

Влияние факторов криоконсервирования на энергетический обмен активированных спермиев сазана (*Cyprinus carpio* L.)

В.В. ЧЕРЕПАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Cryopreservation Factors on the Energetic Metabolism of *Cyprinus carpio* L. activated Spermatozoa

CHEREPANOV V.V.

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

Изучали влияние факторов криоконсервирования (гипотермии, гипертонии, замораживания и оттаивания) на содержание ключевых энергетических метаболитов глюкозо-6-фосфата (Н6Ф), пирувата (ПВ), лактата и основных макроэргических фосфатов АТФ и креатинфосфата (КФ) в спермиях сазана для выявления наиболее криочувствительных метаболических реакций. Установлено, что все исследованные факторы вносят значительные изменения в энергообмен большинства клеток, а используемые методы криоконсервирования спермы рыб не обеспечивают полной сохранности внутренних функциональных параметров всех клеток.

Ключевые слова: криоконсервирование, сперма рыб, креатинфосфат, АТФ, лактат, пируват, глюкозо-6-фосфат.

Вивчали вплив факторів криоконсервування (гіпотермії, гіпертонії, заморожування і відтавання) на вміст ключових енергетичних метаболітів глюкозо-6-фосфату, пірувату, лактату і основних макроергічних фосфатів АТФ і креатинфосфату в сперміях сазана для виявлення найбільш криочутливих метаболічних реакцій. Установлено, що всі досліджувані фактори вносять значні зміни в енергообмін більшості клітин, а методи криоконсервування сперми рыб, які використовуються, не забезпечують повної цілості внутрішніх функціональних параметрів усіх клітин.

Ключові слова: криоконсервування, сперма рыб, креатинфосфат, АТФ, лактат, піруват, глюкозо-6-фосфат.

We have investigated the cryopreservation factors (hypothermia, hypertonia, freezing and thawing) on the content of such key energetic metabolites as glucose-6-phosphate (G6P), pyruvate (PV), lactate and main macroergic phosphates of ATP and creatinephosphate (CP) in *Cyprinus carpio* L. spermatozoa to reveal the most cryosensitive metabolic reactions. It has been established that all the factors studied cause significant alterations in an energy metabolism of the majority of cells; the methods for fish sperm cryopreservation used do not provide a complete integrity of internal functional parameters for all the cells.

Key-words: cryopreservation, fish sperm, creatinephosphate, ATP, lactate, pyruvate, glucose-6-phosphate.

Механизмы, определяющие инициацию движения, движение и остановку спермиев, изучены недостаточно. Имеющиеся данные по энергетическому обеспечению их движения указывают на активное протекание как анаэробного, так и аэробного обменов, однако четкая метаболическая картина этих процессов отсутствует. Практически не изучено влияние различных физических и химических факторов, возникающих в процессе криоконсервирования на энергообеспечение спермиев.

Для уяснения влияния факторов криоконсервирования на энергетические параметры спермиев сазана следует установить, какие метаболические пути или циклы превращения и накопления энергии в виде макроэргических фосфатных соединений необходимы для активного движения спермиев.

Известно, что период активного движения в жизни спермиев сазана занимает 1-2 мин. За такой короткий промежуток времени энергия, расходуемая динеиновыми АТФазами, может черпаться

The mechanisms determining the movement initiation, spermatozoa movement and stopping have not been studied sufficiently. The existing data on the spermatozoa energy providing pointing out to an active course of both anaerobic and aerobic metabolisms, however the clear metabolic picture of these processes is absent. Actually there has not been investigated the influence of various physical and chemical factors appearing during cryopreservation on energy providing for spermatozoa.

To reveal the effect of cryopreservation factors on the energy parameters of *Cyprinus carpio* L. spermatozoa it should be established which metabolic ways or the cycles of energy transformation and accumulation as macroergic phosphate compounds are essential for an active spermatozoa movement.

It is known that the period of active movement in *Cyprinus carpio* L. sperm life takes 1-2 min. During such a short time period the energy spent by dinein ATP phases can be taken either from the depot of macroergic phosphates stocked by a cell earlier or it

Адрес для корреспонденции: Черепанов В.В. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-41-43, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Cherepanov V.V., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7724143, fax: +38(057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

либо из депо макроэргических фосфатов, запасенных клеткой заранее, либо должен быть включен мощный механизм получения энергии при окислении углеводов или липидов и превращения ее в энергию макроэргических фосфатных связей. Для спермиев сазана наиболее значимыми источниками энергии, вероятно, являются углеводы и липиды, а механизмами преобразования энергии – процессы аэробного и анаэробного метаболизма, которые реализуются в гликолизе и цикле трикарбоновых кислот, а локализуются в цитоплазме и митохондриях.

Материалы и методы

В работе использовали сперму сазана (*Cyprinus carpio* L.), полученную от производителей через 24 ч после гипофизарной инъекции, обрабатывали, криоконсервировали, оттаивали и определяли качество [6]. Криоконсервировали в среде [4], содержащей (мМ): NaCl – 59, KCl – 0.68, CaCl₂ – 0.68, MgSO₄ – 2.1, NaHCO₃ – 27, сахарозы – 3.4, D-маннит-69, глутатиона - 0.7, трис-HCl – 118 (pH 8.1)

Для биохимических исследований отцеженную сперму делили на 2 части: первую активировали 0.3%-м раствором NaCl и через определенные промежутки времени аликвоту приливали к равному объему 10%-й HClO₄, а затем быстро опускали в жидкий азот и использовали для изучения динамики содержания метаболитов в активированной сперме; вторую разбавляли криозащитной средой, инкубировали 30 мин на холоде и делили на 2 части: первую активировали 0.3%-м раствором NaCl, инкубировали при 20°C и через определенные промежутки времени отбирали аликвоту и приливали к равному объему 10%-й HClO₄, и быстро опускали в жидкий азот; вторую замораживали по программе для изучения динамики содержания метаболитов в активированных замороженных-оттаянных спермиях.

После размораживания ампулы с хлорнокислым экстрактом центрифугировали 5 мин при 1000 g, супернатант сливали и нейтрализовали KOH до pH 7.0. Осадок, содержащий ДНК, РНК, белки и другие вещества, растворяли в NaOH для определения белка по методу Лоури в модификации Миллера [7]. Нейтрализованный супернатант помещали на 15 мин в ледяную баню, после чего центрифугировали 5 мин при 1000 g и использовали для определения содержания Г6Ф, лактата, ПВ, АТФ и КФ.

Количество Г6Ф, АТФ и КФ определяли ферментативным методом по накоплению НАДФН в системе сопряженных ферментативных реакций в одной кювете, используя глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу (Г6ФДГ), гексокиназу (ГК) и

must be switched on a strong mechanism of getting the energy during carbohydrates or lipids oxidation and its transformation into an energy of macroergic phosphate links.

For *Cyprinus carpio* L. spermatozoa the most important energy sources are probably carbohydrates and lipids, and the mechanisms of energy transformation are known to be the processes of aerobic and anaerobic metabolism realized in glycolysis and in a cycle of tricarboic acids, and localized in cytoplasm and mitochondria.

Materials and methods

In the work we have used the *Cyprinus carpio* L. sperm procured from males in 24 hours following a hypophysial injection, it has been treated, cryopreserved, thawed and the quality was estimated [6]. Cryopreservation was performed in the medium [4] comprising (mM): NaCl – 59, KCl – 0.68, CaCl₂ – 0.68, MgSO₄ – 2.1, NaHCO₃ – 27, sucrose – 3.4, D-mannitol – 69, glutathione – 0.7, tris-HCl – 118 (pH 8.1).

For the biochemical studies the filtered sperm was divided in two parts: the first one was activated by 0.3% NaCl solution and in certain periods of time the aliquot was added to an equal volume of 10% HClO₄, then quickly immersed into liquid nitrogen and used in order to study the dynamics of metabolites' content in the sperm activated; the second part was diluted by a cryoprotective medium, incubated at cold within 30 min and divided in two parts: the first one was activated by 0.3% NaCl solution, incubated under 20°C and in certain time periods the aliquot was removed and added to an equal volume of 10% HClO₄, immersed quickly into liquid nitrogen according to the program for studying the dynamics of metabolite content in the activated frozen-thawed spermatozoa.

Following freezing the ampoules with HClO₄ extract were for 5 min centrifuged under 1000g, supernatant was poured out and neutralized KOH to pH 7.0. Supernatant comprising DNA, RNA, protein and other substances was dissolved in NaOH to determine the protein using Lawry method in Miller's modification [7]. The supernatant neutralized was placed in an ice bath for 15 min, centrifuged then for 5 min at 1000g and used to determine the G6H, lactate, PV, ATP and CP contents.

The amount of G6P, ATP and CP was evaluated by enzymic method on NADPH accumulation in the system of conjugated enzymic reactions using in one cuvette glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, hexokinase (HK) and creatine phosphokinase adding consequently the following enzymes: G6PDH 25 units/ml, HK 5 units/ml + glucose 4 mM, ADP 0.5 mM and CFK 5 units/ml. NADPH was determined in the medium comprising tris-HCl 100mM, pH 7.4, EDTA 1mM, Mg (CH₃COO)₂ 2 mM

креатинфосфокиназу (КФК) и последовательно добавляя следующие ферменты: Г6ФДГ 25 ед/мл, ГК 5 ед/мл + глюкозы 4 мМ, АДФ 0,5 мМ и КФК 5 ед/мл. Определение НАДФН проводили в среде, содержащей трис-НСl 100 мМ, рН 7,4, ЭДТА 1 мМ, $Mg(CH_3COO)_2$ 2 мМ и НАДФ 4 мМ [1]. Уровень содержания НАДФН регистрировали флуориметрически. Реакцию начинали добавлением экстракта. Количество метаболитов выражали в нмоль/мг белка.

Содержание лактата определяли ферментативным методом по накоплению НАДН в системе сопряженных ферментативных реакций, используя лактатдегидрогеназу (ЛДГ). Определение проводили в среде следующего состава: гидразин 0,4 М, глицин 1 М, рН 9,5, ЭДТА 1 мМ, НАД 30 мМ, ЛДГ 22 ед/мл и МДГ 20 ед/мл [1]. Уровень НАДН регистрировали флуориметрически. Реакцию начинали добавлением экстракта.

Содержание ПВ определяли ферментативным методом по убыли НАДН в среде следующего состава: трис-НСl 100 мМ, рН 7,4, $MgCl_2$ 10 мМ, ЭДТА 1 мМ, НАДН 0,25 мМ и ЛДГ 22 ед/мл [1]. Уровень НАДН регистрировали флуориметрически. Реакцию начинали добавлением экстракта.

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом Фишера-Стьюдента [2]. В работе использовали реактивы фирмы "Sigma" США.

Результаты и обсуждение

Из проведенных экспериментов видно, что на метаболизм активированных спермиев существенное влияние оказывают 30-минутная инкубация свежих спермиев в холодильнике при 4°C, последующая 30-минутная эквilibрация с криозащитной средой и замораживание-оттаивание по программе, т.е. все технологические операции, проводимые со спермой при ее замораживании.

Динамика содержания Г6Ф в активированных спермиях, являющегося первым фосфорилированным интермедиатом, находящимся на перекрестке двух метаболических путей (гликолиза и пентозофосфатного цикла), представлена на рис. 1.

Подготовка к криоконсервированию и замораживание-оттаивание спермиев не изменяют исходного содержания Г6Ф по сравнению с контролем (4,1- 4,6 нмоль/мг белка). Активация нативных спермиев приводит к росту более чем в 3 раза уровня Г6Ф к 15-й секунде и в дальнейшем к достоверному его падению к 40-й секунде с последующим ростом до 12 нмоль/мг белка к 90-й секунде активной жизни спермиев.

Эквilibрация спермиев с криозащитной средой

and NADP 4 мМ [1]. The level of NADP content was recorded fluorimetrically. The reaction was started by adding the extract. Metabolites' number was manifested in nmol/mg of protein.

Lactate content was determined by enzymic method on NADH accumulation in the system of conjugated enzymic reactions using lactate dehydrogenase (LDH). The determination was performed in the medium of the following composition: hydrazine 0.4 M, glycine 1 M, pH 9.5, EDTA 1 μ M, NAD 30 μ M, LDH 22 units/ml and MDH 20 units/ml [1]. NADH level was recorded fluorimetrically. The reaction was started by adding the extract.

Pyruvate content was determined using enzymic method on NADN reduction in the medium of the following composition: tris-HCl 100 мМ, pH 7.4, $MgCl_2$ 10 μ M, EDTA 1 μ M, NADH 0.25 μ M and LDH 22 units/ml [1]. NADH level was recorded fluorimetrically. The reaction was started by adding the extract.

Statistical processing of the results obtained was accomplished by Fisher-Student's method [2]. The reagents of "SIGMA" (USA) were used in the work.

Results and discussion

The experiments performed have demonstrated that the activated spermatozoa metabolism is significantly affected by 30 min incubation of fresh spermatozoa stored in freezer under 4°C, the further 30-min equilibration with cryoprotective medium and freeze-thawing according to the program, i.e. all the technological operations performed with the sperm when its freezing.

Dynamics of G6P content in spermatozoa activated, which is the first phosphorylated intermediate being at the crossroad of two metabolic ways (glycolysis and pentosophosphate cycle) is presented in Fig. 1.

Preparing to cryopreservation and freeze-thawing of spermatozoa do not change the primary G6P content comparing to the control (4.1-4.6 nmol/mg of protein). Native spermatozoa activation results in a more than thrice growth of the G6P level by the 15th second and in the following rise up to 12 nmol/mg of protein by the 90th second of an active spermatozoa life.

Spermatozoa equilibration with the cryoprotective medium increases the G6P level by more than 5 times by 15 s after starting the movement, this level did not change by the 40th s and by the 90th s decreased down to its level in the control.

Activation of the spermatozoa subjected to freeze-thawing results in a gradual G6P increase and reaches the maximum (32.6 nmol/mg of protein) by the 40th s of incubation. By the 90th s of spermatozoa movement the G6P level falls down to 8.9 nmol/mg of protein.

Pyruvate amount in the activated native spermatozoa (Fig. 2) is at the level of 9.4 nmol/mg of

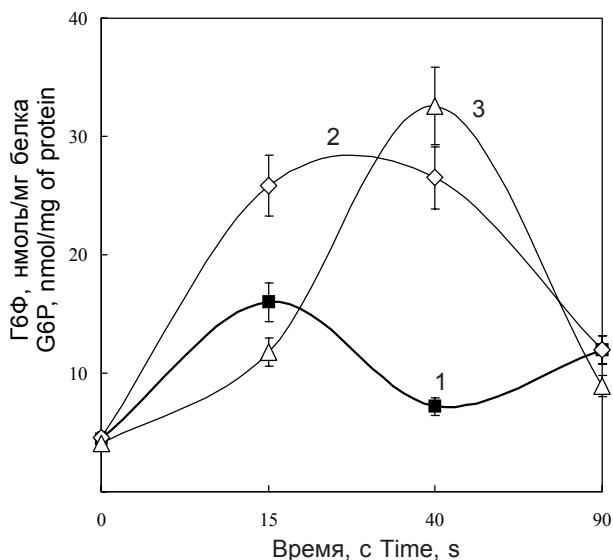


Рис. 1. Содержание Г6Ф в двигающихся сперматозоидах сазана до и после криоконсервирования: 1 – контроль; 2 – эквилибрация; 3 – оттаивание.

Fig. 1. G6P content in *Cyprinus carpio* L. moving spermatozoa prior to and following the cryopreservation: 1 – control; 2 – equilibration; 3 – thawing.

повышает более чем в 5 раз уровень Г6Ф через 15 с после начала движения, который не изменялся к 40-й, а к 90-й секунде понижался до его уровня в контроле.

Активация спермиев, подвергнутых замораживанию-оттаиванию, приводит к постепенному повышению Г6Ф и достигает максимума (32,6 нмоль/мг белка) к 40-й секунде инкубации. К 90-й секунде движения спермиев уровень Г6Ф понижается до 8,9 нмоль/мг белка.

Количество ПВ в активированных нативных спермиях (рис.2) находится на уровне 9,4 нмоль/мг белка, почти не изменяется к 15-й секунде движения, достоверно возрастает к 40-й секунде и сохраняется почти на том же уровне до конца инкубации сперматозоидов.

Предварительная эквилибрация спермиев с криозащитной средой повышает исходный уровень ПВ в 2 раза (20,9 нмоль/мг белка). Последующая активация этих спермиев вызывает увеличение его уровня, который через 15 с достигает максимума (49,0 нмоль/мг белка), понижаясь к концу инкубации до 12,9 нмоль/мг белка.

Активация замороженных-оттаянных спермиев не изменяет уровня ПВ в первые временные интервалы, исследованные нами, и только к 90-й секунде инкубации спермиев его количество достоверно понижается до 7,0 нмоль/мг белка.

Содержание лактата в нативных спермиях сазана (рис.3) составляет 65,6 нмоль/мг белка, а после их активации в результате работы гликолитического пути, его уровень уже через 15 с достигает максимума (286,5 нмоль/мг белка), постепенно

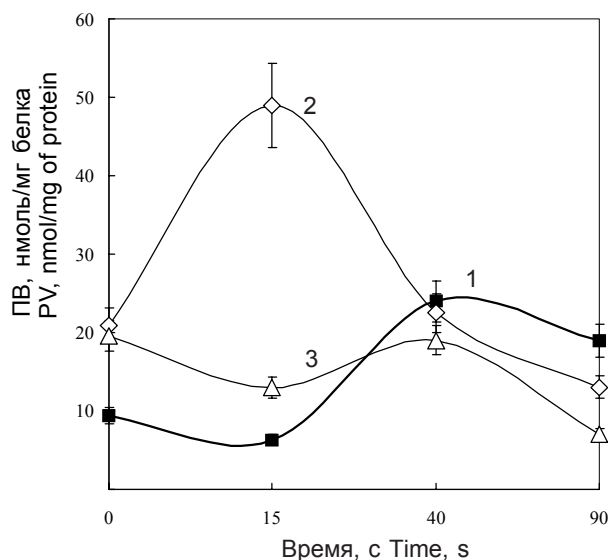


Рис. 2. Содержание ПВ в двигающихся сперматозоидах сазана до и после криоконсервирования: 1 – контроль; 2 – эквилибрация; 3 – оттаивание.

Fig. 2. PV content in moving spermatozoa of *Cyprinus carpio* L. prior to and following the cryopreservation: 1 – control; 2 – equilibration; 3 – thawing.

protein, it does not change practically by the 15th s of movement, significantly increases by the 40th s and remains at about the same level up to the end of spermatozoa incubation.

Preliminary spermatozoa equilibration with the cryoprotective medium increases twice the initial PV level (20.9 nmol/mg of protein). Further activation of these spermatozoa caused the increase of its level, that reaches its maximum by 15 s (49.0 nmol/mg of protein), by the end of the incubation decreasing down to 12.9 nmol/mg of protein.

Activation of frozen-thawed spermatozoa does not change the PV level at first time intervals studied by us, and only by the 90th s of spermatozoa incubation its amount significantly falls down to 7.0 nmol/mg of protein.

Lactate content in native *Cyprinus carpio* L. spermatozoa (Fig.3) makes 65.6 nmol/mg of protein, but following the activation of those as a result of the work of glycolytic way its level reaches the maximum even by 15 s (286.5 nmol/mg of protein) decreasing gradually by the end of incubation. Spermatozoa equilibration with the cryoprotective medium causes a two fold rise of lactate content. While moving of spermatozoa its accumulation occurs with the maximum by the 40th s and further decrease down to its initial level.

Lactate amount in sperm thawed has remained at practically the same level (about 140 nmol/mg of protein) within all the time intervals studied.

As Fig. 4 shows, following the activation of native *Cyprinus carpio* L. spermatozoa the ATP level by the 15th s increased more than twice (51.7 nmol/mg of

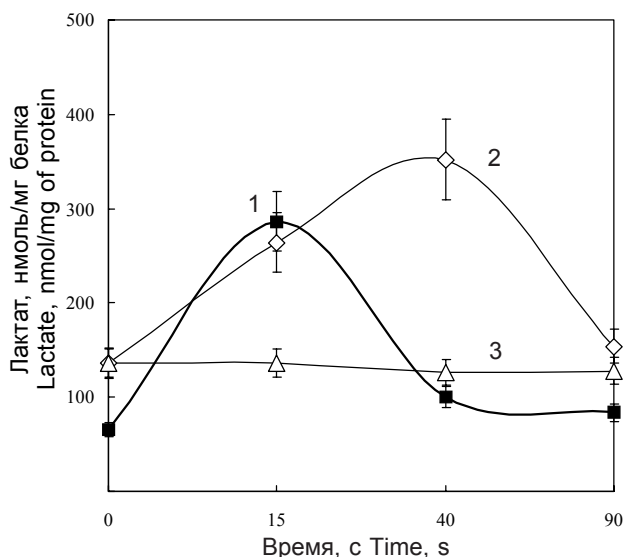


Рис. 3. Содержание лактата в двигающихся сперматозоидах сазана до и после криоконсервирования: 1 – контроль; 2 – эквilibрация; 3 – оттаивание.

Fig. 3. Lactate content in moving spermatozoa of *Cyprinus carpio* L. prior to and following the cryopreservation: 1 – control; 2 – equilibration; 3 – thawing.

снижаясь к окончанию инкубации. Эквilibрация спермиев с криозащитной средой приводит к повышению содержания лактата в 2 раза. В процессе движения этих спермиев происходит его накопление с максимумом к 40-й секунде и понижением до начального уровня в дальнейшем.

Количество лактата в оттаянной сперме находилось почти на одном уровне (около 140 нмоль/мг белка) во все изученные нами временные интервалы.

Из рис.4 видно, что после активации нативных спермиев сазана к 15-й секунде уровень АТФ увеличивается более чем в 2 раза (51,7 нмоль/мг белка). Дальнейшая инкубация сперматозоидов приводит к уменьшению количества АТФ и к 90-й секунде ее уровень снижается (11,7 нмоль/мг белка), что в 2 раза ниже исходного значения. Тридцатиминутная эквilibрация сперматозоидов в криозащитной среде повышает исходный уровень АТФ в сперме на 50% и через 15 с после активации его количество достигает максимума (42,4 нмоль/мг белка). К 40-й секунде активного движения количество АТФ в этих сперматозоидах уменьшается на 50% и к 90-й секунде достигает значения 16,9 нмоль/мг белка.

Замораживание-оттаивание сперматозоидов понижает послеэквilibрационный уровень АТФ в 2 раза, приближаясь к контролю. Дальнейшая динамика уровня АТФ аналогична предыдущей, но с более низкими значениями и с менее выраженным повышением через 15 с инкубации.

Динамика содержания КФ в нативной сперме (рис.5) после активации показала, что разница между исходным содержанием КФ и наблюдаемым через 15 с движения спермиев составляла

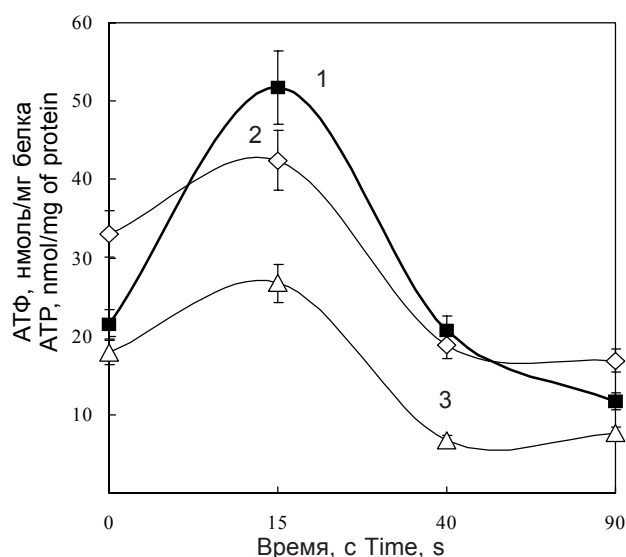


Рис. 4. Содержание АТФ в двигающихся сперматозоидах сазана до и после криоконсервирования: 1 – контроль; 2 – эквilibрация; 3 – оттаивание.

Fig. 4. ATP content in moving spermatozoa of *Cyprinus carpio* L. prior to and following the cryopreservation: 1 – control; 2 – equilibration; 3 – thawing.

protein). Further spermatozoa incubation results in the decrease of ATP amount and its level decreases by the 90th s (11.7 nmol/mg of protein) that is twice lower than the initial value. A 30 min spermatozoa equilibration in the cryoprotective medium increases the initial ATP level in sperm by 50% and in 15 s following the activation its amount reaches the maximum (42.4 nmol/mg of protein). By the 40th s of active movement the ATP amount in these spermatozoa decreases by 50% and reaches the value of 16.9 nmol/mg of protein by the 90th s.

The spermatozoa freeze-thawing decreases twice the ATP post-equilibration level approaching to the control. Further dynamics of the ATP level is analogous to the previous one but with lower values and less manifested rise in 15 s of the incubation.

The CP content dynamics in native sperm (Fig. 5) following the activation has shown that the difference between the initial CP content and the one observed by 15 s of spermatozoa movement made 1400% that testifies to the inclusion of strong mechanisms of energy accumulation like as CP essential for the spermatozoa movement. By 40 s of the movement start the CP amount decreased down to the initial level and did not change in later.

A 30-min spermatozoa equilibration with a cryoprotective medium increases by 30% the CP amount in sperm, and by 1 s following the activation its content rises by 500% and remains at this level for 40 s and by the 90th s of active movement the CP amount in these spermatozoa decreases down to the initial level.

Freeze-thawing of spermatozoa reduces twice the

1400%, что свидетельствует о включении мощных механизмов накопления энергии в виде КФ, необходимой для движения сперматозоидов. Через 40 с после начала движения количество КФ снижалось до исходного уровня и не изменялось в дальнейшем.

Тридцатиминутная эквilibрация сперматозоидов в криозащитной среде повышает количество КФ в сперме на 30%, а через 1 с после активации его содержание повышается на 500% и продолжает оставаться на том же уровне 40 с и к 90-й секунде активного движения в этих сперматозоидах количество КФ снижается до исходного уровня.

Замораживание-оттаивание сперматозоидов понижает исходный уровень КФ в 2 раза по сравнению с предыдущим вариантом опыта. Активация сперматозоидов повышает содержание КФ ко 2-й секунде движения и уже к 40-й секунде его количество снижается до нуля.

Полученные нами результаты показывают, что в первые секунды после активации спермиев включается гликолитический путь обмена углеводов, основным исходным субстратом которого является глюкоза, о чем свидетельствует накопление Г6Ф и лактата. Через 15 с после активации нативных спермиев повышается уровень лактата до 200 нмоль/мг белка, при образовании которого в гликолизе должно быть произведено около 200 нмоль/мг белка АТФ, но мы наблюдали накопление только 30 нмоль/мг белка АТФ и около 100 нмоль/мг белка КФ. Следовательно, остальная часть произведенной энергии, запасаемой в виде макроэргических фосфатных связей, была израсходована на движение сперматозоидов и на другие метаболические процессы.

В нативной сперме, как уже было сказано, к 15-й секунде происходит накопление Г6Ф, лактата, КФ и АТФ, а к 40-й секунде – быстрое уменьшение количества этих интермедиатов до уровня контроля, что, безусловно, связано с затратой энергии этих веществ на движение спермиев.

После инкубации спермы с криозащитной средой динамика содержания метаболитов меняется. Повышается исходный уровень всех измеренных метаболитов, кроме Г6Ф. Увеличивается количество макроэргических фосфатов (АТФ и КФ), т.е. происходит как бы “подзарядка” энергетической системы спермиев либо вследствие нарушения процесса расходования энергии на внутренние метаболические нужды спермиев из-за ингибирующего действия криопротекторов на ферментные системы, либо в результате добавки вместе со средой экзогенных субстратов, используемых на энергетические нужды, либо других причин. Активация спермиев, обработанных

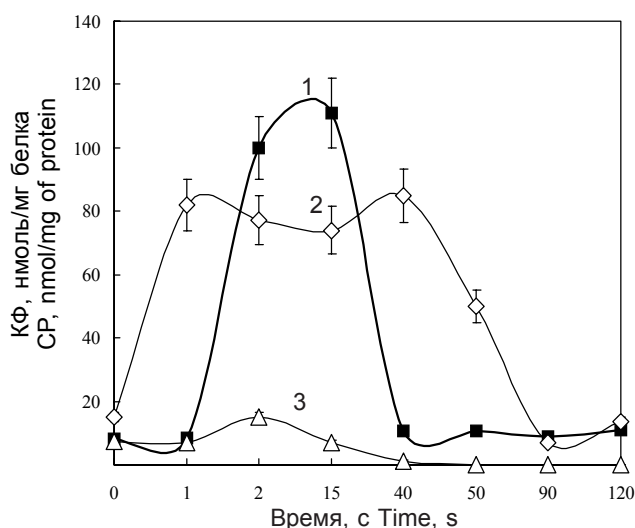


Рис. 5. Содержание КФ в двигающихся сперматозоидах сазана до и после криоконсервирования: 1 – контроль; 2 – эквilibрация; 3 – оттаивание.

Fig. 5. CP content in moving spermatozoa of *Cyprinus carpio* L. prior to and following the cryopreservation: 1 – control; 2 – equilibration; 3 – thawing.

initial CP level comparing to the previous variant of the experiment. Spermatozoa activation increases the CP content by the 2nd s of movement and by the 40th s its amount falls even down to zero.

The results obtained testify that within first seconds following the spermatozoa activation the glycolytic way of carbohydrates metabolism, the basic primary substrate of which is glucose, is switched on, that approved by G6P and lactate accumulation.

In 15 s following the native spermatozoa activation the lactate level rises up to 200 nmol/mg of protein, during the production of which in glycolysis produced should be 200 nmol/mg of protein of ATP, but we observed the accumulation of only 30 nmol/mg of ATP protein and about 100 nmol/mg of CP protein.

Consequently the rest of the energy produced which is stocked as macroergic phosphate links was spent to spermatozoa movement and other metabolic processes.

As it was shown in native sperm the accumulation of G6P, lactate, CP and ATP occurred by the 15th s, and by the 40th s a rapid reduction of these intermediates' number down to the control level happened, that was undoubtedly related to the energy expenditures of these substances for the spermatozoa movement.

Following the sperm incubation with a cryo-protective medium the dynamics of the metabolites content changes. The initial level of all the metabolites measured but G6P, increases. Also rises the number of macroergic phosphates (ATP and CP), i.e. occurs so-called “charging” of the spermatozoa energetic system either as a result of the failure of the process of energy expenditure for inner metabolic spermatozoa

криозащитной средой, приводила к повышению количества всех метаболитов уже к 15-й секунде движения, а уровень Г6Ф и КФ не изменялся к 40-й секунде, а лактата даже возрастал. Возможно, использование этих интермедиатов замедляется этиленгликолем [5] и только после 40 с инкубации их количество понижается до исходного уровня.

Описывая обмен глюкозы, фруктозы, ацетата, лактата и пирувата в сперме животных, Murdoch R.N. и White J.G. [8, 9] отмечают, что добавлением в среду инкубации сперматозоидов ингибиторов цикла Кребса, окислительного фосфорилирования и гликолиза удается установить вклад гликолитического расщепления глюкозы в аккумуляцию энергии в виде АТФ. Они показали, что для спермы быка, кролика, собаки и крысы основная часть энергии, получаемая клеткой в процессе движения, производится в гликолитическом пути. По данным [9], в сперме кролика 72% глюкозы превращается в лактат, 6% полностью окисляется в CO_2 и H_2O и 22%, вероятно, в другие метаболиты без образования АТФ. В одиночном опыте в анаэробных условиях 81% глюкозы превращается в лактат и 19% метаболизируется в других реакциях, в то время как в аэробных условиях 70% глюкозы превращается в лактат, 7% окисляется до CO_2 и 19% метаболизируется в других реакциях. Эти же авторы сообщают, что аэробный гликолиз свежих сперматозоидов с глюкозой, меченой в положении ^1C и ^6C , дает отношение ^1C и ^6C в CO_2 , близкое к единице, это показывает, что пентозофосфатный путь окисления глюкозы вносит малый вклад в потребление глюкозы спермиями в этих условиях. Авторы рассчитали, что в митохондриях происходит образование 63% АТФ при доле глюкозы, превращаемой в лактат 90% от всей окисленной глюкозы. В сперме быка по данным [8], 66% глюкозы превращается в лактат, 16% полностью окисляется до CO_2 и 18% в других реакциях без образования АТФ (для эпидидимальных сперматозоидов быка – 63, 18 и 19% соответственно). Спермии быка имеют несколько больший выход АТФ от митохондриального окисления 82 и 18% АТФ из катаболизма до лактата. Количество глюкозы, превращаемой аэробно в лактат, равняется 77% от такового при анаэробнозе. Аэробное образование лактата отмечено также для фруктолиза в сперме хряка, барана и человека. Для спермиев человека в эксперименте было получено больше лактата, чем могло бы быть рассчитано, исходя из утилизации глюкозы. На сперме форели установлено, что инкубация в анаэробных условиях приводит к накоплению лактата, но значительно меньше, чем в сперме млекопитающих.

Фосфолипиды, которые используются в значи-

needs, because of the cryoprotectant inhibiting effect on the enzyme systems, or due to adding together with the medium the exogenous substrates used for the energetic needs, or because of other reasons.

Activation of the spermatozoa, treated by a cryoprotective medium resulted in a rise of the amount of all metabolites even by the 15th s of movement, and the levels of G6P, lactate and CP did not change by the 40th s and even increased (for lactate). The use of these intermediates is probably delayed by ethylene glycol [5] and only after the 40th s of the incubation the number of those decreases down to the initial level.

Describing the glucose, fructose, acetate, lactate and pyruvate metabolism in an animal sperm, Murdoch R.N. and White J.G. [8,9] have noted that by adding into an incubation medium of spermatozoa of the inhibitors of Krebs cycle, of oxidative phosphorylation and glycolysis they succeeded in revealing the contribution of the glucose glycolytic splitting in an energy accumulation as ATP. The authors demonstrated that for a bovine, rabbit, dog and rat sperm the major part of energy received by a cell during movement, is produced in a glycolytic way. According to the data [9] 72% of glucose in a rabbit's sperm transforms into lactate, 6% is completely oxidized in CO_2 and H_2O and 22%, are obviously transformed into other metabolites without the ATP formation. In a single experiment under anaerobic conditions 81% of glucose transforms into lactate and 19% metabolizes during other reactions, while under aerobic conditions 70% of glucose is transformed in lactate, 7% is oxidized to CO_2 and 19% are metabolized during other reactions. These authors report that aerobic glycolysis of fresh spermatozoa with glucose labeled in the ^1C and ^6C position, gives the ratio of ^1C and ^6C into CO_2 close to 1, that testifies that pentose phosphate way of glucose oxidation slightly contributes to the glucose consumption by spermatozoa under these conditions. The authors calculated that in mitochondria the formation of 63% ATP occurs at 90% share of glucose being transformed into lactate of the whole glucose oxidized. In a bovine sperm according to the data [8] 66% of glucose transforms into lactate, 16% is oxidized completely to CO_2 and 18% is transformed during an other reaction with no ATP production (for epididymal bovine spermatozoa the numbers made 63, 18 and 19%). Bovine spermatozoa have a higher ATP yield from mitochondrial oxidation 82 and 18% ATP from catabolism to lactate. The amount of aerobically transformed into lactate glucose is 77% of that at anaerobiosis. Aerobic lactate formation is also noted for fructolysis in boar, ram and human sperm. For human spermatozoa in an experiment there was obtained a higher amount of lactate we could calculated proceeding from the glucose utilization. Using a trout sperm it was established that the incubation under

тельных количествах, возможно, являются важным энергетическим субстратом в спермиях рыб [3, 10]. Низкий уровень гликолитических субстратов в сперме рыб по сравнению со спермой млекопитающих может объясняться тем, что сперматозоиды рыб, находящиеся в молоках в неподвижном состоянии, после активации двигаются (во внешней среде в сильно разбавленном состоянии) секунды и в редких случаях минуты, а сперматозоиды млекопитающих и особенно птиц – часы и даже сутки, находясь в семенной жидкости эякулята.

Выводы

Обнаруженное значительное накопление КФ на стадии активации сперматозоидов сазана вместе с известными данными об относительно небольшом времени двигательной активности свидетельствует о том, что энергетический обмен этих клеток организован так, чтобы, используя все возможности гликолиза и митохондриального окисления, создать в кратчайшее время большой пул макроэргических соединений. Адресное энергоснабжение именно двигательной активности достигается креатинкиназной системой, локализованной в митохондриях и в хвостовой части спермиев, подобно миокардиоцитам млекопитающих.

Сперматозоиды, вероятно, принадлежат к такому типу клеток, в которых гликолиз организован так, чтобы давать максимальный поток энергии, а не максимальную эффективность.

Литература

1. Асатиани В.С. Ферментные методы анализа.– М.: Наука, 1969.– 836 с.
2. Бейли Н. Статистические методы в биологии. – М.: Мир, 1964.– 271 с.
3. Герасимова Т.Д. Показатели энергетического обмена в зрелых половых продуктах и в теле развивающихся зародышей чешуйчатого карпа // Тез. докл. Всесоюз. конф. по экологической физиологии рыб.– М., 1973.– С. 97- 98.
4. Копейка Е.Ф. Инструкция по низкотемпературной консервации спермы карпа.– М.: Изд-во ВНИИПРХ, 1986.– 9 с.
5. Очкур С.И. Влияние факторов криоконсервирования на энергетику спермиев петухов: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 1989.– 175 с.
6. Черепанов В. В., Копейка Е. Ф. Криоустойчивость спермиев сазана, выделенных из различных участков молок // Пробл. криобиологии.– 2000.– №3.– С. 59-63
7. Miller G.L. Protein determination for large number of samples// Anal. Chem.– 1959.– Vol. 31, N 5. – P. 964- 966.
8. Murdoch R.N., White J.G. The metabolism of glucose, fructose, acetate, lactate and pyruvate by ram, bull, dog and rabbit spermatozoa // J.Reprod.Fert.– 1966.– N 12.– P. 271- 278.
9. Murdoch R.N., White J.G. The metabolism of labelled glucose by rabbit spermatozoa after incubation in vitro // J.Reprod. Fertil.– 1967.– N 14.– P. 213 - 216.
10. Nissen H.R., Kreysel H.W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility // Andrologia.– 1983.– Vol.15, N 3.– P. 264-269.

Поступила 20.01.2003

anaerobic conditions resulted in lactate accumulation, but the extent was significantly lower if compared to mammal sperm.

Phospholipids used in large amounts are known to be an important energetic substrate in fish spermatozoa [3, 10]. Low level of glycolytic substrates in a fish sperm comparing to the one of mammals may be explained by the fact that fish spermatozoa, being in milt in an immobile state, move during the seconds after following the activation (in an external medium in a diluted state), rarely during the minutes, and mammal spermatozoa, especially of birds are move for hours and even days, being in a semen liquid of ejaculate.

Conclusions

Revealed significant CP accumulation at the stage of spermatozoa activation in *Cyprinus carpio* L. together with the existing data on a relatively slight moving activity testifies to the fact that the energy metabolism of these cells is organized to create in the shortest time a large pool of macroergic compounds using all the possibilities of glycolysis and mitochondrial oxidation.

Direct energy supply namely of a moving activity is achieved by a creatin-kinase system localized in mitochondria and in a tale part of spermatozoa, the same as for myocardiocytes in mammals.

Spermatozoa are thought to belong to such a cell type where glycolysis is organized to provide the maximum energy flow, but not the maximum efficacy.

References

1. Asatiani V.S. Enzyme methods of analysis.– Moscow: Nauka, 1969.– 836 p.
2. Beily N. Statistical methods in biology.– Moscow: Mir, 1964.– 271 p.
3. Gerasimova T.D. Energy metabolism indices in mature sex products and in the body of carp embryos in development // Abstracts of the reports of the All-Union Conference for ecological physiology of fish.– Moscow, 1973.– P. 97-98.
4. Kopeika E.F. Instructions on carp sperm low-temperature preservation.– Moscow: Publ. House of VNIIPRKh, 1986.– 9 p.
5. Ochkur S.I. Effect of cryopreservation factors on fowl spermatozoa energetics: Thesis of the candidate of Biol. Sci.– Kharkov, 1989.– 175 p.
6. Cherepanov V.V., Kopeika E.F. Cryostability of *Cyprinus carpio* L. spermatozoa derived from different parts of milt // Problems of Cryobiology.– 2000.– N3.– P. 59-63.
7. Miller G.L. Protein determination for large number of samples// Anal. Chem.– 1959.– Vol. 31, N 5. – P. 964- 966.
8. Murdoch R.N., White J.G. The metabolism of glucose, fructose, acetate, lactate and pyruvate by ram, bull, dog and rabbit spermatozoa // J.Reprod.Fert.– 1966.– N 12.– P. 271-278.
9. Murdoch R.N., White J.G. The metabolism of labelled glucose by rabbit spermatozoa after incubation in vitro // J.Reprod. Fertil.– 1967.– N 14.– P. 213 - 216.
10. Nissen H.R., Kreysel H.W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility // Andrologia.– 1983.– Vol.15, N 3.– P. 264-269.

Accepted in 20.01.2003