

Роль про- и антиоксидантных свойств биологически активных веществ в повышении устойчивости клеток к гипотермии и криоконсервированию

В.И. КАБАЧНЫЙ, Н.И. ГОРБУНОВА

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Role of Pro- and Antioxidant Properties of Biologically Active Substances When Increasing Cell Resistance to Hypothermia and Cryopreservation

V.I. KABACHNY, N.I. GORBUNOVA

National Pharmaceutical University, Kharkov

Исследовано влияние различных по химической природе биологически активных веществ (БАВ) на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран и антиоксидантную (АО) ферментную систему в сперматозоидах быка в условиях гипотермии и криоконсервирования. Показано, что регуляция баланса между про- и антиоксидантными системами клетки при участии производных гетерозидов (ПГ) К321 и К322 обеспечивает устойчивость клеток к охлаждению, на что указывает повышение подвижности деконсервированных клеток соответственно на 33,6 ($p < 0,05$) и 44,6% ($p < 0,05$) в сравнении с контролем. Стимуляция подвижности нативных сперматозоидов пентоксифиллином (ПФ) и кофеином (КФ) сопровождается повышением ПОЛ, что может быть одним из факторов снижения их функциональной активности после криоконсервирования.

Ключевые слова: сперматозоиды, гипотермия, криоконсервирование, перекисное окисление липидов, антиоксиданты.

Досліджено вплив різних за хімічною природою біологічно активних речовин на процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) мембран та антиоксидантну ферментну систему в сперматозоїдах бугая за умов гіпотермії та криоконсервування. Показано, що регуляція балансу між про- та антиоксидантними системами клітин за участю похідних гетерозидів К321 і К322 забезпечує стійкість сперматозоїдів до охолодження, на що вказує підвищення рухливості деконсервованих клітин відповідно на 33,6 ($p < 0,05$) та 44,6% ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем. Стимуляція рухливості нативних сперматозоїдів пентоксифіліном і кофеїном супроводжується підвищенням ПОЛ, що може бути одним із факторів зниження їх функціональної активності після криоконсервування.

Ключові слова: сперматозоїди, гіпотермія, криоконсервування, перекисне окиснення ліпідів, антиоксиданти.

The effect of biologically active substances (BAS) with different chemical origin nature on lipid peroxidation (LPO) processes in the membranes and an antioxidant (AO) enzyme system in bovine spermatozoa under hypothermia and cryopreservation, was under study. The regulation of balance between pro- and antioxidant cell systems with participation of K321 and K322 heteroside derivatives provides a cell resistance to cooling, that is manifested by an increase in the motility of frozen-thawed cells by 33.6 ($p < 0.05$) and 44.6% ($p < 0.05$), correspondingly in comparison with the control. The motility stimulation in native spermatozoa with pentoxifylline (PF) and caffeine (CF) is accompanied with LPO increase, that can be one of the factors of a decrease in their functional activity after cryopreservation.

Key-words: spermatozoa, hypotermia, cryopreservation, lipid peroxidation, antioxidants.

Теоретическая основа долговременного низкотемпературного хранения биологического материала – термокинетическая зависимость снижения скорости химических (в том числе и биохимических) процессов от температуры. Однако в многочисленных работах утверждается факт интенсификации ПОЛ мембран в условиях охлаждения, индуцируемого усиленной продукцией супероксид-аниона (O_2^-), что считается одним из факторов нарушения их целостности и снижения функциональной активности клеток после отогрева [10, 11].

В связи с этим усилия многих исследователей направлены на “тушение” активных форм кислорода (АФК) введением антиоксидантов в среды для хранения биологического материала [2, 12].

Адрес для корреспонденции: Кабачный В.И., Национальный фармацевтический университет, ул. Блюхера, 4, г. Харьков, Украина 61002; тел.: +38 (0572) 67-98-38, e-mail: kabachny@ukrfa.kharkov.ua

Theoretical base for a long-term low temperature storage of biological material is thermokinetic dependency of a decrease in the rate of chemical processes (including biochemical ones) with a temperature reduction. The fact of LPO intensification in membranes under cooling, induced by a strengthened production of superoxide-anion (O_2^-), considered as one of the disorder factors in their integrity and a decrease in functional activity of cells after thawing, is stated in numerous papers [10, 11].

In this connection the efforts of many researchers are directed to the “extinction” of active oxide forms (AOF) by the AO introducing into the media for biological material storage [2, 12]. However this way for cryoprotective media modification did not find a wide application due to the limitation of nomenclative

Address for correspondence: Kabachny V.I., National Pharmaceutical University, 4, Blyukhera str., Kharkov, Ukraine 61002; tel.: +380 572 67 9838, e-mail: kabachny@ukrfa.kharkov.ua

Однако данный способ модификации криозащитных сред не нашел широкого применения из-за ограниченности номенклатурного спектра веществ, разнонаправленного или малоэффективного их действия и видоспецифичности биологического материала.

Цель настоящей работы – исследование зависимости криопротекторных свойств различных по химической природе БАВ от их антиоксидантной активности. Объектом исследования были выбраны производные гетерозидов, криопротекторное действие которых и его механизм описаны в [3].

Материалы и методы

Материалом исследования служила сперма быка. Эякулят одного животного (количество образцов $n=7$) разбавляли глюкозо-цитратно-желточной средой. Концентрация сперматозоидов в суспензии составляла 20 млн клеток/мл. Исследуемые вещества 10^{-8} моль/л 7-метил-N-малеогетерозид (K321) и 10^{-7} моль/л N-малеогетерозид (K322) были добавлены в состав стандартной глицерин-содержащей криозащитной среды, в которой инкубировали нативные сперматозоиды при 37°C в течение 30 мин, после чего клетки хранили 3 ч при 4°C и замораживали по стандартной методике [9], отогревали при 40°C на водяной бане. Для сравнения были выбраны производные метилксантина: $3,5 \times 10^{-3}$ моль/л пентоксифиллина (ПФ) $6,0 \times 10^{-3}$ моль/л кофеина (КФ) и антиоксидант глутатион восстановленный (ГВ) с концентрацией 2×10^{-3} моль/л. Контрольные образцы содержали эквивалентный объем буфера Тироде (pH 7,2). Биологический скрининг на криопротекторную активность проводили, исследуя микроскопическим методом подвижность сперматозоидов до и после проведения цикла замораживания-оттаивания. Нативные и отогретье после гипотермии и криоконсервирования сперматозоиды выделяли дифференциальным центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин, супернатант отделяли, а осадок отмывали и ресуспендировали в буфере Тироде (pH 7,2). Содержание малонового диальдегида (МДА) в сперматозоидах оценивали по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), используя набор “Агат” (Россия). Определяли активность ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) по степени торможения реакции окисления кверцетина [4], глутатионредуктазы (ГР) по убыли НАДФН в реакции с окисленным глутатионом [8], глутатионпероксидазы (ГП) по убыли ГВ в пероксидазной реакции, инициированной с помощью трет-бутила [6], каталазы по скорости разложения перекиси водорода [7]. При измерении содержания общего белка

spectrum in substances, their differently orientated or slightly efficient action and biological material specificity.

The aim of this work was to investigate the dependency of BAS cryoprotective properties with a different chemical origin on their AO activity. As the investigation object we selected heteroside derivatives which cryoprotective effect and its mechanism were described in the paper [3].

Materials and methods

Bovine sperm was the material for investigation. The ejaculate for one animal (number of samples, $n=7$) was diluted with glucose-citrate-yolk medium. The spermatozoa concentration in a suspension made 20 million cells/ml. The studied substances of 10^{-8} mol/l 7-methyl-N-maleoheteroside (K321) and 10^{-7} mol/l N-maleoheteroside (K322) were added to the composition of standard glycerol-containing cryoprotective medium, where the native spermatozoa were incubated at 37°C for 30 min, after that the cells were stored for 3 hrs at 4°C and frozen by the standard methods [9]. They were thawed on water bath at 40°C . Such methylxanthine derivatives as: $3,5 \times 10^{-3}$ mol/l pentoxifylline (PF) and $6.0 \cdot 10^{-3}$ Mol/l caffeine (CF) and AO recovered glutathione (RG) with 2×10^{-3} Mol/l concentration were selected for comparing. The control samples comprised the equivalent volume of Tyrode's buffer (pH 7.2). Biological screening for cryoprotective activity was performed by studying the spermatozoa motility before and after freeze-thawing cycle by means of microscopic method. The native and thawed after hypothermia and cryopreservation spermatozoa were isolated using differential centrifuging under 1000 rpm during 10 min, a supernatant was removed and the sediment was washed-out and resuspended in Tyrode's buffer (pH 7.2). The malone dialdehyde (MDA) content in spermatozoa was estimated by the test with thiobarbituric acid (TBA) using the “Agat” kit (Russia). The activity of enzymes was determined as following: for superoxide dismutase (SOD) it was done by the inhibition degree of meletin oxidation reaction [4], for glutathione reductase (GR) by the NADPH decrease in the reaction with oxidised glutathione [8], for glutathione peroxidase (GP) by RG decrease in peroxidase reaction, initiated with tret-butyl [6] and for catalase by the rate of hydrogen peroxide disintegration [7]. When measuring the content of a total protein in a sample with biuretic method we used the standard “Agat” kit (Russia). The results were statistically processed using the SPSS statistical software.

Results and discussion

Biological screening of heteroside derivatives for cryoprotective activity included the investigation of motile native and frozen-thawed spermatozoa, frozen in cryoprotective medium, containing the studied

в образце биуретовым методом использовали стандартный набор "Агар" (Россия). Результаты статистически обрабатывали при помощи пакета статистических программ SPSS.

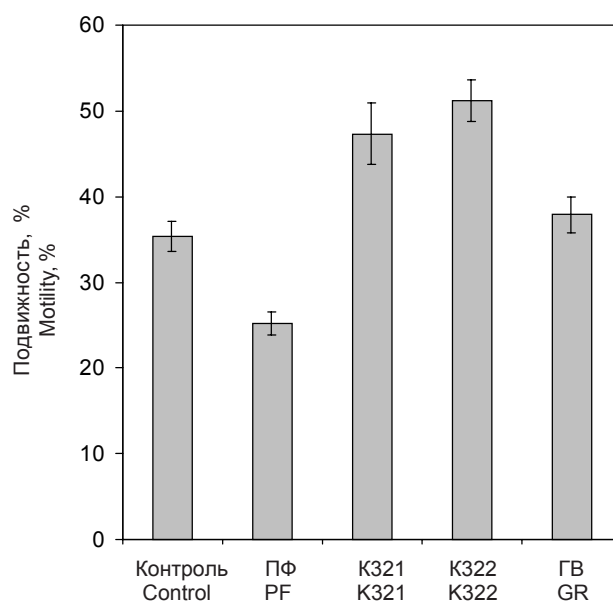
Результаты и обсуждение

Биологический скрининг производных гетерозидов на криопротекторную активность включал исследование подвижности нативных и деконсервированных сперматозоидов, замороженных в криозащитной среде, содержащей исследуемые вещества (рисунок). Снижение подвижности замороженно-оттаянных клеток на 28,8% обнаружили в среде, содержащей ПФ, тогда как K321 и K322 сохранили их подвижность на уровне, который был соответственно на 33,6 и 44,6% выше, чем в деконсервированном контроле. Добавление в криозащитную среду ГВ не привело к достоверному повышению подвижности деконсервированных сперматозоидов в сравнении с контролем. Результаты эксперимента указывают на то, что метилксантины не обладают криопротекторными свойствами [13], а гетерозиды проявили криопротекторную активность. Действие ГВ при замораживании физиологически полноценных сперматозоидов оказалось малоэффективным.

Исследование влияния охлаждения на ПОЛ и АО-ферментную систему сперматозоидов показало, что хранение клеток в условиях гипотермии сопровождается ингибированием скорости протекания процессов ПОЛ, о чем свидетельствует снижение содержания МДА на 20%, инактивацией СОД на 68,5 и ГР на 45,3%, тогда как активность ГП возросла на 65,8%, а активность каталазы в клетке вообще не проявилась (табл. 1). После криоконсервирования содержание МДА в сперматозоидах достоверно не изменилось в сравнении с нормотермией, однако активность СОД понизилась на 71,1, ГР – на 52,0, а ГП – всего лишь на 15% по отношению к исходному уровню (табл. 1). Из полученных результатов следует, что протекание биохимических процессов в клетке подчиняется законам химической кинетики, т.е. сопровождается уменьшением АО-ферментной активности и ингибированием ПОЛ при снижении температуры. Проявление активности ГП в условиях гипотермии может быть обусловлено большей устойчивостью фермента к охлаждению до 0°C и/или увеличением количества субстрата. Криоконсервирование сперматозоидов с последующим отогревом сопровождалось большим снижением активности ферментов по сравнению с гипотермией, что, вероятно, является результатом криодеструкции как самих ферментов, так и структурных элементов клетки. Вместе с тем, как и в случае с энергопродуцирующими ферментами [3], доля

substances (Figure). A decrease in the motility of frozen-thawed cells by 28.8% was revealed in the PF-containing medium, meanwhile K321 and K322 kept their motility at the level, by 33.6 and 44.6% higher, correspondingly, than in a frozen-thawed control. The addition of GR into a cryoprotective medium did not result in a statistical and significant augmentation of motility in frozen-thawed spermatozoa in comparison with the control. The experiment results indicate the fact that the methylxanthines have no cryoprotective properties [13], but heterosides manifested it. The RG action when freezing physiologically integral spermatozoa occurred to be of low efficiency.

The investigation of cooling effect on LPO and AO-enzyme system of spermatozoa demonstrated, that the storage of cells under hypothermia was accompanied with inhibiting the rate of LPO proceeding, that was testified by a decrease in MDA content by 20%, SOD inactivation by 68.5 and GR by 45.3%, meanwhile the GP activity augmented by 65.8% and catalase activity in a cell was not manifested at all (Table 1). After cryopreservation the MDA content in spermatozoa did not statistically and significantly change in comparison with normothermia, however the SOD activity reduced by 71.1, for GR it was by 52.0 and only by 15% for GP in comparison with the initial level (Table 1). The obtained results show that the biochemical process proceeding in a cell are subjected to the rules of chemical kinetics, *i.e.* are accompanied with a reduction of AO-enzyme activity and LPO inhibition during temperature decrease. The manifestation of GP activity under hypothermia can be stipulated by a



Подвижность деконсервированных сперматозоидов, хранившихся в стандартной криозащитной среде, содержащей добавки БАВ.

Motility of frozen-thawed spermatozoa, stored under standard cryoprotective medium with BAS additives

криогенных поврежденный незначительна и составила для СОД 2,6, а для ГР – 6,7%. При этом снижение активности ГП на 15% по отношению к исходному уровню и на 49% по отношению к гипотермической активации может быть объяснено большим повреждением митохондриальных ферментов в сравнении с цитоплазматическими, так как 1/3 от общего содержания ГП локализована в мембранах митохондрий [1].

Нормотермия. Для оценки вклада АО компоненты в эффективность криопротекторного действия БАВ исследовали влияние производных гетерозидов на ПОЛ и АО ферменты в нативных сперматозоидах (табл. 2). Препаратами сравнения служили метилксантины, стимулирующие энерговыработку в сперматозоидах [5], и антиоксидант ГВ, используемый как добавка к криозащитным средам для хранения сперматозоидов быка [2]. Инкубация нативных сперматозоидов с ПФ и КФ привела к повышению содержания МДА в клетках на 34,4 и 20,1% соответственно. Действие метилксантинов на активность АО ферментов неоднозначно: ПФ ингибировал активность СОД на 38,9% и не влиял на глутатион-зависимые ферменты, тогда как КФ повысил

Таблица 1. Содержание МДА и активность АО ферментов в сперматозоидах, хранившихся в условиях нормо-, гипотермии и криоконсервирования

Table 1. MDA content and AO enzyme activity in spermatozoa, stored under conditions of normo-, hypothermia and cryopreservation

Условия хранения Storage conditions	МДА, нмоль/г белка MDA, nMol/g of protein	Активность ферментов Enzyme activity		
		СОД, нг/г белка SOD, ng/g of protein	ГП, мккат/г белка GP, µcat/g of protein	ГР, нмоль НАДФН/г белка GR, nmol NADPH/g of protein
Нормотермия Normothermia	0,407±0,045	251,37±66,4	53,27±18,77	0,296±0,084
Гипотермия Hypothermia	0,325±0,064 ²	79,13±23,65 ¹	88,33±25,73 ²	0,162±0,029 ¹
Криоконсер – вирование Cryopreservation	0,422±0,082	72,53±3,75	45,3±3,4	0,142±0,017

Примечание: достоверность различий по отношению к нормотермии: ¹ – p<0,01, ² – p<0,05.

Notes: statistically significant changes comparing to the data of normothermia, ¹ – p<0.01, ² – p<0.05.

greater enzyme resistance to cooling down to 0°C and by an increase in substrate amount. The spermatozoa cryopreservation with following thawing was accompanied with a greater reduction of enzyme activity in comparison with hypothermia, that probably resulted from a cryodestruction in both enzymes themselves and cell structural elements under freezing and thawing conditions. However as in the case of energy-producing enzymes [3], a part of cryogenic damages was insignificant and made 2.6 for SOD and 6.7% for GR. At the same time a decrease in GP activity by 15% in respect to the initial level and by 49% in respect to hypothermic activation can be explained by a high damage in mitochondria enzymes if comparing with cytoplasmic ones, because the 1/3 of the total GP content is localised in mitochondria membranes [1].

Normothermia. In order to estimate the contribution of AO component into the efficiency of BAS cryoprotective effect there was investigated the influence of heteroside derivatives on LPO and AO enzymes in native spermatozoa (Table 2). The preparations for comparing were as follows: methylxanthines, stimulating energy production in spermatozoa [5], and RG antioxidant, used as an additive to cryoprotective media for bovine spermatozoa storage [2]. The incubation of native spermatozoa with PF and CF resulted in the augmentation of MDA content in cells by 34.4 and 20.1%,

Таблица 2. Влияние метилксантинов и гетерозидов на содержание МДА и активность АО ферментов в нативных сперматозоидах

Table 2. Effect of methyl xanthines and heterosides on the MDA content and AO enzyme activity in native spermatozoa

Исследуемое вещество Studied substance	МДА, нмоль/г белка MDA, nMol/g of protein	Активность ферментов Enzyme activity		
		СОД, нг/г белка SOD, ng/g of protein	ГП, мккат/г белка GP, µcat/g of protein	ГР, нмоль НАДФН/г белка GR, nmol NADPH/g of protein
Контроль Control	0,407±0,045	251,37±66,4	53,27±18,77	0,296±0,084
ПФ PF	0,545±0,072 ²	153,6±8,75	57,17±16,87	0,305±0,070
КФ CF	0,489±0,170 ²	135,77±30,95 ¹	64,17±19,5 ²	0,192±0,070 ²
К321	0,303±0,007	182,8±45,1 ²	73,27±2,21 ¹	0,483±0,095 ²
К322	0,312±0,003	150,63±33,9 ²	57,23±17,78	0,204±0,045 ²
ГВ RG	0,623±0,024 ¹	277,47±104,8 ²	46,77±13,39 ²	0,202±0,070 ²

Примечание: достоверность различий по отношению к контролю: ¹ – p<0,01, ² – p<0,05.

Notes: statistically significant changes comparing to the control data, ¹ – p<0.01, ² – p<0.05.

активность СОД и ГП на 46,9 и 19,5% соответственно и ингибировал активность ГР на 35%. Гетерозиды К321 и К322, наоборот, ингибировали не только продукцию МДА на 25,6 и 23,3%, но и активность СОД на 27,3 и 40% соответственно. На глутатион-зависимые ферменты гетерозиды действуют по-разному: К321 повысил активность ГП и ГР на 37,6 и 63,2% соответственно, тогда как К322 не влиял на активность ГП и ингибировал активность ГР на 31,1%. После инкубации сперматозоидов с ГВ содержание МДА повысилось на 53,1% на фоне снижения активности ГР на 31,8 и ГП на 12,2%. В данном случае очевидно прооксидантное действие ГВ.

В [1, 14] сообщалось, что ГВ может оказывать не только антиоксидантное, но и прооксидантное действие. Вероятно, проявление прооксидантной активности ГВ в данных условиях определяется его избыточным количеством, что может служить источником свободных радикалов.

Анализ полученных данных позволил предположить, что интенсификация ПОЛ при действии метилксантинов в условиях нормотермии обусловлена их энергостимулирующим действием и является результатом усиления всех метаболических процессов в клетке. У гетерозидов отмечен незначительный, но одинаковый по величине АО эффект. Наблюдаемое при этом понижение активности СОД можно рассматривать как проявление компенсаторной реакции в условиях ингибирования ПОЛ гетерозидами, или инактивация фермента происходит в результате усиленного "тушения" им АФК на начальных этапах их продуцирования ($r=0,99$). Значительная активация глутатион-зависимых ферментов при действии К321 все же указывает на протекание перекисных процессов, а превалирование активности ГР по отношению к ГП почти в 2 раза свидетельствует об альтернативном пути нивелирования АФК. Несмотря на то, что К321 и К322 являются представителями одного ряда БАВ, механизмы ингибирования ПОЛ при их воздействии разные. Так, при воздействии К322 корреляционный анализ указал на отсутствие связи между всеми изучаемыми показателями, следовательно, понижение содержания МДА, вероятно, обусловлено его непосредственным влиянием на прооксидантную систему клеток.

Гипотермия. Аналогичные исследования были проведены после гипотермического хранения сперматозоидов (табл. 3). В условиях гипотермии все БАВ усилили продукцию ПОЛ. Содержание МДА в средах с ПФ, КФ, К321, К322 и ГВ повысилось на 14,5; 44,3; 36,3; 44,3 и 55,7% соответственно. При этом наблюдалось синхронное повышение активности АО ферментов. Наибольшая активация отмечалась для СОД, активность

соответственно. The effect of methylxanthines on the AO enzyme activity is not uniform: PF inhibited the SOD activity by 38.9% and did not affect the glutathione-dependent enzymes, whereas CF increased the SOD and GP activity by 46.9 and 19.5%, correspondingly, as well as inhibited the GR activity by 35%. In contrast, the K321 and K322 heterosides inhibited not only MDA production by 25.6 and 23.3% but the SOD activity by 27.3 and 40%, correspondingly. Heterosides affect glutathione-dependent enzymes in a different way: K321 increases GP and GR activity by 37.6 and 63.2%, correspondingly, K322 does not affect GP activity and inhibits GR activity by 31.1%. After incubating spermatozoa with GR the MDA content increased by 53.1% at the background of reduction of GR activity by 31.8 and GP by 12.2%. In this case a prooxidant effect of GR is evident.

In the papers [1, 14] there was reported about the fact, that RG could cause not only AO but pro-oxidant effect as well. The manifestation of RG pro-oxidant activity under these conditions is probably determined by its surplus amount, that can serve as the source of free radicals.

The data obtained analysis allowed to suppose that the LPO intensification under methylxanthines effect under normothermic conditions was stipulated by their energy-stimulating effect and was a result of strengthening of all metabolic processes in a cell. A slight but equal on the value AO effect was noted in heterosides. The observed at that decrease in SOD activity can be considered as the manifestation of compensatory reaction under conditions of LPO inhibition by heterosides or the enzyme inactivation occurs as a result of its strengthened "extinction" of AOF at the initial stages of their production ($r=0.99$). Nevertheless the considerable activation of glutathione-dependent enzymes under K321 effect indicates to the proceeding of peroxide processes, and the predomination of GR in respect to the GP almost twice testifies to an alternative way of AOF levelling. In spite of the fact, that K321 and K322 are the representatives of one BAS series, the mechanisms of LPO inhibition under their effect are different, thus, under K322 effect a correlative analysis indicated to the absence of the link between all studied indices, consequently, a decrease in MDA content is probably stipulated by its direct effect in pro-oxidant system of cells.

Hypothermia. The similar investigations were conducted after hypothermic storage of spermatozoa (Table 3). Under hypothermia conditions all BAS strengthened the LPO production. The MDA content in the media with PF, CF, K321, K322 and RG increased by 14.5, 44.3, 36.3, 44.3 and 55.7%, correspondingly. At the same time there was observed an increase in the AO enzyme activity. The highest activation was noted for SOD, which activity

которой возросла на 66,4; 47,6; 71,5; 56,5 и 30,4%, соответственно. Активность ГП в средах, содержащих ПФ, КФ, К322 и ГВ, также увеличилась соответственно на 40,0, 50,6, 36,6 и 30,4%, однако эти вещества ингибировали ГР.

Анализ полученных результатов указывает на то, что исследуемые вещества не только восстанавливают активность АО ферментов после гипотермии, но и регулируют при этом баланс между про- и антиоксидантной ферментными системами. Усиление ПОЛ при воздействии ПФ и КФ может быть не только сопряжено с их энергостимулирующим действием, но и обусловлено ингибированием ГР, на что указывает положительная корреляция между содержанием МДА и активностью фермента ($r=0,89$ и $r=0,93$ соответственно). Отсутствие корреляции между активностью СОД и повышением содержания МДА свидетельствует о возможности непосредственной активации фермента метилксантинами, а не о развитии компенсаторной реакции.

Повышение активности ГП в среде, содержащей КФ и положительная корреляция между активностью ГП и ГР ($r=0,97$), скорее всего, объясняются усилением АО статуса клетки из-за увеличения в ней содержания эндогенного ГВ и ауторегуляторного ограничения его восстановления. Вышеизложенное подтверждено при воздействии экзогенного ГВ на сперматозоиды, однако ингибирование ГР в данном случае в 2 раза меньше, чем при нормотермии, следовательно, охлаждение клеток может сопровождаться уменьшением пула ГВ. Одновременная с повышением содержания МДА активация СОД при воздействии К321 и К322 свидетельствует о развитии компенсаторной реакции ($r=0,97$ и $r=0,92$ соответственно), которая, однако, не достаточна для ингибирования ПОЛ и в большей степени проявляется в среде, содержащей К321.

Криоконсервирование. Так как ПФ и КФ не проявили криопротекторной активности при исследовании подвижности деконсервированных сперматозоидов, влияние этих веществ на ПОЛ и АО-ферментную систему не изучалось. Производные гетерозидов и ГВ были добавлены в состав криозащитной среды. После отогрева деконсервированных клеток обнаружили повышение содержания МДА на 23,7% в среде с К321, активности СОД – на 43,8%. Активность глутатион-зависимых ферментов практически не изменилась

Таблица 3. Влияние метилксантинов и гетерозидов на содержание МДА и активность АО ферментов в сперматозоидах, хранившихся в условиях гипотермии

Table 3. Effect of methylxanthines and heterosides on the MDA content and AO enzyme activity in spermatozoa, stored under hypothermia conditions

Исследуемое вещество Studied substance	МДА, нмоль/г белка MDA, nMol/g of protein	Активность ферментов Enzyme activity		
		СОД, нг/г белка SOD, ng/g of protein	ГП, мккат/г белка GP, μ cat/g of protein	ГР, нмоль НАДФН/г белка GR, nmol NADPH/g of protein
Контроль Control	0,325 \pm 0,064	79,13 \pm 23,65	88,33 \pm 25,73	0,162 \pm 0,029
ПФ PF	0,375 \pm 0,062*	131,7 \pm 32,95*	123,67 \pm 7,77	0,122 \pm 0,068*
КФ CF	0,469 \pm 0,151*	116,83 \pm 41,25*	133,00 \pm 22,60*	0,147 \pm 0,029*
К321	0,443 \pm 0,041*	186,53 \pm 92,85*	74,33 \pm 32,32*	0,139 \pm 0,039*
К322	0,469 \pm 0,074*	123,83 \pm 36,1*	120,67 \pm 4,04	0,132 \pm 0,034*
ГВ RG	0,506 \pm 0,236*	103,4 \pm 40,0*	115,67 \pm 5,85	0,137 \pm 0,045*

Примечание: * – достоверные различия по отношению к контролю ($p<0,05$).

Notes: * – statistically significant changes comparing to the control data ($p<0.05$).

augmented by 66.4, 47.6, 71.5, 56.5 and 30.4%, correspondingly. The GP activity in the media, containing PF, CF, K322 and RG augmented by 40.0, 50.6, 36.6 and 30.4%, correspondingly, however all these substances inhibited RG.

The data obtained analysis indicates to the fact, that the studied substances not only recover the AO enzyme activity after hypothermia, but regulate in this case the balance between pro- and antioxidant enzyme systems. The LPO strengthening under PF and CF effect can be related not only with their energy-stimulating effect, but can be stipulated by GR inhibition, that is indicated by positive correlation between MDA content and the enzyme activity ($r=0.89$ and $r=0.93$, correspondingly). The absence of correlation between the SOD activity and an increase in MDA content testifies to the possibility of a direct enzyme activation by methylxanthines, but not to the development of compensatory reaction. An increase in GP activity in CF-contained medium and a positive correlation between the GP and GR activity ($r=0.97$), are rather explained by the strengthening of AO-status of cells due to the augmentation in it of the endogenous RG content and an autoregulatory limitation of its recovery. The mentioned above is confirmed under the effect of exogenous RG on spermatozoa, however the GR inhibition in this case is twice lower, than under normothermia, consequently, the cooling of cell can be accompanied with a decrease in RG pool. The SOD activation, simultaneous with an increase in MDA

(табл. 4). При действии К322 содержание МДА в сперматозоидах повысилось всего лишь на 14,9% на фоне значительной синхронной активации АО ферментов. В этом случае активность СОД была на 107, ГП – на 41,6, ГР – на 44,3% выше, чем в деконсервированном контроле.

Сохранение содержания МДА на уровне контроля и значительная активация всех АО ферментов в среде с ГВ указывают на его АО действие. В отличие от нормо- и гипотермии повышение активности ГР при действии экзогенного ГВ свидетельствует об истощении запасов эндогенного глутатиона в процессе криоконсервирования [10]. Аналогичные эффекты прослеживались и в среде, содержащей гетерозиды, причем действие К322 в несколько раз превосходит действие К321. Учитывая значительную активацию СОД, можно предположить, что утилизация АФК на начальных этапах их продуцирования осуществляется именно этим ферментом, а дальнейшее нивелирование продуктов дисмутации – при участии ГП, на что указывает корреляция между активностью фермента и содержанием МДА в сперматозоидах ($r=0,93$ и $r=0,92$ для К321 и К322 соответственно).

Выводы

Установлено, что гипотермическое хранение физиологически полноценных сперматозоидов быка в стандартной криозащитной среде сопровождалось термокинетической инактивацией как про-, так и антиоксидантной систем; доля необратимой криогенной деструкции АО ферментов незначительна.

Введение в состав криозащитных сред АО прямого действия не целесообразно, поскольку нарушает естественное соотношение между про- и антиоксидантными системами сперматозоидов и не влияет на устойчивость клеток к охлаждению.

Криопротекторное действие БАВ не зависит от величины оказываемого ими АО эффекта; наиболее перспективным направлением повышения устойчивости сперматозоидов к гипотермии и криоконсервированию является поиск веществ, регулирующих баланс между про- и антиоксидантными системами.

Литература

1. Биленко М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов. – М.: Медицина, 1989. – С. 268-289.

Таблица 4. Влияние метилксантинов и гетерозидов на содержание МДА и активность АО ферментов в сперматозоидах, хранившихся в условиях криоконсервирования

Table 4. Effect of methylxanthines and heterosides on the MDA content and AO enzyme activity in spermatozoa, stored under low temperatures

Исследуемое вещество Studied substance	МДА, нмоль/г белка MDA, nMol/g of protein	Активность ферментов Enzyme activity		
		СОД, нг/г белка SOD, ng/g of protein	ГП, мккат/г белка GP, μ cat/g of protein	ГР, нмоль НАДФН/г белка GR, nmol NADPH/g of protein
Контроль Control	0,422 \pm 0,082	72,53 \pm 3,75	45,3 \pm 3,4	0,142 \pm 0,017
К321	0,522 \pm 0,038 ¹	104,3 \pm 3,0 ²	50,20 \pm 5,5 ²	0,153 \pm 0,011 ²
К322	0,485 \pm 0,064 ²	150,2 \pm 6,3 ²	67,13 \pm 6,85 ²	0,205 \pm 0,050 ²
ГВ RG	0,414 \pm 0,063	187,03 \pm 12,5 ²	55,33 \pm 1,65 ²	0,164 \pm 0,013 ²

Примечание: достоверность различий по отношению к контролю: ¹ – $p<0,01$, ² – $p<0,05$.

Notes: statistically significant changes comparing to the control data, ¹ – $p<0.01$, ² – $p<0.05$.

content under K321 and K322 effect testifies to the development of compensatory reaction ($r=0.97$ and $r=0.92$, correspondingly), which is not sufficient yet for LPO inhibition and is manifested in a greater extent in the K321-contained medium.

Cryopreservation. As PF and CF did not manifest a cryoprotective activity when investigating the motility of frozen-thawed spermatozoa, the effect of these substances on LPO and AO-enzyme system was not under study. The heteroside derivatives and RG were added to the cryoprotective medium composition. After thawing frozen-thawed cells there was found out an increase in MDA content by 23.7% in the medium with K321 and by 43.8% for SOD activity. The activity of glutathione-dependent enzymes was practically unchanged (Table 4). Under the effect of K322 the MDA content in spermatozoa increased only by 14.9% at the background of a considerable synchronic activation of AO-enzymes. In this case the SOD activity was by 107, for GP by 41.6 and for GR by 44.3% higher, than in the frozen-thawed control.

The preservation of MDA content at the control level and a considerable activation of all AO enzymes in the RG-contained medium indicate to its AO effect. In contrast to normo- and hypothermia an increase in GR activity under exogenous RG effect testifies to the exhaustion in the stocks of endogenous glutathione during cryopreservation [10]. The similar effects were also traced in the heteroside-contained medium, moreover the K322 effect was some times higher than the K321 one. Taking into account a considerable SOD activation we can suppose that the AOF utilisation at initial stages of their production is realised mainly by

2. Зубец М.В., Буркат В.П., Бегма А.Л., Бегма Л.О. Сучасні аспекти криоконсервації сперми бугаїв // Вісник Полтав. держ. сільськогосп. інс.– 2000.– N1.– С. 40-44.
3. Кабачный В.И., Горбунова Н.И., Антоненко Т.С. Производные гетерозидов – криопротекторы нового поколения // Збірка тез доповідей учасників I Всеукраїнської науково-практичної конф. “Біотехнологія. Освіта. Наука”.– Київ, 2003.– С. 85-86.
4. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии.– 1990.– Т. 36.– N2.– С. 88-91.
5. Лучко Н.А., Кучков Н.И. Влияние производных метилксантина на биоэнергетические параметры спермиев человека до и после криоконсервации // Пробл. криобиологии.– 1998.– N4.– С. 48-53.
6. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело.– 1986.– N12.– С. 724-727.
7. Переслегина И.А. Активность антиоксидантных ферментов слюны здоровых детей // Лаб. дело.– 1989.– N11.– С. 20-23.
8. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лаб. дело.– 1989.– N4.– С. 19-21.
9. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: Метод. рекомендации / Под ред. Ф.И.Осташко.– Харьков.– 1990.– 47 с.
10. Bilodeau J.F., Chatterjee S., Sirard M.A., Garnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing // Mol. Reprod. Dev.– 2000.– Vol. 55.– N3.– P. 282-288.
11. Chatterjee S., Garnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing // Mol. Reprod. Dev.– 2001.– Vol. 59.– N4.– P.451-458.
12. Dalvit G.C., Cetica P.D., Beconi M.T. Effect of alfa-tocopherol and ascorbic acid on bovine *in vitro* fertilization // Theriogenology.– 1988.– Vol. 49.– N3.– P. 619-627.
13. Gradil C.M., Ball B.A. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa // Theriogenology.– 2000.– Vol. 54.– N7.– P. 1041-1047.
14. Karoui H., Hogg N., Frejaviille C. et al. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiol and sulfite by peroxyntirite // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol. 271, N11.– P. 6000-6009.

Поступила 08.07.2004

this enzyme and the following levelling of dismutase products at the GP participation, that is indicated by the correlation between the enzyme activity and MDA content in spermatozoa ($r=0.93$ and $r=0.92$ for K321 and K322, correspondingly).

Conclusions

Hypothermic storage of physiologically integral bovine spermatozoa in the standard cryoprotective medium was established to be accompanied with a thermokinetic inactivation of both pro- and antioxidant systems. A part of irreversible cryogenic destruction in AO enzymes is insignificant.

The introduction into the cryoprotective medium composition of AO with direct effect is not expedient, because it impairs the natural ratio between the pro- and antioxidant systems of spermatozoa and does not affect cell resistance to cooling.

The BAS cryoprotective effect does not depend on the value of the caused by them AO effect; the most perspective way to increase the spermatozoa resistance to hypothermia and cryopreservation is the search for the substances, regulating the balance between the pro- and antioxidant systems.

References

1. Bilenko M.V. Ischemic and reperfusion damages in organs.– Moscow: Meditsina, 1989.– P.268-289.
2. Zubets M.V., Burkat V.P., Begma A.L., Begma L.O. Actual aspects of bovine sperm cryopreservation // Visnyk Polt. Derzh. Silskogospod. Instytutu.– 2000.– N1.– P. 40-44.
3. Kabachny V.I., Gorbunova N.I., Antonenko T.S. Heteroside derivatives are the cryoprotectants of new generation// Collection of report proceedings of the 1st All-Ukrainian Scientific and Practical Conference “Biotechnology. Education. Science”.– Kyiv, 2003.– P. 85-86.
4. Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. Simple and sensitive method for determining superoxide dismutase activity, based on the reaction of quercitrol oxidation // Vopr. med. khimii.– 1990.– Vol. 36.– N2.– P. 88-91.
5. Luchko N.A., Kuchkov I.N. Effect of methyl xanthine derivatives upon some bioenergetic parameters of human spermatozoa prior to and after cryopreservation // Problems of Cryobiology.– 1998.– N4.– P. 48-53.
6. Moyn V.M. Simple and specific method to determine glutathione peroxidase activity in erythrocytes // Lab. delo.– 1986.– N12.– P. 724-727.
7. Pereslegina I.A. Activity of antioxidant enzymes in saliva of healthy children // Lab. delo.– 1989.– N11.– P. 20-23.
8. Yusupova L.B. About increase in the accuracy of determination of glutathione peroxidase activity in erythrocytes // Lab. delo.– 1989.– N4.– P. 19-21.
9. Kharkov technology of aseptic procurement and cryopreservation of mature bull sperm: Methodical recommendations / Edited by F.I. Ostashko.– Kharkov, 1990.– 47p.
10. Bilodeau J.F., Chatterjee S., Sirard M.A., Garnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing // Mol. Reprod. Dev.– 2000.– Vol. 55.– N3.– P. 282-288.

11. Chatterjee S., Garnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing // *Mol. Reprod. Dev.*–2001.– Vol. 59.– N4.– P.451-458.
12. Dalvit G.C., Cetica P.D., Beconi M.T. Effect of alfa-tocopherol and ascorbic acid on bovine *in vitro* fertilization // *Theriogenology.*– 1988.– Vol. 49.– N3.– P. 619-627.
13. Gradil C.M., Ball B.A. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa // *Theriogenology.*– 2000.– Vol. 54.– N7.– P. 1041-1047.
14. Karoui H., Hogg N., Frejaviille C. *et al.* Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiol and sulfite by peroxyntirite // *J. Biol. Chem.*– 1996.– Vol. 271, N11.– P. 6000-6009.

Accepted in 08.07.2004