

**Биохимические и диэлектрические характеристики фолликулярной жидкости яичников человека после замораживания-отогрева**

UDC 537.226.57.043:612.621

A.G. GERODES<sup>1</sup>, O.A. GOROBCHENKO<sup>2</sup>, O.A. NARDID<sup>1\*</sup>, O.T. NIKOLOV<sup>2</sup>, E.D. ROZANOVA<sup>1</sup>**Biochemical and Dielectric Characteristics of Follicular Fluid from Human Ovary after Freezing-Thawing**

Исследовано влияние размера фолликула, содержания общего белка, сахаров, гормонов (эстрадиола, тестостерона, прогестерона), а также замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  и хранения в жидком азоте на состояние воды в фолликулярной жидкости (ФЖ) яичника человека. Обнаружено увеличение частоты диэлектрической релаксации молекул в ФЖ с ростом размера фолликула. Выявлена тесная зависимость гидратации компонент ФЖ от диаметра фолликула. Установлено, что быстрое замораживание и хранение приводят к понижению частоты диэлектрической релаксации молекул воды в ФЖ, что может быть результатом увеличения в системе количества связанной воды.

**Ключевые слова:** фолликулярная жидкость, замораживание, частота диэлектрической релаксации молекул воды, гидратация.

Досліджено вплив розміру фолікула, вмісту загального білка, сахарів, гормонів (естрадіолу, тестостерону, прогестерону), а також заморожування до  $-196^{\circ}\text{C}$  і зберігання у рідкому азоті на стан води у фолікулярній рідині (ФР) яєчника людини. Визначено збільшення частоти діелектричної релаксації молекул у ФР з ростом розміру фолікула. Виявлена тісна залежність гідратації компонентів ФР від діаметра фолікула. Встановлено, що швидко заморожування і зберігання приводять до зниження частоти діелектричної релаксації молекул води в ФР, яке може бути результатом збільшення у системі кількості зв'язаної води.

**Ключові слова:** фолікулярна рідина, заморожування, частота діелектричної релаксації молекул води, гідратація.

The effects of a follicle size, total protein, sugar and hormone (estradiol, testosterone, progesterone) contents as well as freezing up to  $-196^{\circ}\text{C}$  and storage in liquid nitrogen on water state in follicular fluid (FF) of the human ovary were studied. An enhancement in the frequency of dielectric relaxation of molecules in FF with a follicle size increasing was discovered. A close dependence of FF component hydration on a follicle diameter was revealed. It was shown that a rapid freezing and storage caused a decrease in the frequency of dielectric relaxation of water molecules in FF, which could be a result of a gain in the quantity of bound water in the system.

**Key words:** follicular fluid, freezing, frequency of dielectric relaxation of water molecules, hydration.

Фолликулярная жидкость (ФЖ) яичника является сложной биологической средой, продуктом клеток гранулы, окружающей ооцит в период его созревания. Установлено, что добавление 50% нативной ФЖ в среду Menezo B-2 повышает оплодотворяющую способность спермиев, их функциональную активность и переживаемость. В работе [2] показано, что предварительная инкубация спермиев хряка в 75%-й бычьей ФЖ при  $25^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч перед замораживанием повышает их криорезистентность и защищает от криоповреждений. В связи с этим возникает необходимость сохранить биологически активные свойства ФЖ в исходном состоянии длительное время. Разработка технологического и эффективного способа длительного хранения ФЖ расширит возможности ее применения в разных областях биологии и медицины, в частности для подготовки спермиев к инсеминации [3], культивирования ооцитов и эмбрионов [2, 4].

Ovarian follicular fluid (FF) is a complex biological medium, a product of granulosa cells surrounding the oocyte during its maturation. Adding 50% of native FF to the medium Menezo B-2 was found to increase fertilising ability of spermatozoa, their functional activity and survival. A pre-incubation of the boar spermatozoa in 75% bovine FF at  $25^{\circ}\text{C}$  for 1 hour before freezing was shown [2] to increase their cryoresistance and to protect them from cryoinjuries. In this respect a necessity to preserve biologically active properties of FF on the original level for a long time arises. Development of producible and efficient methods of long storage of FF can widen opportunities of its application in different fields of biology and medicine, particularly for preparation of spermatozoa for insemination [3], cultivation of oocytes and embryos [2, 4].

Low temperature preservation is used for long storage of biological tissues and media. However low temperature influence on biological fluids (FF, plasma,

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

<sup>2</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Перяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>V.N. Karazin Kharkov National University

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3733141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Для длительного хранения биологических тканей и сред используется низкотемпературное консервирование. Однако действие низких температур на биологические жидкости (ФЖ, плазму, сыворотку крови и др.) может изменить ряд физико-химических показателей [9], которые впоследствии будут действовать повреждающе на структуру и функции макромолекул, содержащихся в них, или на межмолекулярные взаимодействия в биологических жидкостях. Большое значение для стабилизации нативной конформации макромолекул имеет гидратационный слой воды, структурно связанный с ней [18]. В этом аспекте интерес представляет изучение влияния замораживания-отогрева и хранения при  $-196^{\circ}\text{C}$  на гидратацию макромолекул ФЖ, полученной из преовуляторных фолликулов яичника человека. В работе был использован метод СВЧ-диэлектрметрии [10], который позволяет регистрировать даже незначительные изменения свойств биологических жидкостей по изменению состояния воды в системе. Это обусловлено тем, что любые структурные или конформационные изменения компонент растворов влияют на соотношение количества свободной и связанной воды.

Цель работы – исследование биохимических показателей ФЖ и сыворотки крови, влияния размера фолликула, а также замораживания и хранения ФЖ при температуре жидкого азота на состояние воды и гидратацию компонент ФЖ, отражающих изменения их структурного и конформационного состояния.

### Материалы и методы

Фолликулярную жидкость получали на базе Центра репродукции человека “Имплант” г. Харькова от 15 женщин (всего 15 фолликулов), прошедших курс лечения бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) ооцита с последующим переносом эмбрионов в полость матки. Все женщины находились в репродуктивном возрасте (25–35 лет) и не имели эндокринных нарушений. В процессе ЭКО проводили медикаментозную стимуляцию фолликулогенеза по длинному протоколу с использованием агонистов релизинг-гормона (“Suprefact”, Hoechst, ЮАР) и человеческого фолликулостимулирующего гормона (“Menogon”, Ferring, Германия) [16]. Жидкость из доминантных фолликулов (17–25 мм) получали путем трансвагинальной пункции и аспирации фолликулов на 12–14-й день менструального цикла после предварительной инъекции 10000 ед. человеческого хорионального гонадотропина (“Profasi”, Serono, Великобритания), который вводили за 34–36 ч перед аспирацией. Объем полученной жидкости, зависящий от размера фолликула (коэффициент корреляции 0,91 при уровне значимости

blood serum *etc.*) can change a number of physico-chemical indices [9], which afterwards will damage structures and functions of macromolecules or intermolecular interactions in biological fluids. Hydration layer of water bound structurally with macromolecules [18] is of great importance for the stabilisation of a native conformation of macromolecules. In this aspect the investigation of freezing-thawing and  $-196^{\circ}\text{C}$  storage influence on hydration of macromolecules of FF obtained from human ovarian preovulatory follicles is of great interest. The method of UHF-dielectrometry, which allows recording even minor changes of properties of biological fluids judging by changes in water state in the system, was used in the work. It is due to the fact that any structural or conformational changes of a solution components affect the free water and bound water ratio.

The aim of the work is to study biochemical parameters of FF and blood serum, the influence of a follicle size as well as the influence of freezing and storage of FF at liquid nitrogen temperature on the water state and hydration of FF components, which reflect changes of their structure and conformation.

### Materials and methods

Follicular fluid was obtained in the Human Reproduction Center “Implant” (Kharkov) from 15 women (15 follicles on the whole), who were under infertility treatment by the method of *in vitro* fertilisation of an oocyte with the following transfer of an embryo into the uterine cavity. All the women were at the reproductive age (25–35 years old) and had no endocrine disorders. In the process of *in vitro* fertilization drug stimulation of folliculogenesis according to the long protocol with release hormone agonists (Suprefact, Hoechst, RSA) and human follicle-stimulating hormone (Menogon, Ferring, Germany) was carried out [16]. Fluid from dominant follicles (17–25 mm) was obtained by transvaginal puncture and aspiration of follicles on the 12<sup>th</sup>–14<sup>th</sup> day of a menstrual cycle after the preliminary injection of 10,000 units of human chorionic gonadotropin (Profasi, Serono, UK), which was administered 34–36 hours prior to the aspiration. The volume of the fluid obtained, which depended on a follicle size (the correlation coefficient 0.91 with the significance level less than 0.01, the amount of sampling 11), was measured with a graduated vial. After extracting oocytes and assessing their quality the remaining FF was centrifuged at 200 g for 10–15 min to have cumulus and blood cells precipitated. The supernatant was used in the experiments. The FF obtained was packaged into apyrogenic plastic ampoules in 0.7–1.0 ml, marked and frozen at the rate of 300–400 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  by a direct plunging of the ampoules into liquid nitrogen. A part of the frozen material was stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  for a month. The FF samples were thawed in a water bath

менее 0,01, объем выборки 11), измеряли мерной пробиркой. После выделения ооцитов и оценки их качества оставшуюся ФЖ центрифугировали при 200 г в течение 10–15 мин для осаждения клеток кумулюса и крови. Для исследований использовали супернатант. Полученную ФЖ расфасовывали в апиrogenные пластиковые ампулы по 0,7–1,0 мл, маркировали и замораживали со скоростью 300–400°C/мин прямым погружением ампул в жидкий азот. Часть замороженного материала хранили при –196°C в течение месяца. Образцы ФЖ размораживали на водяной бане при 37°C. Нативную ФЖ (контроль) исследовали в течение 3–6 ч после выделения. Сыворотку крови пациенток получали по стандартной методике, используемой в клинике [6].

Уровень гормонов (эстрадиола, тестостерона и прогестерона) в ФЖ и сыворотке определяли методом трехфазного иммуноферментного анализа [17]. При определении общего белка по методу Lowry [28] в качестве стандарта использовали сывороточный альбумин человека. Для изучения распределения белков по молекулярным массам использовали гель-хроматографию на колонке 30×1 см с сефадексом G-200. Концентрацию белка во фракциях объемом 1 мл определяли спектрофотометрическим методом. Сахар в ФЖ и сыворотке крови исследовали по методу [19]. Диэлектрическую проницаемость ФЖ измеряли на СВЧ-диэлектрическом резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц при комнатной температуре (20°C) по методу, описанному в [22]. Погрешность измерений составляла 0,1% для  $\epsilon'$  и 0,5% для  $\epsilon''$ . Частоту диэлектрической релаксации молекул воды  $f_d$  в образцах рассчитывали по уравнениям Дебая [5].

Нормальность распределений проверяли при помощи теста Шапиро-Уилка. При сравнении биохимических показателей ФЖ и сыворотки использовали парный t-критерий Стьюдента. Равенство дисперсий оценивали критерием Фишера. Тесноту связи между показателями определяли по коэффициенту корреляции Пирсона. Сравнение нативных, замороженных и хранившихся в жидком азоте образцов ФЖ осуществляли при помощи дисперсионного анализа повторных измерений, множественное сравнение групп – t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистическую обработку результатов осуществляли в программе OriginPro 8.

## Результаты и обсуждение

Средние значения биохимических показателей ФЖ и сыворотки крови пациенток представлены в табл. 1. При уровне значимости  $p = 0,05$  обнаружено достоверное понижение среднего значения концентрации общего белка, эстрадиола и тестостерона в ФЖ по сравнению с сывороткой. Наблюдае-

at 37°C. The native FF (control) was studied within 3–6 hours after obtaining. The patients' blood sera were obtained according to the standard technique used in the clinic [6].

The hormone (estradiol, testosterone and progesterone) levels in FF and blood were determined by the three phase immune-enzyme assay [17]. When the total protein content by Lowry method [28] being estimated, human serum albumin was used as the standard. To study the protein distribution by molecular weights gel-chromatography on a column 30×1 cm filled with Sephadex G-200 was applied. Protein concentrations in the 1 ml fractions were registered spectrophotometrically. FF and blood sugar contents were determined according to the method [19]. FF dielectric permittivity was recorded with a resonator UHF-dielectricmeter at the frequency of 9.2 GHz at the room temperature (20°C) according to the method [22]. The pre-precision of measurements was 0.1% for  $\epsilon'$  and 0.5% for  $\epsilon''$ . The frequency of dielectric relaxation of water molecules,  $f_d$ , in the samples was calculated by Debye equations [5].

The normalcy of distribution was checked with the Shapiro-Wilks test. The FF and serum biochemical indices were compared with the Student paired t-test. The equality of variances was estimated with the Fisher test. The closeness of connection between the indices was assessed with the Pearson correlation coefficient. The comparison of the native, frozen and stored in liquid nitrogen FF samples was performed with the variance analysis of repeated measurements. The multiple comparison of the groups was performed with the Student t-test with the Bonferroni correction. The data were statistically processed using OriginPro 8 software.

## Results and discussion

The average values of the patients' FF and blood serum biochemical indices are presented in Table 1. A significant reduction in the total protein concentration, estradiol and testosterone levels in FF in comparison with the blood serum values was observed (the significance level  $p = 0.05$ ). There is an increase in the progesterone content. Testosterone variances in FF are lower than those in serum, but FF progesterone variances are higher. The most variable parameters are the FF volume in a follicle, estradiol and testosterone concentrations in FF as well as progesterone concentration in serum. The variation coefficients for these parameters are 20% and higher. The least variable parameters are the frequency of dielectric relaxation of water molecules in FF and the total protein contents in FF and serum (the variation coefficients are lower than 10%). Positive correlations between estradiol and testosterone concentrations, between total protein and sugar contents in blood serum and a negative correlation

тся повышение среднего значения концентрации прогестерона. Дисперсии тестостерона в ФЖ меньше, чем в сыворотке, а прогестерона больше. Наиболее вариabельными параметрами являются объем ФЖ в фолликуле, концентрации эстрадиола и тестостерона в ФЖ, а также концентрация прогестерона в сыворотке. Для этих показателей коэффициенты вариации составляют 20% и выше. Наименее вариabельны – частота диэлектрической релаксации молекул воды в ФЖ и концентрация общего белка в ФЖ и сыворотке (коэффициенты вариации менее 10%). Наблюдаются положительная корреляция между концентрацией эстрадиола и тестостерона, между общим белком и сахаром в сыворотке крови и отрицательная – между концентрацией эстрадиола и белка в ФЖ ( $p < 0,05$ ). С увеличением размера фолликула уменьшаются концентрации стероидных гормонов эстрадиола ( $p < 0,01$ ) и тестостерона ( $p = 0,07$ ) (табл. 2). Не наблюдается явной корреляции между размером фолликула и концентрацией сахаров в ФЖ. Ме-

between estradiol concentration and total protein content in FF ( $p < 0.05$ ) are found. The bigger a follicle is, the lower steroid hormone estradiol ( $p < 0.01$ ) and testosterone ( $p = 0.07$ ) concentrations are (Table 2). No correlation between the size of a follicle and sugar content in FF was found. A significant difference in relative protein contents in FF of big and small follicles in the fractions containing the most high-molecular proteins with the molecular weights of 600–800 kDa and larger was found using gel-chromatography (Fig. 1). In the diagram presented one can see that in the FF obtained from small follicles the portion of high-molecular proteins is higher. A distinctive feature of FF is the presence of high-molecular proteoglycans in it. They are carbohydrate-protein complexes, in which polysaccharide chains are bound covalently to protein holding a central location in the molecule [20]. Proteoglycans are highly negatively charged because of great quantity of lateral polyanionic chains. These unique structural properties allow binding a large amount of water and provide a high hydration capacity of proteo-

**Таблица 1.** Средние значения биохимических и физических показателей ФЖ яичника человека и сыворотки крови

**Table 1.** Average values of biochemical and physical indices of human ovarian FF and blood serum

Показатель Index	Образец Sample	Среднее значение Average	Стандартное отклонение Standard deviation	Доверительный интервал Confidence interval	Дисперсия Variance	Коэффициент вариации Variation coefficient	Объем выборки Amount of sampling
Общий белок, г/л Total protein, g/l	Сыворотка	67	6	4	32	0,08	12
	ФЖ	57	5	3	27	0,09	12
Сахар, ммоль/л Sugar, mmole/l	Сыворотка	4,0	0,7	0,5	0,6	0,19	12
	ФЖ	4,5	0,6	0,4	0,4	0,13	11
Эстрадиол, нмоль/л Estradiol, nmole/l	Сыворотка	0,37	0,04	0,02	0,001	0,14	12
	ФЖ	0,18	0,05	0,03	0,002	0,27	11
Тестостерон, нмоль/л Testosterone, nmole/l	Сыворотка	1,0	0,2	0,09	0,02	0,15	12
	ФЖ	0,17	0,04	0,03	0,002	0,23	11
Прогестерон, нмоль/л Progesterone, nmole/l	Сыворотка	13	4	4	16	0,32	6
	ФЖ	160	12	12	142	0,08	6
Диаметр фолликула, мм Follicle diameter, mm	–	20	2	1	5	0,11	11
Объем ФЖ в фолликуле, мл FF volume in the follicle, ml	–	2,4	0,7	0,4	0,3	0,29	15
Частота диэлектрической релаксации молекул воды ( $f_d$ ) в ФЖ, Гц Frequency of dielectric relaxation of water molecules ( $f_d$ ) in FF, Hz	–	$14,7 \times 10^9$	$0,3 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9$	$8 \times 10^{16}$	0,02	9



тодом гель-хроматографии было обнаружено достоверное различие в относительном содержании белка в ФЖ малых и больших фолликулов во фракциях с наиболее высокомолекулярными белками молекулярной массы 600–800 кДа и выше (рис. 1). Из приведенной диаграммы видно, что в ФЖ, полученной из малых фолликулов, доля высокомолекулярных белков больше. Характерная особенность фолликулярной жидкости – наличие в ней высокомолекулярных протеогликанов. Они представляют собой углевод-белковые комплексы, в которых полисахаридные цепи ковалентно связаны с белком, занимающим в молекуле центральное положение [20]. Протеогликаны имеют большой отрицательный заряд из-за значительного количества латеральных полианионных цепей. Эти уникальные структурные свойства позволяют связывать большое количество воды и обеспечивают высокую гидратационную емкость протеогликанов [21]. Полученные методом гель-хроматографии данные позволяют предположить, что в малых фолликулах относительное

содержание протеогликанов выше, чем в больших. Релаксационные свойства молекул воды в ФЖ также существенно зависят от размера фолликула: с его увеличением значение  $f_d$  ФЖ возрастает (коэффициент корреляции 0,91 при уровне значимости менее 0,01) (табл. 2). Полученные нами данные согласуются с данными зависимости вязкости ФЖ от размера фолликула [29]. По Дебаю вязкость и частота диэлектрической релаксации полярной жидкости, состоящей из сферических диполей, имеют обратную зависимость [5]. Согласно работе [29] вязкость ФЖ, полученной из более крупных фолликулов, имеет тенденцию к уменьшению, что может быть связано со снижением концентрации некоторых компонент ФЖ и увеличением содержания свободной воды.

В ФЖ выявлены белки плазмы, стероидсвязывающий белок, ферменты, мукополисахариды, стероиды, гормоны гипофиза, нестероидные овари-

**Таблица 2.** Коэффициенты корреляции между различными биохимическими и физическими показателями ФЖ и сыворотки крови

**Table 2.** Correlation coefficients between different biochemical and physical indices of FF and blood serum

Показатель Index	Коэффициент корреляции Correlation coefficient	Уровень значимости корреляции Significance level of correlation	Объем выборки Amount of sampling
Эстрадиол ФЖ и объем ФЖ фолликула FF estradiol and FF volume in the follicle	– 0,78	0,005	11
Тестостерон ФЖ и объем ФЖ фолликула FF testosterone and FF volume in the follicle	– 0,57	0,07	11
Частота диэлектрической релаксации молекул воды ( $f_d$ ) и объем ФЖ фолликула Frequency of dielectric relaxation of water molecules ( $f_d$ ) and FF volume in the follicle	0,91	0,0008	9
Белок и сахар сыворотки Serum protein and sugar	0,68	0,02	12
Белок и эстрадиол ФЖ FF protein and estradiol	– 0,71	0,02	11
Эстрадиол и тестостерон ФЖ FF estradiol and testosterone	0,64	0,03	11
Частота диэлектрической релаксации молекул воды ( $f_d$ ) и белок ФЖ Frequency of dielectric relaxation of water molecules ( $f_d$ ) and FF protein	0,68	0,14	6
Удельный декремент диэлектрической проницаемости и объем ФЖ фолликула Permittivity specific decrement and FF volume in the follicle	– 0,97	0,002	6
Удельный декремент диэлектрической проницаемости и диаметр фолликула Permittivity specific decrement and the follicle diameter	– 0,998	0,0001	5

glycans [21]. The data obtained using gel-chromatography allow assuming that the proteoglycan relative quantity in small follicles is higher than that in big ones.

The relaxational properties of water molecules in FF also depend greatly on a follicle size: the bigger a follicle is, the higher the FF  $f_d$  value is (the correlation coefficient 0.91 with the significance level less than 0.01) (Table 2). The results obtained are consistent with the data on the dependence of the FF viscosity upon a follicle size [29]. According to Debye viscosity and frequency of dielectric relaxation of a polar liquid consisting of spherical dipoles are in an inverse relationship [5]. In the work [29] the viscosity of FF obtained from bigger follicles tends to decrease, which can be due to a decline in concentrations of FF certain components and a rise in the free water content.

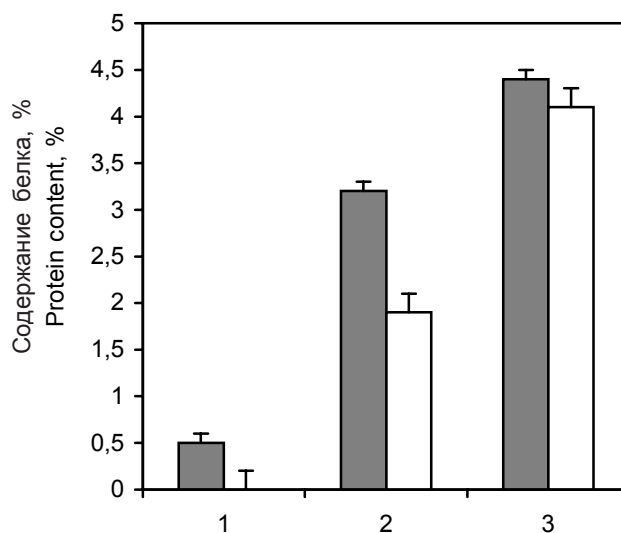
Plasma proteins, a steroid-binding protein, enzymes, mucopolysaccharides, steroids, hypophysis hormones, nonsteroid ovarian factors *etc.* are found in FF [13,

льные факторы и др. [13, 26]. Состав ФЖ варьирует в зависимости от гормонального статуса женщины, стадии созревания фолликула и целого ряда других факторов. Все это может оказывать существенное влияние на  $f_d$  ФЖ. В наших исследованиях из всех фолликулов были получены зрелые ооциты, а концентрации половых гормонов в ФЖ и сыворотке крови пациентов соответствовали нормальным показателям для этих биологических жидкостей. Поэтому можно предположить, что различия в значениях  $f_d$  ФЖ разных по размеру фолликулов связаны с содержанием большего количества свободной воды в ФЖ более крупных фолликулов. Данное предположение согласуется с уменьшением концентрации стероидных гормонов при увеличении размера фолликула. Кроме того, согласно данным работ [25, 27] с увеличением размера фолликула в ФЖ уменьшается концентрация калия, хлорида, лактата, мочевины и триглицеридов. Однако концентрация этих компонент намного меньше концентрации белка, поэтому вклад последнего в изменение  $f_d$  ФЖ будет более существенным.

Предполагая, что вклад белка в изменение состояния воды в ФЖ является определяющим, мы провели оценку степени гидратации компонент ФЖ непосредственно по уменьшению диэлектрической проницаемости исследуемой системы по отношению к чистой воде (декременту диэлектрической проницаемости). Метод СВЧ-диэлектротометрии основан на том, что диэлектрическая проницаемость водного раствора пропорциональна числу несвязанных молекул воды [23], а степень гидратации растворенного вещества пропорциональна удельному декременту диэлектрической проницаемости (декременту, поделенному на концентрацию растворенного вещества). Наиболее тесная взаимосвязь наблюдается между удельным декрементом диэлектрической проницаемости и диаметром фолликула (коэффициент корреляции  $-0,998$  при уровне значимости менее  $0,01$ ). В данном случае можно выяснить функциональную зависимость степени гидратации компонент ФЖ от диаметра фолликула, что свидетельствует о ее существенной роли в фолликулогенезе. Полученные результаты согласуются с относительно высоким содержанием протеогликанов в фолликулах меньшего размера.

Таким образом, наблюдаемый рост  $f_d$  ФЖ с увеличением размера фолликула можно объяснить снижением концентрации связанной воды в ФЖ вследствие уменьшения относительного содержания высокомолекулярных протеогликанов.

Участие воды в межмолекулярных взаимодействиях обуславливает интерес к исследованию ее состояния в биологических жидкостях, подвергнутых действию замораживания-отогрева. Мы исследовали влияние замораживания при самом



**Рис. 1.** Содержание белка в высокомолекулярных фракциях с молекулярной массой, кДа: 1 – 800 и более; 2 – 750; 3 – 600; ■ – малые фолликулы; □ – большие фолликулы.

**Fig. 1.** Content in the high-molecular fractions of protein with molecular weight of (kDa): 1 – 800 and higher; 2 – 750; 3 – 600; ■ – small follicles; □ – large follicles.

26]. The FF composition varies depending on the hormone status of a woman, a stage of a follicle maturation and a number of other factors. All those can affect considerably the FF  $f_d$ . In our study mature oocytes were obtained from all the follicles, and the sex hormone levels in the patients' FF and blood serum corresponded to the normal values for these biological fluids. That is why one can assume that differences in the FF  $f_d$  values for follicles of different sizes are associated with a higher amount of free water in FF of bigger follicles. This assumption agrees with decreasing concentrations of steroid hormones as the size of a follicle increases. Besides according to the data [25, 27] the bigger a follicle is, the lower potassium, chloride, lactate, urea and triglyceride concentrations in FF are. Nevertheless, the concentrations of these components are much lower than the protein concentration, so the latter contributes to the FF  $f_d$  changes more considerably.

Surmising a determinative contribution of proteins to changing water state in FF we assessed directly the hydration of FF components judging by a reduction in the dielectric permittivity of the studied system related to pure water (the dielectric permittivity decrement). The UHF-dielectrometry method is based on finding that dielectric permittivity of an aqueous solution is proportional to the number of non-bound water molecules [23], and hydration extent of a dissolved substance is proportional to the specific dielectric permittivity decrement (the decrement normalized to concentration of dissolved substance). The closest relationship is ob-

щадящем для биомакромолекул режиме до температуры жидкого азота ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) и хранения при этой температуре в течение месяца на релаксационные свойства воды в ФЖ.

В процессе исследования было установлено, что средние значения  $f_d$  ФЖ при замораживании-отогреве и при хранении образцов в жидком азоте достоверно ( $p = 0,05$ ) понижаются по сравнению с контролем (нативная ФЖ), независимо от размера фолликулов, в то же время между средними значениями  $f_d$  образцов после замораживания-отогрева и хранения отличий не наблюдалось (рис. 2). Следует отметить, что дисперсия средних величин  $f_d$  в нативной и подвергшейся замораживанию-отогреву ФЖ одинакова, что подтверждает отсутствие индивидуальных проявлений влияния замораживания и длительного хранения при низких температурах на эти показатели. Понижение  $f_d$  ФЖ при замораживании свидетельствует об уменьшении количества свободной воды в системе, что может являться результатом повышения степени гидратации отдельных компонент ФЖ, например белков [8]. Это, вероятно, обусловлено появлением дополнительных участков связывания для молекул воды, что может быть следствием изменения конформации макромолекул при действии низких температур. Исследование методом гель-хроматографии белкового состава ФЖ после замораживания-отогрева показало, что как для малых, так и больших фолликул наблюдается снижение содержания высокомолекулярных фракций белка. Это позволяет предположить, что некоторые молекулы с высокой молекулярной массой дезагрегируют. Возможно, таковыми являются протеогликаны, которые могут достаточно легко деполимеризоваться при изменении условий окружающей среды, в частности при повышении концентрации солей [30].

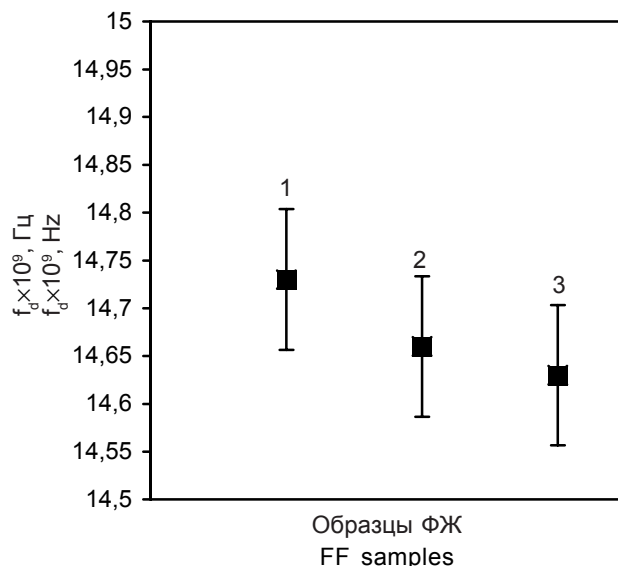
К основным факторам, лежащим в основе криоповреждений белков, ферментов, гормонов белковой природы, входящих в состав биологических жидкостей, относятся снижение pH и гидратации [24], изменение тоничности среды, повышение концентрации солей [15, 17]. Анализ литературы о влиянии низких температур на изолированные или входящие в состав биологических систем протеины позволяет заключить, что наиболее криолабильными являются белки, имеющие четвертичную структуру [16]. Одно изменение pH может вызвать дестабилизацию белков с четвертичной структурой [12, 13], а образующийся при понижении температуры в микрофазах закристаллизовавшаяся матрица концентрированный раствор солей и метаболитов – распад белка на субъединицы [24]. Кроме того, нарушение системы пептидно-водородных связей может изменить структуру  $\alpha$ -спиралей в направлении статистического клубка [8].

served between the specific permittivity decrement and the follicle diameter (the correlation coefficient made  $-0.998$  with the significance level less than 0.01). In this case it is possible to ascertain a functional dependence of the hydration of FF components upon the follicle diameter, which attests its considerable role in folliculogenesis. The results obtained are consistent with a relatively high proteoglycan content in smaller follicles.

Thus, the rise in the FF  $f_d$  observed as the follicle enlarges can be explained by a reduction in the concentration of bound water in FF owing to a decline in high-molecular proteoglycan relative content.

Participation of water in intermolecular interactions determines interest to studies of its state in biological fluids subjected to freezing-thawing. We studied the influence of freezing under the most permissive for biomacromolecules regimen up to the temperature of liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) and storage at this temperature for a month on relaxational properties of water in FF.

It was established that the average values of the FF  $f_d$  after freezing-thawing and storage of the samples in liquid nitrogen decreased significantly ( $p = 0.05$ ) in comparison with the control ones (native FF) regardless of the follicle sizes. At the same time there were no differences between the average values of the FF  $f_d$  after freezing-thawing and those after storage (Fig. 2). It should be noted that the variances of the average values of the  $f_d$  for the native FF and the FF subjected to freezing-thawing were the same, that



**Рис. 2.** Частота диэлектрической релаксации молекул воды нативной ФЖ (контроль), замороженной до  $-196^{\circ}\text{C}$  и хранившейся месяц: 1 – контроль; 2 – замораживание; 3 – хранение.

**Fig. 2.** Frequency of dielectric relaxation of water molecules in native (control), frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  and stored for a month at  $-196^{\circ}\text{C}$  FF: 1 – control; 2 – freezing; 3 – storage.

Эти процессы сопровождаются перегруппировкой отдельных элементов макромолекул, что приводит к увеличению количества мест связывания для молекул воды и повышению степени гидратации макромолекул.

### Выводы

Проведенные исследования показали возможность использования радиофизических методов для изучения механизмов криоповреждения биологических жидкостей при низкотемпературном воздействии. Установлено, что быстрое замораживание до  $-196^{\circ}\text{C}$  и хранение в жидком азоте приводят к понижению частоты диэлектрической релаксации молекул воды в ФЖ, что может быть результатом увеличения степени гидратации ее компонент в результате конформационных изменений макромолекул, которые, однако, не приводят к существенным повреждениям их структуры. Хранение ФЖ в течение месяца не оказывает влияния на ее диэлектрические характеристики по сравнению с образцами после замораживания-отогрева.

Обнаружено увеличение частоты диэлектрической релаксации молекул воды в ФЖ с ростом размера фолликула. Выявлена тесная зависимость гидратации компонент ФЖ от диаметра фолликула.

### Литература

1. Аскоченская Н.А., Петин Н.С. Структура воды и ее роль в биологических системах // Успехи современной биологии.— 1972.— Т. 73, №2.— С. 288–306.
2. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П. и др. Использование фолликулярной жидкости человека на этапе культивирования гамет и эмбрионов в программе ЭКО // Пробл. репродукции.— 1999.— №6.— С. 43–46.
3. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Никитченко Ю.В. и др. Роль антиоксидантной системы фолликулярной жидкости в сохранении биологических свойств спермиев человека // Биологический вестник.— 1999.— Т. 3, №1–2.— С. 36–40.
4. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Петрушко М.П. Влияние нативной и криоконсервированной фолликулярной жидкости человека на оплодотворяющую способность человека *in vitro* // Пробл. криобиологии.— 1999.— № 1.— С. 45–46.
5. Дебай П. Полярные молекулы.— М.— Л., 1931.— 245 с.
6. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова.— М.: Медицина, 1987.— 368 с.
7. Леонов Б.Н., Нардид О.А., Моисеев В.А. Влияние состава растворителя на структуру сывороточного альбумина в растворе // Тез. докладов V Всесоюзной конференции по спектроскопии биополимеров.— Харьков, 1984.— С. 142–143.
8. Марковский А.Л. Влияние факторов криоконсервации на гидратацию глобулярных белков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1984.— 20 с.
9. Нардид Э.О., Цымбал Л.В., Нардид О.А. Влияние режимов замораживания на динамику водно-белковой системы сыворотки кордовой крови человека // Пробл. криобиологии.— 2005.— Т. 15, №3.— С. 544–545.
10. Нардид О.А., Горобченко О.А., Ніколов О.Т. та інш. Дослідження впливу низьких температур на сироватку кордо-

confirms the absence of individual displays of freezing and long low temperature storage effects on these parameters. A decline in the  $FF f_d$  after freezing attests a decrease of free water amount in the system, that can be a consequence of an enhancement in hydration of FF certain components, *e. g.* proteins [8]. It is likely to be due to emergence of additional loci binding water molecules, which can be caused by macromolecule conformation changes affected by low temperature. Gel-chromatographic analysis of the FF protein composition after freezing-thawing revealed a reduction in high-molecular protein fraction contents for small follicles as well as for big ones. This allows contemplating the disaggregation of some molecules with high molecular weights. They may be proteoglycans, which depolymerize easily enough when environmental conditions are changing, particularly when salt concentrations are rising [30].

A decrease in pH and hydration [24], changes of a medium tonicity, a rise in salt concentrations [15, 17] belong to the main factors underlying cryoinjuries of proteins, enzymes, proteinaceous hormones, which are parts of biological fluids. The review of literature on low temperature influence upon isolated proteins or proteins as parts of biological systems allows concluding that quaternary structure proteins are the most cryolabile [16]. A pH change itself can destabilize quaternary structure proteins [12, 13], and a concentrated salt and metabolite solution forming in microphases of crystallized matrix can result in a protein degradation into subunits [24]. Besides disruption of peptide-hydrogen bonds can change  $\alpha$ -helical structures towards random coils [8]. These processes are accompanied by a realignment of certain elements in macromolecules, which leads to an increase in the amount of loci binding water molecules and a rise in the macromolecule hydration.

### Conclusions

The investigation carried out demonstrated a possibility of using radiophysical methods for studying cryoinjury mechanisms of biological fluids under low temperature impact. It was ascertained that a rapid freezing to  $-196^{\circ}\text{C}$  and storage in liquid nitrogen led to a reduction in the frequency of dielectric relaxation of water molecules in FF, which could be a consequence of an increase in the hydration of its components. That, in its turn, was a result of macromolecule conformational changes, which, however, caused no conspicuous damages of their structure. One-month storage of FF had no effect on its dielectric characteristics as compared to the samples before freezing-thawing.

A rise in the frequency of dielectric relaxation of water molecules in FF as a follicle enlarges was found. A close dependence of the hydration of FF components on a follicle diameter was discovered.



вої крові методом діелектрометрії надзвичайно високих частот // Фізіологічний журнал.– 2005.– Т. 51, №5.– С. 56–60.

11. Пасынский А.Г., Эльпинер И.Э. О зависимости гидратации белков от pH и температуры среды // ДАН СССР.– 1955.– Т. 105, № 6.– С. 1296–1299.
12. Пфайль В.П., Привалов П.Н. Конформационные изменения в белках // Биохимическая термодинамика.– М.: Мир, 1982.– С. 95–137.
13. Репродуктивная эндокринология / Под ред. С.С.К. Йена, Р.Б. Джаффе.– М.: Медицина, 1998.– Т. 1.– 701 с.
14. Хенوخ М.А., Першина В.П., Латинская Е.М. Влияние глубокого замораживания на белковые растворы // Цитология.– 1966.– Т. 8, №6.– С. 769–772.
15. Хуппель П., Шлейх Т. Влияние нейтральных солей на структуру и конформационную стабильность // Структура и стабильность биологических макромолекул.– М.: Мир, 1973.– 480 с.
16. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия. Теоретические и практические подходы / Под ред. В.И. Кулакова, Б.В. Леонова.– М.: МИА, 2000.– 783 с.
17. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Н.Тица.– М.: Лабинформ, 1997.– 26 с.
18. Якубе Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки.– М.: Мир, 1985.– 455 с.
19. Barharm D., Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system // Analyst.– 1972.– Vol. 97.– P. 142–145.
20. Eriksen G.V., Carlstedt I., Mörgelin M. et al. Isolation and characterization of proteoglycans from human follicular fluid // Biochem J.– 1999.– Vol. 340, Pt. 3.– P. 613–620.
21. Götting C., Kuhn J., Tinnenberg H.R. et al. High xylotransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells // Mol. Hum. Reprod.– 2002.– Vol. 8, N12.– P. 1079–1086.
22. Hackl E.V., Gatash S.V., Nikolov O.T. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions // J. Biochem. Biophys. Methods.– 2005.– Vol. 63, N2.– P. 137–148.
23. Hasted J.B., Riston D.M., Collie C.H. Dielectric properties of aqueous ionic solutions. Part I and II // J. Chem. Phys.– 1948.– Vol. 16, N1.– P. 1–21.
24. Hey M.J., Clough J.M., Taylor D.J. Ion effects on macromolecules in aqueous solutions // Nature.– 1976.– Vol. 262, N5571.– P. 807–809.
25. Iwata H., Hashimoto S., Ohota M. et al. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes // Reproduction.– 2004.– Vol. 127, N2.– P. 159–164.
26. Klein N.A., Battaglia D.E., Woodruff T.K. et al. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2000.– Vol. 85, N12.– P. 4520–4525.
27. Leroy J.L., Vanholder T., Delanghe J.R. et al. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows // Anim. Reprod. Sci.– 2004.– Vol. 80, N3–4.– P. 201–211.
28. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– Vol. 193, N1.– P. 265–275.
29. Luck M.R., Ye J., Almislimani H., Hibberd S. Follicular fluid rheology and the duration of the ovulatory process // J. Reprod. Fertil.– 2000.– Vol. 120, N2.– P. 411–421.
30. Rueda C., Arias C., Galera P. et al. Mucopolysaccharides in aqueous solutions: effect of ionic strength on titration curves // Farmaco.– 2001.– Vol. 56, N 5–7.– P. 527–532.

## References

1. Askochenskaya N.A., Petinova N.S. Water structure and its role in biological systems // Uspekhi Sovremennoy Biologii.– 1972.– Vol. 73, N2.– P. 288–306.
2. Grischenko V.I., Gerodes A.G., Petrushko M.P. et al. Usage of human follicular fluid on the cultivation stage of gametes and embryos in the program of in vitro fertilisation // Problemy Reproduktsii.– 1999.– N6.– P. 43–46.
3. Grischenko V.I., Gerodes A.G., Nikitchenko Yu.V. et al. Role of antioxidant system of follicular fluid in maintaining biological properties of human spermatozooids // Biologicheskii Vestnik.– 1999.– Vol. 3, N1–2.– P. 36–40.
4. Grischenko V.I., Gerodes A.G., Petrushko M.P. Influence of native and cryopreserved human follicular fluid on human fertilising capacity in vitro // Problems of Cryobiology.– 1999.– N1.– P. 45–46.
5. Debye P. Polar molecules.– Moscow-Leningrad, 1931.– 245 p.
6. Laboratory methods of investigation in clinic: Manual / Ed. by V.V. Menshikov.– M.: Meditsina, 1987.– 368 p.
7. Leonov B.N., Nardid O.A., Moiseyev V.A. Influence of a solvent composition on structure of serous albumin in solution // Proceedings of the 5<sup>th</sup> All-Union conference on biopolymer spectroscopy.– P. 142–143.
8. Markovsky A.L. Influence of cryopreservation factors on globular protein hydration: Author's abstract of thesis of cand. of biol. sci.– Kharkov, 1984.– 20 p.
9. Nardid E.O., Tsymbal L.V., Nardid O.A. Influence of cryopreservation regimens on dynamics of water-protein system of human cord blood serum // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 544–545.
10. Nardid O.A., Gorobchenko O.A., Nikolov O.T. et al. Studies of low temperature influence on cord blood serum by the method of ultra-high frequency dielectrometry // Fisiologichnyy Zhurnal.– 2005.– Vol. 51, N5.– P. 56–60.
11. Pasyynskiy A.G., Elpiner I.E. About dependence of protein hydration on pH and environmental temperature // Doklady Akademii Nauk SSSR.– 1955.– Vol. 105, N6.– P. 1296–1299.
12. Pfeil W., Privalov P.N. Conformational changes in proteins // In: Biochemical thermodynamics.– Moscow: Mir, 1982.– P. 95–137.
13. Reproductive endocrinology / Ed. by S.S.C. Jen, R.B. Jaffe.– Moscow: Meditsina, 1998.– Vol. 1.– 701 p.
14. Khenokh M.A., Persina V.P., Latinskaya Ye.M. Influence of deep freezing on protein solutions // Tsitologiya.– 1966.– Vol. 8, N 6.– P. 769–772.
15. Hippel P., Schleich T. Influence of neutral salts on structure and conformational stability / In: Structure and stability of biological macromolecules.– Moscow: Mir, 1973.– 480 p.
16. In vitro fertilisation and its novel trends in male and female infertility treatment / Ed. by V.I. Kulakov, B.V. Leonov.– Moscow: MIA, 2000.– 783 p.
17. Encyclopaedia of clinical laboratory tests / Ed. by N.Tits.– Moscow: Labirinform, 1997.– 26 p.
18. Jakube H.D., Jeschkeit H. Aminoacids, peptides, proteins.– Moscow: Mir, 1985.– 455 p.
19. Barharm D., Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system // Analyst.– 1972.– Vol. 97.– P. 142–145.
20. Eriksen G.V., Carlstedt I., Mörgelin M. et al. Isolation and characterization of proteoglycans from human follicular fluid // Biochem J.– 1999.– Vol. 340, Pt. 3.– P. 613–620.
21. Götting C., Kuhn J., Tinnenberg H.R. et al. High xylotransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells // Mol. Hum. Reprod.– 2002.– Vol. 8, N12.– P. 1079–1086.
22. Hackl E.V., Gatash S.V., Nikolov O.T. Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions // J. Biochem. Biophys. Methods.– 2005.– Vol. 63, N2.– P. 137–148.

31. Zeng W.X, Isobe N., Terada T. Effects of exposure to bovine follicular fluid before freezing on cryoresistance of boar spermatozoa // Anim. Sci. J.– 2001.– Vol. 72, N4.- P. 291–298.

*Поступила 22.12.2009  
Рецензент М.П. Петрушко*

23. Hasted J.B., Riston D.M., Collie C.H. Dielectric properties of aqueous ionic solutions. Part I and II // J. Chem. Phys.– 1948.– Vol. 16, N1.– P. 1–21.
24. Hey M.J., Clough J.M., Taylor D.J. Ion effects on macromolecules in aqueous solutions // Nature.– 1976.– Vol. 262, N5571.– P. 807–809.
25. Iwata H., Hashimoto S., Ohota M. et al. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes // Reproduction.– 2004.– Vol. 127, N2.– P. 159–164.
26. Klein N.A., Battaglia D.E., Woodruff T.K. et al. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2000.– Vol. 85, N12.– P. 4520–4525.
27. Leroy J.L., Vanholder T., Delanghe J.R. et al. Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows // Anim. Reprod. Sci.– 2004.– Vol. 80, N3–4.– P. 201–211.
28. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– Vol. 193, N1.– P. 265–275.
29. Luck M.R., Ye J., Almislimani H., Hibberd S. Follicular fluid rheology and the duration of the ovulatory process // J. Reprod. Fertil.– 2000.– Vol. 120, N2.– P. 411–421.
30. Rueda C., Arias C., Galera P. et al. Mucopolysaccharides in aqueous solutions: effect of ionic strength on titration curves // Farmaco.– 2001.– Vol. 56, N 5–7.– P. 527–532.
31. Zeng W.X, Isobe N., Terada T. Effects of exposure to bovine follicular fluid before freezing on cryoresistance of boar spermatozoa // Anim. Sci. J.– 2001.– Vol. 72, N4.- P. 291–298.

*Accepted in 22.12.2009*