

## Определение вероятности образования микроскопических пор в мембранах криоконсервированных сперматозоидов карпа (*Cyprinus carpio*)

К.И. Буцкий<sup>1</sup>, Т.С. Дюбко<sup>1</sup>, И.А. Федуняева<sup>2</sup>, А.Т. Татарец<sup>2</sup>, Е.Ф. Копейка<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины, г. Харьков

## Study of Probability of Microscopic Pore Formation in Post-Thaw Sperm Membranes

K.I. Butskiy<sup>1</sup>, T.S. Dyubko<sup>1</sup>, I.A. Fedunyayeva<sup>2</sup>, A.L. Tatarets<sup>2</sup>, E.F. Kopeika<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Сперматозоиды пресноводных рыб, не утратившие подвижность после криоконсервирования, приобретают повышенную чувствительность к изменениям осмотичности среды. Природа этого явления до сих пор не объяснена. Одной из причин подобного эффекта, возможно, является образование микропор в мембранах сперматозоидов в процессе криоконсервирования [Копейка Е.Ф., 2015]. Поэтому целью данной работы было определить вероятность образования пор и их размер в сперматозоидах карпов, криоконсервированных по 3-этапной программе в солевой криозащитной среде с этиленгликолем [Копейка Е.Ф., 1986].

Для выявления пор были использованы флуоресцентные красители Square-460, DSP-8-4, DSP-16-4 с м. м. 423, 509 и 621, конечная концентрация которых составляла 1–6 мкМ. Интенсивность флуоресценции оценивали до и после криоконсервирования на конфокальном микроскопе LSM 510 META («Carl Zeiss», Германия).

В результате исследования были установлены различия в локализации и интенсивности флуоресценции исследуемых зондов в сперматозоидах до и после криоконсервирования. После криоконсервирования спермы с зондом Square-460 количество клеток с высокой интенсивностью флуоресценции практически не изменилось по сравнению с контролем, тогда как с DSP-16-4 оно было на 40% больше. Также оценивали число сперматозоидов с агрегатами красителя. При окрашивании Square-460 и DSP-8-4 количество клеток с агрегатами под воздействием криоконсервирования не претерпевало существенных изменений, в то время как для DSP-16-4 оно увеличилось более чем наполовину. Тот факт, что количество проникших зондов с молекулярной массой 423 и 508 не изменялось после криоконсервирования, а DSP-16-4 с массой 621 проникало значительно больше, позволяет оценить размер образовавшихся дефектов в мембране. Ранее был рассчитан гидродинамический радиус молекул с различной молекулярной массой [Антонов В.Ф., 2008], для ПЭГ-600 он составлял 0,78 нм.

Таким образом, в результате этих экспериментов было впервые установлено образование пор в криоконсервированных сперматозоидах, радиус которых составляет более 0,78 нм. Это может быть причиной полной утраты подвижности частью клеток и повышения осмотической чувствительности мембран у оставшейся части, способной активироваться.

Spermatozoa of freshwater fish which have not lost the motility after freeze-thawing gain an increased sensitivity to the environmental osmoticity changes. This phenomenon basics have not been elucidated yet. There was supposed that one of the causes of this effect was the formation of micropores in spermatozoa membranes during cryopreservation [Kopeika E.F., 2015]. Therefore the aim of this work was to examine the probability of forming the pores and their dimensions in common carp spermatozoa cryopreserved according to three-step program in a saline cryoprotective medium with ethylene glycol [Kopeika E.F., 1986].

To reveal the pores there were used Square-460, DSP-8-4, DSP-16-4 fluorescent dyes with molecular weights of 423, 509, 621, the final concentration of those made 1–6  $\mu$ M. The fluorescence intensity was assessed prior to and after cryopreservation with confocal microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany).

The research results demonstrated the differences in the localization and intensity of fluorescence of the investigated probes in spermatozoa before and after cryopreservation. After cryopreservation of the sperm with Square-460 probe the number of cells with high fluorescence intensity did not virtually changed if compared with the control, but when using the probe DSP-16-4 it was by 40% higher, that correlated with a decreased motility of spermatozoa. In addition, there was found the number of spermatozoa with dye aggregates. Staining with Square 460 and DSP-8-4 did not changed significantly the number of cells with aggregates following cryopreservation effect, whilst for DSP-16-4 it was increased by more than a half. The fact that the amount of penetrated probe with molecular weight of 423 and 508 was not change after cryopreservation, and DSP-16-4 with molecular weight of 620 penetrated much better after cryopreservation, allowed us to estimate the dimensions of the resulting defects in membranes. Recently the hydrodynamic radius of molecules with different molecular weights was calculated [Antonov V.F., 2008], for PEG-600 it made 0.78 nm.

Thus, the performed experiments allowed to establish for the first time the formation of pores in cryopreserved spermatozoa, the approximate radius of those was more than 0.78 nm. This may be the cause of a complete loss of the motility by a part of the cells and an increased sensitivity of membranes in the remained part being capable of activating.

