

# Осмотическая резистентность сперматозоидов карпа *Cyprinus carpio*

А.Ю. Пуговкин, Е.Ф. Копейка

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Osmotic Resistance of Carp *Cyprinus carpio* Spermatozoa

A.Yu. Pugovkin, E.F. Kopeika

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

Задачей исследования было создание способа определения осмотической устойчивости сперматозоидов карпа с целью выяснения механизмов криоповреждений сперматозоидов и отбора более качественного материала для дальнейшего использования.

Известно, что при попадании в гипотоническую среду непроникающего вещества объем клетки увеличивается за счет притока внеклеточной воды, что определяется разностью между осмотичностью внутриклеточной и внеклеточной среды. Кроме того, величина изменения объема зависит от видовых и индивидуальных особенностей самца, условий обитания и других факторов [Е.Ф. Копейка, 2007].

При низкой осмотичности внеклеточной среды приток воды в клетку, вызванный значительным перепадом осмотического давления, приводит к критическому увеличению объема и разрыву плазматической мембраны сперматозоида. В силу гетерогенности клеток в суспензии повреждение всех сперматозоидов в суспензии происходит не одновременно, а в течение определенного времени, при этом гибель клеток может быть описана зависимостью числа поврежденных клеток от времени.

В работе использовали разработанный нами спектрофотометрический метод [А.Ю. Пуговкин, 2013]. Сперму карпа получали по принятой в рыбоводной практике методике гипофизарных инъекций. Нативную сперму карпа добавляли в кювету спектрофотометра, заполненную дистиллированной водой, погружали в кювету магнитную мешалку, быстро размешивали содержимое встряхиванием, ставили кювету в кюветное отделение и фиксировали динамику оптической плотности. Полученная зависимость является суперпозицией двух процессов – набухания клетки, отражающегося в уменьшении оптической плотности, и уменьшения числа целых клеток, также приводящего к снижению оптической плотности суспензии. В результате преобразований получали кривую, отображающую динамику повреждения клеток.

В проведенном эксперименте время инкубации сперматозоидов карпа, при котором повреждалось 50% клеток, составило  $273 \pm 21$  с ( $n = 12$ ). Нами была исследована зависимость времени, при котором повреждается 50% инкубированных в дистиллированной воде сперматозоидов карпа, от температуры воды. По нашим данным, при инкубации клеток в среде с температурой  $24 \dots 25^\circ\text{C}$  повреждение сперматозоидов происходило через 150–160 с после начала инкубации, в то время как в среде с температурой  $8 \dots 10^\circ\text{C}$  – через 550–600 с.

На температурную зависимость осмотической резистентности сперматозоидов может оказывать влияние как температура содержания рыб в лабораторных условиях, так и характерная для того или иного вида температура естественного нереста.

The research task was to develop a method for assessing osmotic resistance of carp spermatozoa to elucidate the mechanisms of spermatozoa cryodamage and to select the samples with higher quality for further studies.

Of common knowledge is the fact that when cell appears in a hypotonic solution of non-penetrating substance, cell volume increases due to the influx of extracellular water, which driving force is the difference between osmotic pressure of intra- and extracellular medium. Moreover, the value of the volumetric changes depends on species and individual peculiarities of a male, habitat conditions and other factors [E.F. Kopeika, 2007].

Low osmotic pressure of extracellular medium results in the water influx into a cell caused by significant gradient of osmotic pressure and leads to a critical rise in the volume and rupture of plasma membrane of spermatozoon. Due to heterogeneity of cells in suspensions the injury of all spermatozoa in suspension occurs not simultaneously, but during certain time, herewith the cell death can be described as distribution of the number of damaged cells in time.

This study involved the designed by us spectrophotometric method [A.Yu. Pugovkin, 2013]. Carp sperm was obtained using the methods of pituitary injections traditional in fish breeding. Native carp sperm were added into spectrophotometer cuvette with distilled water, equipped with magnetic stirrer, the content was rapidly mixed with shaking, the cuvette was placed into a holder and the dynamics of optical density was recorded. The resulted dependence was the superposition of two processes: cell swelling reflected in decreased optical density, and decrease in the number of intact cells also leading to a reduction in optical density of the suspension. As the result of transformations we obtained the curve reflecting the dynamics of cell injury.

In the performed experiment the incubation time of carp spermatozoa whereat 50% of cells were damaged was  $273 \pm 21$  s ( $n = 12$ ). We obtained the dependence of time value, when 50% of carp spermatozoa incubated in distilled water became damaged, vs. water temperature. According to our data incubation of cells in the medium of  $24 \dots 25^\circ\text{C}$  resulted in the damage of spermatozoa in 150–160 s after incubation start, while in the medium with the temperature of  $8 \dots 10^\circ\text{C}$  it was observed in 550–600s.

Thus, both temperature of fish maintenance in laboratory conditions and specific for each species spawning temperature can affect temperature dependence of osmotic resistance of spermatozoa.

