

Активность сукцинатдегидрогеназы в спермиях человека, хранившихся в условиях гипотермии

Э.И. АЛЕКСЕЕВСКАЯ, М.И. КРАМАР, Н.Н. ЧУБ, П. ТОДОРОВ, В.Л. РОДИОНОВА
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Activity of Succinate Dehydrogenase in Human Spermatozoa Stored under Hypothermia Conditions

ALEKSEYEVSKAYA E.I., KRAMAR M.I., CHUB N.N., TODOROV P.T., RODIONOVA V.L.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Изучали влияние околонулевых температур и цитохрома С на активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в сперматозоидах человека. Установлено, что цитохром С способствует повышению подвижности спермиев и активности СДГ на 30% на этапе реабилитации после гипотермии и, следовательно, может быть использован для улучшения качества спермы при подготовке ее к инсеминации.

Вивчали вплив навколонулевих температур і цитохрому С на активність сукцинатдегідрогенази (СДГ) в сперматозоїдах людини. Установлено, що цитохром С сприяє підвищенню рухливості сперміїв і активності СДГ на 30% на етапі реабілітації після гіпотермії і, отже, може бути використаний для покращення якості сперми при підготовці її до інсемінації.

The authors investigated the effect of about zero temperatures and cytochrome C on the activity of succinate dehydrogenase (SDG) in human spermatozoa. It has been established that cytochrome C contributes to the increase of spermatozoa motility and activity of SDG by 30% at the rehabilitation stage after hypothermia and therefore can be used for the improvement of sperm quality when preparing it for insemination.

В наши дни организм человека подвергается мощному воздействию различных факторов загрязнения внешней среды, отрицательно влияющих на здоровье человека, в том числе и на репродуктивную функцию [6,10]. По данным ВОЗ [13], за последние 50 лет концентрация спермиев в эякуляте здоровых мужчин снизилась на 40-50%, а количество бесплодных супружеских пар увеличилось до 30%. Около 50% из них приходится на долю мужского бесплодия, вызванного различными причинами: гормональной недостаточностью, воздействием эндогенных или экзогенных факторов, которые в сочетании значительно затрудняют коррекцию вызванных нарушений [1, 11]. Для повышения подвижности и жизнеспособности спермиев применяли различные физические и химические методы, в частности, ультразвуковые колебания, лазерное излучение, постоянное магнитное поле, а также некоторые фармакологические, химические и биологические вещества [2-5]. Традиционные методы лечения бесплодия не всегда приводят к восстановлению функции сперматогенеза. В таких случаях приходится использовать новые репродуктивные технологии (IVF, ICSI, ИСМ, донорство гамет и эмбрионов), включающие кратковременное или долгосрочное хранение репродуктивных клеток, что можно достичь криоконсервированием или гипотермией.

Интегральный показатель внутриклеточного метаболизма – активность СДГ. Данный фермент занимает центральное место в цикле Кребса и находится в тесной коррелятивной зависимости от других ключевых ферментов. Важным свойством

Nowadays a human organism is subjected to a powerful effect of different factors of environmental pollution, negatively affecting the human health, including reproductive function [6, 10]. According to the WHO data [13] during recent 50 years the concentration of spermatozoa in ejaculate of healthy men reduced by 40-50% and the number of infertile married couples increased up to 30%. About 50% of them are referred to the share of male infertility, caused by different reasons: hormonal insufficiency, effect of endogenic and exogenic factors, which in the combination make the correction of caused impairment significantly difficult [1, 11]. To enhance the motility and viability of spermatozoa there were used different physical and chemical methods, in particular, ultrasound oscillations, laser irradiation, constant magnetic field as well as some pharmacological, chemical and biological substances [2-5]. Traditional methods of infertility treatment do not always result in the recovery of spermatogenesis function. In such cases one has to use new reproductive technologies (IVF, ICSI, insemination with husband's sperm, donation of gametes and embryos), including short- and long-term storage of reproductive cells, which can be achieved with cryopreservation and hypothermia.

SDG activity is an integral index of intracellular metabolism. This enzyme takes a central place in Krebs cycle and is in a tight correlative dependence on other key enzymes. Belonging to highly activated enzymes is also an important SDG property [8, 9].

It is known that during infertility, caused both inflammatory processes in reproductive tract and androgenic insufficiency, SDG activity reduction is

СДГ также является принадлежность к высокоактивируемым ферментам [8,9].

Известно, что при бесплодии, вызванном как воспалительными процессами в репродуктивном тракте, так и андрогенной недостаточностью, снижается активность СДГ [11]. С изменением активности этого фермента меняется физиологическое состояние клеток, что может являться диагностическим и прогностическим тестом для определения жизнеспособности спермиев человека на этапах низкотемпературного консервирования и гипотермии.

Цель исследования – определение активности СДГ в спермиях человека до и после гипотермического хранения (8°C), а также при добавлении цитохрома С в среду отогрева.

Объектом исследований служила сперма мужчин, полученная путем мастурбации после 3-дневного полового воздержания. Исследование спермы проводили по рекомендациям ВОЗ [13]. Концентрацию и подвижность спермиев подсчитывали в камере Маклера (Израиль). Подвижную фракцию гамет получали путем фильтрации эякулята по модифицированной нами методике. Для этого спермии помещали в колонку с 15 мг стекловаты, предварительно промытой питательной средой ХЭНКСа. Суспензию спермиев, разбавленную 1:1 питательной средой, центрифугировали 7 мин при 160 g, надосадочную жидкость осторожно убирали, наслаивали 0,8 мл среды и помещали в термостат на 20 мин под углом 45° . Затем супернатант (подвижная фракция спермиев) осторожно снимали и охлаждали от комнатной температуры до 8°C , хранили при той же температуре [7]. Полученную суспензию спермиев отогревали до 37°C в термостате. После отогрева к образцам добавляли цитохром С в концентрации $2,4 \times 10^{-6}$ М.

Для определения активности СДГ нами был модифицирован метод, применяемый для тканевых срезов [12]. На предметном стекле изготавливали тонкие равномерные мазки спермиев, высушивали, добавляли 0,2 мл инкубационной среды, состоящей из 30 мг/мл сукцината натрия, 2 мг/мл нитросинего тетразолия, 0,5 мг/мл феназинметасульфата в фосфатном буфере 0,2 М (рН 7,2). Мазки помещали на 40 мин в термостат при 37°C . Затем их фиксировали в парах 10%-го нейтрального формалина в течение 10 мин, промывали в физиологическом растворе и заключали в глицерин-желатин. Результат реакции определяли по показателю среднего гистохимического коэффициента (СГК) для каждой группы клеток по формуле:

$$\text{СГК} = 0 + 1a + 2b + 3v / 100,$$

где 0 – отсутствие окраски; 1a – наличие в цитоплазме до 30 гранул – слабая реакция; 2b –

characteristic [11]. When changing the activity of this enzyme the physiological state of the cells changes as well, this fact can be diagnostic and prognostic tests to determine the viability of human spermatozoa at the stages of low temperature preservation and hypothermia.

The aim of the study was to determine the SDG activity in human spermatozoa before and after hypothermic storage (8°C), as well as when adding cytochrome C to the warming medium.

Men's sperm obtained by masturbation after 3-days' sexual abstinence served as the object. Sperm examination was carried out according to the WHO recommendations [13]. Concentration and motility of spermatozoa were counted in Makler's chamber (Israel). Motile fraction of gametes was obtained by ejaculate filtration according to the modified by us methods. For this aim the spermatozoa were placed to the column with 15 mg of glass wool, preliminarily washed with Hanks nutritive medium. Spermatozoa suspension diluted in the 1:1 ratio with nutritive medium, were centrifuged during 7 min at 160g, supernatant liquid was carefully removed, 0.8 ml of medium was laid by layers and placed to thermostat for 20 min under the angle of 45° . Afterwards the supernatant (motile sperm fraction) was removed and then was cooled from room temperature down to 8°C , and stored at the same temperature [7]. Obtained suspension of spermatozoa was thawed up to 37°C in thermostat. After thawing to the samples we added cytochrome C under concentration of 2.4×10^{-6} M.

To determine SDG we have modified the method applied for tissue slices [12]. Fine even spermatozoa smears were done on the subject glass, then they were dried, 0.2 ml of incubation medium, comprising 30mg/ml of sodium succinate, 2mg/ml of nitroblue tetrasolium, 0.5 mg/ml phenazinemetasulphate in

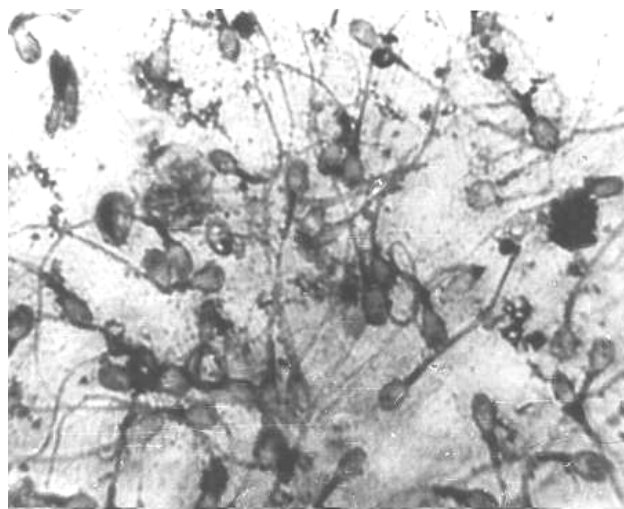


Рис.1. Активность СДГ в спермиях человека (контроль) – от умеренной до выраженной реакции ($\times 1000$).

Fig. 1. SDG activity in human spermatozoa (control): from moderate to manifested reaction ($\times 1000$).

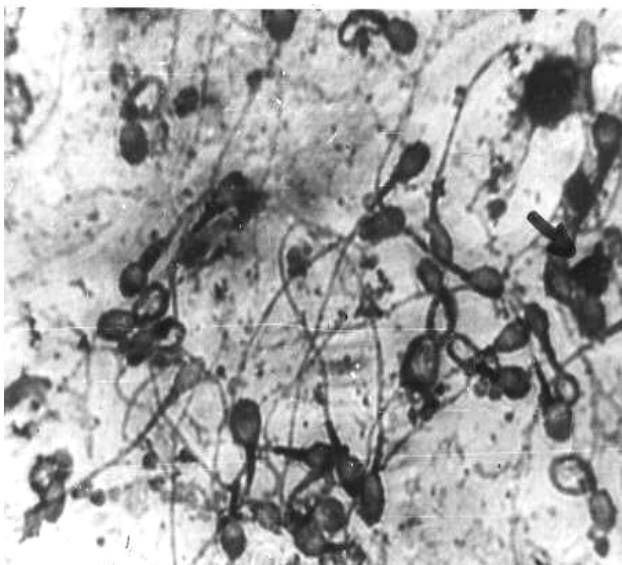


Рис.2. Активность СДГ в спермиях человека после 2-х суток гипотермического хранения – от слабой реакции до умеренной (видны крупные нестандартные гранулы продукта реакции).

Fig. 2. SDG activity in human spermatozoa after 48hrs of hypothermic storage: from slight to moderate reaction (non-standard granules of the product reaction are seen).

наличие в цитоплазме до 60 гранул – умеренная реакция; 3в – содержание более 60 гранул – выраженная реакция.

В результате исследования было отмечено, что при гипотермическом хранении (8°C) в 70 образцах содержание спермиев с быстрым и медленным поступательным движением (группы *a* и *в*) после 2-х суток хранения существенно не отличалось от контроля, а именно: группа *a* составляла 32 и 37%, а группа *в* – 41 и 51 % ($p \leq 0,05$) соответственно. В суспензии гамет, полученных из 10 эякулятов, даже на 5-е сутки 10% спермиев оставались слабо подвижными. Хранение эякулятов при комнатной температуре в течение 48 ч приводило к снижению подвижности в группе *в* с 41 до 12% и полному отсутствию спермиев группы *a*.

При оценке мазков было установлено, что по мере созревания клеток активность энзима в контрольных образцах снижается. Отмечена выраженная реакция в юных клетках, умеренная – в зрелых (рис.1). СГК соответственно составлял: в юных формах – $2,89 \pm 0,1$, в зрелых спермиях – $1,42 \pm 0,04$ ($p \leq 0,05$). После суток гипотермического хранения характер и локализация гранул в зрелых спермиях существенно не изменялись по отношению к контролю, в то время как активность фермента в юных спермиях снизилась на 36%. СГК был $1,87 \pm 0,14$. После 2-х суток хранения СГК в юных и зрелых гаметах составлял $1,80 \pm 0,02$ и $1,33 \pm 0,02$ ($p \leq 0,05$) соответственно. Активность СДГ в мазках при оценке отложения продукта реакции варьировала от слабой до умеренной. В

0.2M phosphate buffer (pH 7.2) were added. The smears were placed for 40 min to thermostat at 37°C. Afterwards they were fixed in the vapours of 10% neutral formalin during 10 min, were washed-out in physiological solution and placed to glycerol-gelatin. The result of reaction was determined on the index of average histochemical coefficient (AHC) for each group of cells on the formula:

$$AHC = 0+1a+2b+3c/100,$$

where: 0 – the absence of reaction; 1a – the presence in cytoplasm of up to 30 granules (weak reaction); 2b – the presence in cytoplasm up to 60 granules (moderate reaction); 3c – the presence in cytoplasm of more than 60 granules (manifested reaction).

In the result of investigation it was noted that under hypothermic storage (8°C) in 70 samples the content of spermatozoa with rapid and slow forward moving (groups *a* and *c*) after 48 hrs of storage did not differ considerably in comparison with the control: group *a* made 32 and 37%, and group *b* did 41 and 51% ($p \leq 0.05$), correspondingly. In the suspension of gametes, obtained from 10 ejaculates even to the 5th day 10% of spermatozoa remained motile. Storage of ejaculates at room temperature during 46 hrs resulted in a decrease in the motility in the group *c* with 41 and 21% and complete absence of spermatozoa of the group *a*.

During evaluation of the smears we have found that when the cells became mature the enzyme activity in the control samples reduces. There was found a manifested reaction in young cells, moderate in mature (Fig.1). AHC made, correspondingly: in young forms 2.89 ± 0.1 and 1.42 ± 0.04 in mature spermatozoa ($p \leq 0.05$). After 24 hrs of hypothermic storage the character and localization of granules in mature spermatozoa did considerably not change in respect of the control, meanwhile the enzyme activity in young spermatozoa decreased by 36%. AHC was 1.87 ± 0.14 . After 48hrs of storage AHC in young and mature gametes made 1.80 ± 0.02 and 1.33 ± 0.02 ($p \leq 0.05$), correspondingly. SDG activity in the smears during the estimation of reaction product formation varied from a slight to moderate one. In pathologically changed cells, maybe, the membrane permeability impaired that was accompanied by the appearance of abnormal amounts of substrate in different sites of cell and the formation of large conglomerates (Fig. 2).

Since after 3 days of hypothermic storage the kinetic activity of spermatozoa sharply reduced, for us it was expedient to stimulate the motility, in particular using cytochrome C. Earlier it has been shown that when adding cytochrome C under concentration of 2.4×10^{-6} M to the storage medium the number of spermatozoa in a motile fraction increased [7]. It has been established that after adding cytochrome C to the samples of suspension spermatozoa, stored under hypothermia conditions during 48 hrs and 72 hrs, the

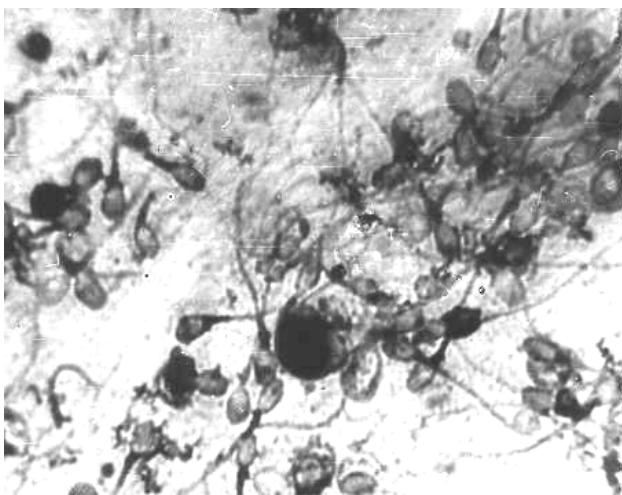


Рис. 3. Активность СДГ в спермиях человека, хранившихся в течение 3-х суток при гипотермии, после добавления цитохрома С. Преобладающее количество спермиев с выраженной реакцией (x1000).

Fig. 3. SDG activity in human spermatozoa, stored during 3 days under hypothermia after adding cytochrome C. Predominant number of spermatozoa with manifested reaction (x 1000).

патологически измененных клетках, по-видимому, нарушалась проницаемость мембраны, что сопровождалось появлением аномальных количеств субстрата в различных участках клетки и образованием крупных конгломератов (рис.2).

Поскольку после 3-х суток гипотермического хранения кинетическая активность спермиев резко снижалась, было целесообразно проводить стимуляцию подвижности, в частности, с помощью цитохрома С. Ранее было показано, что при добавлении в среду хранения цитохрома С в концентрации $2,4 \times 10^{-6}$ М увеличивалось количество спермиев в подвижной фракции [7]. Установлено, что после добавления цитохрома С в образцы суспензии спермиев, хранившихся в условиях гипотермии в течение 2-х или 3-х суток, активность СДГ в юных и зрелых клетках повышалась по сравнению с контролем на 30 и 32%, соответственно. Реакцию на фермент оценивали как выраженную (рис.3). Контролем служили образцы суспензии спермиев, к которым цитохром С после гипотермического хранения не добавляли. В мазках наблюдали преобладающее количество спермиев с низкой активностью фермента (рис.4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что, по-видимому, применение цитохрома С с целью повышения биологической активности спермиев человека как нативных, так и хранившихся в условиях гипотермии обусловлено участием данного фермента в энергетическом обмене клеток и его способностью активировать СДГ и дыхание и тем самым опосредованно способствовать повышению оплодотворяющей способности спермиев человека.

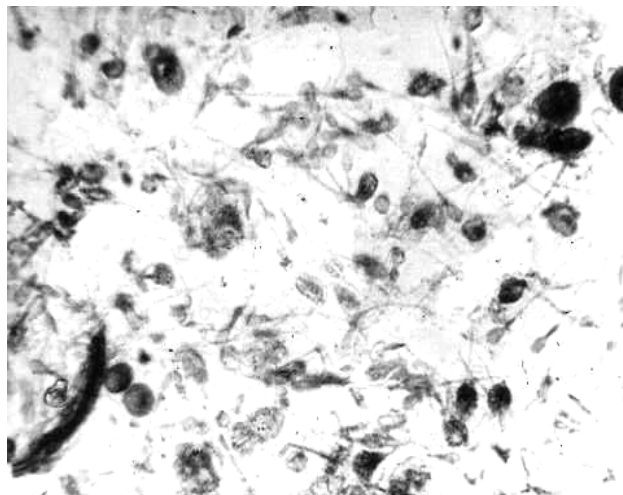


Рис. 4. Активность СДГ в образцах спермиев человека после 3-х суток хранения без добавления цитохрома С (контроль).

Fig. 4. SDG activity in the samples of human spermatozoa after 3 days of storage without cytochrome C (control).

SDG activity in young and mature cells enhanced in comparison with the control by 30 and 32%, correspondingly. The response to enzyme was estimated as manifested (Fig. 3). The samples of spermatozoa suspension without adding cytochrome C after hypothermic storage served as the control. In the smears we observed the predominant number of spermatozoa with a low enzyme activity (Fig. 4).

Obtained data testify to the fact that probably the application of exogenic cytochrome C with the aim of enhancing the biological activity of human spermatozoa of both native and stored under hypothermia conditions, is stipulated by the participation of this enzyme in energy exchange process and its capability to activate the SDG and respiration and by this to contribute as a mediator to increasing of fertilizing ability of human spermatozoa.

References

1. *Aldo Isidori.* Andrology, reproduction and sexual disorders. – М.– 1992.– Vol. 1, N1.– P. 8-9.
2. *Ahmad M.M., Kovalev G.M., Pinyaev V.I., Chadaev V.E.* Effect of hypothermia and treatment of storage medium by additional constant magnetic field on kinetic characteristics of human spermatozoa // *Problems of Cryobiology.*– 1997.– N3.– P. 45-48.
3. *Vesich T.L., Kramar M.I.* Studying the effect of laser irradiation on native and survived the cryopreservation human spermatozoa // *Problems of Cryobiology.* – 1994.– N2.– P. 55-56.
4. *Vishnevsky V.I.* Ultrasound and cryopreservation // *Coll. of Scient. Papers: Cryopreservation of reproductive cells and embryos.*– Kharkov, 1992.– P. 146-147.
5. *Gerodes A.G.* Increase of sperm fertility using native and cryopreserved human follicular fluid: Author abstract of the candidate of medical sciences.– Kharkiv, 1999.– 16 p.
6. *Koryakin M., Akopyan A.* Male infertility. Kiev, 1990.– 443 p.
7. *Kramar M.I.* Effect of hypothermia on morphofunctional and functional properties of human sperm: Author's abstract of the candidate of biological sciences – Kharkov, 1990.– 40 p.

Литература

1. *Альдо Исидори*. Андрология, репродукция и сексуальные расстройства – М., 1992.– Т. 1,– № 1.– С. 8-9.
2. *Ахмад М.М., Ковалев Г.М., Пиняев В.И., Чадаев В.Е.* Влияние гипотермии и обработки среды хранения дополнительным постоянным магнитным полем на кинетические характеристики спермиев человека // Пробл. криобиологии. –1997.– №3.– С. 48-52.
3. *Весич Т.Л., Крамар М.И.* Изучение действия лазерного излучения на нативные и перенесшие криоконсервирование спермии человека // Пробл. криобиологии.– 1994.– №2.– С. 55-56.
4. *Вишневецкий В.И.* Ультразвук и криоконсервирование // Сб.науч.трудов: Криоконсервирование репродуктивных клеток и эмбрионов.– Харьков, 1992.– С.146-147 .
5. *Геродес А.Г.* Підвищення плодючості сперми з використанням нативної та криоконсервованої фолікулярної рідини людини: Автореф. дис...канд. мед.наук.– Харків, 1999.– 16 с.
6. *Корякин М., Акоюн А.* Мужское бесплодие. – Киев, 1990.– 463 с.
7. *Крамар М.И.* Влияние гипотермии на морфологические и функциональные свойства спермиев человека: Автореф. дис... канд. биол. наук – Харьков, 1990.– 40 с.
8. *Ленинжер А.* Биохимия: Молекулярные основы структуры и функции клеток.– М: Мир, 1974.– 975 с.
9. *Обозная Э.И., Панков Е.Я.* Цитохимия костного мозга при криоконсервировании. Атлас.– Киев: Наук.думка, 1989.– 259 с.
10. *Юнда И.Ф.* Болезни мужских половых органов.– Киев, 1981.– 246 с.
11. *Юнда И.Ф., Петрунь Н.М., Горпинченко И.И.* Энзимологические особенности эякулята при различных формах мужского бесплодия // Сб.науч.трудов: Эндокринология мужского бесплодия.– Тбилиси, 1980.– С. 118-123.
12. *Nachlas M.M., Tsou K., Souza E.* Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. // J. Histochem. & Cytochem.– 1957.– Vol.5, №9.– P. 103-107.
13. WHO laboratory manual for the examination of human semens and sperm-cervical mucus interaction // Cambridge University Press – 1992.– 107 p.
8. *Lehninger A.* Biochemistry: Molecular bases of the structure and function of cells.– Moscow: Mir, 1974.– 975 p.
9. *Oboznaya E.I., Pankov E.Ya.* Cytochemistry of bone marrow during cryopreservation.– Atlas.– Kiev: Naukova dumka, 1989.– 259 p.
10. *Yunda I.F.* Diseases of male genitals. Kiev, 1981. – 246p.
11. *Yunda I.F., Petrun N.M., Gorpichenko I.I.* Enzymic peculiarities of ejaculate under different forms of male infertility // Coll. of Scient. Papers: Endocrinology of male infertility.– Tbilisi, 1980.– P. 118-123.
12. *Naclas M.M., Tsou K., Souza E.* Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole // J. Histochem. & Cytochem.– 1957.– Vol. 5, N 9. – P. 103-107.
13. WHO laboratory manual for the examination of human semens and sperm-cervical mucus interaction // Cambridge University Press.– 1992.– 107 p.

Accepted in 29.05.2002

Поступила 29.05.2002