

СОСТОЯНИЕ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Академик В.И. ГРИЩЕНКО, Е.А. ЯКОВЛЕВА,
профессор А.Ю. ПЕТРЕНКО, к. биол. н. Ю.В. НИКИТЧЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Исследована интенсивность перекисных процессов и активности ряда антиоксидантных ферментов в фолликулярной жидкости яичника человека после 6 мес криоконсервирования и последующего хранения в условиях бытового холодильника. Показана возможность ее хранения в таких условиях в течение по крайней мере 12 ч без существенных изменений в состоянии свободнорадикального окисления липидов и белков, а также активности ферментов антиоксидантной защиты.

Свободнорадикальное окисление в клетках организма играет важную роль в возникновении и развитии различных патологических состояний, в том числе и бесплодия [1–3]. В частности, установлено, что в результате активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) нарушается проницаемость мембран и, как следствие, снижаются кинетические свойства и оплодотворяющая способность спермиев [4, 5]. Фолликулярная жидкость яичника человека (ФЖ) является естественной средой развития ооцита и средой окружения гамет в период оплодотворения. Было показано [6] уменьшение содержания одного из токсичных продуктов ПОЛ — малонового диальдегида при инкубации спермы в ФЖ, что свидетельствует о защитных свойствах последней.

Антиоксидантная и антирадикальная активность ФЖ, очевидно, определяет положительное действие этой биологической среды на подвижность и оплодотворяющую способность спермиев в методиках выделения активно-подвижной фракции гамет эякулята и обуславливает основной механизм сохранения оплодотворяющих свойств мужских гамет при культивировании.

Уникальность операции получения ФЖ яичника человека, этические и моральные факторы, связанные с программой экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), а также необходимость использования ФЖ в те дни, когда получить ее не представляется возможным, требуют разработки методов длительного хранения этого биологического материала. Наиболее перспективным методом бессрочного хранения ФЖ является криоконсервация. Ранее было показано [7], что ФЖ может храниться в условиях жидкого азота в течение 3 мес без существенной потери биологических свойств. Однако программа экстракорпорального оплодотворения предусматривает использование одного препарата ФЖ несколько раз на нескольких этапах, разнесенных во времени. Вместе с тем возможность гипотермического хранения деконсервированной ФЖ до настоящего времени остается неисследованной.

Критерием эффективности хранения ФЖ может служить изменение в ней состояния свободнорадикального окисления липидов и активности антиоксидантной системы.

Основную роль в защите биологических объектов от негативного действия свободных радикалов отводят неферментативной и ферментативной антиоксидантным системам. Неферментативная система антиоксидантной защиты в клетке обычно характеризуется количеством и активностью истинных антиоксидантов — веществ, способных перехватывать, или «тушить», свободные радикалы. Ферментативная антиоксидантная система включает ряд ферментов, способных прямо или косвенно метаболизировать токсичные продукты перекисного окисления. Такими ферментами в первую очередь являются ферменты глутатионзависимой антиоксидантной системы (глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза).

Известно, что ФЖ яичника человека [7] обладает селензависимой глутатионпероксидазной активностью; этот антиоксидантный фермент является основным ферментом, утилизирующим перекись водорода и токсичные продукты ПОЛ — гидроперекиси липидов. При этом интересно отметить, что активность селензависимой глутатионпероксидазы в ФЖ по абсолютным значениям сравнима с активностью фермента в плазме крови человека [8].

Помимо селензависимой глутатионпероксидазы в ФЖ обнаружена и селеннезависимая глутатионпероксидаза, которая является одним из изоферментов глутатион-s-трансферазы. Некоторые изоферменты [9] глутатион-s-трансферазы могут утилизировать вторичные продукты ПОЛ — альдегиды. Еще одним важным ферментом глутатионзависимой антиоксидантной системы глутатиона является обнаруженная в ФЖ глутатионредуктаза — основной фермент, генерирующий восстановленный глутатион.

Целью данной работы было исследование интенсивности перекисных процессов и активности ряда антиоксидантных ферментов в ФЖ яичника человека после криоконсервирования, включающего длительное (6 мес) хранение в жидком азоте, и последующего гипотермического хранения при +8°C в условиях бытового холодильника.

Образцы ФЖ, полученные при пункции фолликулов яичников женщин, участвующих в программе ЭКО, делили на 5 групп. Первая группа — нативная ФЖ, была контрольной. Образцы второй группы

хранили в жидком азоте при -196°C в течение 6 мес по описанной методике. Исследования проводили непосредственно после отогрева образцов на водяной бане при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Третью группу образцов хранили в условиях гипотермии при $+8^{\circ}\text{C}$ в течение 12 ч, четвертую — в течение 24 ч, пятую — в течение 48 ч.

Гидроперекиси липидов определяли по методу Asakawa [10]. Определение реактивных карбонильных белков ФЖ проводили по методу R.L. Levine с небольшой модификацией [11]. Активность глутатионпероксидазы определяли методом Paglia, Valentine в модификации по окислению NADPH в сопряженной глутатионредуктазной системе, глутатионредуктазную активность — спектрофотометрически [12]. Глутатион-S-трансферазную активность определяли спектрофотометрически [13].

Определение белка проводили по методу Lowry et al. в модификации Miller [14]. Полученные данные были обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

В качестве показателей неферментативной системы антиоксидантной защиты в работе использовали содержание ТБК-активных продуктов и карбонильных производных белков. Содержание ТБК-активных продуктов отражает, главным образом, накопление токсичных продуктов перекисного окисления липидов, в то время как накопление карбонильных производных белков пропорционально их модификации свободными радикалами.

Из рис. 1 видно, что содержание ТБК-активных продуктов в нативной фолликулярной жидкости составляло $2,17 \pm 0,17$ нмоль/мл.

Непосредственно после криоконсервирования, включающего быстрое замораживание — быстрый отогрев (вторая группа), содержание ТБК-активных продуктов не изменялось. Последующее гипотермическое хранение деконсервированной ФЖ при $+8^{\circ}\text{C}$ в течение 12 ч (третья группа) также не вызывало значительного изменения данного показателя. Увеличение срока гипотермического хранения до 24 ч (четвертая группа) приводило к достоверному ($p < 0,05$) увеличению содержания ТБК-активных продуктов на 22%. Хранение ФЖ в течение 48 ч (пятая группа) приводило к последующему накоплению продуктов ПОЛ до $3,15 \pm 0,18$ нмоль/мл. При этом содержание ТБК-активных продуктов было на 45% выше уровня контроля и достоверно выше результатов, полученных после 24 ч хранения.

Из рис. 2 видно, что содержание карбонильных производных белка в нативной ФЖ составляло $2,21 \pm 0,09$ нмоль/мг белка. После замораживания — оттаивания уровень фермента не изменялся. Последующее гипотермическое хранение замороженной — оттаянной ФЖ при $+8^{\circ}\text{C}$ также не вызвало значительного изменения данного показателя. При увеличении длительности гипотермического хранения до 24 ч наблюдалось достоверное повышение содержания карбонильных производных белка ($p < 0,05$) в ФЖ. Дальнейшее хранение ФЖ в течение 48 ч приводило к двукратному увеличению содержания производных белка по сравнению с контролем.

Полученные результаты показывают, что хранение криоконсервированной ФЖ в жидком азоте в течение 6 мес не приводит к активации ПОЛ и модификации белков свободными радикалами непосредственно после отогрева. Более того, ФЖ можно хранить после процедуры криоконсервирования в условиях холодильника по крайней мере в течение 12 ч без существенного накопления ТБК-активных продуктов и модифицированных белков.

Ферментативную систему антиоксидантной защиты исследовали по изменению активностей глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы, а также общей глутатионпероксидазы и ее селензависимой и селеннезависимой изоформ. Как следует из рис. 3, общая глутатионпероксидазная активность практически не изменялась после криоконсервирования и последующего гипотермического хранения в течение 12 и 24 ч.

Увеличение сроков гипотермического хранения до 48 ч приводило к достоверному ($p < 0,05$) снижению активности фермента более чем на 30% по сравнению с контрольной группой.

Селеннезависимая глутатионпероксидазная активность в контрольных образцах была равна $76,2 \pm 6,1$ нмоль/мл и составляла около 30% общей глутатионпероксидазной активности (рис. 4). После криоконсервирования эта активность оставалась на том же уровне.

Динамика активности фермента в ходе гипотермического хранения при $+8^{\circ}\text{C}$ мало отличалась от общей активности фермента. Так, только 48-часовое хранение ФЖ приводило к достоверному снижению

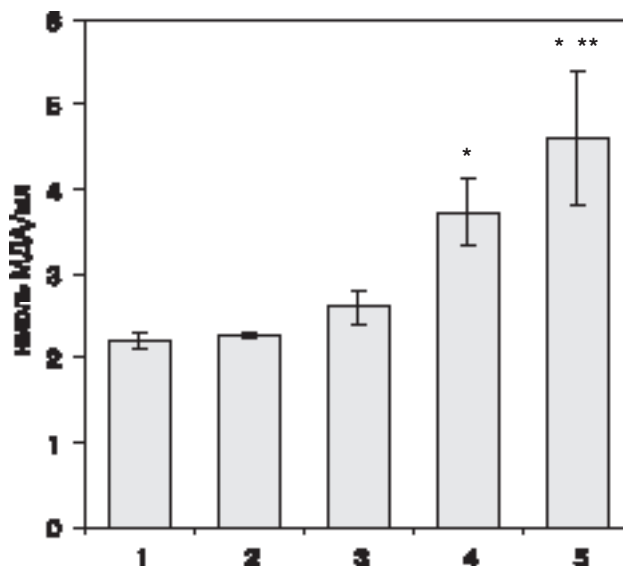


Рис. 1. Содержание ТБК-активных продуктов ПОЛ в ФЖ при разных сроках гипотермического хранения: 1 — нативная ФЖ; 2 — замороженная при -196°C — отогретая ФЖ; 3 — 12 ч хранения; 4 — 24 ч хранения; 5 — 48 ч хранения.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ по сравнению с группой 24 ч гипотермического хранения. То же на последующих рисунках

($p < 0,05$) селенезависимой активности на 25% по сравнению с контролем (рис. 4).

Из рис. 5 видно, что основной вклад в общую активность глутатионпероксидазы, выявляемую в ФЖ, вносит ее селензависимая изоформа, которая в нативном образце составляла $139,4 \pm 16,7$ нмоль/мл. Селензависимая глутатионпероксидаза оказалась более чувствительной к криоконсервированию и последующему гипотермическому хранению по сравнению с общей и селенезависимой глутатионпероксидазой.

Вместе с тем увеличение срока гипотермического хранения до 24 ч приводило к снижению активности фермента на 22,5%. Однако высокая вариабельность результатов в эти сроки хранения позволила выявить

лишь тенденцию ($p < 0,1$) к уменьшению активности. Последующее хранение ФЖ в течение 48 ч приводило к достоверному ($p < 0,01$) почти двукратному угнетению селензависимой глутатионпероксидазной активности (рис. 5). Полученные результаты показывают, что селензависимая составляющая глутатионпероксидазы более чувствительна к криоконсервированию ФЖ и последующему гипотермическому хранению.

Активность глутатион-S-трансферазы и глутатионредуктазы оказалась резистентной к процессу криоконсервирования и последующего гипотермического хранения ФЖ, что видно из приводимой таблицы.

Даже хранение ФЖ в течение 48 ч после деконсервирования не приводило к достоверным изменени-

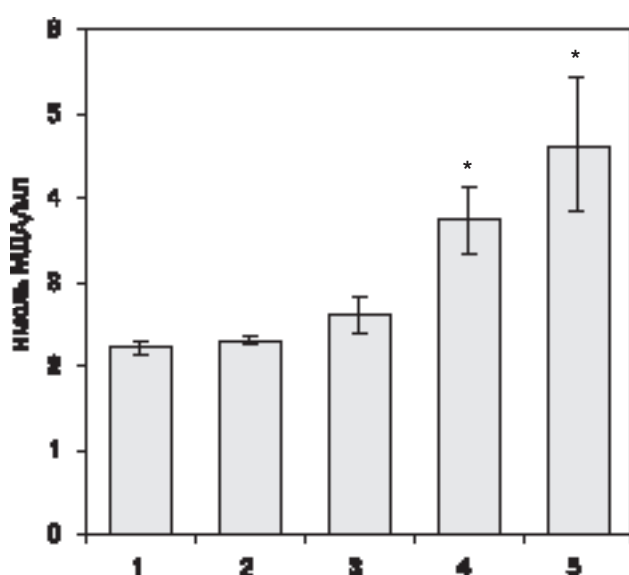


Рис 2. Содержание карбонильных производных белка в ФЖ при разных сроках гипотермического хранения

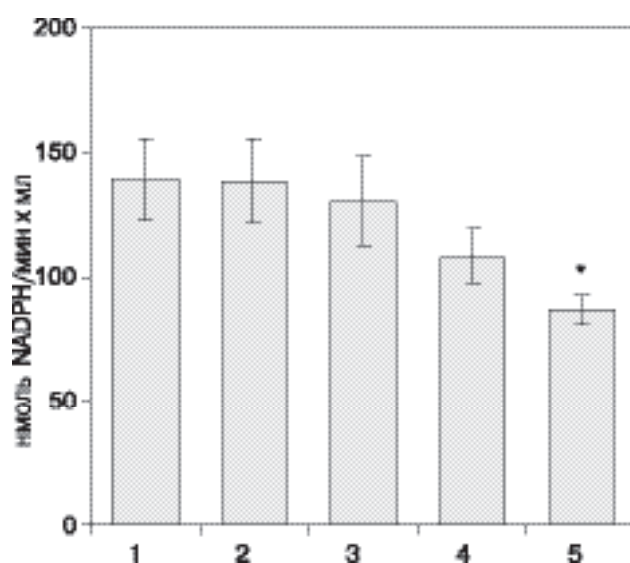


Рис 3. Селензависимая глутатионпероксидазная активность в ФЖ при разных сроках хранения

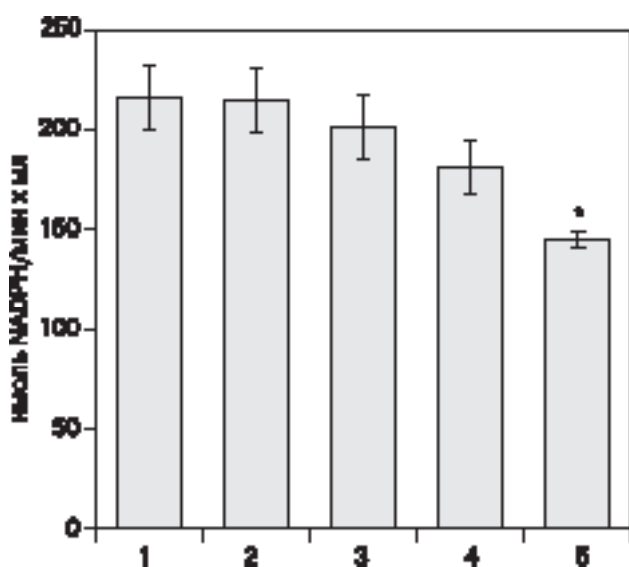


Рис 4. Общая глутатионпероксидазная активность в ФЖ при разных сроках хранения

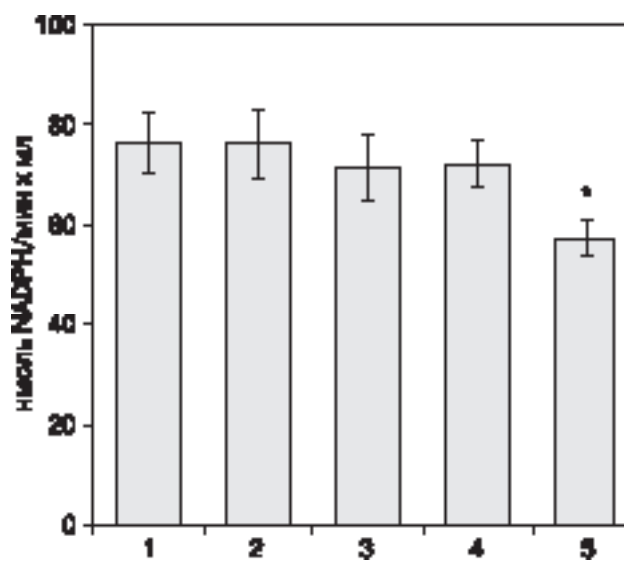


Рис 5. Селенезависимая глутатионпероксидазная активность в ФЖ при разных сроках хранения

Глутатионредуктазная и глутатион-s-трансферазная активность в ФЖ яичника человека при гипотермическом хранении

Условия эксперимента	Глутатион-s-трансферазная активность		Глутатионредуктазная активность	
	Нмоль ХНБ/мин·мл	% к контролю	Нмоль NADPH/мин·мл	% к контролю
Нативная ФЖ (контроль)	250,0±31,0	100,0±12,4	24,02±4,05	100±16,9
Замороженная — оттаявшая	250,3±32,7	100,1±13,1	23,88±3,76	99,4±15,7
Гипотермическое хранение 24 ч	240,1±25,8	96,0±10,3	24,16±3,96	100,6±16,5
Гипотермическое хранение 48 ч	238,5±25,6	95,4±10,2	23,58±3,79	98,2±15,8

ям активности ферментов по сравнению с контрольными образцами.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ФЖ яичника человека характеризуется достаточно мощными антиоксидантными системами. В связи с этим общим свойством всех исследованных показателей свободнорадикального окисления является их устойчивость к криоконсервированию, включающему быстрое замораживание, хранение в жидком азоте ФЖ в течение длительного срока (до 6 мес) и быстрый отогрев, а также к последующему 12-часовому гипотермическому хранению в условиях бытового холодильника (+8°C). Последующее гипотермическое хранение позволило выявить различную устойчивость ферментов антиоксидантной защиты. Так, если активность глутатион-s-трансферазы и глутатионредуктазы не изменялась в течение всего срока наблюдения, то активность глутатионпероксидазы снижалась. При этом снижение общей активности глутатионпероксидазы в большей степени связано с угнетением ее селензависимой формы.

При анализе полученных результатов обращает на себя внимание обратная корреляция в динамике гипотермического хранения между содержанием ТБК-

активных продуктов и карбонильных производных белков, с одной стороны, и активностью селензависимой глутатионпероксидазы — с другой. Это позволяет предположить, что причиной активации неферментативной антиоксидантной системы является угнетение глутатионпероксидазы через 24 ч и особенно через 48 ч гипотермического хранения.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что ФЖ можно криоконсервировать и хранить длительное время (не менее 6 мес) при температурах жидкого азота, а затем в условиях бытового холодильника (+8°C) по крайней мере в течение 12 ч без существенных изменений в состоянии свободнорадикального окисления липидов и белков, а также активности ферментов антиоксидантной защиты.

Полученные данные представляют интерес для познания механизмов действия низких температур на биологически активные жидкости, а также могут иметь большое значение для репродуктологии, поскольку добавление в питательную среду существенно повышает эффективность выделения из спермы фракции быстрых гамет для внутриматочной инсеминации.

Литература

1. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program / E. Geva, B. Bartoov, N. Zabludovsky et al. // *Fertil. Steril.*— 1996.— Vol. 66, № 3.— P. 430–434.
2. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men / S.E.M. Lewis, E.S.L. Sterling, I.S. Young, W. Thompson // *Ibid.*— 1997.— Vol. 67, № 1.— P. 142 — 147.
3. Zini A., de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase — like activities in seminal plasma and spermatozoa // *Int. J. Androl.*— 1993. № 16.— P. 188–189.
4. Cummins J.M., Jequier A.M., Kan R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress // *Mol. Reprod. Dev.*— 1994.— P. 345 — 462.
5. Content of significant amounts of a cytotoxic end — product of lipid peroxidation in human semen / M.U. Selly, M.J. Lacey, M.R. Barnett et al. // *J. Reprod. Fertil.*— 1991.— № 92.— P. 291 — 298.
6. Decrease of malondialdehyde generation in human spermatozoa after human follicular fluid treatment / S. Hamamah, M. Lanson, C. Bartheymy et al. // 11th Annual Meeting of the EHSRE.— Hamburg: Hum. Reprod, 1995.— Vol. 10.— P. 11 — 12.
7. Грищенко В.И., Геродес А.Г., Никитченко Ю.В. Влияние низкотемпературного хранения на перекисное окисление липидов и антиоксидантную активность фолликулярной жидкости человека // *Пробл. криобиол.*— 1998.— № 4.— С. 44 — 47.
8. Maddipati K.R., Marnett L.Z. Characterization of the major hydroxoperoxid reducing activity of human plasma // *The J. of Biological chemistry.*— 1987.— Vol. 262, № 36.— P. 17 398 — 17 403.
9. Beckett G.S., Hayes J.D. Plasma glutathione-s-transferase in man // *J. Clin. Biochem. Nutr.*— 1987.— № 2.— P. 1 — 24.
10. Asakawa T., Matsusita S. Coloring condition of thiobarbitu-

- ric acid test for detecting lipid hidroperoxides // *Lipids*.— 1980.— Vol. 15, № 3.— P. 137 — 140.
11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. рек.— С.Пб.: Фолиант, 2000.— 104 с.
 12. Ланкин В.Э., Гуревич С.М. Инкубирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментными системами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза) при экспериментальном злокачественном росте // Докл. АН СССР.— 1976.— Т. 226, № 3.— С. 705 — 708.
 13. Younes M., Schlichting R., Siegers C.-P. Glutathione-s-transferase activities in ret liver: effect of some factors influencing the metabolism of xenobiotics // *Pharmacol. Res. Com.*— 1980.— Vol. 12, № 2,— P. 115 — 128.
 14. Miller S.I. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. chem.*— 1959.— Vol. 31, № 5.— P. 954 — 966.

Поступила 07.02.2005

THE STATE OF FREE-RADICAL OXIDATION OF THE HUMAN OVARY FOLLICULAR FLUID AFTER A PROLONGED CRYOPRESERVATION

V.I. Grischenko, E.A. Yakovleva, A.Yu. Petrenko, Yu.V. Nikitchenko

S u m m a r y

The intensity of peroxidation processes and activity of a number of antioxidant enzymes was studied in the follicular fluid of human ovaries after 6 months of cryopreservation followed by storage in the conditions of a domestic refrigerator. The possibility to store it in these conditions for at least 12 hours without considerable changes in the state of free-radical oxidation of lipids and proteins as well as antioxidant system enzyme activity is shown.