

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СПЕРМИЕВ ИНДЮКОВ И ПЕТУХОВ

Овсянникова Т. Н., Линник Т. П.<sup>1</sup>, Мартынюк И. М.<sup>1</sup>, Коваленко А. А., Прокопчук Г. С.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина;*

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

Длительное хранение репродуктивного биоматериала в нативном состоянии является важной прикладной задачей, решаемой посредством криоконсервации с применением криопротекторов. Наличие антиоксидантных свойств у криопротектора повышает эффективность его использования. Была исследована возможность криоконсервации спермиев птиц (как модель) с различными криопротекторами. Показателем потенциальной способности клеток к обеспечению подвижности и функционированию может служить эффективность работы митохондрий в сперматозоидах.

Роль различных метаболических путей в обеспечении энергетических потребностей сперматозоидов давно и активно изучается, вместе с тем до сих пор нет абсолютного единства мнений по этому вопросу. Важность определения параметров митохондриального дыхания спермиев для оценки их функциональных свойств очевидна, что и отмечается в ряде работ [1–4]. Кроме того, имеются данные, что дыхательные дефекты ответственны не только за подвижность, но и за развитие олигоспермии и астенозооспермии, нарушения морфологии сперматозоидов. Известно, что определенный вклад в выработку энергии в спермиях вносит гликолиз, причем величина этого вклада видо-

специфична [4–6]. Некоторые авторы приводят экспериментальные доказательства возможности существования ферментов гликолитического цикла даже в матриксе митохондрий [6]. В отдельных работах отмечается, что в спермиях могут существовать до сих пор неизвестные источники энергии [2]. Данные о том, что кетоновые тела могут относиться к подобным источниками энергии [7], на наш взгляд, уравнивают в правах все теории энергообеспечения спермиев. Вероятно, в клетке, которой приходится чередовать условия своей жизнедеятельности от аэробных к анаэробным, выработаны механизмы, позволяющие с одинаковым успехом использовать разные источники энергии в зависимости от обеспеченности среды обитания кислородом и субстратами. Это предположение находит свое подтверждение в работах, методически наиболее корректно выполненных [6–8].

В связи с вышеизложенным, эффективность работы митохондрий в сперматозоидах может служить показателем потенциальных возможностей клеток к обеспечению их энергией. Дыхательная активность спермиев связана исключительно с работой митохондрий в этих специализированных клетках, поскольку эндоплазматический ретикулум, потребляющий в большинстве клеток

до 60 % кислорода, в них отсутствует. В связи с этим, поглощение кислорода спермиями является характеристикой потенциальных возможностей клеток к синтезу АТФ и, соответственно, обеспечению двигательной активности их жгутика.

Митохондрии с хорошо развитыми кристами спирально располагаются вокруг аксонемы в промежуточной части спермия. Функционирование дыхательной цепи внутренней мембраны митохондрий вообще и у спермиев, в частности, зависит от целостности митохондриальных мембран, а также от многих химических факторов, которые потенциально могут выступать в качестве разобщителей дыхания и окислительного фосфорилирования [9–11]. Поэтому применение различных криопротекторов требует, по крайней мере, оценки их влияния в це-

лом на комплексы электронпереносящей цепи именно с точки зрения сохранения общей работоспособности всей системы дыхания-фосфорилирования. Кроме того, картина изменений процессов функционирования митохондрий при действии разных криопротекторов позволит выявить наиболее уязвимые для данных условий участки цепи, поскольку исследование митохондрий *in vitro* является наиболее подходящей моделью для решения подобных задач.

Целью данной работы было выяснить влияние разных криопротекторов на биоэнергетические показатели спермиев петухов и индюков для определения оптимально пригодной из них для низкотемпературной консервации репродуктивного материала с сохранением физиологических характеристик.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследована сперма 10 петухов и 10 индюков, предоставленная Институтом птицеводства УНАН Украины (с. Борки Харьковской области). Птиц содержали в стандартных условиях при природном освещении и пищевом режиме, рекомендованном для данных животных. Исследования проводились в соответствии с национальными «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Украина, 2001), которые согласуются с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, использующихся для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Дыхание спермиев петуха и индюка измеряли полярографическим методом с помощью замкнутого платинового кислородного электрода типа Кларка [12]. Пробы замораживали погружением пластиковых пробирок Эппендорфа со спермой птиц в жидкий азот ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) с последующим хранением (3 месяца и более) в тех же условиях. Пробы хранили в нативном состоянии и с добавлением различных криопротекторов.

В качестве криопротекторов применяли формамидом (ФА), N,N-диметилформамидом (ДМФА), N,N-диметил-ацетамидом (ДМАЦ), этиленгликолем (ЭГ),

1,2-пропандиолом (1,2-ПД), 2,3-бутандиолом (2,3-БД).

Нативные или замороженно — оттаянные (в водяном термостате при  $37^{\circ}\text{C}$ ) спермии вносили в термостатированную полярографическую ячейку объемом 1 мл, содержащую среду инкубации, и регистрировали поглощение кислорода с помощью полярографического прибора — кислородомера «Ptenomiertz 5221» (Польша). Регистрировали различные биоэнергетические параметры дыхания: в присутствии глюкозы ( $V_4$ ) — нефосфорилирующие митохондрии, а также после добавления аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) до конечной концентрации 200 мкМ ( $V_3$ ) — фосфорилирующие митохондрии. По данным показателям был рассчитан коэффициент дыхательной активности (ДК), характеризующий сопряжение дыхания и фосфорилирования и выражающийся как отношение  $V_3$  к  $V_4$  ( $\text{ДК} = V_3/V_4$ ). Исследованы биоэнергетические показатели нативных спермиев птиц, а также замороженных — оттаянных после хранения с криопротекторами.

До внесения в ячейку нативных (незамороженных) спермиев их эквilibрировали либо с криопротектором в соотношении 1 : 1, либо со средой (раствор глюкозы, 4,7 %)

в таком же соотношении (контроль). Добавка в ячейку соответствовала  $10^8$  штук спермиев.

Скорости поглощения кислорода образцами нативной спермы петуха и индюка ( $10^9$  клеток/мл) исследованы после инкубации ее в течение 30 мин. при  $25^\circ\text{C}$  с каждым из криопротекторов.

Статистический анализ данных производился с помощью стандартных пакетов про-

грамм Ehel (версия 7) и Biostat [13]. Проверку распределения данных на соответствие закону Гаусса проводили с использованием среднего арифметического и стандартного отклонения. При нормальном распределении данных применяли параметрическую статистику. При сравнении групп с распределением, отличным от нормального, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни [14].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из данных, представленных на рис. 1, дыхание нативной спермы петуха до криоконсервации в двух состояниях — с фосфорилированием и без фосфорилирования (с экзогенной АДФ) несколько выше, чем у индюка, однако значимость различий невелика. При этом коэффициент дыхательного контроля у индюков выше, чем у петухов, что говорит о более высоких потенциальных возможностях спермиев индюка в плане образования АТФ. Обращает на себя внимание тот факт, что различия между  $V_4$  у петухов и индюков (21 %) выше, чем между  $V_3$  — 11 %. Это может свидетельствовать о том, что внутренняя мембрана митохондрий спермиев петухов более проницаема для протонов, а также о большей проницаемости плазмолеммы петухов для глюкозы и фруктозы. Возможно, мембраны спермиев индюков и петухов различаются по содержанию холестерина.

После криоконсервации возрастают скорости поглощения кислорода спермиями как индюков, так и петухов, то есть электрон-переносящие цепи митохондрий спермиев начинают работать более интенсивно. По всей видимости, происходит это из-за разрушения их плазматических мембран и появления вследствие этого большей доступности субстратов и их метаболитов из среды. Вместе с тем, коэффициент ДК у петухов возрастает ( $p < 0,05$ ), тогда как у индюков он даже несколько снижается ( $p < 0,1$ ). Это может свидетельствовать в пользу большей устойчивости митохондрий петухов по сравнению с индюками к действию криоконсервации.

Таким образом, необходимость использо-

вания криопротекторов для сохранения целостности мембранного аппарата спермиев птиц очевидна, поэтому следует выяснить, насколько будут индифферентны митохондрии спермиев птиц к химическим компонентам, определяющим консервирующий эффект.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, три из шести веществ практически полностью угнетали процесс фосфорилирования АДФ, что может быть связано с разобщением дыхания и фосфорилирования на уровне так называемого пятого комплекса дыхательной цепи — фермента АТФ-азы (АТФ-синтазы). Учитывая сложность строения данного фермента и еще более сложный механизм его функционирования, обнаруженный эффект может быть связан с несколькими явлениями, в их числе — перенаправление тока протонов из межмембранного пространства внутрь митохондрии минуя канал АТФ-азы за счет связывания протонов криопротекторами. Но в качестве акцептора протонов может выступать лишь ФА, тогда как ЭГ и 2,3-БД являются донорами протонов (вероятно, именно по этой причине скорость дыхания, но не фосфорилирования, парадоксальным образом повышается при действии на спермии 2,3-БД и 1,2 ПД.) В любом случае, выработки АТФ при инкубации с ФА, ЭГ и 2,3-БД не происходит, по-видимому, из-за ингибирования каким-либо способом АТФ-синтазной активности. При этом возможной причиной может быть изменение качества липидного окружения фермента за счет деградации мембранных липидов по пути перекисного окисления липидов. В случае с дру-

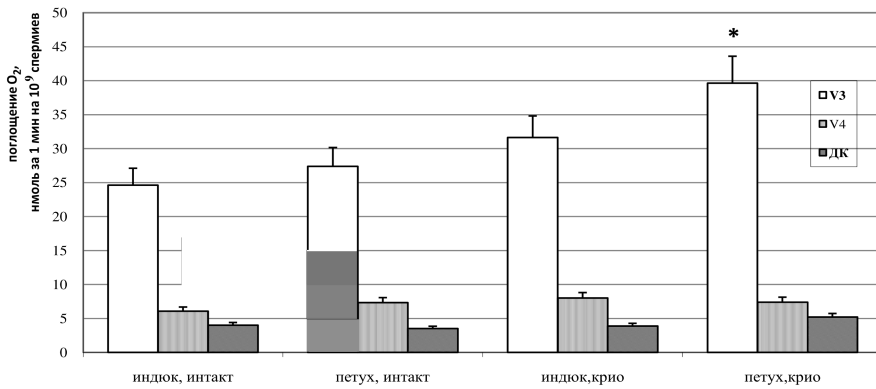


Рис. 1. Влияние криоконсервации на дыхательную активность спермиев петухов и индюков.  
\* —  $p < 0,05$ , достоверные изменения относительно данных группы «петух, интакт».

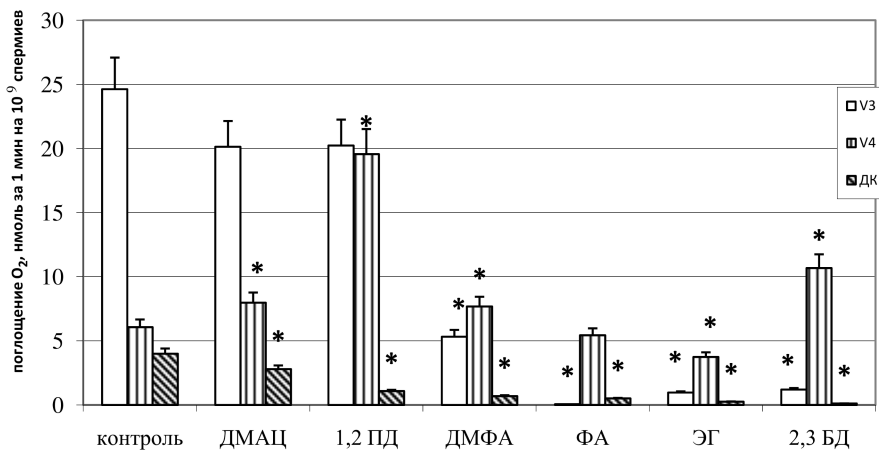


Рис. 2. Влияние различных криопротекторов на дыхательную активность свежих спермиев индюков.  
\* —  $p < 0,05$ , достоверные изменения относительно данных группы «контроль».

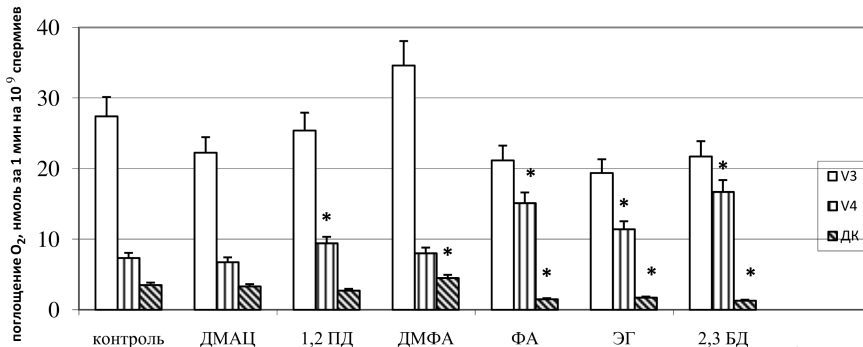


Рис. 3. Влияние различных криопротекторов на дыхательную активность свежих спермиев петухов.  
\* —  $p < 0,05$ , достоверные изменения относительно данных группы «контроль».

гим диолом (1,2 ПД), процесс фосфорилирования также угнетен при вполне активном процессе дыхания, что явно указывает на прямое повреждение внутренней мембраны митохондрий спермиев — она натуральным образом фрагментирована с сохранением работающих участков дыхательной цепи, но с утратой способности фор-

мировать пул протонов в межмембранном пространстве.

Рассматривая влияние изучаемых веществ на нативные спермии петухов (рис. 3), можно сделать аналогичный вывод о наиболее отрицательном действии на дыхательную активность митохондрий клеток именно ФА, ЭГ и 2,3-БД. Вместе с тем, сле-

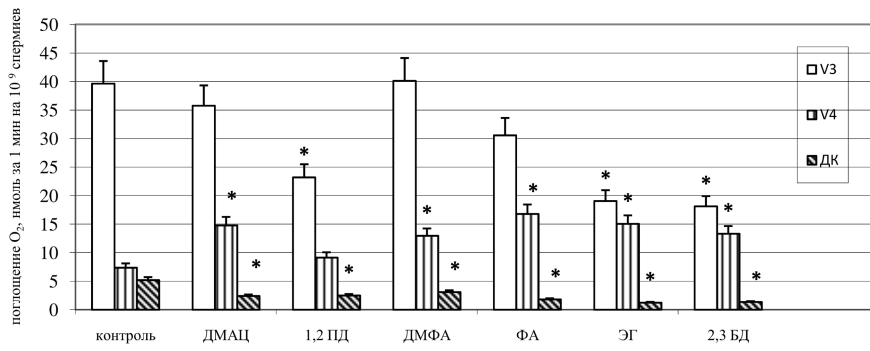


Рис. 4. Влияние различных криопротекторов на дыхательную активность спермиев петухов после оттаивания.

\* —  $p < 0,05$ , достоверные изменения относительно данных группы «контроль».

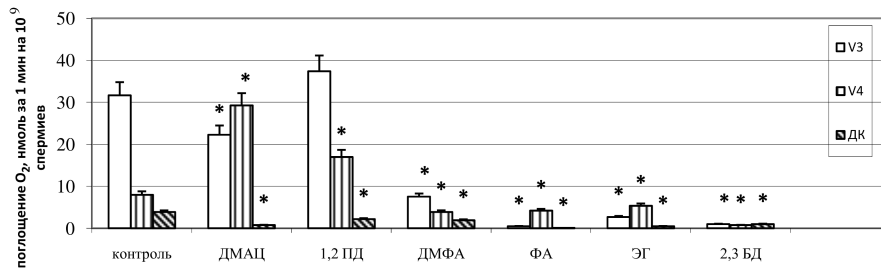


Рис. 5. Влияние различных криопротекторов на дыхательную активность спермиев индюков после оттаивания.

\* —  $p < 0,05$ , достоверные изменения относительно данных группы «контроль».

дует заметить, что возможные механизмы эффектов в этих двух случаях различаются. По крайней мере, митохондрии спермиев петухов после инкубации с указанными веществами не утрачивают полностью способность к образованию АТФ (на что указывают величины  $V_3$  и ДК), но претерпевают значительное повреждение своей внутренней мембраны, что явно заметно по показателям  $V_4$ . При этом максимально повреждающий эффект выказывает 2,3-БД. Вполне «лояльными» к дыхательным процессам в митохондриях спермиев петухов являются эффекты ДМФА и ДМАЦ, причем при инкубации с первым даже повышается степень сопряженности дыхания и фосфорилирования. Подобная картина не может быть объяснена результатами настоящих исследований, а требует отдельных экспериментов. Можно лишь предполагать роль привнесения дополнительных протонов в межмембранное пространство из цитоплазмы с помощью этих веществ.

Как видно из данных рис. 4, после криоконсервирования спермиев петухов с иссле-

дуемыми протекторами и последующего оттаивания образцов закономерности влияния на них криопротекторов остаются прежними, правда, снижается (не критично, хотя и статистически значимо) эффективность процессов дыхания с ДМАЦ. И некоторое повышение скорости поглощения кислорода при добавлении АДФ указывает на устранение такой помехи для транспорта субстратов в спермий, как плазмолемма. Обнадешивает в этом случае достаточная сохранность митохондрий, то есть в общей массе, очевидно, деградации всех клеток не происходит.

Несколько иная картина показана на рис. 5, демонстрирующем данные по криоконсервированной — оттаянной сперме индюков. Из всех примененных нами веществ удовлетворительный эффект можно наблюдать только в случае 1,2 ПД. Весьма относительный позитивный эффект продемонстрирован также ДМФА: клетки остались способными к дыханию и фосфорилированию, но при очень низких абсолютных величинах процесса.

Хотя, учитывая, что, возможно, роль митохондрий и не основная по сравнению с гли-

колизом в плане энергообеспечения спермиев, а дыхательная цепь их является местом генерирования активных форм кислорода

при эффективной работе, нельзя рассматривать подобную картину как сугубо негативную.

## ВЫВОДЫ

1. У петухов и индюков исследованные криопротекторы по-разному влияют на дыхательные процессы как в нативных спермиях, так и после их криоконсервирования — оттаивания.
2. ФА, ЭГ и 2,3-БД снижают эффективность дыхания митохондрий спермиев петухов, примерно в одинаковой степени как нативных, так и после криоконсервирования, в условиях дыхания как

без, так и с добавлением экзогенного АДФ.

3. ФА, ЭГ и 2,3-БД снижают эффективность дыхания митохондрий спермиев индюков.
4. Приемлемым криопротектором для спермиев индюков, из изученных в данном исследовании, является 1,2 ПД, тогда как для спермиев петухов положительно себя зарекомендовали ДМФА, ДМАЦ, 1,2 ПД.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mitochondria-related male infertility [Text] / Kazuto Nakada, Akitsugu Sato, Kayo Yoshida [et al.]. // Proc Nat. Acad Sci USA. — 2006 — № 10, Vol. 103 (41). — P. 15148–15153.
2. Ford, W. C. L. The role of oxidative-phosphorylation in the generation of ATP in human-spermatozoa [Text] / W. C. L. Ford, A. Harrison, // J. Reprod Fertil. — 1981. — Vol. 63. — P. 271–278.
3. Krzyzosiak, J. Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. [Text] / J. Krzyzosiak, P. Molan, R. Vishwanath. // Anim. Reprod. Sci. — 1999. — № 55. — P. 163–173.
4. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility [Text] / K. Miki, W. Qu, E. H. Goulding [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2004. — Vol. 101. — P. 16501–16506.
5. Mukai, C. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement [Text] / C. Mukai, M. Okuno. // Biol. Reprod. — 2004. — Vol. 71. — P. 540–547.
6. Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa [Text] / A. J. Travis, J. Foster, N. A. Rosenbaum [et al.] // Mol. Biol. Cell. — 1998. — Vol. 9 — P. 263–276.
7. Ketone bodies could support the motility but not the acrosome reaction of mouse sperm [Text] / H. Tanaka, T. Takahashi, N. Iguchi [et al.] // Int. J. Androl. — 2004. — Vol. 27. — P. 172–177.
8. Vande Voort, C. A. Effects of glucose and other energy substrates on the hyperactivated motility of macaque sperm and the zona pellucida-induced acrosome reaction [Text] / C. A. Vande Voort, J. W. Overstreet / J. Androl. — 1995. — Vol. 16. — P. 327–333.
9. Role of mitochondria in toxic oxidative stress [Text] / M. W. Fariss, C. B. Chan, M. Patel [et al.] // Mol. Interv. — 2005. — Vol. 5, № 2. — P. 94–111.
10. Duchon, M. R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology [Text] / M. R. Duchon // Mol. Aspects Med. — 2004. — Vol. 25, № 4. — P. 365–451.
11. Schober, D. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa [Text] / D. Schober, C. Aurich, H. Nohl, L. Gille // Theriogenology. — 2007. — Vol. 68, № 5. — P. 745–754.
12. Практикум по биохимии [Текст]: учеб. пособие / под ред. С. Е. Северина, Г. Е. Соловьевой. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — С. 480–483.
13. Гланц, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланц. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
14. Атраментова, Л. А. Статистические методы в биологии: учебник для студ. высш. уч. зав. / Л. А. Атраментова, О. М. Утевская. — Горловка: «Видавництво Ліхтар», 2008. — 248 с.

## ВПЛІВ РІЗНИХ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА ДИХАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ СПЕРМІЇВ ІНДИКІВ ТА ПІВНІВ

Овсяннікова Т. М., Ліннік Т. П.<sup>1</sup>, Мартинюк І. М.<sup>1</sup>, Коваленко А. А., Прокопчук Г. С.

*Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна;  
<sup>1</sup>Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків*

Досліджено мітохондріальну дихальну активність сперміїв півнів та індиків (у якості моделей) за умов кріоконсервування у присутності різних кріопротекторів. Продемонстровано, що оптимальним кріопротектором для сперміїв, як нативних, так і після заморожування-відігріву, є 1,2-пропандіол.

К л ю ч о в і с л о в а: спермії, мітохондрії, кріопротектори, півні, індики.

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СПЕРМИЕВ ИНДЮКОВ И ПЕТУХОВ

Овсянникова Т. Н., Линник Т. П.<sup>1</sup>, Мартынюк И. М.<sup>1</sup>, Коваленко А. А., Прокопчук Г. С.

*Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина;  
<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

Исследована митохондриальная дыхательная активность спермиев петухов и индюков (как моделей) при кріоконсервировании в присутствии различных кріопротекторов. Показано, что оптимальным кріопротектором для спермиев, как нативных, так и после замораживания-отогрева, является 1,2-пропандиол.

К л ю ч е в ы е с л о в а: спермии, митохондрии, кріопротекторы, петухи, индюки.