можна зробити висновок, що зі зниженням осмотичності гіпотонічного середовища інкубації на кожні 10 мОсмоль/кг характерний час проникнення води в клітку збільшується на 5 с.

На рис. 4.16 представлено час руху сперматозоїдів, отриманих до і після гормональної стимуляції сперматогенезу. Як відомо, ініціація рухливості сперматозоїдів коропа відбувається при переміщенні їх в гіпотонічне середовище. Час рухливості клітин визначали в розчинах хлориду натрію осмолярністю 20, 40,...,180, 200 мОсмоль/кг і дистильованій воді та розраховували середнє значення.

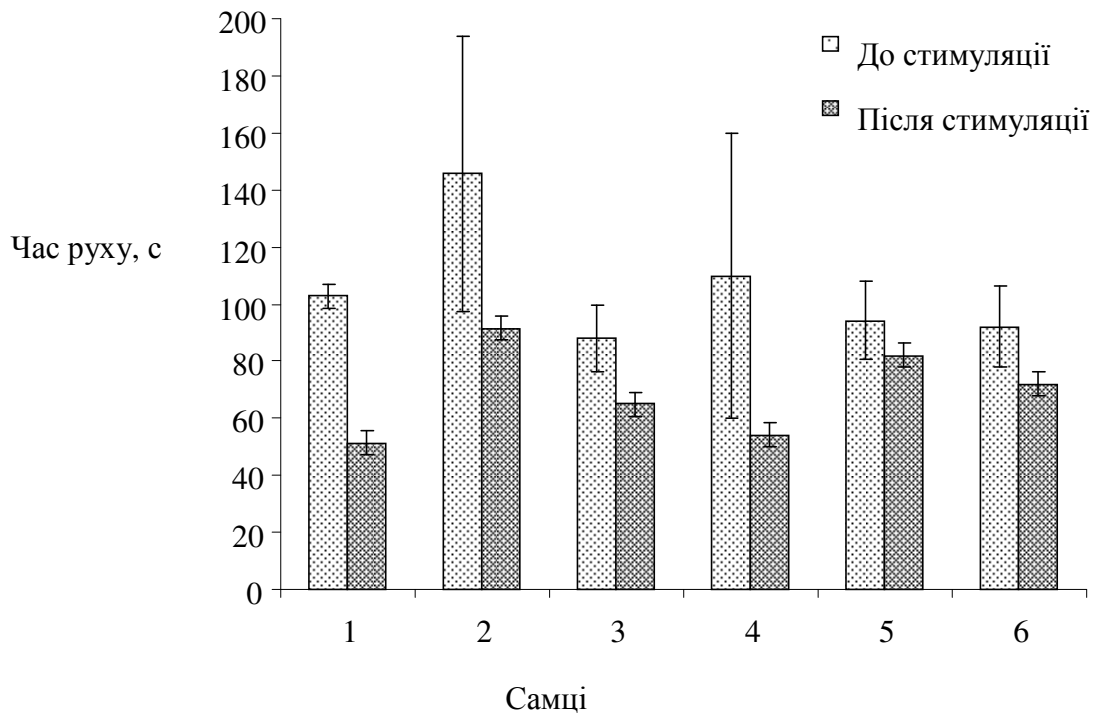


Рис. 4.16. Час руху сперматозоїдів, отриманих до і після гормональної стимуляції

Як впливає з отриманих результатів, час рухливості сперматозоїдів, отриманих після гормональної стимуляції, нижче, ніж в контролі. Як правило, спостерігається більший розкид значень часу рухливості сперматозоїдів, отриманих без гормональної стимуляції, тобто сперматозоїди

більш чутливі до осмотичності середовища активації і в діапазоні осмолярності 100-150 мОсмоль/кг є максимум часу рухливості, який в залежності від самця виражений більшою або меншою мірою [249].

Дані про характеристики сперми коропа наведені в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3

Вплив гіпофізарної стимуляції дозрівання на сперму коропа

|   |                                 | Сперма, отримана без<br>гормональної<br>стимуляції | Сперма, отримана<br>після гормональної<br>стимуляції |
|---|---------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1 | Концентрація сперми,<br>млрд/мл | 26,4±3,5                                           | 24,0±3,4                                             |
| 2 | Маса еякуляту, г                | 0,29±0,19*                                         | 1,76±1,25*                                           |
| 3 | Осмотична<br>резистентність, с  | 269±28                                             | 273±16                                               |
| 4 | Ширина розподілу, с             | 42,8±7,1*                                          | 52,6±8,9*                                            |
| 5 | Час руху сперматозоїдів, с      | 97±18*                                             | 68±14*                                               |
| 6 | Маса риб, кг                    | 0,96±0,20                                          |                                                      |

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

Про відсутність суттєвого впливу гормональних стимуляцій на осмотичну чутливість сперматозоїдів риб свідчать також дані про осмотичну резистентність сперматозоїдів білого товстолобика після стимуляції сумішшю метоклопрамід+сурфагон або стимуляції препаратом «Овопель».

На рис. 4.17 представлена залежність часу інкубації сперматозоїдів в дистильованій воді, при якому гине 50% клітин, від температури середовища інкубації. За температури середовища 22 °C витримка суспензії сперматозоїдів в дистилаті протягом 200–210 с призводила до лізису 50% сперматозоїдів. Пошкодження половини клітин в суспензії відбувалось вдвічі

швидше за температури 27–30 °С. Оскільки немає статистично значущих відмінностей  $T_{50}$  для сперматозоїдів товстолобика після ін'єкції препарату «Овопель» і суміші сурфагон + метоклопрамід, можна зробити висновок, що досліджувані клітини не розрізнялись за осмотичною резистентністю.

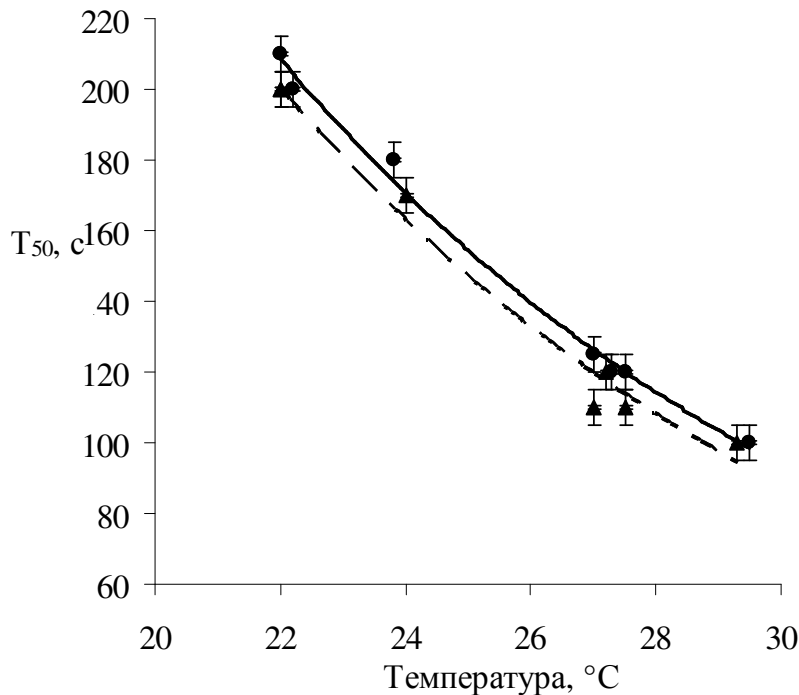


Рис. 4.17. Залежність часу інкубації сперматозоїдів товстолобика в дистильованій воді, при якому гине 50% клітин, від температури середовища інкубації після стимуляцію сумішшю сурфагон+метоклопрамід (●) або препаратом «Овопель» (▲)

Без гормональної стимуляції не вдалося отримати сперму, що обумовлює відсутність контролю. Проте однакова осмотична резистентність сперматозоїдів товстолобика після різної гормональної стимуляції непрямым чином підтверджує припущення про відсутність істотного впливу гормональної стимуляції як такової на осмотичну стійкість сперматозоїдів риб.



#### 4.5. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів риб до молекул води

##### 4.5.1. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води

Проникність плазматичних мембран до молекул води і кріопротекторів є важливим параметром для визначення швидкостей охолодження при кріоконсервуванні генетичного матеріалу риб [26]. На сьогоднішній день відомі лише окремі дослідження проникності мембран сперматозоїдів риб до води і кріопротекторів [27, 28]. Перш за все, це обумовлено специфікою цих клітин і відсутністю зручних методів, що дозволяють отримувати інформацію про осмотичні характеристики сперматозоїдів безпосередньо перед кріоконсервуванням та проводити дослідження за принципом розташування риб, в польових умовах [11, 29].

Застосування модифікованої фізико-математичної моделі Кедем – Качальського та спектрофотометричного методу для визначення осмотичної реакції сперматозоїдів риб дозволяє розрахувати коефіцієнт проникності мембран сперматозоїдів.

Якщо відома кінетика відносного об'єму клітини, то для розрахунку параметру проникності необхідне врахування морфометричних характеристик клітин. Припускаючи форму голівки сперматозоїда коропа сферичною та беручи середній радіус 1,3 мкм [32], поверхнево-об'ємне відношення клітини  $\gamma$  складає  $2,3 \text{ мкм}^{-1}$ .

Розрахована згідно з цією моделлю проникність мембран сперматозоїдів коропа до молекул води за  $20^\circ\text{C}$  становить  $3,05 \pm 0,40 \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$ .

Як відомо, проникність мембран є функцією від температури, тому, варіюючи температуру середовища інкубації сперматозоїдів при фіксованій осмолярності, ми отримали температурну залежність проникності мембран сперматозоїдів коропа для молекул води. Її зниження в діапазоні температур  $35\text{-}15^\circ\text{C}$  характеризується енергією активації  $53,9 \pm 3,8 \text{ кДж/моль}$ .

Час експозиції сперматозоїдів коропа в дистильованій воді, при якому пошкоджувалося 50% клітин (осмотична резистентність), становить  $273 \pm 21$  с ( $n=12$ ,  $p<0,05$ ) за температури води  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Оскільки зі зниженням температури проникність клітинних мембран зменшується, і швидкість притоку позаклітинної води в сперматозоїди також знижується, пошкодження переважного числа клітин відбувається при більшій тривалості інкубації. Так, за нашими даними, під час інкубації клітин в середовищі з температурою  $24\ldots 25^{\circ}\text{C}$  пошкодження сперматозоїдів відбувалося через 150-160 с після початку інкубації, в той час як у середовищі з температурою  $8\ldots 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  – через 550-600 с. Дані свідчать на користь того, що еквілібрацію сперми коропа з кріозахисними середовищами, слід проводити за більш низьких температур з метою запобігання осмотичного шоку на даному етапі процесу кріоконсервування.

Температурна залежність коефіцієнта проникності мембран є не тільки загальнобіологічною властивістю мембран, але й підходом до опису властивостей мембран сперматозоїдів риб, що відносяться до різних видів, мають різні умови проживання, температури природного нересту і т. п.

#### 4.5.2. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів щуки до молекул води

Відомі лише окремі дослідження з кріоконсервування сперми щуки [250, 251], і останні роботи свідчать про можливість активації рухливості близько 70% сперматозоїдів після відігріву та 80% запліднення ікри кріоконсервованою спермою під захистом глюкози та метанолу. Автори [250] також зазначають, що отримані результати запліднення кріоконсервованою спермою близькі до контролю, акцентуючи на тому, що це перша робота зі спермою щуки, де отримані високі результати збереження клітин після їх кріоконсервування. Однак, порівнюючи збереження сперматозоїдів щуки зі спермою сига після кріоконсервування під захистом того ж середовища, до складу якого входять глюкоза та метанол, автори констатують на 20% нижчу

виживаність сперми лососевих та пояснюють різну чутливість клітин видоспецифічністю; з'ясування ж механізмів потребує подальших досліджень.

Наші спроби кріоконсервування сперми щуки за програмою та з середовищем, що містить ЕГ у якості кріопротектора [236], не мали успіху. В окремих випадках спостерігали поодинокі клітини, що рухалися в активуючих середовищах після відігрівання. Вочевидь, ефективність використання метанолу як кріопротектора порівняно з ЕГ може бути пояснена його вдвічі меншою молекулярною масою та іншими параметрами, що обумовлюють проникання до клітин. Все це вказує на важливість осмотичного фактора під час кріоконсервування. Отже, вивчення осмотичної резистентності і транспортних характеристик мембран сперматозоїдів щуки є актуальним та обґрунтованим.

Застосування методики фотометричного аналізу дозволяє дослідження осмотичної резистентності та проникності мембран сперматозоїдів щуки. Залежність характерного часу проникнення молекул води в сперматозоїди щуки від осмолярності позаклітинного середовища представлена на рис. 4.18.

Як впливає з рис. 4.18, характерний час проникнення води до сперматозоїдів щуки складає близько 40-50 с при інкубації клітин в гіпотонічному розчині непроникної речовини осмолярністю 100-200 мОсмоль/кг (за температури +12°C). При зниженні осмолярності середовища інкубації, характерний час проникнення молекул води до сперматозоїдів збільшується, тобто в цих умовах клітина зазнає більшої зміни об'єму. Відповідна залежність характерного часу проникнення води в клітину від осмолярності середовища інкубації вказує на те, що сперматозоїди щуки по реакції на середовища різної осмолярності близькі до «ідеальних осмометрів».

Проникність мембран сперматозоїдів щуки до молекул води становить  $5,43 \pm 1,15 \times 10^{-15} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$  (12°C).

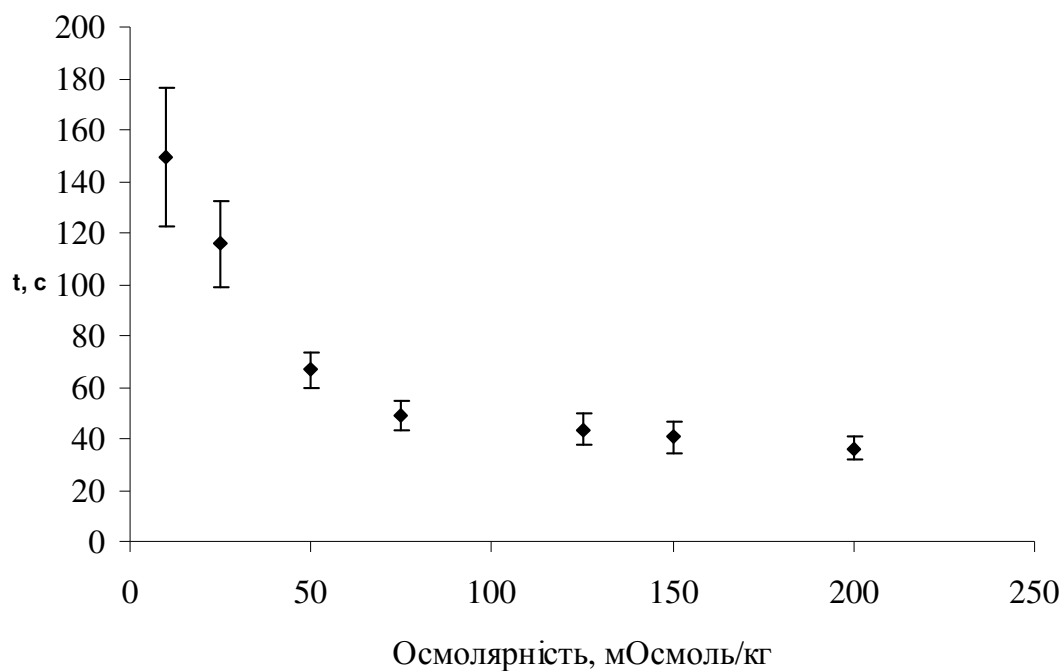


Рис. 4.18. Залежність характерного часу проникнення молекул води в сперматозоїди щуки від осмолярності позаклітинного середовища (за температури  $+12^{\circ}\text{C}$ )

Зниження проникності мембран сперматозоїдів для молекул води в діапазоні  $25\ldots 10^{\circ}\text{C}$  характеризується енергією активації переносу води, що дорівнює  $64 \pm 5$  кДж/моль (рис. 4.19).

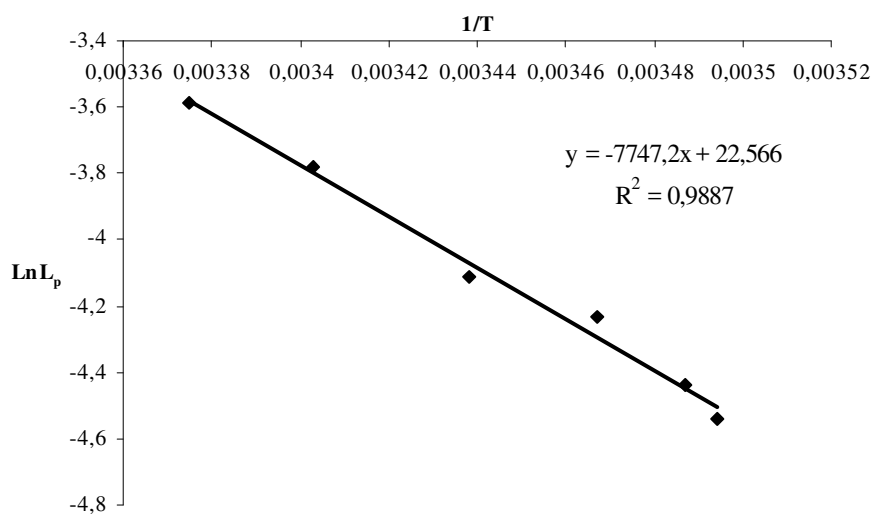


Рис. 4.19. Типова Ареніусова залежність коефіцієнту проникності плазматичних мембран сперматозоїдів щуки

Таке значення  $E_a$  свідчить про проникнення води в клітину шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар.

Гіпоосмотична резистентність сперматозоїдів щуки, яку визначали як час лізису 50% інкубованих в дистилаті клітин, становить 70...110 с ( $12^{\circ}\text{C}$ ).

4.5.3. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів стерляді до молекул води

Раніше повідомлялось [160], що протягом періоду руху сперматозоїдів стерляді їхній клітинний об'єм не змінюється. На підставі цього авторами передбачалося, що мембрани сперматозоїдів стерляді практично не мають аквапоринів і вода повільно проникає через мембрану шляхом дифузії.

Для вимірювання проникності мембран сперматозоїдів стерляді фотометричним способом, нам було необхідним враховувати специфічні відмінності сперми стерляді від сперми коропових, для яких було розроблено зазначений метод. До цих відмінностей, зокрема, можна віднести:

1) Більш низьку в порівнянні з короповими рибами осмолярність сім'яної рідини, що визначає осмолярність середовища інкубації – а саме низькоосмотичні сольові середовища, або дистилат. Якщо для коропа осмотичність сім'яної плазми, як правило, становить 250-300 мОсмоль/кг, то для сперматозоїдів стерляді – близько 100-150 мОсмоль/кг, і в окремих випадках ще нижче [16].

2) Різну форму сперматозоїдів, яка може вносити обмеження до використання прийнятої в основі способу фізико-математичної моделі. Проте для зміни світлопропускання суспензії розсіюючих частинок відповідного розміру характерна незначна чутливість до їх форми [247].

3) Істотно більш низьку концентрацію сперми стерляді (0,5-2 млрд/мл) порівняно з короповими рибами (10-30 млрд/мл). Виходячи з цього, відношення сперми до середовища інкубації (V/V) в разі сперми стерляді було істотно вище: якщо у випадку коропових риб сперма становить 1-2%, то для стерляді це 15-20%.

4) Концентрацію сперми, що сильно варіює між різними еякулятами. Для кожного вимірювання була підібрана така концентрація сперми, яка б призводила до найбільшого сигналу (рис. 4.20).

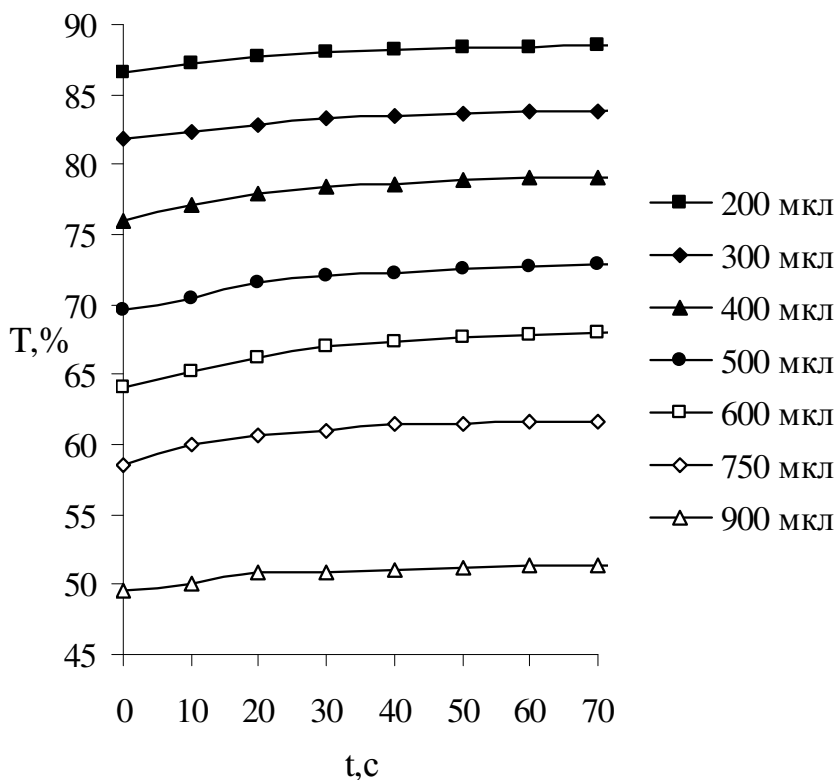


Рис. 4.20. Кінетика світлопропускання суспензії сперматозоїдів стерляді у водному розчині NaCl осмолярністю 10 мОсоль/кг в залежності від об'єму інкубованої сперми (16 °C)

Результати проведеного нами дослідження свідчать на користь того, що в гіпотонічних умовах відбувається збільшення об'єму сперматозоїдів стерляді за рахунок проникаючих всередину молекул води, що дозволяє визначити проникність мембран сперматозоїдів фотометричним способом. Отримана залежність  $L_p$  від температури середовища інкубації в інтервалі температур +10...30 °C. За температури 15 °C  $L_p$  становить близько  $3,52 \pm 0,49 \times 10^{-13} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$ . Зниження проникності мембран сперматозоїдів стерляді для молекул води в діапазоні 30...10 °C характеризується енергією активації переносу води, що дорівнює  $74 \pm 17 \text{ кДж/моль}$

#### 4.5.4. Проникність мембран сперматозоїдів риб до молекул води: порівняльний аналіз

Нами була визначена проникність до води мембран сперматозоїдів риб, достатньо далеких за таксономією в межах класу, – коропа, щуки та стерляді.

Вочевидь, відносна зміна об'єму сперматозоїдів стерляді менше, ніж сперматозоїдів коропа в ідентичних умовах. На це вказують результати попередніх робіт та наші дані, згідно з якими відносна зміна світлопропускання при інкубації сперми стерляді навіть у однаковій концентрації в порівнянні зі спермою коропа, істотно менша. Однак час встановлення рівноважного значення об'єму сперматозоїдів стерляді менший, що свідчить про більш високу проникність для молекул води (рис. 4.21).

В цілому значення коефіцієнтів проникності досліджених видів риб суттєво відрізняються, утворюючи таку послідовність щука – короп – стерлядь,  $1,13 \pm 0,24 \times 10^{-14}$  м<sup>3</sup>/Н·с,  $3,05 \pm 0,40 \times 10^{-14}$  м<sup>3</sup>/Н·с та  $5,96 \pm 0,83 \times 10^{-13}$  м<sup>3</sup>/Н·с (20 °С) відповідно (таблиця 4.4).

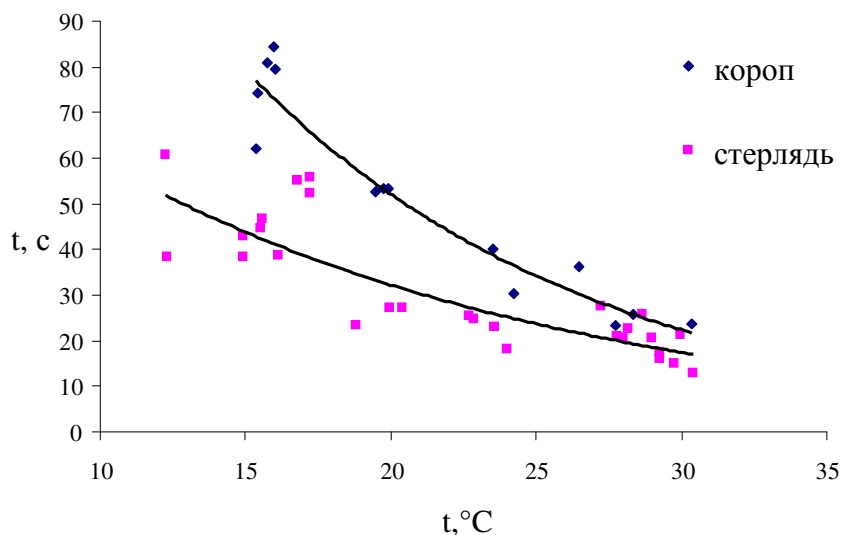


Рис. 4.21. Залежність характерного часу проникнення молекул води в сперматозоїди коропа та стерляді від температури інкубації сперматозоїдів у водних розчинах NaCl 100 мОсмоль/кг (короп) та 10 мОсмоль/кг (стерлядь)

Таблиця 4.4

Деякі характеристики сперми щуки, коропа і стерляді

| Параметр:                                                                          | Щука<br>( <i>Esox lucius L.</i> )       | Стерлядь<br>( <i>Acipenser<br/>ruthenus L.</i> ) | Короп<br>( <i>Cyprinus carpio<br/>L.</i> ) |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Осмолярність<br>сім'яної рідини,<br>мОсмоль/кг                                     | 250 – 350                               | 50 – 100                                         | 250 – 300                                  |
| Форма головки                                                                      | Кулеподібна                             | Продовгувата                                     | Кулеподібна                                |
| Розмір головки:<br>ширина, мкм<br>довжина, мкм                                     | 1,3 – 1,4<br>1,5 – 1,6                  | 1,5 – 1,8<br>6 – 7                               | 2,4 – 2,6<br>2,8 – 3,0                     |
| Поверхнево-об'ємне<br>відношення ( $\gamma$ ), мкм <sup>-1</sup>                   | 4,2±0,2                                 | 2,95±0,3                                         | 2,25±0,3                                   |
| Концентрація<br>сперматозоїдів,<br>млрд./мл                                        | 7 – 22                                  | 0,5 – 2                                          | 10 – 20                                    |
| Температура<br>нересту, °С                                                         | 4 – 13                                  | 11–16                                            | 18 – 22                                    |
| Коефіцієнт<br>проникності мембран<br>за температур нересту,<br>м <sup>3</sup> /Н·с | 5,43±1,15 ×10 <sup>-15</sup><br>(12 °С) | 3,52±0,49 ×10 <sup>-13</sup><br>(15 °С)          | 3,05±0,40 ×10 <sup>-14</sup><br>(20 °С)    |
| Коефіцієнт<br>проникності мембран<br>за 20 °С, м <sup>3</sup> /Н·с                 | 1,13±0,24×10 <sup>-14</sup>             | 5,96±0,83×10 <sup>-13</sup>                      | 3,05±0,40 ×10 <sup>-14</sup>               |
| Енергія активації<br>переносу води,<br>кДж/моль                                    | 64±5 <sup>a</sup>                       | 74±17 <sup>a</sup>                               | 53,9±3,8 <sup>b</sup>                      |



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

Для коропа, як прісноводного виду риб, встановлене значення коефіцієнта проникності плазматичних мембран до молекул води, яке у декілька разів менше порівняно з відповідним показником сперматозоїдів людини або бика [26], може пояснюватися видоспецифічною властивістю підтримки сталості внутрішньоклітинної середовища. Оскільки запліднення відбувається в прісній воді, сперматозоїди коропа, як слід очікувати, повинні бути еволюційно пристосовані до перепаду осмотичності під час їх виділення із сім'яного каналу і перебуванню в низькоосмотичному середовищі. Крім порівняно погано проникних для води мембран, сперматозоїдам коропа властива невелика тривалість їх руху.

Неминучість впливу фізичного процесу проникнення розчинника через напівпроникну клітинну мембрану, що веде до надмірного набухання клітини і пошкодження мембранного апарату, з одного боку, і необхідність передачі генетичної інформації в процесі запліднення, вимагає можливості цілеспрямованого розриву мембрани сперматозоїда, з іншого боку, як протиріччя, призвели до того, що сперматозоїд повинен бути як можна менш проникним для води і при цьому здатним виконати свою основну функцію.

Ймовірно, неможливість зменшення проникності мембран за рахунок більш щільної упаковки ліпідів, що їх утворюють, і неможливість підвищення міцності є однією з причин невеликої тривалості руху сперматозоїдів деяких видів риб, що нерестяться в прісній воді. Час руху, як одна з важливих функціональних характеристик сперматозоїда, біологічно обмежений його здатністю протистояти осмотичному тиску через мембрану і підтримувати свою цілісність і збереження генетичної інформації. Крім структурних особливостей, сумарна проникність клітинної мембрани для води визначається також активним транспортом речовин, що впливає на

внутрішньоклітинну осмотичність. Однак можливості цього захисного засобу також обмежені, і при попаданні клітин у воду з невеликим вмістом субстратів, в результаті надмірного набухання сперматозоїдів, їхні мембрани, тим не менш, пошкоджуються.

Проникність мембран сперматозоїдів є одним з основних факторів, що визначають їх кріорезистентність. Більш низькі значення проникності мембран сперматозоїдів риб у порівнянні з ссавцями асоціюються з їх меншим збереженням в результаті низькотемпературних впливів. Було показано, що короткочасна експозиція сперматозоїдів коропа в гіпотонічному середовищі перед додаванням кріозахисного середовища збільшує ефективність кріоконсервування за рахунок підвищення проникності мембран сперматозоїдів.

В роботі [252] для підвищення проникності мембран застосовувався метод електростимуляції, що також призводило до збільшення виживаності спермій севрюги на 30%.

Враховуючи, що виживання сперматозоїдів коропа після відігріву зазвичай не перевищує 30-60% в залежності від умов кріоконсервування, в той час як виживання сперматозоїдів стерляді може досягати 100%, а також зважаючи на низький рівень збереження сперми щуки в середовищах з ЕГ, можна припустити, що проникність мембран може бути однією з причин, що визначають кріорезистентність сперматозоїдів риб.

Безумовно, цілеспрямований підбір протоколу кріоконсервування може призвести до більшого збереження клітин (наприклад, застосування Ме порівняно з ЕГ для сперми щуки). Такі дані як проникність мембран до води і кріопротекторів є певними характеристиками сперматозоїдів того чи іншого виду риб.

4.6. Зміна проникності мембран клітин для води у присутності лікарських речовин

Дослідження взаємодії активних фармацевтичних інгредієнтів/ фармацевтичних препаратів (АФІ/ФП) з мембранами сперматозоїдів коропа має декілька переваг.

Взаємодія АФІ/ФП з ліпідними мембранами, що відбивається на зміні їх калориметричних та спектроскопічних параметрів, може також проявлятися у зміні проникності мембран до води. Цей ефект можна спостерігати *in vitro* на клітинах, у мембранах яких відсутні аквапоріни, і, отже, транспорт води відбувається шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар. У даній роботі була застосована методика, де в якості модельних клітин використовувалися сперматозоїди коропа. Отже, по-перше, сперматозоїди коропа розглядаються як модельний об'єкт для досліджень змін проникності плазматичних мембран до води.

По-друге, модифікація мембран сперматозоїдів мембранотропними препаратами, яка призводить до змін їхньої проникності, може бути використана в процесі кріоконсервування на етапі підготовки сперми задля забезпечення оптимального результату. Тобто через зміну проникності мембран можна корегувати резистентність мембран до факторів кріоконсервування.

Оскільки це є новим окремим напрямом досліджень, доречно навести деякі поточні результати з дослідження впливу аміксину та фенібуту на мембрани сперматозоїдів коропа.

Як можна бачити (рис. 4.22), в присутності аміксину спостерігається зниження енергії активації процесу перенесення води через мембрану ( $E_a$ ) на ~ 40%, що добре корелює зі зниженням температури плавлення модельних мембран ( $\Delta T_m$ ). Введення фенібута в суспензію сперматозоїдів коропа призводить до зниження  $E_a$  на ~ 25%. Така зміна проникності може бути обумовлена підвищенням латеральної неоднорідності мембрани внаслідок утворення доменів різної щільності.

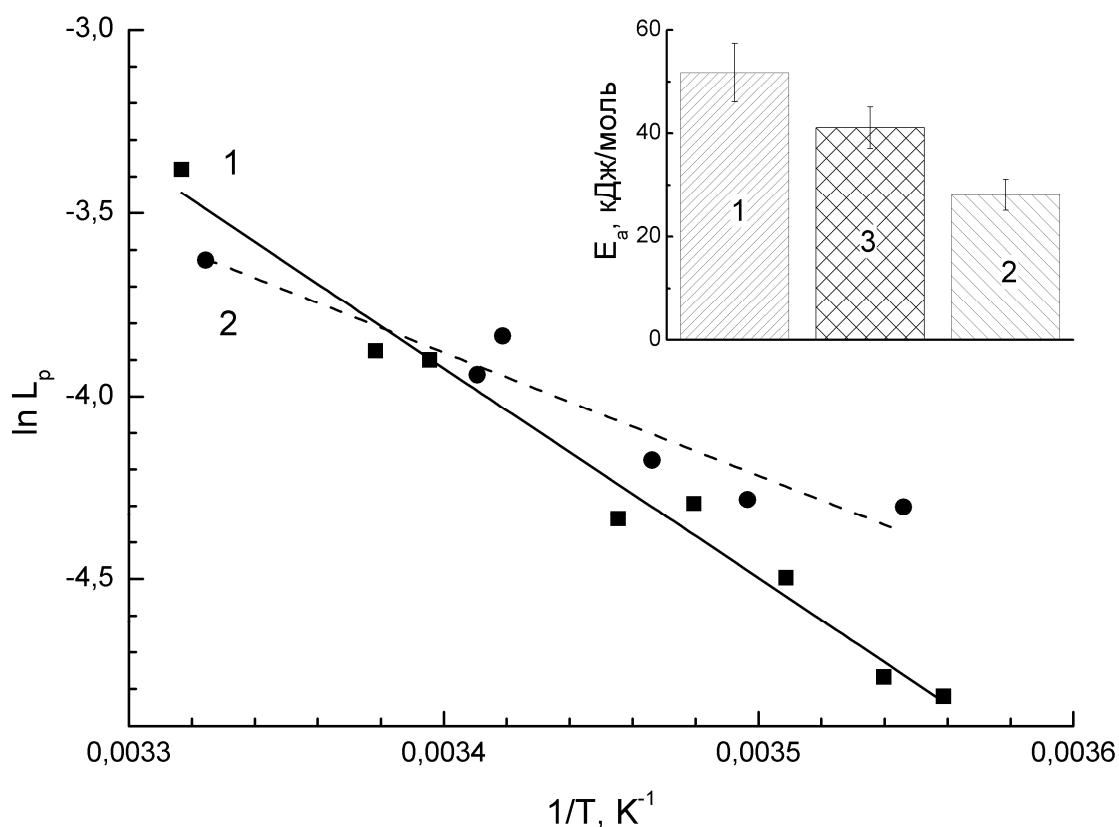


Рис. 4.22. Проникність клітинної мембрани сперматозоїдів коропа для води ( $L_p$ ) і значення енергії активації перенесення води через ліпідну мембрану ( $E_a$ ) в чистому фізіологічному розчині (1), при додаванні 5 мас. % аміксину (2) або фенібута (3)

Таким чином, продемонстрована можливість модифікації клітинних мембран мембранотропними агентами, з одного боку, та можливість використання сперматозоїдів коропа як модельних клітин для досліджень взаємодії АФІ/ФП з ліпідними мембранами *in vitro*.

Матеріали розділу IV опубліковані в роботах [49–61, 63–77].

## РОЗДІЛ 5.

ДОСЛІДЖЕННЯ ОСМОТИЧНОЇ РЕАКЦІЇ СПЕРМАТОЗОЇДІВ  
ПРІСНОВОДНИХ РИБ НА ОКРЕМИХ ЕТАПАХ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

## 5.1. Вплив часу зберігання сперми до кріоконсервування на осмотичну реакцію сперматозоїдів коропа

Оскільки проміжок часу від моменту отримання еякуляту до кріоконсервування сперми може складати від декількох хвилин до годин, то його можна розглядати як фактор, що може завдавати суттєвого впливу на осмотичну резистентність сперматозоїдів. Час руху сперматозоїдів, якщо їх активувати через 8 годин, менший, аніж час руху сперматозоїдів, активованих відразу ж після отримання еякуляту або через значно менший час (протягом однієї години). Для часу руху сперматозоїдів коропа характерна Л-подібна залежність від осмолярності середовища активації з максимумом в області 100-200 мОсмоль/кг (рис. 5.1).

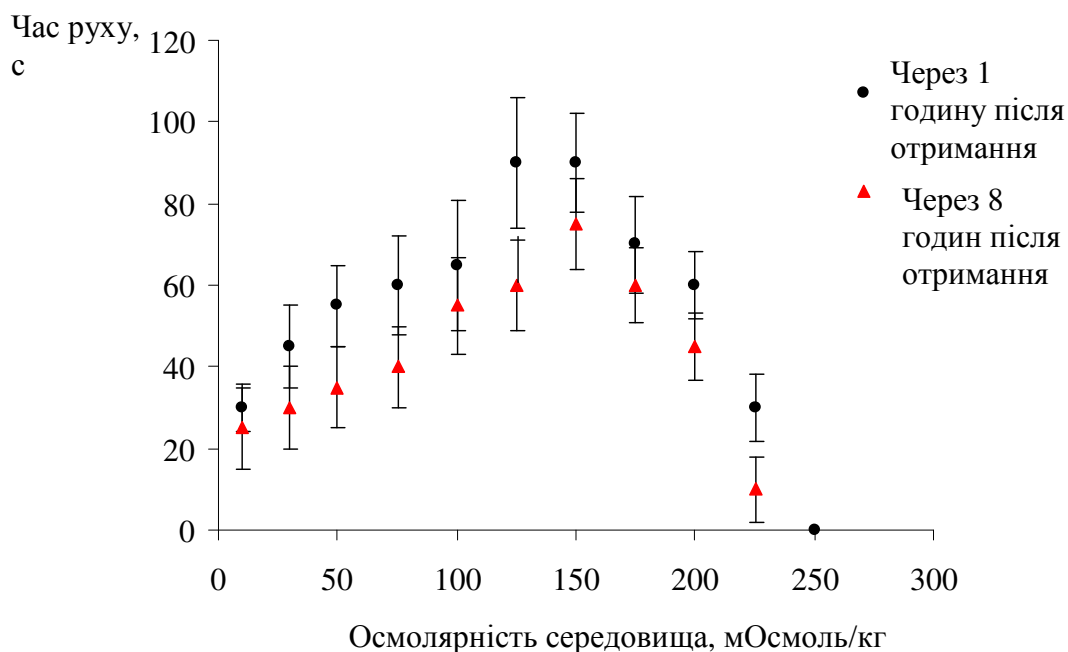


Рис. 5.1. Час руху сперматозоїдів коропа, активованих через 1 та 8 годин після отримання еякуляту (n=6)

Зменшення часу руху в низькоосмотичних середовищах пов'язують із більшим ступенем набухання клітин у цих розчинах [141, 160].

У проведеному експерименті коефіцієнт проникності мембран до молекул води через 8 годин після отримання сперми збільшився і становив відповідно  $4,5 \pm 0,5 \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$  ( $20^\circ \text{C}$ ) проти  $3,2 \pm 0,5 \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$ , який був визначений через 1 годину після отримання еякуляту. Це є непрямим підтвердженням того, що клітини із часом стають більш чутливими до змін осмотичного тиску, тобто їх мембрани стають менш резистентними.

Цілком природно, що кріоконсервування сперми за описаної в підрозділі 2.3 методикою, після 8-годинної попередньої витримки сперми призвело до значно гіршого результату:  $10 \pm 5\%$  проти  $42 \pm 12\%$  ( $n=6$ ), що було отримано протягом однієї години після отримання еякуляту (таблиця 5.1). Оцінка ефективності кріоконсервування проводилась за ступенем рухливості відігрітих сперматозоїдів. Позначені різними літерами значення статистично значущі відмінності,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ .

Таблиця 5.1

Вплив часу зберігання сперми коропа на ефективність її кріоконсервування

|                                                | Кріоконсервування<br>через 1 год. після отримання |             | Кріоконсервування через<br>8 год. після отримання |             |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------|-------------|
|                                                | Ступінь<br>рухливості, %                          | Час руху, с | Ступінь<br>рухливості, %                          | Час руху, с |
| Нативна сперма                                 | $95 \pm 5^a$                                      | $92 \pm 13$ | $50 \pm 6^b$                                      | $76 \pm 10$ |
| Після додавання<br>кріозахисного<br>середовища | $92 \pm 5^a$                                      | $90 \pm 15$ | $40 \pm 9^b$                                      | $68 \pm 12$ |
| Після кріо-<br>консервування                   | $42 \pm 12^b$                                     | $65 \pm 10$ | $10 \pm 5^c$                                      | $25 \pm 15$ |

## 5.2. Проникність мембран сперматозоїдів коропа до кріопротекторів

При розробці методів кріоконсервування пошук оптимальних рішень доцільно виконувати на основі експериментально-теоретичного підходу із застосуванням модифікованої фізико-математичної моделі Кедем-Качальського [253]. Такий підхід направлений на оптимізацію процесів масопереносу в системі «клітина-навколишнє середовище» в ході консервування і потребує конкретизації даних про склад поза- і внутрішньоклітинного середовища, морфометричні параметри клітин, проникність та її температурну залежність.

В таблиці 5.2 наведені розраховані коефіцієнти проникності плазматичних мембран сперматозоїдів коропа для досліджуваних кріопротекторів за температури 20°C та відповідні енергії активації їх проникності.

Таблиця 5.2

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

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

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

Зазначені кріопротектори обрані для дослідження через те, що вони найчастіше використовуються для кріоконсервування сперми риб [10]. Розраховані значення  $E_a$  для 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 канальний механізм (полегшену дифузію) [254].

Значно більш низьку енергію активації перенесення гліцерину порівняно з іншими кріопротекторами також відзначали у роботі [255]. Повідомлялося [180], що гліцерин не запобігає дегідратації клітин, викликаній охолодженням, однак швидкість дегідратації в присутності гліцерину була меншою.

### 5.3. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води на окремих етапах кріоконсервування

Дослідження збереження сперми, охолодженої до різних температур і відігрітої відповідно до стандартних режимів, дозволяє визначити критичні температурні діапазони, в яких гине частина сперматозоїдів і сприяє розробці найбільш підходящих для сперми того чи іншого виду риб режимів кріоконсервування.

Експеримент виконували як описано в підрозділі 2.7.

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 (до  $20$  °C) ми не виявили значущих змін коефіцієнта проникності мембран клітин для води (рис. 5.2). Сперматозоїди, що були охолоджені до  $-100$  °C і відігріті, мали значимо більший порівняно з контролем коефіцієнт проникності мембран для молекул води.

Зміни проникності клітин для води можуть виникати внаслідок механічного пошкодження клітин і зміни динамічної структури мембран сперматозоїдів.



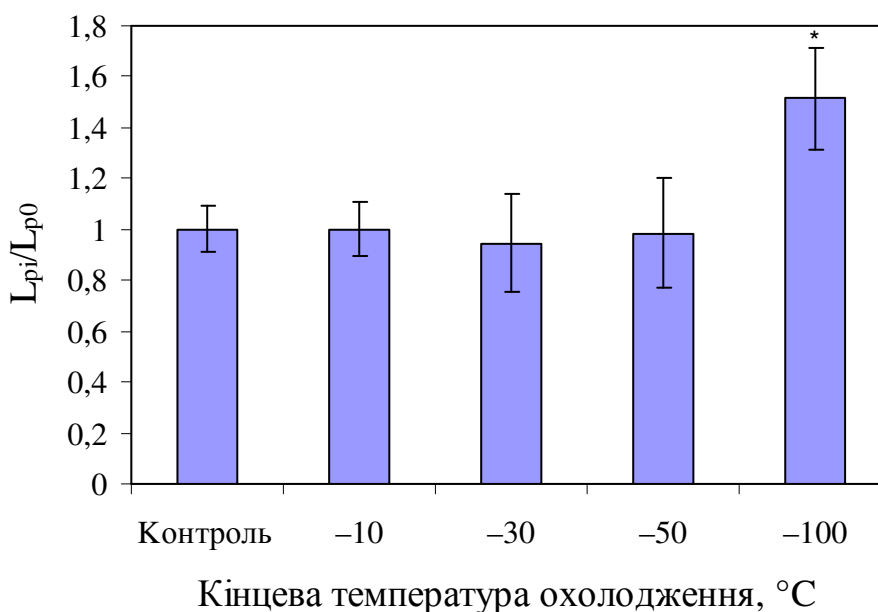


Рис. 5.2. Зміна проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води після охолодження – відігріву в порівнянні з контролем (n=6). Наведено середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення.  $L_{p0}$ ,  $L_{pi}$  – коефіцієнти проникності в контролі та досліді відповідно. \* – відмінність статистично значуща по відношенню до контролю,  $p < 0,05$ ,  $n=6$

Рівень рухливості сперматозоїдів, охолоджених до  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  і відігрітих, значуще не відрізняється від такого в контролі. Зазначена кінцева температура охолодження обрана у зв'язку з тим, що при цій температурі ще не відбулася кристалізація. Охолодження до температури  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  і подальший відігрів призвели до статистично значущого зниження кількості клітин, що рухаються, на 20% в порівнянні з контролем (рис. 5.3).

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 рівень рухливості сперматозоїдів не змінювався і сягав 60%, що свідчить про те, що режим охолодження-відігрівання у відповідному температурному діапазоні не чинить негативного впливу на клітини.

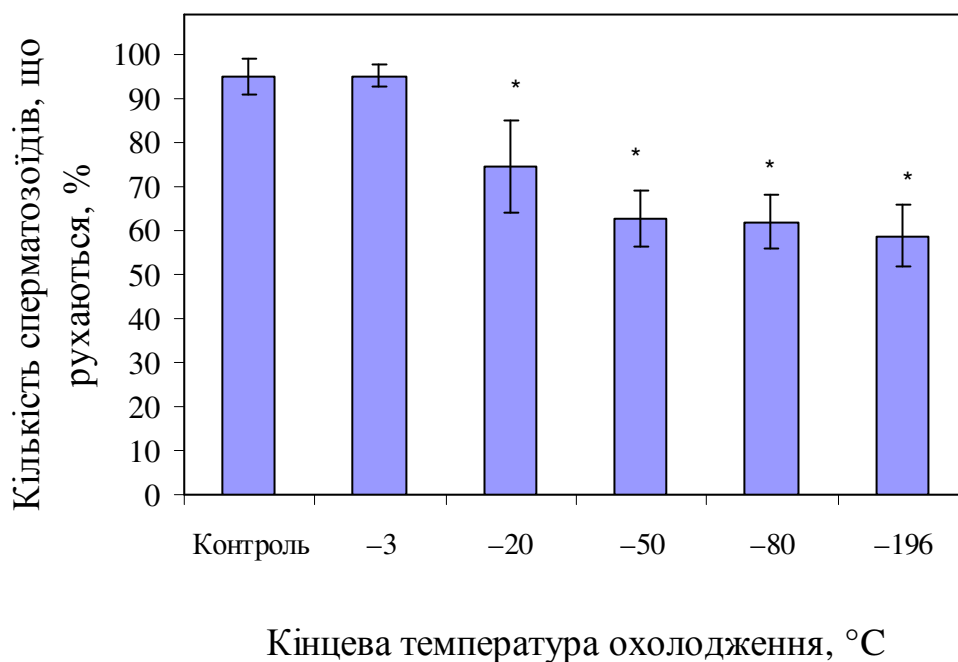


Рис. 5.3. Зміна рухливості сперматозоїдів коропа після охолодження – відігріву в порівнянні з контролем (n=6). Наведено середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення. \* – відмінність статистично значуща по відношенню до контролю,  $p < 0,05$ , n=6

5.4. Дослідження проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води після повного циклу кріоконсервування

Сперматозоїди коропа після їх кріоконсервування за описаним у розділі 2.3 режимом мали вдвічі більшу проникність мембран до води (рис. 5.4) порівняно з контролем. При активації цієї сперми рухалося 20-30% клітин, що в 2-3 рази менше, ніж до кріоконсервування.

При наступних вимірах коефіцієнту проникності мембран сперматозоїдів до молекул води через кожні 5 хв після відігрівання були встановлені ще більші його зміни. Сперма весь час після відігрівання перебувала за температури +24 °C.

Таким чином, результати цього експерименту свідчать про можливість значних пошкоджень мембран сперматозоїдів на різних етапах кріоконсервування.

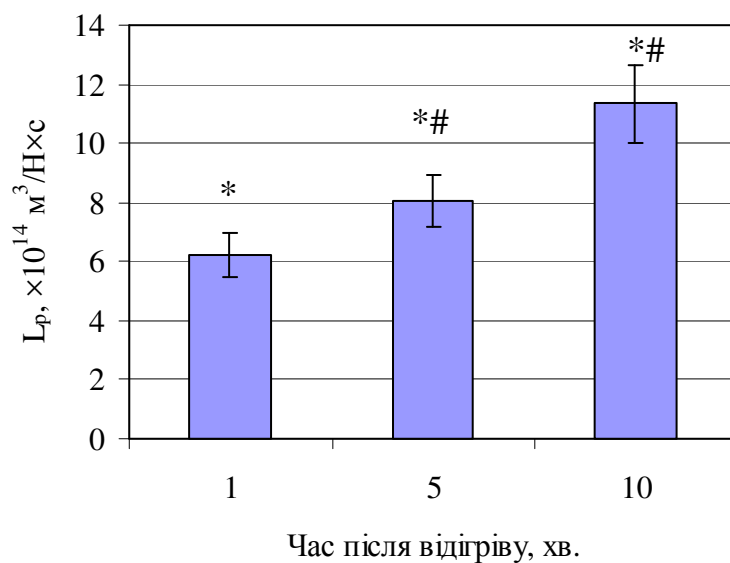


Рис. 5.4. Зміна проникності мембран сперматозоїдів коропа до молекул води після кріоконсервування. Дані представлені як середнє значення  $\pm$  С.В.

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

Отримані результати можуть свідчити про те, що сперматозоїди коропа в процесі їх зберігання до охолодження, а також на етапах кріоконсервування та оцінки їх якості, поступово втрачають свій енергетичний потенціал і стають менш здатними контролювати зміни свого об'єму. Такий висновок підтверджують дані [159], які показують, що в спермі коропа в процесі зберігання до кріоконсервування зростає осмотична концентрація її плазми, тому що сперматозоїди втрачають іони  $K^+$ , що позначається на їх трансмембранному потенціалі.

### 5.5. Оптимізація умов кріоконсервування сперми стерляді (*Acipenser ruthenus*, L. 1758)

Головним завданням робіт щодо кріоконсервування сперми рідкісних та зникаючих видів риб є підвищення ефективності методів кріоконсервування, тобто збереження рухливості та запліднюючої здатності відігрітих сперматозоїдів. Підвищення кріозахисту сперми можливе шляхом введення до кріозахисного розчину антифризів риб або сироватки крові карася, у якого в зимовий період під час адаптації до навколишньої температури середовища збільшується кількість вільних амінокислот [256]. Крім того, для зменшення селективної дії екстремальних чинників необхідно також визначитись з оптимальною осмотичністю кріозахисного середовища, кращим кріопротектором та способом заморожування сперми.

Відомо, що результат кріоконсервування сперми риб залежить від правильного підбору складових компонентів кріозахисного розчину. Головною вимогою до кріозахисного розчину є збереження специфічної функціональної повноцінності біологічного об'єкту за мінімального токсичного впливу компонентів [257]. Підбір оптимального компонентного складу кріозахисного розчину забезпечить зберігання високих показників якості сперми, що, в свою чергу, є необхідною умовою отримання життєстійкого потомства для потреб товарної аквакультури та відновлення чисельності осетрових у природних водоймах.

Кріоконсервування сперми стерляді проводили у гранулах об'ємом 100 мкл. В якості модифікаторів кріозахисних середовищ використовували креатин, фруктозу та плазму крові карася сріблястого (*Carassius gibelio*), який пройшов природну холодову аклімацію. Заморожування сперматозоїдів стерляді виконували з використанням двох кріозахисних середовищ, склад яких наведено в підрозділі 2.3.1.

Частка сперматозоїдів з прямолінійно-поступальним рухом знаходилася на рівні 95 – 100%.

У розведених кріозахисними середовищами №1 та №2 спермі рухливість сперматозоїдів становила відповідно 95 та 80-85%. Зниження якості сперми, розведеної середовищем №2, пов'язане, головним чином, зі збільшенням осмотичності кріозахисного розчину. Це пов'язано з подвійною концентрацією креатину у порівнянні з середовищем №1. Після відігрівання показник рухливості сперматозоїдів знизився до 75-80% в обох розчинах.

Вплив осмотичного тиску проявився і у разі запліднення ікри, знизивши його показники. Так, розвиток ікри, заплідненої спермою, розведеною кріозахисним розчином №1, на стадії 4-х бластомерів проходив на рівні з контролем. Ікра, що запліднена спермою, кріоконсервованою у кріорозчині №2, характеризувалася нижчими показниками ембріонального розвитку порівняно із контролем та середовищем №1. Аналогічні дані отримані після перевірки ікри через 22-24 год після запліднення під час визначення кількості ембріонів, що розвиваються (таблиця 5.3).

Таблиця 5.3

Запліднення ікри та кількість ембріонів, що розвиваються,  
у варіантах досліду,  $M \pm m$ .

| Показник                          | Контроль       | Середовище №1  | Середовище №2  |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Запліднення ікри, %               | $87,6 \pm 0,2$ | $85,6 \pm 3,6$ | $68,0 \pm 7,1$ |
| Ембріони, що розвиваються, %      | $79,8 \pm 0,5$ | $77,0 \pm 3,9$ | $60,5 \pm 8,9$ |
| Вихід передличинок з інкубації, % | $68,7 \pm 0,6$ | $63,2 \pm 6,1$ | $47,3 \pm 7,2$ |

Показники виходу передличинок з ікри, заплідненої спермою, кріоконсервованою у розчині №1, були фактично рівними показнику контрольної партії. У разі використання сперми, замороженої у кріозахисному розчині №2, вихід передличинок з інкубаційних апаратів був нижчий на 21% порівняно з контролем. Зниження показника запліднюючої здатності сперміїв та виходу передличинок можна пояснити вищою

осмотичністю середовища за рахунок більшої концентрації креатину та його накопиченням у сперматозоїдах внаслідок збільшення проникності їхніх мембран.

Аналізуючи результати запліднення ікри спермою, замороженою в кріозахисному розчині №1, та вплив даного компонентного розчину на статеві клітини самців, можна зробити висновок про кращий захист сперматозоїдів від впливу екстремальних факторів кріоконсервування у вищезгаданому розчині.

Матеріали розділу V опубліковані в роботах [51, 62, 64, 66, 76–81].

## АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дослідження впливу фізико-хімічних факторів, що діють на різних етапах кріоконсервування, на морфологічні і функціональні характеристики клітин є невід'ємною складовою робіт, спрямованих на розробку і оптимізацію методів довгострокового зберігання клітинних суспензій.

Існуючі методи кріоконсервування передбачають зміну фізіологічного оточення клітин через використання різноманітних кріозахисних середовищ, що призводить до порушення осмотичної рівноваги клітин із навколишнім середовищем. Дослідження осмотичної реакції клітин, кінетики клітинного об'єму дозволяє визначати транспортні характеристики їхніх мембран, які, в свою чергу, є важливими параметрами для підбору режимів кріоконсервування.

Дослідженню такого біологічного об'єкту, як сперма риб, приділяється достатньо уваги. Необхідність кріоконсервування сперми риб обумовлена різними факторами і не викликає сумніву. Однією із головних перешкод широкого застосування цієї біотехнології є невисока відтворюваність методів кріоконсервування, яка обумовлює пошуки причин різної кріорезистентності сперматозоїдів риб.

В останні роки дослідження сперматозоїдів риб в аспекті їх кріоконсервування зосередились на підборі оптимального складу кріозахисних середовищ. Риби є одним із найчисельніших класів тварин, тому цілком природно, що існує багато видів, для яких ще не було розроблено відповідних протоколів кріоконсервування сперматозоїдів. Дослідження кріостійкості сперматозоїдів риб, що мешкають у найрізноманітніших умовах, представляє певний інтерес для біологічної науки.

Також можна виділити вагомий напрямок досліджень зв'язку біохімічного складу мембран сперматозоїдів з їхньою кріорезистентністю. Останні роботи вказують на неоднозначність ролі співвідношення

холестерину і фосфоліпідів, вмісту ненасичених жирних кислот, тощо, у формуванні кріостійкості сперматозоїдів риб.

Розвиток методів гормональної стимуляції дозрівання плідників потребує вивчення впливу цих процедур на функціональні характеристики як нативних, так і кріоконсервованих сперматозоїдів, що, в свою чергу, обґрунтовує ще один напрямок сучасних досліджень.

Пошук причин різної кріорезистентності сперматозоїдів риб здійснюється через вивчення умов існування видів, чинників, що обумовлюють зміну якості сперми протягом сезону. Дослідження характеристик сперми різних популяцій в межах одного виду, різних еякулятів від одного і того ж плідника, різних субпопуляцій сперматозоїдів в одному еякуляті – все це сприяє розвитку теорії кріостійкості сперматозоїдів риб.

Проведене дисертаційне дослідження відноситься до маловивченої області сперматології риб – визначення біофізичних параметрів клітинних мембран сперматозоїдів, що є важливим для кріобіології. Оскільки однією з перешкод на шляху до вивчення осмотичної реакції сперматозоїдів риб та кінетики їхнього клітинного об'єму за різних умов були певні недоліки існуючої інструментальної бази, в дисертаційній роботі запропоновано простий і зручний метод фотометричного аналізу суспензій сперматозоїдів. Розроблений метод полягає у визначенні кінетики світлопропускання суспензії сперматозоїдів протягом її інкубації в гіпоосмотичному середовищі відомої осмолярності. Зміна світлопропускання відбувається через зміну показника відносного заломлення світла внутрішньоклітинного середовища до позаклітинного, яка, в свою чергу, викликана притоком води до клітини під час осмотичної реакції, спрямованої на осмотичне урівноваження. Отже, кінетику світлопропускання суспензії сперматозоїдів цілком обґрунтовано можна використовувати для визначення кінетики клітинного об'єму. За відомої кінетики клітинного об'єму та деяких морфологічних параметрів



сперматозоїдів, насамперед їхнього розміру, можливе розрахування коефіцієнтів проникності мембран до води.

Якщо ж сперматозоїди інкубуються в дистилаті, тобто в екстремальному за осмолярністю для них середовищі, то через деякий час інкубації відбувається їхній лізис. У цьому випадку кінетика світлопропускання має складний вигляд, обумовлений накладанням двох процесів: спочатку набухання сперматозоїдів, а через деякий час – їхнього пошкодження. Для відокремлення кривої пошкодження сперматозоїдів із часом від загальної кінетики світлопропускання запропонована певна методика, яка наведена в дисертаційній роботі.

Таким чином, дослідження осмотичної реакції сперматозоїдів прісноводних риб насамперед здійснювалось через визначення двох взаємопов'язаних параметрів. Перший – це коефіцієнт проникності мембран до молекул води, який пов'язує потік води до клітини з силою, що його викликає, тобто перепадом осмотичного тиску, і описує транспортні властивості клітинної мембрани. Другий – це значення осмотичної резистентності, яку оцінювали як час інкубації сперматозоїдів у дистилаті, за який відбувається лізис половини клітин в суспензії. Цей параметр визначає стійкість клітин до осмотичного шоку, побічно характеризуючи міцність плазматичних мембран.

Верифікація запропонованих методик передбачала проведення вимірювань за класичними методами, для чого було залучено метод ЕПР для визначення зміни вмісту внутрішньоклітинної води та мікроскопічні дослідження лізису клітин, що продемонструвало високий рівень кореляції даних, отриманих класичними та розробленими методами.

Було вивчено вплив осмолярності і температури середовища інкубації, а також концентрації клітин у середовищі інкубації, на кінетику світлопропускання інкубованих суспензій сперматозоїдів. Враховуючи високу варіабельність концентрації клітин у різних еякулятах, незалежність характеру кінетики світлопропускання (тобто певних коефіцієнтів

апроксимуючих функцій) від концентрації сперматозоїдів у достатньо широкому діапазоні її зміни є вагомою перевагою фотометричного аналізу через необов'язковість виміру концентрації сперматозоїдів.

Характерною особливістю сперматозоїдів риб є те, що зміна осмолярності позаклітинного середовища є цілком природною для них, бо під час нересту сперматозоїди виділяються у воду, що призводить до активації їхнього руху і, як наслідок, можливості запліднити ікру. Тому на відміну від багатьох інших клітин організму, для яких гіпоосмотичні тести здебільшого є суто штучними, а осмотичний шок виступає екстремальним фактором, інкубація сперматозоїдів риб у гіпоосмотичних умовах дозволяє вивчення специфічної осмотичної реакції, яка може мати важливе функціональне значення (наприклад, залучення її до механізмів активації руху сперматозоїдів, обмеження часу рухливості, тощо). Отже, в певному розумінні, запропоновані фотометричні методи є фізіологічними по відношенню до об'єкту дослідження.

Зважаючи на низку переваг фотометричного аналізу суспензій, із застосуванням цієї методики була досліджена осмотична реакція сперматозоїдів трьох видів риб, достатньо далеких у межах класу за таксономією: з родини корошових – коропа (*Cyprinus carpio*, L., 1758), з родини щукових – щука (*Esox lucius*, L., 1758), з родини осетрових – стерлядь (*Acipenser ruthenus*, L., 1758).

Нерест цих видів відбувається за різних температурних діапазонів: 4 – 13 °C у щуку, 11–16 °C у стерлядь та 18 – 22 °C у коропа.

Виявлені відмінності у проникності мембран сперматозоїдів цих видів риб до молекул води дозволяють створити таку послідовність за зростанням коефіцієнту проникності (20 °C): щука – короп – стерлядь,  $(1,13 \pm 0,24) \times 10^{-14}$ ,  $(3,05 \pm 0,40) \times 10^{-14}$ ,  $(5,96 \pm 0,83) \times 10^{-13}$  м<sup>3</sup>/Н·с, відповідно. В той же час енергія активації перенесення води через мембрани сперматозоїдів досліджених видів істотно не відрізняється і складає  $64 \pm 5$ ,  $53,9 \pm 3,8$ ,

74±17 кДж/моль, відповідно. Це свідчить про проникнення води до клітини шляхом пасивної дифузії через ліпідний бішар.

Спостерігається тенденція взаємозв'язку проникності мембран до води із кріорезистентністю сперматозоїдів, проте багатофакторність процесу кріоконсервування та невизначеність терміну «кріочутливість», дозволяють сприймати проникність мембран скоріше як важливий параметр для підбору оптимальних програм кріоконсервування, аніж природно обумовлений фактор кріорезистентності. Тим не менш, в цілому, сперматозоїди з більшою проникністю мембран (в певному діапазоні) мають більш високу кріорезистентність, наприклад сперматозоїди стерляді порівняно із сперматозоїдами коропа, або сперматозоїди ссавців порівняно із сперматозоїдами прісноводних риб. Тобто в обох випадках перші характеризуються більшою проникністю мембран до води і одночасно більш високими результатами збереження в процесі кріоконсервування.

Про позитивний ефект зміни проникності мембран сперматозоїдів риб на виживаність клітин після кріоконсервування також свідчать деякі дослідники, в роботах яких кращий результат кріоконсервування досягався після підвищення проникності мембран нативних сперматозоїдів через їхню короткочасну витримку в гіпоосмотичних розчинах або електростимуляцією.

У дисертаційній роботі продемонстрована можливість модифікації клітинних мембран деякими мембранотропними агентами, що призводить до зниження енергії активації процесу перенесення води через клітинну мембрану.

У роботі було вивчено вплив часу зберігання сперми до кріоконсервування на осмотичну реакцію сперматозоїдів коропа. Було встановлено, що сперматозоїди із часом стають більш чутливими до змін осмотичного тиску, тобто їх мембрани стають менш резистентними. Це позначається на збільшенні коефіцієнту проникності мембран сперматозоїдів до молекул води, меншому часі руху клітин і меншій виживаності сперматозоїдів після кріоконсервування.

У проведеному експерименті коефіцієнт проникності мембран до молекул води через 8 годин після отримання сперми збільшився і становив відповідно  $4,5 \pm 0,5 \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$  ( $20^\circ \text{C}$ ) проти  $3,2 \pm 0,5 \times 10^{-14} \text{ м}^3/\text{Н} \cdot \text{с}$ , який був визначений через 1 годину після отримання еякуляту, а ступінь рухливості сперматозоїдів був на рівні  $10 \pm 5\%$  та  $42 \pm 12\%$  відповідно.

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 риб 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  $273 \pm 22$  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  $3,05 \pm 0,40 \times 10^{-14}$  м<sup>3</sup>/Н·с,  $5,96 \pm 0,83 \times 10^{-13}$  м<sup>3</sup>/Н·с,  $1,13 \pm 0,24 \times 10^{-14}$  м<sup>3</sup>/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 Гл 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 –  $78,6 \pm 3,9$ ;  $73,2 \pm 5,4$ ;  $73,6 \pm 4,1$ ;  $16,5 \pm 9,6$  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 відігріву проникність мембран відігрітих сперматозоїдів в 1,4 рази більша, ніж при охолодженні до температур -10, -30, -50 °С і подальшому відігріванні. Після кріоконсервування осмотична чутливість відігрітих сперматозоїдів різко зростає, що відображується в швидкому збільшенні проникності мембран до молекул води.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Осташко Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. Київ : Урожай, 1978. 247 с.
2. Curry M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock // *Reviews of Reproduction*. 2000. Vol. 5. P. 46–52.
3. Вепринцев Б. Н., Ротт Н. Н. Консервация генетических ресурсов // *Природа*. 1978. № 11. С. 10–21.
4. Качество криоконсервированной спермы сазанов после 25 лет хранения / Е. Ф. Копейка, С. И. Дрокин, В. В. Черепанов [и др.] // Матер. IV Междунар. ихтиологической научн.-практ. конф. «Современные проблемы теоретической и практической ихтиологии» : тезисы докл. Одесса: Феникс, 2011. С. 136–138.
5. Gwo J. -C., Jamieson B. G. M., Leung L. K.-P. Live Preservation of Fish Gametes // *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes)*: Barrie G M Jamieson. 2009. P. 395–484.
6. Фермерське рибництво / І. І. Грициняк, М. В. Гринжевський, О. М. Третяк [та ін.]. Київ : Герб, 2008. 560 с.
7. Алимов С. І. Рибне господарство України: стан і перспективи. Київ : Вища освіта, 2002. 335 с.
8. Організація селекційно-племінної роботи в рибництві / М. В. Гринжевський, І. М. Шерман, І. І. Грициняк [та ін.]. Київ : Рибка моя, 2006. 352 с.
9. 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.
10. Fuller B. J., Lane N., Benson E. E. Life in the frozen state // CRC Press. 2004. 663 p.
11. Bobe J., Labbé C. Egg and sperm quality in fish // *General and Comparative Endocrinology*. 2010. Vol. 165. P. 535–548.

12. Sperm quality evaluation in *Solea senegalensis* during the reproductive season at cellular level / J. Beirão, F. Soares, M. P. Herráez, M. T. Dinis, E. Cabrita // *Theriogenology*. 2009. Vol. 72. P. 1251–1261.
13. Kopeika E. F., Tsvetkova L. I. Cryoresistance of fish sperm and methods for its improvement // *Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organisms*. Marly le Roi, 1992. P. 53.
14. Cryopreservation for sperm in marine fish / M. Suquet, C. Dreanno, C. Fauvel, J. Cosson, R. Billard // *Aquaculture Research*. 2000. Vol. 31. P. 231–243.
15. Kopeika E., Kopeika J., Zhang T. Cryopreservation of fish sperm // *Cryopreservation and freeze-drying protocols* / Ed. by J. G. Day and G. N. Stacey. Humana Press. Totowa, New Jersey, 2007. P. 203–217.
16. Kopeika E. F., Kopeika J. E. Variability of sperm quality after cryopreservation in fish // *Fish spermatology* / Editors: S. H. M. Alavi, J. Cosson, K. Coward, G. Rafiee. Alpha Science International Ltd. Oxford, 2007. P. 347–396.
17. Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts / F. Martínez-Pastor, E. Cabrita, F. Soares, L. Anel and M. T. Dinis // *Reproduction*. 2008. Vol. 135. P. 449–459.
18. Копейка Е. Ф. Экологическая ниша как фактор, определяющий криорезистентность сперматозоидов рыб // *Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2014. Т. 24, № 4. С. 302–311.
19. Fertilizing ability of frozen-thawed sperm of trout in relation with rearing temperature and dietary lipid origin: what about membrane fluidity and polar lipid composition / C. Labbe, G. Maisse, K. Miller, A. Zachowski [et al.] // *Workshop on gamete and embryo storage and cryopreservation in aquatic organisms*. Marly le Roi, 1992. P. 49.
20. Oxygen and fish spermatozoa cryoresistance / E. F. Kopeika, S. I. Drokin, V. V. Cherepanov, B. B. Dzuba, L. I. Tsvetkova // *34th Annual Meeting of the Society for Cryobiology*. Barcelona, 8–12 June 1997.



21. Effect of cryopreservation on fish sperm subpopulations / J. Beirão, E. Cabrita, S. Pérez-Cerezales, S. Martínez-Páramo, M. P. Herráez // *Cryobiology*. 2011. Vol. 62. P. 22–31.
22. The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout / E. Cabrita, R. Alvarez, E. Anel, M. P. Herraéz // *Animal Reproduction Science*. 1999. Vol. 55. P. 279–287.
23. Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // *Exp. Cell. Res.* 1972. Vol. 71. P. 345–355.
24. In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa / C. Redondo-Muller, M.-P. Cosson, J. Cosson, R. Billard // *Molecular Reproduction and Development*. 1991. Vol. 29, № 3. P. 259–270.
25. Freeze-thawing as the factor of spontaneous activation of spermatozoa motility in common carp (*Cyprinus carpio* L.) / S. Boryshpolets, B. Dzyuba, M. Rodina [et al.] // *Cryobiology*. 2009. Vol. 59. P. 291–296.
26. Petrunkina A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology // *Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*. 2007. Vol. 4. P. 78–91.
27. Subzero water permeability parameters and optimal freezing rates for sperm cells of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus* / D. Pinisetty, C. Huang, Q. Dong [et al.] // *Cryobiology*. 2005. Vol. 50. P. 250–263.
28. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm / M. Hagedorn, J. Ricker, M. McCarthy [et al.] // *Cryobiology*. 2009. Vol. 58. P. 12–19.
29. Fauvel C., Suquet M., Cosson J. Evaluation of fish sperm quality // *Appl. Ichthyol.* 2010. Vol. 26. P. 636–643.
30. Hypo-osmotic shock induces an osmolality-dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm / T. Márián, Z. Krasznai, L. Balkay, M. Balázs, M. Emri, L. Bene, L. Trón // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1993. Vol. 41. P. 291–297.
31. Biology of sperm and artificial reproduction in carp / R. Billard, J. Cosson., G. Perchec, O. Linhart // *Aquaculture*. 1995. Vol. 129. P. 95–112.

32. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species / D. K. Verma, P. Routray, C. Dash, S. Dasgupta, J. K. Jena // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2009. Vol. 9. P. 67–76.

33. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius*) / S. M. H. Alavi, M. Rodina, T. M. Viveiros, J. Cosson [et al.] // Theriogenology. 2009. Vol. 72. P. 32–43.

34. Calorimetric measurement of water transport and intracellular ice formation during freezing in cell suspensions / S. Mori, J. Choi, R. V. Devireddy, J. C. Bischof // Cryobiology. 2012. Vol. 65. P. 242–255.

35. Extender composition, osmolality, cryoprotectant and equilibration time effects on fresh sperm motility of two Characiformes fish: piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) and streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*) / A. F. Nascimento, A. C. S. Gonçalves, R. V. Reis Neto, M. C. Leal, A. T. M. Viveiros // Animal Reproduction. 2012. Vol. 9, № 2. P. 103–110.

36. Evaluating the Impacts of Osmotic and Oxidative Stress on Common Carp (*Cyprinus carpio*, L.) Sperm Caused by Cryopreservation Techniques / P. Li, Z.-H. Li, B. Dzyuba, M. Hulak, M. Rodina, O. Linhart / Biology of reproduction. 2010. Vol. 83. P. 852–858.

37. Hypotonic treatment prior to freezing improves cryoresistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa / B. Dzyuba, J. Cosson, G. Yamaner, O. Bondarenko, M. Rodina, D. Gela, V. Bondarenko, A. Shaliutina, O. Linhart // Cryobiology. 2013. Vol. 66. P. 192–194.

38. Ragoonanan V., Less R., Aksan A. Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses. Part 2: The link between the state of the membrane-cytoskeleton complex and the cellular damage // Cryobiology. 2013. Vol. 66. P. 96–104.

39. Ragoonanan V., Hubel A., Aksan A. Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses // Cryobiology. 2010. Vol. 61. P. 335–344.

40. Weng L., Li W., Zuo J. Kinetics of osmotic water flow across cell membranes in non-ideal solutions during freezing and thawing // *Cryobiology*. 2010. Vol. 61. P. 194–203.
41. Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation / R. Spindler, B. Rosenhahn, N. Hofmann, B. Glasmacher // *Cryobiology*. 2012. Vol. 64. P. 250–260.
42. Mathematical prediction of freezing times of bovine semen in straws placed in static vapor over liquid nitrogen / M. V. Santos, M. Sansinena, N. Zaritzky, J. Chirife // *Cryobiology*. 2013. Vol. 66. P. 30–37.
43. Curry M. R., Millar J. D., Watson P. F. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations // *Biology of Reproduction*. 1994. Vol. 51. P. 1014–1021.
44. Prickett R. C., Elliott J. A. W., McGann L. E. Application of the osmotic virial equation in cryobiology // *Cryobiology*. 2010. Vol. 60. P. 30–42.
45. Katkov I. I. On proper linearization, construction and analysis of the Boyle–van't Hoff plots and correct calculation of the osmotically inactive volume // *Cryobiology*. 2011. Vol. 62. P. 232–241.
46. Peckys D., Mazur P. Regulatory volume decrease in COS-7 cells at 22 °C and its influence on the Boyle van't Hoff relation and the determination of the osmotically inactive volume // *Cryobiology*. 2012. Vol. 65. P. 74–78.
47. Melting point equations for the ternary system water/sodium chloride/ethylene glycol revisited / J. D. Benson, A. Bagchi, X. Han, J. K. Critser, E. J. Woods // *Cryobiology*. 2010. Vol. 61. P. 352–356.
48. Benson J. D., Kearsley A. J., Higgins A. Z. Mathematical optimization of procedures for cryoprotectant equilibration using a toxicity cost function // *Cryobiology*. 2012. Vol. 64. P. 144–151.
49. 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.

50. 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.

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

52. 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 (35). С. 103–112.

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

54. 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.

55. 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.

56. 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.

57. 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.

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

59. 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.

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

61. 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.

62. Пуговкин А. Ю., Буцкий 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.

63. 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.

64. 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.

65. 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.

66. 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.

67. 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.

68. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю., Копейка Е. 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.

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

70. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю. Изменение качества нативной и криоконсервированной 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.

71. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю. Кріорезистентність сперми білого толстолобика після стимуляції його широко використовуваними гормональними препаратами // Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 24, № 2. С. 177.

72. 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.

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

74. 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.

75. 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.

76. Оптимізація складу кріозахисних 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.

77. 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.

78. 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.

79. 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.

80. 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].

81. 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.

82. Никольский Г. В. Экология рыб. Москва : Высшая школа, 1974. 357 с.

83. Турдаков А. Ф. Воспроизводительная система самцов рыб. Фрунзе : Илим, 1972. 280 с.

84. Хлебович В. В. Критическая соленость биологических процессов. Ленинград : Наука, 1974. 236 с.

85. Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных: приспособление и среда / Под ред. Е. М. Крепса. Пер. с англ. М. Д. Гроздовой, Г. И. Рожковой. Москва : Мир, 1982. 412 с.

86. Portner H., Peck L., Somero G. Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view // Philosophical transactions of the Royal Society B. 2007. Vol. 362. P. 2233–2258.



87. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms // F. Lang, G. L. Busch, M. Ritter [et al.] // *Physiological reviews*. 1998. Vol. 78. P. 247–306.

88. Evidence for the Involvement of Aquaporins in Sperm Motility Activation of the Teleost Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) / L. Zilli, R. Schiavone, F. Chauvigné, J. Cerdà, C. Storelli, S. Vilella // *Biology of Reproduction*. 2009. Vol. 81. P. 880–888.

89. Pommer A. C., Rutlant J., Meyers S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function // *Theriogenology*. 2002. Vol. 58. P. 1373–1384.

90. Involvement of redox- and phosphorylation-dependent pathways in osmotic adaptation in sperm cells of euryhaline tilapia / M. Morita, A. Nakajima, A. Takemura, M. Okuno // *The Journal of Experimental Biology*. 2011. Vol. 214. P. 2096–2104.

91. Barfield J. P., Yeung C. H., Cooper T. G. Characterization of potassium channels involved in volume regulation of human spermatozoa // *Molecular Human Reproduction*. 2005. Vol. 11, № 12. P. 891–897.

92. Activity of the Na,K-ATPase  $\alpha 4$  isoform is important for membrane potential, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , and pH to maintain motility in rat spermatozoa / T. Jimenez, G. Sánchez, E. Wertheimer, G. Blanco // *Reproduction*. 2010. Vol. 139. P. 835–845.

93. Juyena N. S., Stelletta C. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa // *Journal of Andrology*. 2012. Vol. 33, № 4. P. 536–551.

94. Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility / S. M. H. Alavi, J. Cosson, M. Karami, H. Abdolhay, B. M. Amiri // *Aquaculture Research*. 2004. Vol. 35. P. 1238–1243.

95. Physiology and behavior of stripped and testicular sperm in *Perca fluviatilis* / S. M. H. Alavi, M. Rodina, T. Policar, J. Cosson [et al.] // *Cybum*. 2008. Vol. 32, № 2. P. 162–163.

96. Calcium channels in the development, Maturation, and function of spermatozoa / A. Darszon, Takuya Nishigaki, C. Beltran, C.L. Treviño // *Physiol. Rev.* 2011. Vol. 91. P. 1305–1355.

97. Aquaporin inhibition changes protein phosphorylation pattern following sperm motility activation in fish / L. Zilli, J. Beirão, R. Schiavone, M. P. Herraiz, E. Cabrita, C. Storelli, S. Vilella // *Theriogenology*. 2011. Vol. 76. P. 737–744.

98. Shukla K. K., Mahdi A. A., Rajender S. Ion Channels in Sperm Physiology and Male Fertility and Infertility // *Journal of Andrology*. 2012. Vol. 33, № 5. P. 777–788.

99. Su Y.-H., Vacquier V. D. A flagellar  $K^+$ -dependent  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger keeps  $Ca^{2+}$  low in sea urchin spermatozoa // *PNAS*. 2002. Vol. 99, № 10. P. 6743–6748.

100. Golpour A., Imanpoor M. R., Hosseini S. A. Changes in Ionic Ratios of Seminal Plasma and its Effect on Sperm Characteristics in Caspian Roach (*Rutilus rutilus caspicus*) During Spawning Migration // *Fisheries and Aquaculture Journal*. 2011. Vol. FAJ-17. P. 1–6.

101. Rodriguez E., Darszon A. Intracellular sodium changes during the speract response and the acrosome reaction in sea urchin sperm // *J. Physiol.* 2003. Vol. 546, № 1. P. 89–100.

102.  $Ca^{2+}$ -stores in sperm: their identities and functions / S. Costello, F. Michelangeli, K. Nash, L. Lefievre, J. Morris, G. Machado-Oliveira, C. Barratt, J. Kirkman-Brown, S. Publicover // *Reproduction*. 2009. Vol. 138. P. 425–437.

103. Whitaker M. Calcium at Fertilization and in Early Development // *Physiol. Rev.* 2006. Vol. 86. P. 25–88.

104. Wennemuth G., Babcock D. F., Hille B. Calcium Clearance Mechanisms of Mouse Sperm // *J. Gen. Physiol.* 2003. Vol. 122. P. 115–128.

105. Alavi S. H. M., Cosson J. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review // *Cell Biology International*. 2006. Vol. 30. P. 1–14.

106. Alavi S. H. M., Cosson J. Sperm motility and fertilizing ability in the Persyan sturgeon *Acipenser persicus* // *Aquaculture Research*. 2005. Vol. 36. P. 841–850.
107. Billard R., Cosson M. P. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish // *Journal of Experimental Zoology*. 1992. Vol. 261. P. 122–131.
108. Sperm structure and motility of the freshwater teleost *Cottus gobio* / F. Lahnsteiner, B. Berger, T. Weismann, R. Patzner // *J Fish Biology*. 1997. Vol. 50. P. 564–574.
109. Ciereszko A. Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation in fish // *Fish spermatology* / Editors: S. H. M. Alavi, J Cosson, K. Coward, G. Rafiee. Alpha Science International Ltd. Oxford, 2007. P. 215–240.
110. Billard R., Cosson J., Crim L. W. Motility of fresh and aged halibut sperm // *Aquat. Living Resour.* 1993. Vol. 6. P. 67–75.
111. Semen of Beluga, *Huso huso*: Ionic Content and Osmolality of Seminal Plasma and Their Physiological Correlation with Sperm Motility Indices / M. S. Aramli, R. M. Nazari, M. R. Kalbassi, S. Aramli // *Fish Aquac. J.* 2013. Vol. 4, № 1. P. 1–5.
112. Relationship between seminal plasma composition and spermatological parameters in Scaly Carp (*Cyprinus carpio*) / Y. Bozkurt, F. Öğretmen, F. S. Secer, U. Ercin // *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2009. Vol. 8, № 12. P. 2745–2749.
113. Faramarzi M. Assessment of Reproductive Parameters in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) // *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 2012. Vol. 4, № 3. P. 244–248.
114. Ubilla A., Valdebenito I. Use of antioxidants on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) sperm diluent: effects on motility and fertilizing capability // *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 2011. Vol. 39, № 2. P. 338–343.

115. Linhart O., Mims S. D., Shelton W. L. Motility of spermatozoa from Shovelnose sturgeon, *Scaphirhynchus platyrhynchus*, and Paddlefish, *Polyodon spathula* // J Fish Biol. 1995. Vol. 47. P. 902–909.

116. Roles of pH and cyclic adenosine monophosphate in the acquisition of potential for sperm motility during migration from the sea to the river in chum salmon / S. Morisawa, K. Ishida, M. Okuno, M. Morisawa // Mol. Reprod. Develop. 1993. Vol. 34. P. 420–426.

117. Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa / G. Perchee, C. Jeulin, J. Cosson, F. André, R. Billard // Journal of Cell Science. 1995. Vol. 108. P. 747–753.

118. Bioenergetics of fish spermatozoa during semen storage / M. S. Ziętara, A. Biegniewska, E. Rurangwa, J. Swierczynski, F. Ollevier, E. F. Skorkowski // Fish Physiol. Biochem. 2009. Vol. 35. P. 607–614.

119. Takai H., Morisawa M. Change in intracellular K<sup>+</sup> concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts // Journal of Cell Science. 1995. Vol. 108. P. 1175–1181.

120. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes / M. Morisawa, K. Suzuki, H. Shimizu, S. Morisawa, K. Yasuda // The Journal of Experimental Biology. 1983. Vol. 107. P. 95–103.

121. Morita M., Fujinoki M., Okuno M. K<sup>+</sup>-independent initiation of motility in chum salmon sperm treated with an organic alcohol, glycerol // The Journal of Experimental Biology. 2005. Vol. 208. P. 4549–4556.

122. Cosson. J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa // Aquaculture International. 2004. Vol. 12. P. 69–85.

123. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of Carp spermatozoa / G. Perchee Poupard, J. L. Gatti, J. Cosson, C. Jeulin, F. Fierville, R. Billard // J Reprod Fertil. 1997. Vol. 110. P. 315–327.

124. Ion Channels in Sperm Physiology / A. Darszon, P. Labarca, T. Nishigaki, F. Espinosa // *Physiological Reviews*. 1999. Vol. 79, № 2. P. 481–510.
125. Hamamah S., Gatti J.-L. Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity // *Human Reproduction*. 1998. Vol. 13, № 4. P. 20–30.
126. Morisawa S., Morisawa M. Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon // *J. Exp. Biol.* 1988. Vol. 136. P. 13–22.
127. Role of Extracellular and Intracellular pH in Carp Sperm Motility and Modifications by Hyperosmosis of Regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger / T. Márián, Z. Krasznai, L. Balkay, M. Emri, L. Trón // *Cytometry*. 1997. Vol. 27. P. 374–382.
128. Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility / Z. Krasznai, M. Morisawa, S. Morisawa, Z. T. Krasznai, L. Trón, R. Gáspár, T. Márián // *Aquat. Living Resour.* 2003. Vol. 16. P. 445–449.
129. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca<sup>2+</sup> channels, leading to Ca<sup>2+</sup> influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp / Z. Krasznai, T. Márián, H. Izumi [et al.] // *Proc National Academy Science USA*. 2000. Vol. 97, № 5. P. 2052–2057.
130. Effects of ions on the motility of fresh and demembrated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) and paddlefish (*Polyodon spathula*) / O. Linhart, J. Cosson, S. D. Mims, M. Rodina, D. Gela, W. L. Shelton // *Fish Physiology and Biochemistry*. 2003. Vol. 28. P. 203–205.
131. Changes in extracellular osmolarity initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntius conchonius* / J. Hu, Y. Zhang, R. Zhou, Y. Zhang // *Theriogenology*. 2009. Vol. 72. P. 704–710.
132. Tanimoto S., Morisawa M. Roles for Potassium and Calcium Channels in the Initiation of Sperm Motility in Rainbow Trout // *Develop. Growth & Differ.* 1988. Vol. 30, № 2. P. 117–124.

133. Takei G. L., Mukai C., Okuno M. Transient  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization caused by osmotic shock initiates salmonid fish sperm motility // The Journal of Experimental Biology. 2012. Vol. 215. P. 630–641.

134. Transmembrane Cell Signaling for the Initiation of Trout Sperm Motility: Roles of Ion Channels and Membrane Hyperpolarization for Cyclic AMP Synthesis / K. H. Kho, S. Tanimoto, K. Inaba, Y. Oka, M. Morisawa // Zoological Science. 2001. Vol. 1. P. 919–928.

135. Inaba K., Morisawa S., Morisawa M. Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of cAMP-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain // Journal of Cell Science. 1998. Vol. 111. P. 1105–1115.

136. Boitano S., Omoto C. K. Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH // Journal of Cell Science. 1991. Vol. 98. P. 343–349.

137. Molecular Mechanisms Determining Sperm Motility Initiation in Two Sparids (*Sparus aurata* and *Lithognathus mormyrus*) / L. Zilli, R. Schiavone, Carlo Storelli, S. Vilella // Biology Of Reproduction. 2008. Vol. 79. P. 356–366.

138. Involvement of redox- and phosphorylation-dependent pathways in osmotic adaptation in sperm cells of euryhaline tilapia / M. Morita, A. Nakajima, A. Takemura, M. Okuno // The Journal of Experimental Biology. 2011. Vol. 214. P. 2096–2104.

139. Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers / J. Cosson, A.-L. Groison, M. Suquet, C. Fauvel, C. Dreanno, R. Billar // Reproduction. 2008. Vol. 136. P. 277–294.

140. Dzuba B. B., Kopeika E. F. Relationship between the changes in cellular volume of fish spermatozoa and their cryoresistance // CryoLetters. 2002. Vol. 23. P. 353–360.

141. Дзюба Б. Б. Динамика клеточного объема и содержания макроэргических фосфатов спермиев рыб до и после криоконсервирования : дисс. ... кандидата биол. наук : 03.00.19. Харьков, 1998. 127 с.

142. Jenkins J. A., Goodbred S. L. Viability of Male Gametes in Common Carp (*Cyprinus carpio*) along the Lower Colorado River from the Cibola National Wildlife Refuge (NWR), Havasu NWR, and Lake Mohave of Lake Mead National Recreation Area. Reston, Virginia, 2005. 25 p.

143. Source of dietary lipid affects sperm plasma membrane integrity and fertility in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) after cryopreservation / C. Pustowka, M. A. McNiven, G. P. Richardson, S. P. Lall // *Aquaculture Research*. 2000. Vol. 31. P. 297–305.

144. Blood cells in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* milt: relation to the milt collection method and season / A. Ciereszko, T. Wasow, S. Dobosz [et al.] // *Theriogenol.* 2004. Vol. 62. P. 1353–1364.

145. Munkittrick K. R., Moccia R. D. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents // *Aquaculture*. 1987. Vol. 64. P. 147–156.

146. Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae) / S. M. H. Alavi, M. Rodina, A. Hatef, V. Stejskal, T. Policar, J. Hamačková, O. Linhart // *Czech J. Anim. Sci.* 2010. Vol. 55, № 4. P. 174–182.

147. Hajirezaee S., Amiri B. M., Mirvaghefi A. Fish milt quality and major factors influencing the milt quality parameters: A review // *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9, № 54. P. 9148–9154.

148. Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season / S. M. H. Alavi, M. Psenicka, M. Rodina, T. Policar, O. Linhart // *Aquat. Living Resour.* 2008. Vol. 21. P. 75–80.

149. Sperm biology of artificially induced common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) / M. Nahiduzzaman, S. Akter, M. M. Hassan, A. K. M. Azad Shah, M. A. R. Hossain // *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*. 2014. Vol. 1, № 6. P. 27–31.

150. Alavi S. M. H., Cosson J., Kazemi R. Semen characteristics in *Acipenser persicus* in relation to sequential stripping // J. Appl. Ichthyol. 2006. Vol. 22, № 1. P. 400–405.

151. Spermatozoal competition in common carp (*Cyprinus carpio*): what is the primary determinant of competition success? / O. Linhart, M. Rodina, D. Gela, M. Kocour, M. Vandeputte // Reproduction. 2005. Vol. 130. P. 705–711.

152. Reproductive parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L) spawners during natural season and out-of-season spawning / D. Kucharczyk, K. Targońska, P. Hliwa, P. Gomulka, M. Kwiatkowski, S. Krejszeff, J. Perkowski // Reproductive biology. 2008. Vol. 8, № 3. P. 285–289.

153. In vitro study on sperm competition in common carp (*Cyprinus carpio* L.) / V. Kaspar, M. Hulak, K. Kohlmann, Ma Vandeputte, M. Rodina, D. Gela, O. Linhart // Cybium. 2008. Vol. 32, № 2. P. 303–306.

154. Comparison of oxidant and antioxidant status of seminal plasma and spermatozoa of several fish species / A. Shaliutina-Kolešová, I. Gazo, J. Cosson, O. Linhart // Czech J. Anim. Sci. 2013. Vol. 58, № 7. P. 313–320.

155. Perchec G., Cosson M. P., Cosson J. Morphological and kinetic changes of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water // Cell motility and the cytoskeleton. 1996. Vol. 35. P. 113–120.

156. After finishing of motility, sperm of common carp (*Cyprinus carpio*) is able to re-initiate a second motility period and save ability to fertilize eggs / O. Linhart, S. M. H. Alavi, M. Rodina, D. Gela, J. Cosson // Cybium. 2008. Vol. 32, № 2. P. 187–188.

157. Comparison of sperm velocity, motility and fertilizing ability between firstly and secondly activated spermatozoa of common carp (*Cyprinus carpio*) / O. Linhart, S. M. H. Alavi, M. Rodina, D. Gela, J. Cosson // J. Appl. Ichthyol. 2008. Vol. 24. P. 386–392.

158. Boryshpolets S., Dzyuba B., Drokin S. Pre-spawning water temperature affects sperm respiration and reactivation parameters in male carps // Fish Physiol. Biochem. 2009. Vol. 35. P. 661–668.



159. Дрокин С. И., Копейка Е. Ф., Черепнин В. А. Феномен активации движения спермиев карпа в собственной плазме. Тези II Міжнародної іхтіологічної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми теоретичної та практичної іхтіології», 16–19 вересня 2009 р. Севастополь, 2009. С. 42–43.
160. Volume changes during the motility period of fish spermatozoa: Interspecies differences / O. Bondarenko, B. Dzyuba, J. Cosson [et al.] // *Theriogenology*. 2013. Vol. 79. P. 872–881.
161. Dzuba B., Bozhok G., Rudenko S. A study of the dynamics of volume changes during the period of active motility in carp, *Cyprinus carpio* L., spermatozoa // *Aquaculture Research*. 2001. Vol. 32. P. 51–56.
162. Water volume and osmotic behavior of mouse spermatozoa determined by electron paramagnetic resonance / J. Du, J. Tao, F. W. Kleinhans, P. Mazur, J. K. Critser // *J Reprod Fertil*. 1994. Vol. 101. P. 37–42.
163. Temperature-dependent changes in erythrocytes cytosol state during natural and artificial hypobiosis / S. Repina, O. Nardid, V. Marchenko, A. Shilo // *Bioelectrochemistry*. 2004. Vol. 62. P. 187–190.
164. Goodman B. Transport of small molecules across cell membranes: water channels and urea transport // *Adv Physiol Educ*. 2002. Vol. 26. P. 146–157.
165. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation / J. A. Gilmore, J. Liu, A. T. Peter, J. K. Critser // *Biology of reproduction*. 1998. Vol. 58. P. 28–36.
166. Gilmore J. A., Du J., Tao J. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation // *Journal of reproduction and fertility*. 1996. Vol. 107. P. 87–95.
167. Rutllant J., Pommer A. C., Meyers S. A. Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa // *Journal of Andrology*. 2003. Vol. 24, № 4. P. 534–541.

168. Agca Y., Gilmore J., Byers M. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars // *Biology of reproduction*. 2002. Vol. 67. P. 1493–1501.
169. Phelps M. J., Liu J., Benson J. D. Effects of percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation // *Biology of reproduction*. 1999. Vol. 61. P. 1031–1041.
170. Yeung C., Anapolski M., Cooper T. G. Measurement of Volume Changes in Mouse Spermatozoa Using an Electronic Sizing Analyzer and a Flow Cytometer: Validation and Application to an Infertile Mouse Model // *Journal of Andrology*. 2002. Vol. 23, № 4. P. 522–528.
171. Guthrie H. D., Liu J., Critser J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa // *Biology of reproduction*. 2002. Vol. 67. P. 1811–1816.
172. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa / P. F. Watson, E. Kunze, P. Cramer, R. H. Hammerstedt // *Journal of andrology*. 1992. Vol. 13, № 2. P. 131–138.
173. Video analysis of osmotic cell response during cryopreservation / R. Spindler, B. Rosenhahn, N. Hofmann, B. Glasmacher // *Cryobiology*. 2012. Vol. 64. P. 250–260.
174. Li G., Godke R. A., Devireddy R. V. Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa // *Reproduction*. 2006. Vol. 131. P. 875–886.
175. Devireddy R. V., Swanlund D. J., Olin T. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry // *Biology of reproduction*. 2002. Vol. 66. P. 222–231.
176. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents / R. V. Devireddy,

D. J. Swanlund, K. P. Roberts, J. C. Bischof // *Biology of reproduction*. 1999. Vol. 61. P. 764–775.

177. Devireddy R. V., Swanlund D. J., Roberts K. P. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing // *Human reproduction*. 2000. Vol. 15, № 5. P. 1125–1135.

178. Calorimetric measurement of water transport and intracellular ice formation during freezing in cell suspensions / S. Mori, J. Choi, R. V. Devireddy, J. C. Bischof // *Cryobiology*. 2012. Vol. 65. P. 242–255.

179. Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa / R. V. Devireddy, D. J. Swanlund, A. S. Alghamdi, L. A. Duoos, M. H. T. Troedsson, J. C. Bischof, and K. P. Roberts // *Reproduction*. 2002. Vol. 124. P. 643–648.

180. Oldenhof H., Friedel K., Sieme H. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy // *Cryobiology*. 2010. Vol. 61. P. 115–122.

181. Characterization of a Major Permeability Barrier in the Zebrafish Embryo / M. Hagedorn, F. W. Kleinhans, D. Artemov, U. Pilatus // *Biology of Reproduction*. 1998. Vol. 59. P. 1240–1250.

182. Water Distribution and Permeability of Zebrafish Embryos, *Brachydanio rerio* / M. Hagedorn, F. W. Kleinhans, R. Freitas, J. Liu, E. W. Hsu, D. E. Wildt, W. F. Rall // *The Journal of Experimental Zoology*. 1997. Vol. 278. P. 356–371.

183. Polge C., Smith A. U., Parkes A. S. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures // *Nature Lond.* 1949. Vol. 164. P. 666–669.

184. Bailey J. L., Bilodeau J.-F., Cormier N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon // *Journal of Andrology*. 2000. Vol. 21. P. 1–7.

185. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives / E. Cabrita, C. Sarasquete, S. Martínez-Páramo, V. Robles, J. Beirão, S. Pérez-Cereales, M.P. Herráez // J. Appl. Ichthyol. 2010. Vol. 26. P. 623–635.
186. Effect of time after hormonal stimulation on semen quality indicators of common carp, *cyprinus carpio* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae) / B. I. Cejko, R. K. Kowalski, D. Kucharczyk, D. Żarski, K. Targońska, J. Glogowski // Acta Ichthyologica Et Piscatoria. 2011. Vol. 41, № 2. P. 75–80.
187. Effect of hormone implantation on cryopreservation of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) sperm / F. Ding, J. E. Milley, M. Rommens, J. Li, J. Lei, S. P. Lall // Cryobiology. 2012. Vol. 65. P. 51–55.
188. Quality parameters and selected biochemical markers of asp, *aspius aspius* (L.), semen obtained after hormonal stimulation with ovaprim or ovopel / B. I. Cejko, D. Kucharczyk, K. Targońska, D. Kubiak, B. Sarosiek, J. Glogowski // Archives of Polish Fisheries. 2008. Vol. 16, № 2. P. 179–188.
189. Seifi T., Imanpoor M. R., Golpour A. The Effect of Different Hormonal Treatments on Semen Quality Parameters in Cultured and Wild Carp // Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2011. Vol. 11. P. 595–602.
190. Williot P., Kopeika E. F., Gontcharov B. F. Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt) // Aquaculture. 2000. Vol. 189. P. 53–61.
191. Kopeika E. F., Williot P., Goncharov B. F. Cryopreservation of Atlantic sturgeon *Acipenser sturio* L., 1758 sperm: First results and associated problems // Bol. Inst. Esp. Oceanogr. 2000. Vol. 16. P. 167–173.
192. Yavas I., Bozkurt Y. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*ctenopharyngodon idella*) sperm // Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 2011. Vol. 25, № 1. P. 2253–2257.
193. Linhart O., Rodina M., Cosson J. Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos // Cryobiology. 2000. Vol. 41. P. 241–250.

194. Cryopreservation of Mirror Carp Semen / E. Akçay, Y. Bozkurt, S. Seçer, N. Tekün // Turk J Vet Anim Sci. 2004. Vol. 28. P. 837–843.
195. Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. Cryopreservation of common carp sperm // Aquat. Living Resour. 2003. Vol. 16. P. 457–460.
196. Effect of freezing techniques, extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) sperm / Y. Bozkurt, E. Akçay, N. Tekin, S. Secer // The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh. 2005. Vol. 57, № 2. P. 125–130.
197. Bozkurt Y., Secer S. Effect of short-term preservation of mirror carp (*cyprinus carpio*) semen on motility, fertilization, and hatching rates // The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh. 2005. Vol. 57, № 3. P. 207–212.
198. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a review / R. Billard, J. Cosson, S.B. Noveiric, M. Pourkazemi // Aquaculture. 2004. Vol. 236. P. 1–9.
199. Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (II) sperm morphology, acrosome reaction, motility and cryopreservation / S. M. H. Alavi, A. Hatef, M. Pšenička, V. Kašpar, S. Boryshpolets, B. Dzyuba, J. Cosson, V. Bondarenko, M. Rodina, D. Gela, O. Linhart // Rev. Fish Biol. Fisheries. 2012. Vol. 22. P. 861–886.
200. Hossain M. S., Sarder M. R. I. Cryogenic freezing of silver carp spermatozoa for conservation of gene pool // Progress. Agric. 2009. Vol. 20. P. 99–106.
201. Zilli L., Vilella S. Effect of Cryopreservation on Bio-Chemical Parameters, DNA Integrity, Protein Profile and Phosphorylation State of Proteins of Seawater Fish Spermatozoa // Current Frontiers in Cryobiology / Prof. I. Katkov (Ed.). Rijeka : InTech, 2012. P. 392–414.
202. Francis T., Archana Devi C., Selvamagheswaran M. Cryopreservation of Carp Spermatozoa // Indian Journal of Science and Technology. 2013. Vol. 6, № 5. P. 4524–4530.

203. Basavaraja N., Hedge S. N., Palaksha K. J. Cryopreservation of the Endangered Mahseer (*Tor khudree*) Spermatozoa: Effect of Dimethyl Sulfoxide, Freezing, Activating Media and Cryostorage on Post-Thaw Spermatozoa Motility and Fertility // Cell Preservation Technology. 2006. Vol. 4, № 1. P. 31–47.

204. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish / A. N. Maria, A. T. M. Viveiros, R. T. F. Freitas, A. V. Oliveira // Aquaculture. 2006. Vol. 260. P. 298–306.

205. Effects of the slow cooling during cryopreservation on the survival and morphology of Taiwan shoveljaw carp (*Varicorhinus barbatulus*) spermatozoa / S. Tsai, E. Spikings, C.-C. Hwang, C. Lin // Aquat. Living Resour. 2010. Vol. 23. P. 119–124.

206. Rani K. U., Munuswamy N. Preliminary studies on the cryopreservation of spermatozoa in the fresh water fish common carp (*Cyprinus carpio* L.) // Journal of Coastal Life Medicine. 2014. Vol. 2, № 3. P. 181–186.

207. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters / U. Taşdemir, S. Büyükleblebici, P. B. Tuncer, E. Coşkun, T. Özgürtaş, F. N. Aydın, O. Büyükleblebici, İ. S. Gürcan // Cryobiology. 2013. Vol. 66. P. 38–42.

208. Morris G. J., Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review // Cryobiology. 2013. Vol. 66. P. 85–92.

209. Meryman H.T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury // Cryobiology. 1971. Vol. 8, № 5. P. 489–500.

210. Reproductive physiology of yellow perch (*Perca flavescens*): Environmental and endocrinological cues / K. Dabrowski, R. E. Ciereszko, A. Ciereszko [et al.] // J. Appl. Ichthyol. 1996. Vol. 12. P. 139–148.

211. Devismita D., Kumar A. Effect of cryoprotectant on optimal cooling rate during cryopreservation // Cryobiology. 2015. Vol. 70. P. 53–59.

212. Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes* / H. Yang, M. Norris, R. Winn, T. R. Tiersch // *Cryobiology*. 2010. Vol. 61. P. 211–219.

213. Копейка Е. Ф. Экологическая ниша как фактор, определяющий криорезистентность сперматозоидов рыб / Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014. Т. 24, № 4. С. 302–311.

214. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity / Y. Zeron, M. Tomczak, J. Crowe, A. Arav // *Cryobiology*. 2002. Vol. 45. P. 143–152.

215. In-depth proteomic analysis of carp (*Cyprinus carpio* L) spermatozoa / M. A. Dietrich, G. J. Arnold, T. Fröhlich, A. Ciereszko // *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*. 2014. Vol. 12. P. 10–15.

216. Öğretmen F., İnanan B. E., Öztürk M. Protective effects of propolis on cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm // *Cryobiology*. 2014. Vol. 68. P. 107–112.

217. Improved post-thaw motility, viability and fertility are achieved by hydrostatic pressure treated bull semen / C. Pribenszky, M. Molnár, A. Horváth, G. Kútvölgyi, A. Harnos, O. Szenci, J. Dengg, J. Lederer // *Reprod. Fertil. Dev.* 2007. Vol. 19. P. 181–182.

218. Sea bass sperm freezability is influenced by motility variables and membrane lipid composition but not by membrane integrity and lipid peroxidation / S. Martinez-Paramo, P. Diogo, M. T. Dinis, M. P. Herráez, C. Sarasquete, E. Cabrita // *Animal Reproduction Science*. 2012. Vol. 131. P. 211–218.

219. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation / J. Chakrabarty, D. Banerjee, D. Pal, J. De, A. Ghosh, G. C. Majumder // *Cryobiology*. 2007. Vol. 54. P. 27–35.

220. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future / E. Mocé, E. Blanch, C. Tomás, J. K. Graham // *Reprod. Dom. Anim.* 2010. Vol. 45, № 2. P. 57–66.

221. Cholesterol/phospholipid ratio in sperm of several domestic species does not directly predict sperm fitness for cryopreservation / C. Labbe, J. F. Bussiere, P. Guillouet, B. Leboeuf, M. Magistrini // *Genet. Sel. Evol.* 2001. Vol. 33. P. 61–74.

222. Characterization of Sperm Plasma Membrane Properties after Cholesterol Modification: Consequences for Cryopreservation of Rainbow Trout Spermatozoa / K. Müller, P. Müller, G. Pincemy, A. Kurz, C. Labbe // *Biology of Reproduction*. 2008. Vol. 78. P. 390–399.

223. Drokin S. I., Stein H., Govorukha T. P. Ultrastructure of carp *Cyprinus carpio* spermatozoa after cooling, dilution and freeze-thawing // *Cryoletters*. 2002. Vol. 24. P. 49–55.

224. Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Ленинград : Наука, 1981. 180 с.

225. Дрокин С. И. Фосфолипиды и жирные кислоты фосфолипидов спермы некоторых пресноводных и морских видов рыб // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 1993. Вып. 104. С. 423–428.

226. Effect of cryopreservation on lipids and some physiological features of spermatozoa from rams pastured in highlands and in valleys / S. I. Drokin, T. N. Vaisberg, E. F. Kopeika, K. D. Miteva, G. L. Pironcheva // *Cytobios*. 1999. Vol. 100, № 393. P. 27–36.

227. Drokin S. I. Phospholipid distribution and fatty acid composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in sperm of some freshwater and marine species of fish // *Aquat. Living Resour.* 1993. Vol. 6. P. 49–56.

228. Bell M. V., Dick J. R., Buda C. Molecular Speciation of Fish Sperm Phospholipids: Large Amounts of Dipolyunsaturated Phosphatidylserine // *Lipids*. 1997. Vol. 32, № 10. P. 1085–1091.

229. Thermal Acclimation and Dietary Lipids Alter the Composition, But Not Fluidity, of Trout Sperm Plasma Membrane / C. Labbe, G. Maisse, K. Müller, A. Zachowski, S. Kaushik, M. Loir // *Lipids*. 1995. Vol. 30, № 1. P. 23–32.



230. Wang Z., Crim L. W. Seasonal changes in the biochemistry of seminal plasma and sperm motility in the ocean pout, *Macrozoarces americanus* // Fish Physiology and Biochemistry. 1997. Vol. 16, № 1. P. 77–83.

231. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy / A. Lenzi, M. Picardo, L. Gandini, F. Dondero // Human Reproduction. 1996. Vol. 2, № 3. P. 246–256.

232. Improving Sperm Cryopreservation with Antifreeze Proteins: Effect on Gilthead Seabream (*Sparus aurata*) Plasma Membrane Lipids / J. Beirão, L. Zilli, S. Vilella, E. Cabrita, R. Schiavone, M. P. Herráez // Biology of Reproduction. 2012. Vol. 86, № 2. P. 1–9.

233. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa / P. S. James, C. A. Wolfe, A. Mackie, S. Ladha, A. Prentice, R. Jones // Human Reproduction. 1999. Vol. 14, № 7. P. 1827–1832.

234. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells / A. Lenzi, L. Gandini, V. Maresca, R. Rago, P. Sgrò, F. Dondero, M. Picardo // Human Reproduction. 2000. Vol. 6, № 3. P. 226–231.

235. Лось Д. А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. 2001. Т. 41. С. 163–198.

236. Копейка Е. Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа. Москва : Изд-во ВНИИПРХ. 1986. 9 с.

237. Cabrita E., Robles V., Herráez M. P. Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species // Boca Raton : Biology Series, CRCPress (Taylor and Francis group), 2009. 549 p.

238. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw / N. S. Prathalingam, W. V. Holt, S. G. Revell, S. Mirczuk, R. A. Fleck, P. F. Watson // Theriogenology. 2006. Vol. 66. P. 1894–1900.

239. Effect of oviductal proteins on sperm functions and lipid peroxidation levels during cryopreservation in buffaloes / A. Kumaresan, M. Ansari, A. Garg, M. Kataria // *Anim. Reprod. Sci.* 2006. Vol. 93. P. 246–257.

240. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / Перший національний конгрес з біоетики, Київ, 2001 р. // *Ендокринологія*. 2003. Т. 8, № 1. С. 142–145.

241. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe, Strasbourg, 1986. 53 p.

242. Чебанов М. С., Галич Е. В., Чмырь Ю. М. Руководство по разведению и выращиванию осетровых рыб. Москва : Росинформагротек, 2004. 135 с.

243. Гордієнко Є. О., Товстяк В. В. Фізика біомембран : Підручник. Київ : Наук. думка, 2009. 272 с.

244. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред / В. Н. Лопатин, А. В. Приезжев, А. Д. Апонасенко, Н. В. Шепелевич [и др.] Москва : Физматлит, 2004. 384 с.

245. Шифрин К. С. Введение в оптику океана. Ленинград : Гидрометеоиздат, 1983. 280 с.

246. Шифрин К. С. Рассеяние света в мутной среде. Москва : Государственное издательство технико-теоретической литературы, 1951. 288 с.

247. Ван де Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами / Пер. с англ. Т. В. Водопьяновой. Под ред. В. В. Соболева. Москва : Издательство иностранной литературы, 1961. 536 с.

248. Бабко А. К., Пилипенко А. Т. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура / Под ред. А. К. Бабко. Москва : Химия, 1968. 388 с.

249. Sperm physiology and quality / R. Billard, J. Cosson, W. Crim, M. Suquet // *Broodstock management and egg and larval quality* / Editors: N. R. Bromage, R. J. Roberts. Blackwell Science, Oxford, 1995. P. 25–52.

250. The effect of cryopreservation of semen from whitefish (*Coregonus lavaretus*) and northern pike (*Esox lucius*) using a glucose-methanol extender on sperm motility parameters and fertilizing ability / G. J. Dietrich, J. Nynca, M. Szczepkowski, S. Dobosz, B. Szczepkowska, A. Ciereszko // *Aquaculture*. 2016. Vol. 464. P. 60–64.

251. The effect of egg yolk, low density lipoproteins, methylxanthines and fertilization diluent on cryopreservation efficiency of northern pike (*Esox lucius*) spermatozoa / I. Babiak, J. Glogowski, M. J. Luczynski, M. Luczynski, W. Demianowicz // *Theriogenology*. 1999. Vol. 52. P. 473–479.

252. Повышение эффективности криоконсервации половых кеток севрюги с помощью электростимуляции / Е. Н. Пономарева, М. М. Богатырева, Н. В. Болонина, А. М. Тихомиров // *Рыбное хозяйство*. 2009. № 1. P. 100–103.

253. Гордиенко Е. А., Пушкаръ. Н. С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Київ : Наук. думка, 1994. 140 с.

254. 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.

255. Зависимость проницаемости мембран клеток СПЭВ для молекул криопротекторов от температуры / Н. А. Чернобай, И. Ф. Коваленко, С. В. Коший [и др.] // *Проблемы криобіології*. 2011. Т. 21, № 1. С. 46–51.

256. Каранова М.В. Состав свободных аминокислот крови и мышц ротана *Perccottus glehni* в период подготовки и завершения гибернации // *Ж. эволюционной биохимии и физиологии*. 2009. Т. 45, № 1. С. 59–67.

257. Юрченко Т. Н. Влияние криопротекторов на биологические системы. Киев : Наукова Думка, 1989. 98 с.

## Додаток А

## Список публікацій здобувача:

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 (*Cyprinus 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 кріорезистентность 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,

O. V. Vashchenko, A. Yu. Puhovkin, E. F. Kopeika, N. A. Kasian, L. V. Budianska, A. 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].

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.

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 (участь із усною доповіддю).

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 (участь із усною доповіддю).

16. Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Фотометрический метод оценки качества спермы карпа // Проблемы криобиологии : материалы конф. «Холод в биологии и медицине», 22–24 мая 2012. Харьков, 2012. Т. 22, № 2. С. 197 (участь із усною доповіддю).

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 (участь із усною доповіддю).

18. Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Осмотическая резистентность сперматозоидов карпа *Cyprinus carpio* // Проблемы криобиологии и криомедицины : материалы конф. «Холод в биологии и медицине», 20–21 мая 2013. Харьков, 2013. Т. 23, № 2. С. 190 (участь із усною доповіддю).

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 (участь із усною доповіддю).

20. Пуговкин А. Ю., Буцкий 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 (заочна участь)..

21. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю. Изменение качества нативной и криоконсервированной 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 (заочна участь).

22. Буцкий К. И., Пуговкин А. Ю. Криорезистентность спермы белого толстолобика после стимуляции его широко используемыми гормональными препаратами // Проблемы криобиологии и криомедицины : материалы конф. «Холод в биологии и медицине», 21–22 мая 2014. Харьков, 2014. Т. 24, № 2. С. 177 (очна участь).

23. Пуговкин А. Ю., Буцкий К. И. Проницаемость мембран сперматозоидов стерляди (*Acipenser ruthenus* L) и карпа (*Cyprinus carpio* L) // Проблемы криобиологии и криомедицины : материалы конф. «Холод в биологии и медицине», 21–22 мая 2014. Харьков, 2014. Т. 24, № 2. С. 178 (участь із усною доповіддю).

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 (участь із усною доповіддю).

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 (заочна участь).

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 (заочна участь).

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 (участь із постерною доповіддю).

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 (очна участь).

29. Пуговкин А. Ю., Копейка Е. Ф. Исследование процесса переноса молекул воды через мембраны сперматозоидов щуки (*Esox lucius L*) // Проблемы криобиологии и криомедицины : материалы конф. «Холод в биологии и медицине», 20–21 мая 2015. Харьков, 2015. Т. 25, № 2. С. 165 (участь із усною доповіддю).

30. Оптимізація складу кріозахисних 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 (заочна участь).

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 (заочна участь).

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 : материалы конф. «Холод в биологии и медицине», 23–24 мая 2016. Харьков, 2016. Т. 26, № 2. С. 160 (участь із усною доповіддю).

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 : материалы конф. «Холод в биологии и медицине», 24–25 мая 2017. Харьков, 2017. Т. 27, № 2. С. 174 (заочна участь).