

Сукцинатдегидрогеназная и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная активность спермы человека на этапах низкотемпературного консервирования

В.Л. РОДИОНОВА¹, Ю.В. НИКИТЧЕНКО², Н.Н. ЧУБ¹, В.В. ЧЕРЕПАНОВ¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

Succinate-Dehydrogenase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activities of Human Sperm at Low Temperature Preservation Stages

V.L. RODIONOVA¹, Yu.V. NIKITCHENKO², N.N. TCHOUB¹, V.V. CHEREPANOV¹

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

²Kharkiv National University named by V.N.Karazin

Проведено исследование глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной (Г6ФДГ) и сукцинатдегидрогеназной (СДГ) активности спермы человека после инкубации с криозащитной средой (глицерин-лактоза-желток) и после хранения при гипотермии и замораживании до температуры жидкого азота. Активность ферментов незначительно изменялась на этапах низкотемпературного консервирования (НТК) при выбранных режимах охлаждения. Показано достоверное изменение СДГ и Г6ФДГ активности при хранении образцов как с криозащитной средой, так и без нее при -12°C .

Ключевые слова: сперма человека, криоконсервирование, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа.

Проведено дослідження глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної (Г6ФДГ) і сукцинатдегідрогеназної (СДГ) активності сперми людини після інкубації з криозахисним середовищем (гліцерин-лактоза-жовток) і після зберігання при гіпотермії і заморожуванні до температури рідкого азоту. Активність ферментів незначно змінювались на етапах низькотемпературного консервування при вибраних режимах охолодження. Показана достовірна зміна СДГ і Г6ФДГ активності при зберіганні зразків як з криозахисним середовищем, так і без нього при -12°C .

Ключові слова: сперма людини, криоконсервування, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа.

We have carried out the research in glucose-6-phosphatedehydrogenase (G6PDG) and succinate dehydrogenase (SDG) activities in human sperm following the incubation with cryoprotective medium (glycerol-lactose-yolk) and after hypothermic storage and freezing down to liquid nitrogen temperature. At the low temperature steps preservation the activities were characterized with slight differences at selected cooling regimens. Statistically significant variation in SDG and G6PDG activities was demonstrated during samples' storage at -12°C both with and without cryoprotective medium.

Key-words: human sperm, cryopreservation, glucose-6-phosphatedehydrogenase, succinate dehydrogenase.

Замораживание-оттаивание клеток может вызвать значительное нарушение ферментной системы в клетках. Изменение активности фермента после криоконсервирования клеток не может расцениваться только как результат нарушения нативной конформации белка. Криповреждения ферментов, входящих в состав биологических мембран, по-видимому, чаще всего могут быть вторичным ответом на изменение молекулярной архитектуры и фазового состояния липидного компонента мембран под влиянием охлаждения [1].

Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.1) – один из ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот. Этот фермент окисляет сукцинат в фумарат и очень активен во всех клетках. Восстановительные эквиваленты окисляются в дыхательной цепи с образованием АТФ. СДГ является интегральным

Freeze-thawing of cells may cause a considerable enzyme system disorder in cells. Enzyme activity variation following cell cryo-preservation should not be solely considered to be the result of impairment in protein native conformation. Cryodamages of enzymes being the part of biological membranes, could be frequently the secondary response to the change in molecular structure and phase state of membrane lipid components under the cooling effect [1].

Succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1) is one of the key enzymes in tricarboxylic acids cycle. The enzyme acidifies succinate into fumarate and is very active in all cells. Recovering equivalents are oxidised in a respiration chain with ATP formation. SDG is an integral protein of internal mitochondrial membrane and is strongly fixed in its structure. As mitochondria play an important role in maintenance of sperm motility, which is one of the factors determining male fertility

Адрес для корреспонденции: Родионова В.Л., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Rodionova V.L., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

белком внутренней митохондриальной мембраны и прочно фиксируется в ее структуре. Так как митохондрии играют значительную роль в поддержании подвижности спермиев, одного из факторов, определяющих фертильность спермиев [10], сохранность активности СДГ опосредованно характеризует их функциональную способность.

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа КФ.1.1.1.49 катализирует реакцию окисления D-глюкозо-6-фосфата. С этой реакции начинается пентозофосфатный шунт. Фермент находится преимущественно в растворимой фракции клетки. Г6ФДГ устойчива к действию замораживания-оттаивания [1]. Однако было показано, что низкотемпературное консервирование (НТК) спермы животных приводит к выходу в экстрацеллюлярную среду ряда цитоплазматических ферментов, которые коррелируют со степенью разрушения клеток [7-9]. В связи с этим изучение ферментативной активности биологических объектов на этапах НТК имеет большое значение для диагностики морфофункционального состояния и прогноза выживаемости клеток.

Цель данной работы – изучение влияния факторов НТК на СДГ и Г6ФДГ активность спермы человека.

Материалы и методы

Исследовали 27 эякулятов, полученных у 12 доноров после 3-4-дневного полового воздержания. Для разжижения эякуляты помещали на 40-60 мин в термостат при 37°C. Концентрацию и подвижность спермиев подсчитывали в камере Makler (Израиль) в соответствии с рекомендациями ВОЗ [11].

СДГ активность в спермиях человека определяли по модифицированной нами методике [4, 5]. В 1 мл среды, содержащей 7,5 мМ калий-натрий фосфатного буфера (рН 7,4), 0,05 мМ 2,6-дихлорфенол-индофенола, 1 мМ феназинметасульфата, 25 мМ сукцината, 2,5 мМ NaCN, 2 мкМ ротенона, 0,2 %-го тритона X-100, добавляли 0,1 мл эякулята. Активность СДГ выражали в нмоль окисленного сукцината в минуту на 10^6 клеток, используя молярный коэффициент экстинкции 2,6 дихлорфенол-индофенола, равный $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [3].

Г6ФДГ активность в 0,1 мл спермальной жидкости определяли в 1 мл среды, содержащей 120 мМ Трис HCl буфера, рН 7,4; 10 мМ MgCl₂; 0,9 мМ NADP; 2,0 мМ глюкозо-6-фосфата [6]. Оптическую плотность регистрировали на двулучевом спектрофотометре Specord UV VIS (Германия) при длине волны 600 нм при определении СДГ активности и 340 нм Г6ФДГ активности. Все измерения проводили при температуре 37°C и

[10], integrity of SDG activity characterizes indirectly their functional capability.

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) catalyzes an oxidation reaction of D-glucose-6-phosphate. This reaction initiates pentose-phosphate bypass. Enzyme is mainly located in a soluble cell fraction. G6PDG is known to be resistant to freezethawing effect [1]. It was shown therefore that low-temperature preservation of animals' sperm caused a release of the number of cytoplasmatic enzymes correlating with cell damage degree into extracellular medium [7, 8, 9]. In this connection enzyme activity studying in biological objects at low temperature preservation steps is of a significant value for morphofunctional state diagnosis and a cell viability forecast.

The work was aimed to studying the factors of low temperature preservation effect on SDG and G6PDG activities in human sperm.

Materials and methods

We investigated 27 ejaculates obtained from 12 donors after a 3-4 days' sexual abstinence. For dilution ejaculates were placed into thermostat for 40-60 min at 37°C. Concentration and spermatozoa motility were calculated in Makler chamber (Israel) in compliance with the WHO recommendations [12].

SDG activity in human sperm was determined using the modified by us method [4,5]. Medium comprising 7.5 mM potassium-sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.05 mM 2,6-dichlorophenol-indophenol, 1mM phenazinmethasulfate, 25 mM succinate, 2.5 mM NaCN, 2 μM rothenon, 0.2% triton X-100 was added with 0.1 ml of ejaculate. SDG activity was expressed in nMol of reduced succinate in min per 10^6 cells, using molar extinction coefficient for 2,6-dichlorophenol indophenol equal to $21 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [3].

G6PDG activity in 0.1 ml of sperm fluid was evaluated in the 1 ml of medium containing 120 mM of Tris HCl buffer, pH 7.4; 10 mM MgCl₂; 0.9 mM NADP; 2.0 mM glucose-6-phosphate [6]. Optical density was recorded with a double-ray Specord UV VIS spectrophotometer (Germany) at a 600 nm wave length to evaluate SDG activity and 340 nm for G6FDG activity determination. All the variations were accomplished at 37°C and constant shaking. G6PDG activity in sperm fluid was expressed in nMol NADPH per min x 10^6 using molar extinction coefficient equal to $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

For cryopreservation there was used a cryoprotective medium comprising glycerol, lactose, chicken egg yolk (CEY). Sperm samples after a 10-20s CEY exposure were packed into 0.5-0.7ml polymer apyrogenic tubes [11]. Sperm was frozen using the following protocol: 1) 3-step program [2]; 2) rapid freezing by immersing straws into liquid nitrogen; 3)

постоянном перемешивании. Г6ФДГ активность в спермальной жидкости выражали в нмоль NADPH в мин на 10^6 клеток, используя молярный коэффициент экстинкции, равный $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Для криоконсервирования использовали криозащитную среду, содержащую глицерин, лактозу, желток куриного яйца (ГЛЖ). Образцы спермы после экспозиции с ГЛЖ в течение 10-20 мин расфасовывали по 0,5-0,7 мл в полимерные апиrogenные трубки и замораживали: 1) программное криоконсервирование [2]; 2) быстрое замораживание путем погружения соломинок в жидкий азот (скорость замораживания около $1000^\circ\text{C}/\text{мин}$; 3) охлаждение и хранение в холодильнике при -12°C нативных образцов и обработанных ГЛЖ.

Статистическую обработку проводили с помощью программы Excel, используя критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В результате исследования было установлено, что концентрация спермиев в нативных образцах эякулятов равнялась $72 \pm 6,3$ млн/мл, сумма фракций спермиев с быстрым и медленным прогрессивным движением – $54 \pm 5,0\%$. После добавления ГЛЖ концентрация спермиев составляла $35 \pm 3,2$ млн/мл, подвижность – $57 \pm 5,2\%$. При замораживании по программе концентрация спермиев сохранялась $35 \pm 3,1$ млн/мл, а подвижность – $45 \pm 4,3\%$. После быстрого замораживания подвижность в данной

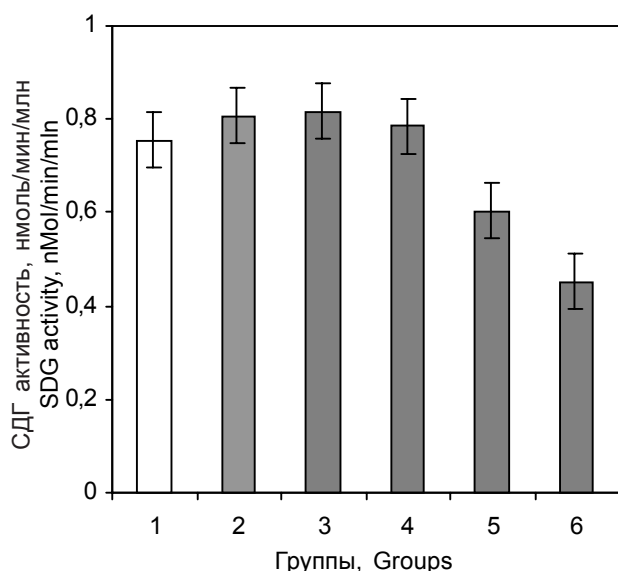


Рис. 1. СДГ активность в спермиях человека: 1 – контроль (натив); 2 – натив+ГЛЖ; 3 – НТК по программе; 4 – быстрый метод-НТК; 5 – охлаждение до -12°C с ГЛЖ; 6 – охлаждение до -12°C без ГЛЖ.

Fig. 1. SDG activity in human sperm: 1 – control (native); 2 – native+CEY; 3 – low temperature storage on the protocol; 4 – low temperature storage (rapid method); 5 – cooling down to -12°C with CEY; 6 – cooling down to -12°C without CEY.

cooling and freezer storage of native and CEY-treated samples at -12°C .

Statistical processing was performed using Excel software with Student's criterion.

Results and discussion

As a result sperm concentration in native ejaculates samples was found to be equal 72 ± 6.3 mln/ml, total number of spermatozoa fractions with rapid and slow progressive movement made $54 \pm 5.0\%$. After CEY addition spermatozoa concentration made 35 ± 3.2 mln/ml, motility was $57 \pm 5.2\%$. When freezing according to the protocol spermatozoa concentration remained 35 ± 3.7 mln/ml with the motility of $45 \pm 4.3\%$. After rapid freezing motility in this group of spermatozoa made $20 \pm 1.8\%$ and after hypothermia (not depending on storage terms) there were no observed motile spermatozoa.

As Fig.1 shows SDG activity in native human spermatozoa (control) made 0.755 ± 0.017 nmol/min/mln ($n=17$). After equilibration with HEY there is observed an increase in SDG activity up to 0.808 ± 0.030 nMol/min/mln ($n=17$), which is not statistically significant. ADG activity after cryopreservation according to the protocol made 0.816 ± 0.022 mol/min/mln ($n=17$). Enzyme integrity at a rapid freezing remained at the control level, i.e. 0.786 ± 0.031 nmol/min/mln. Following storage at -12°C with and without

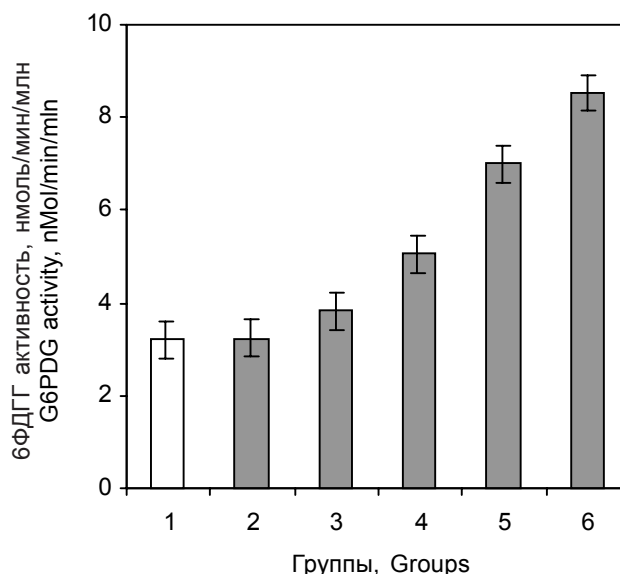


Рис. 2. Г6ФДГ активность в эякулятах до и после криоконсервирования: 1 – контроль (натив); 2 – натив+ГЛЖ; 3 – после НТК по программе; 4 – после НТК (быстрый метод); 5 – охлаждение до -12°C с ГЛЖ; 6 – охлаждение до -12°C без ГЛЖ.

Fig. 2. G6PDG activity in ejaculates prior to and following cryopreservation: 1 – control (native); 2 – native+CEY; 3 – following low temperature storage on the protocol; 4 – following low temperature storage (rapid method); 5 – cooling down to -12°C with CEY; 6 – cooling down to -12°C without CEY.

группе спермиев составляла $20 \pm 1,8\%$, а после гипотермии (независимо от сроков хранения) подвижных спермиев обнаружено не было.

Как видно на рис. 1, СДГ активность в спермиях человека в нативных образцах (контроль) составила $0,755 \pm 0,017$ нмоль в мин/млн ($n=17$). После эквипирации с ГЛЖ наблюдается повышение активности СДГ до $0,808 \pm 0,030$ нмоль в мин/млн ($n=17$), которое является статистически достоверным. После криоконсервирования по программе СДГ активность оставалась на таком же уровне – $0,816 \pm 0,022$ нмоль в мин/млн ($n=17$). При быстром замораживании сохранность фермента оставалась на уровне контроля – $0,786 \pm 0,031$ нмоль в мин/млн. После хранения при -12°C с криопротектором и без него наблюдали достоверное снижение СДГ активности – $0,603 \pm 0,057$ и $0,451 \pm 0,035$ нмоль в мин/млн ($P < 0,05$, $n=6$) соответственно. По-видимому, колебания активности СДГ в образцах связаны с кинетической активностью спермиев.

Как показано на рис. 2, Г6ФДГ активность в спермальной плазме после эквипирации с ГЛЖ и замораживания по программе остаются на уровне контроля. Активность данного фермента в спермальной плазме достоверно выше ($5,05$ нмоль NADPH в мин/млн) после криоконсервирования быстрым методом. Более высокая Г6ФДГ активность отмечается и после хранения при -12°C с криопротектором и без него. Более высокий уровень активности ферментов во внеклеточной среде коррелирует с количеством разрушенных и поврежденных клеток, доля которых в процессе замораживания и оттаивания увеличивается.

Выводы

Таким образом, добавление ГЛЖ и криоконсервирование по программе позволяют сохранить активность исследованных ферментов, которая коррелирует с подвижностью спермиев. Хранение при температуре -12°C в течение 6 ч существенно влияет на СДГ и Г6ФДГ активность спермиев. В результате исследования показано, что оценка активности “дыхательных” ферментов спермиев человека опосредованно характеризует их способность к оплодотворению и ее необходимо проводить после НТК гамет в сочетании с основными параметрами исследования эякулята.

Литература

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под ред. Н.С. Пушкаря и А.М. Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – С. 38-39.
2. Грищенко В.И., Чуб Н.Н., Крамар М.И. и др. Криоконсервирование спермы донора // Пробл. репродукции. – 2001. – №2. – С. 71-73.

cryoprotectant there was observed a considerable fall in SDG activity: 0.603 ± 0.057 and 0.451 ± 0.035 nmol/min/mln ($P < 0.05$ $n=6$), correspondingly. Variation in SDG activity on samples is likely related to kinetic activity of spermatozoa.

As Fig. 2 demonstrates, G6PDG activity in sperm plasma following equilibration with CEY and protocol-based freezing remains at the control level. The enzyme activity in spermal plasma is significantly higher (5.05 nmol NADPH per min/mln) after being cryopreserved with a rapid method. A higher G6PDG activity is also noted following a cryoprotectant-based and cryoprotectant-free storage at -12°C . A higher enzymes activity level in extracellular medium correlates with the amount of destroyed and impaired cells, whose share increases during freeze-thawing process.

Conclusions

Thus CEY addition and protocol-based cryopreservation enable us to keep the activity of the enzymes under study and correlates with the integrity in motile sperm fraction. A 6 hrs' storage at -12°C considerably affects the SDG and G6DG spermatozoa activities and sharply reduces their motility. Evaluation of the activity of “respiratory” human sperm enzymes was shown to indirectly characterize their fertilization capability and it should be studied following low temperature preservation of gametes in combination with main parameters of ejaculate testing .

References

1. *Current problems of cryobiology* / Ed. by Pushkar N.S. and Belous A.M. – Kiev: Naukova dumka, 1981. – P. 38-39.
2. Grischenko V.I., Chub N.N., Kramar M.I. et al. Donor sperm cryopreservation // Problems of reproduction. – 2001. – N2. – P. 71-73.
3. Karuzina I.I., Archakov A.I. Isolation of liver microsomal fraction and characteristics of its oxidative systems / Current methods in biochemistry. – Moscow: Meditsina, 1977. – P. 49-62.
4. Krivchenkova R.S. Determination of succinate dehydrogenase activity in mitochondria suspensions: Current methods in biochemistry. – M.: Meditsina, 1977. – P. 44-46.
5. Petrenko V.V. Activity of rat liver mitochondria succinate dehydrogenase of different age at thyroxin injection at the background of neuroleptins injection (reserpine, ipraside) / Physiology, biochemistry and biophysics of age development. – Kiev: Naukova dumka, 1980. – P. 136-140.
6. Baquer N.Z., Tevary K., Krishman P.S. // Arch. Biochem. Biophys. – 1967. – Vol.120, N1. – P. 22 – 34.
7. Carter J.E., Risch S.J., Graham E.F., Gillehei R.C. The effect of pressure and cooling rate on spermatozoa, kidney tissue and the whole kidney // Cryobiology. – 1973. – Vol. 10, N4. – P. 263-270.
8. Crabo B.G., Braown K.I., Graham E.F. Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa // J. Anim. Sci. – 1972. – Vol. 35, N2. – P. 377-382.
9. Graham E.F., Pace M.M. Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing // Cryobiology. – 1967. – Vol. 4, N2. – P. 75-84.

3. Карузина И.И., Арчаков А.И. Выделение микросомальной фракции печени и характеристика ее окислительных систем / Современные методы в биохимии.– М.: Медицина.– 1977.– С. 49-62.
4. Кривченкова Р.С. Определение активности сукцинатдегидрогеназы в суспензии митохондрий: Современные методы в биохимии – М.: Медицина, 1977.– С. 44-46.
5. Петренко В.В. Активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий печени крыс разного возраста при введении тироксина на фоне введения нейролептинов (резерпина и ипразида) / Физиология, биохимия и биофизика возрастного развития.– Киев: Наук. думка, 1980.– С. 136-140.
6. Baquer N.Z., Tevary K., Krishnan P.S. // Arch. Biochem. Biophys.– 1967.– Vol. 120, N1.– P. 22-34.
7. Carter J.E., Risch S.J., Graham E.F., Gillehei R.C. The effect of pressure and cooling rate on spermatozoa, kidney tissue and the whole kidney // Cryobiology.– 1973.– Vol. 10, N4.– P. 263-270.
8. Crabo B.G., Braown K.I., Graham E.F. Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa // J. Anim. Sci.– 1972.– Vol. 35, N2.– P. 377-382.
9. Graham E.F., Pace M.M. Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing // Cryobiology. – 1967.– Vol. 4, N2.– P. 75-84.
10. Mackenna A. Contribution of the male factor to unexplained infertility: a review // Int. J. Androl.– 1995.– Vol. 18, N1.– P. 58-61.
11. World Health Organization. Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1997.– 22 p.

Accepted in 27.12.2004

Поступила 27.12.2004