

Использование перфторированных углеводов для низкотемпературного хранения спермиев человека

UDC 615.38:611.013.12:612.592

I.V. CHERKASHINA, I.N. KUCHKOV*

Application of Perfluorinated Carbohydrates for Low Temperature Storage of Human Spermatozoa

Исследована возможность использования газотранспортного кровезаменителя перфторана (ПФ) как компонента криозащитной среды для гипотермического хранения спермиев человека. Изучены процессы накопления молочной кислоты и подвижности клеток, сделан вывод о возможности под влиянием ПФ изменять характер обменных процессов в спермиях. Установлен достоверный антиоксидантный эффект эмульсии: торможение накопления диеновых и триеновых конъюгатов; снижение концентрации малонового диальдегида и увеличение активности супероксиддисмутазы. Показано, что торможение развития процессов перекисного окисления липидов температурным фактором в сочетании с антиоксидантным эффектом ПФ (как эмульсии) повышает антиоксидантную активность системы.

Ключевые слова: спермии, гипотермия, перфторан, перекисное окисление липидов.

Досліджена можливість використання газотранспортного кровозамінника перфторану (ПФ) як компонента криозахисного середовища для гіпотермічного зберігання сперміїв людини. Вивчено процеси накопичення молочної кислоти і рухливості клітин, зроблено висновок про можливість під впливом ПФ змінювати характер обмінних процесів у сперміях. Встановлено достовірний антиоксидантний ефект емульсії: гальмування накопичення дієнових і трієнових кон'югатів; зниження концентрації малонового діальдегіду і збільшення активності супероксиддисмутази. Показано, що гальмування розвитку процесів перекисного окислення ліпідів температурним чинником у поєднанні з антиоксидантним ефектом ПФ (як емульсії) підвищує антиоксидантну активність системи.

Ключові слова: спермії, гіпотермія, перфторан, перекисне окислення ліпідів.

The possibility of application of gas-transport blood substitute perfluorin (PF) as the component of cryoprotective medium for hypothermal storage of human spermatozoa has been investigated. The processes of lactic acid accumulation and cell motility have been studied the ability to change the type of metabolic processes in spermatozoa under perfluorin was concluded. The significant antioxidative effect of emulsion has been established. There was the suppression of diene and triene conjugates accumulation, reduction of malone dialdehyde concentration, and increase of superoxide dismutase activity. It has been shown that the suppression of developmental processes of lipid peroxidation by temperature factor in combination with antioxidative effect of perfluorin (as emulsion) increases the antioxidative activity of system.

Key-words: spermatozoa, hypothermia, perfluorin, lipid peroxidation.

Благодаря достижениям современной криобиологии, криоконсервирование и гипотермическое хранение спермиев человека – отработанные процедуры, применяемые во вспомогательных репродуктивных технологиях для лечения бесплодия. Несмотря на определённые успехи в этой области, усовершенствование способов низкотемпературного хранения репродуктивных клеток остаётся актуальной проблемой. В связи с этим необходима разработка способов, повышающих функциональную активность отогретых клеток. Физико-химические свойства криозащитных сред – основной параметр, который определяет восстановление морфофункциональных свойств спермиев после отогрева [1]. Состав и свойства таких растворов являются предметом наших исследований.

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
kuchkov@yahoo.com

Использование газотранспортных сред на основе перфторуглеродных эмульсий в биологии и медицине обусловлено, прежде всего, возможностью стимуляции процесса дыхания как основного источника энергии и интегрального показателя жизнеспособности клеток [2]. Для биологических и медицинских целей широко используется газотранспортный перфторуглеродный кровезаменитель перфторан (ПФ)[3].

Цель работы – исследовать эффективность использования перфторана в качестве компонента сред гипотермического хранения и криоконсервирования спермиев человека.

В соответствии с поставленной целью предполагалось решить следующие задачи: 1) изучить характер влияния ПФ на динамику накопления

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: kuchkov@yahoo.com

молочной кислоты в спермиях после гипотермического хранения; 2) исследовать влияние ПФ на интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в спермиях человека при гипотермии.

Материалы и методы

Объектом исследования служили эякуляты человека при нормоспермии.

Гипотермическое хранение суспензии клеток производили при 10°C в стеклянных пробирках при открытом доступе кислорода, помещая их в холодильник. Отогрев образцов после гипотермии осуществляли в термостате при 37°C на воздухе.

В работе использовался фармакопейный газотранспортный кровезаменитель «Перфторан» – эмульсия, которая имеет высокую газотранспортную способность, стабильность, монодисперсность, а также не реактогенна и нетоксична (табл. 1).

Опытные образцы содержали 40 % об. перфторана. Инкубация проходила во временном интервале от 0 до 120 часов.

Параметры спермограмм были получены при помощи автоматического анализатора спермы SQA-V (Израиль).

Концентрацию молочной кислоты определяли ферментативным методом по накоплению никотинамидадениндинуклеотида восстановленного в системе сопряжённых ферментативных реакций [2].

Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Shimadzu QV-50 (Япония).

Диеновые (ДК) и триеновые (ТК) конъюгаты определяли модифицированным методом Плацера [4].

Концентрацию малонового диальдегида (МДА) устанавливали по интенсивности окраски комплекса в ходе реакции МДА с тиобарбитуровой кислотой, протекающей в кислой среде при высокой температуре [6].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по восстановлению спермийми красителя нитросинего тетразолия [10].

Для исследования общей антиоксидантной активности (АОА) использовали модельную систему суспензии желточных липопропротеидов и выражали результаты в процентах

Таблица 1. Состав и физико-химические свойства перфторана

| Компонент | Содержание |
|----------------------------------|-----------------|
| Перфтордекалин | 13 г |
| Перфторметилциклогексилпиперидин | 6,5 г |
| Проксанол – 268 | 4,0 г |
| Натрия хлорид | 0,6 г |
| Калия хлорид | 0,039 |
| Магния хлорид | 0,019г |
| Кальция хлорид | 0,028 г |
| Натрия гидрокарбонат | 0,065 г |
| Натрия гидрофосфат | 0,02 г |
| Глюкоза | 0,2 г |
| Вода для инъекций | до 100 мл |
| Содержание ионов фтора | < 5 – 10 М |
| Средний размер частиц | 0,03 – 0,15 мкм |
| Осмотическое давление | 280 – 340 мОсм |
| Вязкость | 2,5 сП |
| pH | 7,2 – 7,8 |

от ингибирования 50% ПОЛ в модельной системе по сравнению с классическим антиоксидантом – ионолом [7].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью набора средств анализа данных компьютерной программы Microsoft Excel 2007. В качестве критерия достоверности различий принимали уровень 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Впервые показанная возможность использования газотранспортного кровезаменителя ПФ в качестве компонента криозащитных сред для спермиев человека [3] позволила определить его эффективную концентрацию в суспензии 40% об.

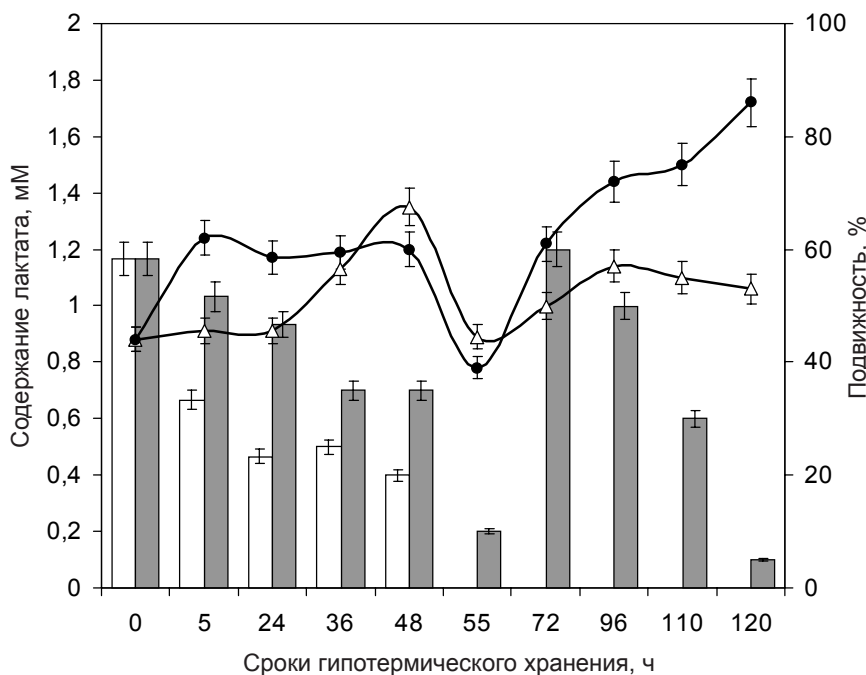


Рис. 1. Динамика накопления молочной кислоты в спермиях человека (□ – контроль; ■ – среда с перфтораном; столбцы) и показатели подвижности клеток (△ – контроль; ● – среда с перфтораном; кривые) при гипотермическом хранении.

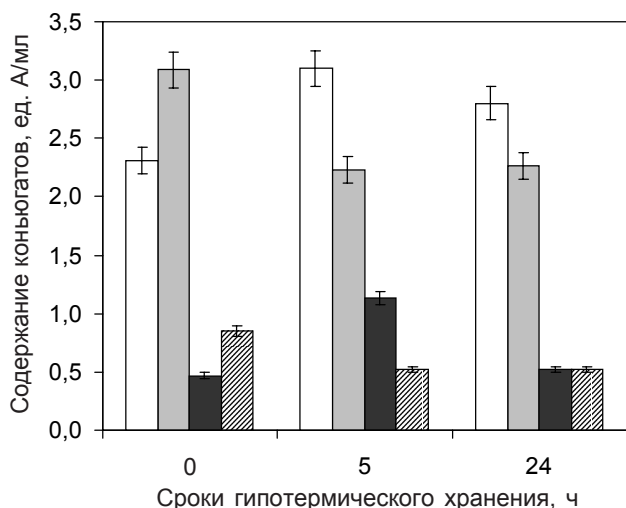


Рис. 2. Содержание диеновых и триеновых конъюгатов в спермиях человека при гипотермическом хранении в среде с перфтораном: □ – ДК контроль; ■ – ДК среда с перфтораном; ■ – ТК контроль; ▨ – ТК среда с перфтораном.

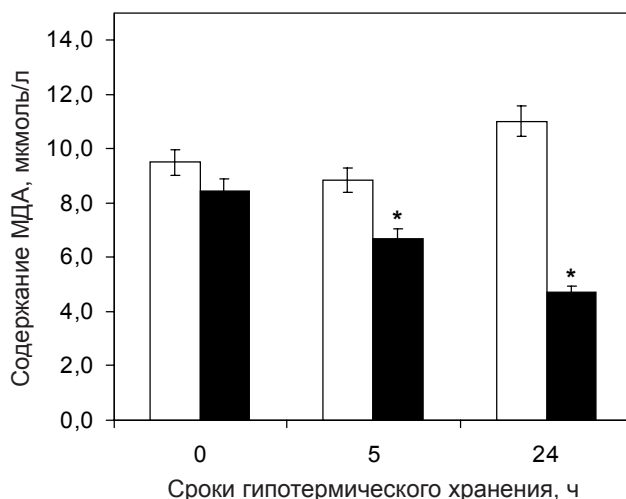


Рис. 3. Содержание МДА в спермиях человека при гипотермическом хранении в среде с перфтораном: □ – контроль; ■ – среда с перфтораном; * – отличия достоверны по отношению к контролю.

Используя эти данные, мы изучили динамику накопления молочной кислоты в спермиях (рис. 1).

Для стимуляции подвижности спермиев после 48 ч инкубации мы применяли пентоксифиллин в конечной концентрации 3,5 ммоль/л. Это позволило выявить жизнеспособные спермии по возобновлению движения. Как видно из рис. 1, во временном интервале 48–72 ч полностью утилизировав фруктозу семенной плазмы спермии человека под воздействием ПФ, переходят на аэробный путь обмена и начинают активно метаболизировать кислород. Наличие в среде инкубации газотранспортного кровезаменителя, являющегося донором кислорода, делает предпочтительным утилизацию кислорода спермиями на начальном этапе с последующим переходом на фруктозу.

Данные содержания ДК и ТК в эякуляте в зависимости от времени гипотермического хранения представлены на рис. 2.

Анализируя эти изменения, мы делаем вывод, что ПФ тормозит накопление ДК в опыте, тогда как в контроле распад этих продуктов трансформации полиненасыщенных жирных кислот существенно ускорен. Высокий уровень ДК в контроле (по сравнению с перфторановой группой) свидетельствует не только об интенсивном метаболизме первичных продуктов ПОЛ, что характерно для спермиев [5], но и, вероятно, о замедленной нейтрализации этих токсичных веществ антиоксидантной системой. Через 5 ч инкубации устанавливается новый уровень динамического равновесия, при котором накопление ДК в контрольной суспензии и снижение

содержания этих продуктов в образцах с ПФ достигли максимума. В контроле к 24 ч инкубации наблюдается плавное снижение содержания ДК, в то время как скорость накопления этих продуктов в эякуляте, содержащем ПФ, не изменяется, оставаясь на уровне 5 ч инкубации.

Образование ТК свидетельствует о дальнейшей интенсификации процессов ПОЛ. Скорость образования ТК в спермиях аналогична динамике изменения ДК (рис. 2). Отмечается достоверно низкое содержание ТК по сравнению с ДК, что свидетельствует об активном вовлечении в процесс утилизации этих продуктов антиоксидантных ферментов спермиев.

Следующим этапом нашей работы был анализ вторичных и конечных продуктов превращения гидроперекисей. Результаты исследования содержания МДА в сперме представлены на рис. 3.

Установлено, что концентрация МДА в образце без ПФ возрастала в процессе инкубации, и к 24 ч наблюдалось его максимальное содержание. Это

Таблица 2. Изменение активности СОД и подвижности спермиев при гипотермическом хранении в среде с ПФ ($X \pm x$, $n=10$)

| Сроки гипотермического хранения, ч | Контроль | | Среда с ПФ | |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| | Активность СОД, у.е. | Подвижность (a + b), % | Активность СОД, у.е. | Подвижность (a + b), % |
| 0 | 158 ± 20 | 65 ± 5 | 154 ± 26 | 65 ± 5 |
| 5 | 160 ± 13 | 21 ± 3 | 140 ± 24 | 40 ± 8 |
| 24 | 150 ± 10 | 0 | 122 ± 11* | 25 ± 4 |

Примечание: * – различия достоверны в сравнении с контрольной группой, $p < 0,05$.

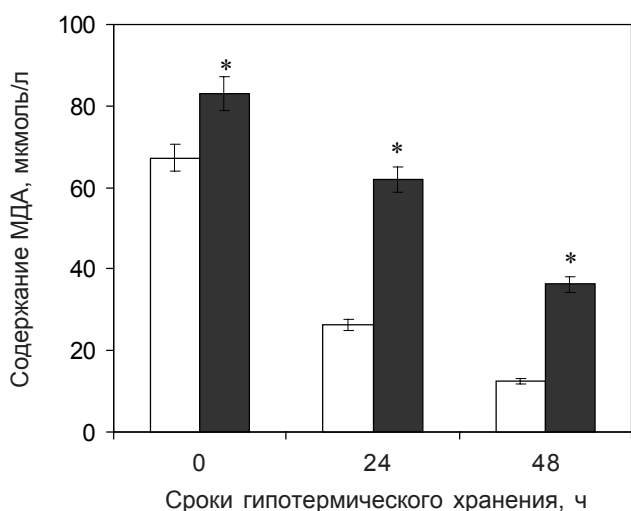


Рис. 4. Общая антиоксидантная активность в спермиях человека при гипотермическом хранении в среде с перфтораном: □ – контроль; ■ – среда с перфтораном; * – отличия достоверны по отношению к контролю.

можно объяснить развитием процессов ПОЛ в спермиях с тенденцией увеличения интенсивности с течением времени. Напротив, при добавлении ПФ к спермиям уровень МДА достоверно снижался через 5 ч гипотермии. После 24 ч инкубации концентрация МДА снизилась почти в два раза по отношению к его содержанию в контроле.

Таким образом, на основании данных о содержании МДА в суспензии установлен антиоксидантный эффект ПФ в отношении спермиев человека при гипотермическом хранении.

Особое место среди ферментов антиоксидантной защиты занимает СОД, так как она участвует в прерывании цепи свободнорадикальных процессов на начальной стадии одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода, вызывая дисмутацию образовавшегося супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot-}$ [10].

Активность СОД в среде гипотермического хранения, содержащей ПФ (табл. 2), была достоверно ниже по отношению к контролю только после 24 ч инкубации. До этого времени активность фермента была стабильно высока, хотя наблюдалась тенденция к ее снижению. Напротив, при наблюдении за кинетическими характеристиками спермиев установлено снижение процента подвижных клеток со временем в обеих исследуемых группах. Полученные результаты могут свидетельствовать об интенсивном образовании супероксид анион-радикала на начальных этапах хранения спермиев. Следует отметить, что при достоверно низкой активности СОД после 24 ч инкубации подвижные спермии выявлены в образце с ПФ, в отличие от контроля подвижные клетки не выявлены.

По изменению активности СОД можно предположить, что увеличение интенсивности образова-

ния супероксид анион-радикала ускорено в контрольной группе, а в опытной – заторможено.

Механизм действия в сперме ингибиторов ПОЛ и их вклад в общий антиоксидантный потенциал спермы различны. Однако важно не только учитывать вклад того или иного эндогенного антиоксиданта, но и оценивать резервы антиоксидантной защиты спермы в целом. Результаты определения АОА спермы представлены на рис. 4.

Известно, что общий уровень ПОЛ в спермиях *in vitro* в основном определяется концентрацией кислорода и температурой внеклеточной среды [6]. Таким образом, данные АОА показывают, что инкубация спермиев с ПФ устанавливает динамическое равновесие между этими факторами, увеличивая переживаемость клеток. Следует полагать, что ПФ, являясь неферментативным антиоксидантом, утилизирует внеклеточные формы свободных радикалов.

Выводы

1. Изучение динамики накопления молочной кислоты в спермиях человека при инкубации с ПФ показало, что клетки при определённых условиях могут переходить на аэробный путь обмена.

2. Установлено, что ПФ обладает антиоксидантным эффектом, препятствуя накоплению первичных и вторичных продуктов ПОЛ в сперме человека.

3. Применение ПФ как компонента криозащитной среды спермиев человека приводит к долгосрочному хранению образцов в условиях гипотермии, что может быть использовано во вспомогательных репродуктивных технологиях.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И., Паращук Ю.С. Криоконсервация репродуктивных клеток.– Киев: Наук. думка, 1986.– 207 с.
2. Иваницкий Г.Р., Архипов В.В., Белоярцев Ф.Ф., Лежнев Э.И. Культивирование животных клеток на жидких перфторуглеродах // Доклады АН СССР.– 1981.– Т. 28, №1.– С. 225–228.
3. Иваницкий Г.Р., Белоярцев Ф.Ф. О развитии фундаментальных и прикладных исследований в СССР по проблеме “Перфторуглероды в биологии и медицине” // Медико-биологические аспекты применения эмульсий перфторуглеродов.– Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1983.– С. 7–38.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Т. 2.– Минск: Беларусь, 2000.– 463 с.
5. Кучков И.Н. Функциональные и биохимические свойства спермиев человека при криоконсервации в условиях сверхбыстрого охлаждения: Автореф. дис. ...канд. биол. наук.– Харьков, 2000.– 17 с.
6. Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs // *Physiol. Rev.*– 1979.– Vol. 59, N3.– P. 527–605.

7. *Colleen S., Marks A.D., Lieberman M.* Basic medical biochemistry. A clinical approach.— New York: Lippincott Williams and Wilkins, 2005.— 977 p.
8. *De Lamirande E., Gagnon C.* Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa // *Free Radic. Biol. Med.*— 1995.— Vol. 18, N3. — P. 487–495.
9. *Gomez E., Irvine D.S., Aitken R.J.* Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function // *Int. J. Androl.*— 1998.— Vol. 21, N2.— P. 81–94.
10. *Nissen H., Kreysel H.W.* Superoxide dismutase in human semen // *Klin. Wochenschr.*— 1983.— Vol. 61, N1.— P. 63–65.

Поступила 08.07.2008