

Исследование процесса переноса молекул воды через мембраны сперматозоидов щуки (*Esox lucius* L)

А.Ю. Пуговкин, Е.Ф. Копейка

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Study of Water Molecules Transfer Through Pike (*Esox lucius* L) Spermatozoa Membranes

A.Yu. Puhovkin, E.F. Kopeika

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Для обоснованного выбора режимов и сред криоконсервирования и, следовательно, эффективного сохранения генетического материала рыб необходимо более углубленное изучение таких параметров как проницаемость мембран и энергия активации переноса веществ через мембраны сперматозоидов рыб.

Цель исследования – определить осмотическую резистентность сперматозоидов щуки, коэффициент проницаемости мембран для молекул воды и энергию активации переноса молекул воды через мембраны клеток.

Сперму получали в период нереста от самцов щуки массой 1–1,5 кг. Осмотические реакции сперматозоидов исследовали с помощью спектрофотометрического метода [Пуговкин А.Ю. и соавт., 2014] на основании данных о динамике светопропускания суспензий клеток, помещенных в дистиллированную воду и растворы NaCl. Коэффициент проницаемости плазматических мембран сперматозоидов (L_p) для молекул воды определяли, сопоставляя экспериментальные зависимости относительных объемов клеток от времени с данными, полученными при решении уравнений теоретической модели. Энергию активации (E_a) процесса переноса веществ через мембраны клеток рассчитывали из зависимостей $\ln L_p(1/T)$, наклон которых согласно уравнению Аррениуса равен E_a/R , где R – универсальная газовая постоянная.

Проницаемость мембран сперматозоидов щуки для молекул воды составляет $(0,033 \pm 0,007)$ мкм/(атм×мин) (15°C). Снижение проницаемости мембран сперматозоидов для молекул воды в диапазоне $30 \dots 10^\circ\text{C}$ характеризуется энергией активации (64 ± 5) кДж/моль, что свидетельствует о проникновении воды в клетку путем пассивной диффузии через липидный бислой. Характерное время проникновения воды в клетку зависит от осмолярности среды инкубации клеток. Сперматозоиды щуки по реакции на среды различной осмолярности близки к идеальным осмометрам. Известно, что скорость и продолжительность движения, а также относительное число подвижных сперматозоидов зависит от осмолярности, ионного состава и pH среды активации [Alavi S.M.H. и соавт., 2009]. В этом контексте, поддержание осмотического равновесия является одной из наиболее важных функций мембран сперматозоидов, поскольку в процессе криоконсервирования возникают значительные перепады осмотического давления на мембране.

Разработанные нами подходы позволяют исследовать осмотическую толерантность сперматозоидов некоторых пресноводных рыб, могут быть использованы как простые и быстрые тесты функционального состояния клеточных мембран. Полученные результаты способствуют теоретически обоснованному выбору криозащитных сред и режимов криоконсервирования сперматозоидов.

Membrane permeability and activation energy of the substances transfer through the fish spermatozoa membranes should be studied more profoundly, since they are necessary for the reasonable choice of cryopreservation regimens and media, and, consequently, for an effective preservation of fish genetic material.

The objective of the study was to determine the osmotic resistance of pike spermatozoa, the coefficient of membrane permeability for water molecules and the values of activation energy for water molecules transfer through the cell membranes.

Sperm were obtained during the spawning season from males of 1–1.5 kg weight. Osmotic reactions of spermatozoa were studied using spectrophotometric method [Puhovkin A.Yu. *et al.*, 2014] on the basis of data concerning light transmission dynamics of cell suspensions placed into distilled water and NaCl solutions. Permeability coefficient of pike spermatozoa plasma membranes for water molecules (L_p) was determined by fitting the experimental dependencies of cell normalized volumes vs. time and the curve resulted from the data of solved theoretical model equations in given experimental conditions. Activation energy (E_a) of the substances transfer through cell membranes was calculated using $\ln L_p(1/T)$ dependencies, which slope according to Arrhenius equation was equal to E_a/R , where R was universal gas constant.

The pike spermatozoa membranes permeability for water molecules was (0.033 ± 0.007) $\mu\text{m}/(\text{atm} \times \text{min})$ (15°C). The decrease of pike spermatozoa membrane permeability for water molecules within $30 \dots 10^\circ\text{C}$ range was characterized by activation energy of (64 ± 5) kJ/mol, that indicated about the water molecules penetration into spermatozoa via a passive diffusion through the lipid bilayer. Characteristic time of water penetration into a cell depends on the osmolarity of cells incubation medium. By the reaction to media of different osmolarity pike spermatozoa are close to ideal osmometers. It is known that the velocity and duration of movement, as well as the relative number of motile spermatozoa are dependent on the osmolarity, ionic composition and pH of activation medium [Alavi S.M.H. *et al.*, 2009]. In this regard, the maintenance of osmotic equilibrium is one of the most important functions of spermatozoa membranes, because there are significant differences in osmotic pressure on the membrane during cryopreservation.

Developed approaches allow the study of osmotic tolerance of some freshwater fish spermatozoa, also they can be used as simple and quick tests of functional state of cell membranes. The obtained results facilitate the reasonable choice of cryoprotective media and modes of sperm cryopreservation.

