

## Производные гетерозидов – эффективные добавки к криозащитным средам

В.И. КАБАЧНЫЙ, Н.И. ГОРБУНОВА

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

## Heterozide Derivatives as Effective Additives to Cryoprotective Media

V.I. KABACHNY, N.I. GORBUNOVA

National Pharmaceutical University, Kharkov

Исследовали влияние производных гетерозидов на активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), малатдегидрогеназы (МДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и динамику синтеза и потребления фруктозы в сперматозоидах быка в условиях нормо-, гипотермии и криоконсервирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что криопротекторный эффект гетерозидов обусловлен активацией энергопродуцирующих ферментов. Кроме того, гетерозиды обладают способностью восстанавливать активность ферментов, поврежденных при охлаждении.

**Ключевые слова:** гетерозиды, метилксантины, сперматозоиды, сукцинат-, малат-, лактат- дегидрогеназы, фруктоза, гипотермия, криоконсервирование.

Дослідили вплив похідних гетерозидів на активність сукцинатдегідрогенази, малатдегідрогенази, лактатдегідрогенази та динаміку синтезу і споживання фруктози в сперматозоїдах бугая за умов нормо-, гіпотермії та криоконсервування. Одержані дані свідчать про те, що криопротекторний ефект гетерозидів обумовлений активацією енергозабезпечуючих ферментів. Крім того, гетерозиди мають здатність відновлювати активність ферментів, ушкоджених при охолодженні.

**Ключові слова:** гетерозиди, метилксантини, сперматозоїди, сукцинат-, малат-, лактатдегідрогенази, фруктоза, гіпотермія, криоконсервування.

We have investigated the effect of heteroside derivatives on succinate dehydrogenase (SDG), malate dehydrogenase (MDG), lactate dehydrogenase (LDG) activity and dynamics of fructose synthesis and uptake in bovine spermatozoa under normo-, hypothermia and cryopreservation conditions. The data obtained testify to the fact, that heteroside cryoprotective effect is stipulated by the activation of energy-producing enzymes. In addition, heterosides recover the activity of enzymes, damaged during cooling.

**Key-words:** heterosides, methylxanthines, spermatozoa, succinate-, malate- and lactate dehydrogenase, fructose, hypothermia, cryopreservation.

Создание банков спермы человека и животных является повседневной практикой в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии. Вместе с тем современные технологии консервирования далеки от совершенства, поскольку позволяют сохранить оплодотворяющую способность деконсервированных сперматозоидов на уровне 30-70%, что связано с повреждением клеток. Существует мнение, что уже на этапе разбавления спермы и инкубации с криопротектором происходит ингибирование жизненно важных метаболических процессов в клетке [16], что требует дополнительной обработки деконсервированного биообъекта для восстановления его функциональных показателей. В связи с этим оптимизация процесса криоконсервирования не утратила своей актуальности.

С нашей точки зрения, наименее изученным, но наиболее перспективным направлением при разработке криозащитных сред является поиск биологически активных веществ (БАВ), обеспечивающих полноценное функциональное состояние клетки после отогрева. Об использовании БАВ как добавки к криозащитным средам известно несколько десятилетий, однако алгоритм их

The establishing of banks for human and animal sperm is a routine practice in medicine, agriculture and biotechnology. However the current cryopreservation technologies are hardly perfect, since they allow to preserve frozen-thawed spermatozoa fertility at the level of 30-70%, that is related to cell damaging. The inhibition of vitally important metabolic processes in a cell is considered to occur even at the stage of sperm dilution and incubation with a cryoprotectant [16], that requires an additional treatment of frozen-thawed bioobject for recovering its functional indices. In this connection the optimisation of cryopreservation process has still remained actual.

From our point of view one of the most perspective ways when developing the cryoprotective media is the search for biologically active substances (BAS), providing an integral functional state of cell after thawing. The BAS usage has been known for decades as an additive to cryoprotective media, however the algorithm for their application is practically absent due to the specificity of biological material spices, different nature of BAS and a system-free character of investigations. In this respect a great attention is paid to antioxidants and biological membrane stabilisers

**Адрес для корреспонденции:** Кабачный В.И., Национальный фармацевтический университет, ул. Блюхера, 4, г. Харьков, Украина 61002; тел.:+38 (0572) 67-98-38, e-mail: kabachny@ukrfa.ua

**Address for correspondence:** Kabachny V.I., National Pharmaceutical University, 4, Blukhera str., Kharkov, Ukraine 61002; tel.:+38 (0572) 679838, e-mail: kabachny@ukrfa.ua

применения практически отсутствует ввиду видоспецифичности биологического материала и разной природы БАВ, а исследования носят бессистемный характер. Больше внимание в этом отношении уделяется антиоксидантам и стабилизаторам биологических мембран (витамин Е, глутатион восстановленный, сывороточный альбумин и др.), усиливающим устойчивость клетки к эндо- и экзогенным факторам физико-химического воздействия [9-11], в то время как направленный поиск БАВ, повышающих способность клетки к самовосстановлению, не проводится из-за отсутствия соответствующего теоретического базиса.

В связи с этим разработка теоретических основ направленного поиска БАВ, криопротекторное действие которых обеспечивается влиянием на защитно-восстановительные системы клетки, является перспективным подходом к созданию криозащитных сред.

Объектом исследования были выбраны производные гетерозидов, проявляющие криопротекторный эффект [2].

Цель исследования – изучение влияния исследуемых веществ на активность ферментов цикла Кребса (СДГ и МДГ), гликолиза (ЛДГ) и динамику синтеза и потребления фруктозы в сперматозоидах быка в условиях нормо-, гипотермии и криоконсервирования.

### Материалы и методы

Исследования проводили на сперме быка. Эякулят одного животного (количество образцов  $n=7$ ) разбавляли стандартной глюкозо-цитратно-желточной средой, содержащей 5%-й глицерин как криопротектор. Концентрация сперматозоидов составляла 20 млн клеток/мл суспензии. Исследуемые образцы охлаждали до  $4^{\circ}\text{C}$  и хранили при этой температуре в течение 3 ч, после чего замораживали по известной технологии [8]. Подвижность нативных и деконсервированных сперматозоидов определяли как отношение прямолинейно и поступательно движущихся клеток к общему их количеству и выражали в процентах. Исследование подвижности оценивали микроскопически (“Axiovert”, Германия) при увеличении  $\times 400$ .

В качестве сравниваемых веществ были выбраны пентоксифиллин (ПФ) в концентрации  $3,5 \times 10^{-3}$  моль/л и кофеин (КФ) –  $6,0 \times 10^{-3}$  моль/л, являющиеся стимуляторами гликолиза [4]. Метилксантины и исследуемые  $10^{-8}$  моль/л 7-метил-N-малеогетерозид (K321) и  $10^{-7}$  моль/л N-малеогетерозид (K322) добавляли в суспензию отогретых клеток, хранившихся в условиях 3-часовой гипотермии, и деконсервированных клеток, после чего инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в

(vitamin E, recovered glutathione, serum albumin etc.), strengthening a cell resistance to endo- and exogenous factors of physical and chemical effects [9-11], whereas a targeted search for BAS, increasing a cell capability to recovery itself, is not carried-out because of the absence of proper theoretical base.

In this connection the development of theoretical bases for BAS targeted search, which cryoprotective effect is provided by the effect on protective and recovery cell systems, is a perspective approach to creation of cryoprotective media.

As the investigation object we have selected heteroside derivatives, manifesting a cryoprotective effect [2].

The investigation aim was to study the effect of studied substances on the Krebs' cycle enzyme activity of SDG, MDG, LDG glycolysis and fructose synthesis and consumption dynamics in bovine spermatozoa under normo-, hypothermia and cryopreservation conditions.

### Materials and methods

The investigations were carried-out in bovine sperm. The ejaculate of one animal (number of samples,  $n=7$ ) was diluted with a standard glucose-citrate-yolk medium, containing 5% glycerol as a cryoprotectant. The spermatozoa concentration made 20 million cells/ml of suspension. The studied samples were cooled down to  $4^{\circ}\text{C}$  and stored under this temperature for 3 hrs, then cryopreserved according to the technology [8]. The motility of native and frozen-thawed spermatozoa was determined as the ratio of cells with rectilinear and translational movement to their total number and shown in percentage. The motility was evaluated with the microscope (“Axiovert”, Germany) with  $\times 400$  magnification.

Pentoxifylline (PF) in  $3.5 \times 10^{-3}$  mol/l and caffeine (CF) in  $6.0 \times 10^{-3}$  mol/l concentrations as glycolysis stimulators were selected to compare the substances [4]. Methylxanthines and studied  $10^{-8}$  mol/l 7-methyl-N-maleoheteroside (K321) and  $10^{-7}$  mol/l N-maleoheteroside (K322) were added into the suspension of warmed cells, stored under 3 hrs hypothermia conditions, and frozen-thawed cells, then incubated under  $37^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The control samples did not contain the studied substances. Spermatozoa were isolated using the method of differential centrifuging, washed and resuspended in Tyrode's medium (pH 7.2). Mitochondria were isolated using the method of differential centrifuging [1]. The activity of SDG [7], MDG [5] in mitochondria, LDG [6] in spermatozoa was measured with a calorimetric method. Fructose content in spermatozoa suspension was estimated according to the paper [4], and by the standard “Agat” sets (Russia) for protein in the samples. The activity of all studied enzymes and fructose content were

течение 30 мин. Контрольные образцы не содержали исследуемых веществ. Сперматозоиды выделяли методом дифференциального центрифугирования, отмывали и ресуспендировали в буфере Тироде (рН 7,2). Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования [1]. Активность СДГ [7], МДГ [5] в митохондриях, ЛДГ [6] в сперматозоидах измеряли по калориметрическому методу. Содержание фруктозы в суспензии сперматозоидов оценивали по [4], белок в образцах – по стандартным наборам “Агат” (Россия). Активность всех исследуемых ферментов и содержание фруктозы определяли до и после гипотермии и криоконсервирования. Статистическую обработку результатов проводили по методу Фишера.

### Результаты и обсуждение

Известно, что процессы энергообеспечения являются основой любых биохимических реакций в клетке. В связи с этим на начальном этапе эксперимента была исследована активность СДГ, МДГ и ЛДГ (табл. 1). Сопоставление активностей исследуемых ферментов указывает на то, что в условиях *in vitro* в сперматозоидах быка выработка энергии осуществляется преимущественно аэробным путем, о чем свидетельствует значительное (в 1000 раз) превалирование активности СДГ и МДГ над ЛДГ, что согласуется с исследованиями [12], в которых изучалась активность ферментов гликолиза.

Для установления влияния охлаждения на энергопродуцирующие ферменты в сперматозоидах были определены активность СДГ, МДГ, ЛДГ и содержание фруктозы в образцах, отогретых после 3-часовой гипотермии. Результаты, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что гипотермия инактивирует СДГ на 87,2, МДГ – на 82,7 и ЛДГ – на 63,5%, а содержание фруктозы снизилось на 74,2% по отношению к исходному. Сравнение степени гипотермической инактивации исследуемых ферментных систем согласуется с предположением, что охлаждение в большей мере влияет на состояние митохондриальных ферментов по сравнению с цитозольными [13].

Еще большее снижение активности отмечается после проведения цикла замораживания-оттаивания. На примере СДГ установлено, что активность фермента после криоконсервации снизилась на 88,7% (0,61±0,04 ммоль/ мг белка×мин в деконсервированных сперматозоидах против 5,39±1,19 ммоль/мг белка×мин в нативном контроле). Сопоставление степени инактивации фермента после гипотермии и криоконсер-

determined before and after hypothermia and cryopreservation. Statistical processing of the results was performed using the Fisher’s method.

### Results and discussion

The energy supply processes are known to be the base for any biochemical reactions in a cell. In this connection at an initial stage of the experiment we have studied the SDG, MDG and LDG activity (Table 1). The comparison of studied enzyme activities points to the fact, that in bovine spermatozoa under *in vitro* conditions the energy production is mostly realised via aerobic way, that is testified by a considerable (in 1000 times) prevalence of SDG and MDG activity over LDG, that correlates with the investigations [12], where one studied the glycolysis enzyme activity.

In order to reveal the cooling effect on energy-producing enzymes in spermatozoa there were determined SDG, MDG, LDG activity and fructose content in the samples, thawed after 3hrs’ hypothermia. The results, shown in the Table 1 testify to the fact, that hypothermia inactivates SDG by 87.2, MDG by 82.7 and LDG by 63.5%, but fructose content decreased by 74.2% in respect of the initial one. The comparison of hypothermic inactivation degree of studied enzyme systems correlates with the supposition about the fact, that cooling affects in a greater extent the state of mitochondrial enzymes in comparison with cytosol ones [13].

Bigger activity decrease is observed after freeze-thawing cycle performing.

With SGD example it was established that the enzyme activity after cryopreservation decreased by 88.7% (0.61±0.04 mM/mg of protein per min in frozen-thawed spermatozoa vs 5.39±1.19 mM/mg of protein per min in the native control). The comparison of the enzyme inactivation degree after hypothermia and cryopreservation (87.2 and 88.7%) points to the fact, that a part of a cryogenic (irreversible) enzyme destruction is insignificant and makes about 1.5%.

**Таблица 1.** Влияние охлаждения до 4°C на активность СДГ, МДГ, ЛДГ и содержание фруктозы в сперматозоидах быка

**Table 1.** Effect of cooling down to 4°C on activity of SDG, MDG, LDG and fructose content in bovine spermatozoa

Активность Activity	СДГ SDG	МДГ MDG	ЛДГ LDG	Содержание фруктозы, ммоль/л Fructose content, mmol/l
	ммоль/г белка×мин mmol per g of protein per minute			
Начальная Primary	5,39±1,19	7,65±1,44	0,34±0,44	14,71±2,02
После охлаждения до 4°C After cooling down to 4°C	0,69±0,26	1,32±0,50*	0,22±0,09*	3,80±0,91*

**Примечание:** \* – различия достоверны по отношению к контролю (p<0,01).

**Note:** \* – statistically significant differences comparing to the control (p<0.01).

вирования (87,2 и 88,7%) указывает на то, что доля криогенной (необратимой) деструкции фермента незначительна и составляет около 1,5%.

Таким образом, уже охлаждение до субнулевых температур приводит не только к термокинетическому (обратимому) снижению скорости ферментативных реакций, но и более глубокому, возможно необратимому ингибированию активности самих ферментов, развивающемуся энергодефициту и, вероятно, снижению скорости ведущих биохимических процессов, обеспечивающих нормальное функционирование клетки.

Из вышесказанного можно предположить, что БАВ, способные защитить или восстановить ферментативную активность, утраченную при охлаждении, должны, прежде всего, активировать энергообеспечивающие системы, которым отведена определяющая роль в жизнедеятельности клетки.

Для выяснения вопроса об обратимости процесса термической инактивации ферментов и возможных путей их восстановления суспензию сперматозоидов, хранившихся в условиях субнулевых температур, инкубировали с производными метилксантина и исследуемыми гетерозидами (табл.2). После инкубации клеток с ПФ, КФ, К321 и К322 наблюдалось значительное восстановление активности всех изучаемых ферментов. Наиболее выражено влияние веществ на СДГ и МДГ в сравнении с ЛДГ: активность ферментов возросла соответственно в 2,3; 2,8 и 1,2 раза в среде, содержащей ПФ, и в 3,4; 2,9 и 1,6 раза – в среде с КФ. Аналогичные результаты получены при воздействии производных гетерозидов (табл.2). После инкубации клеток с К321 и К322 активность СДГ увеличилась в 4,6 и 5,3 раза, МДГ – в 4,0 и 3,6 раза, ЛДГ – в 1,6 и 1,7 раза соответственно.

**Таблица 2.** Влияние производных метилксантина (ПФ и КФ) и гетерозидов (К321 и К322) на активность ЛДГ, СДГ и МДГ в сперматозоидах быка, хранившихся в условиях гипотермии

**Table 2.** Effect of methyl xantine derivatives (PF and KF) and heterosides (K321 and K322) on activity of LDG, SDG and MDG in bovine spermatozoa, stored under hypothermia conditions

Фермент, ммоль/мг белка×мин Enzyme, mmol per mg of protein per min	Контроль Control	ПФ PP	КФ KP	К321	К322
ЛДГ, 10 <sup>-3</sup> LDG, 10 <sup>-3</sup>	0,22±0,04	0,27±0,05*	0,34±0,02*	0,35±0,06*	0,38±0,08*
СДГ SDG	0,69±0,29	1,61±0,61	2,34±0,88	3,17±0,76	3,71±0,75
МДГ MDG	1,32±0,50	3,66±1,31	3,81±1,51	5,41±1,51	4,76±1,47

**Примечание:** \* – различия достоверны по отношению к контролю (p<0,05).

**Note:** \* – statistically significant differences comparing to the control (p<0.05).

Thus, even cooling down to subzero temperatures results not only in a thermokinetic (reversible) decrease in the enzyme reaction rate, but in deeper, possibly, irreversible activity inhibition of enzymes themselves, in a developing energy deficient, and, probably, a decrease in the leading biochemical process rate, providing normal cell functioning.

In view of the aforesaid the BAS, capable to protect or recover an enzyme activity, lost during cooling, can be assumed to have activate first of all the energy supply systems, which role is determinant in cell vital activity.

To elucidate the question about the reversibility of enzyme thermal inactivation process and possible ways for their recovery, the suspension of spermatozoa, stored under subzero conditions, was incubated with methylxanthine derivatives and the studied heterosides (Table 2). After cell incubation with PF, CF, K321 and K322 there was observed a considerable recovery in all studied enzymes activity. The substances effect on SDG and MDG in comparison with LDG was most manifested: the enzyme activity increased, correspondingly in 2.3; 2.8 and 1.2 times in the medium with PF, and in 3.4; 2.9 and 1.6 times in CF-medium. The similar results were obtained under the effect of heteroside derivatives (Table 2). After cell incubation with K321 and K322 the SDG activity increased in 4.6 and 5.3 times, in 4.0 and 3.6 times for MDG and in 1.6 and 1.7 times for LDG, correspondingly.

The Table 3 shows the study of substances effect on fructolysis in spermatozoa after hypothermic storage. Cell incubation with methylxanthines resulted in the augmentation of fructose content in respect of the control sample in 1.5 times, moreover the similar effect was observed for PF and CF. In 2 hrs of incubation the fructose content reduced by 0.1 mM in the control, and by 0.35 and 0.40 mMol in PF and CF-containing samples, correspondingly.

Under K321 and K322 effect the fructose content in cell suspension increased in 2.9 times. In this case as for methylxanthines the similar action of substances was observed. Following cell incubation during 2 hrs with K321 and R322 resulted in a decrease in fructose content by 0.79 and 0.71 mM, correspondingly. At the same time there were no statistically significant changes in fructose con-



Исследование влияния веществ на фруктолиз в сперматозоидах после гипотермического хранения представлено в табл. 3. Инкубация клеток с метилксантинами привела к повышению содержания фруктозы по отношению к контрольной пробе в 1,5 раза, причем для ПФ и КФ наблюдали одинаковый эффект. Через 2 ч инкубации содержание фруктозы в контроле уменьшилось на 0,1 ммоль, а в образцах, содержащих ПФ и КФ, – на 0,35 и 0,40 ммоль соответственно.

При воздействии К321 и К322 содержание фруктозы в суспензии клеток возросло в 2,9 раза. В этом случае, как и для метилксантинов, наблюдали одинаковое действие веществ. Дальнейшая инкубация клеток в течение 2 ч с К321 и К322 привела к снижению содержания фруктозы на 0,79 и 0,71 ммоль соответственно. При этом потребление фруктозы, как и в случае с метилксантинами, достоверно не изменилось (табл.3).

Разность между расщеплением фруктозы на первом и втором этапах инкубации, вероятно, отражает возрастание скорости утилизации фруктозы по отношению к ее накоплению. Причиной этого может быть повышение содержания фруктозы, являющейся индуктором ауторегуляторного процесса, ограничивающего ее накопление, или усиленное потребление энергии, расходуемой на восстановление обменных процессов в клетке после гипотермического хранения.

Сопоставляя порядок применяемых концентраций гетерозидов ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$  моль/л) и порядок повышения содержания фруктозы в суспензии сперматозоидов ( $10^{-3}$  моль/л), можно утверждать, что данные вещества не являются субстратами ферментов фруктолиза (как и других энергообеспечивающих ферментов), а скорее всего выполняют регуляторную функцию.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что все исследуемые вещества являются мощными активаторами энергопродуцирующих ферментов, причем действие гетерозидов более выражено, чем метилксантинов. Восстановление активности ферментов после гипотермии посредством БАВ подтверждает обратимость термической инактивации ферментов. Исходя из [3] и принимая во внимание полученные результаты, мы предположили, что определяющим звеном сохранности сперма-

**Таблица 3.** Динамика потребления фруктозы в суспензии сперматозоидов быка при воздействии производных метилксантина (ПФ и КФ) и гетерозидов (К321 и К322) после гипотермии

**Table 3.** Dynamics of fructose uptake in bovine spermatozoa suspension under the effect of methylxanthine derivatives (PF and KF) and heterosides (K321 and K322) after hypothermia

Показатель Index		Контроль Control	ПФ PP	КФ KF	К321	К322
Содержание фруктозы, ммоль/л	через 30 мин инкубации after 30 min incubation	3,80±0,91	5,55±1,01 <sup>2</sup>	5,77±0,87 <sup>2</sup>	10,83±1,81 <sup>2</sup>	11,01±2,15 <sup>1</sup>
Fructose content, mmol/l	через 2 ч инкубации after 2 hrs incubation	3,71±0,91	5,20±0,98 <sup>2</sup>	5,37±0,85 <sup>2</sup>	10,04±1,89 <sup>1</sup>	10,30±2,18 <sup>1</sup>
Фруктолиза, ммоль/л×2ч Fructolysis, mmol/l ×2hrs		0,10	0,35	0,40	0,79	0,71

**Примечание:** <sup>1</sup> – различия достоверны по отношению к контролю,  $p < 0,01$ ; <sup>2</sup> –  $p < 0,05$ .  
**Note:** <sup>1</sup> – statistically significant differences comparing to the control ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> –  $p < 0,05$ .

sumption as well as in case of methylxanthine (Table 3).

The difference between fructose disintegration at the first and second incubation stages probably reflects an increase in fructose utilisation rate in respect to its accumulation. The cause of that may be the augmentation of fructose content, being an inductor of autoregulatory process, limiting its accumulation or a strengthened consumption of energy, spent for metabolic processes recovery in a cell after hypothermic storage.

When comparing the order of applied heteroside concentrations ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$  mol/l) and that for the augmentation of fructose content in spermatozoa suspension ( $10^{-3}$  mol/l), these substances can be affirmed not to be the substrates of fructolysis enzymes (as well as other energy-supplying enzymes), and most likely they accomplish a regulatory function.

Thus, the results obtained testify to the fact that all studied substances are strong activators of energy-producing enzymes, moreover heteroside action is more manifested, than methylxanthine one. The recovery of enzyme activity after hypothermia using BAS confirms the reversibility of thermal inactivation of enzymes. Proceeding from the paper [3] and taking into consideration the results obtained we assumed that a determinant link of spermatozoa integrity under conditions of low temperature storage could be the energy supply to cells on the stage of preparation to cooling, that would allow to increase their resistance.

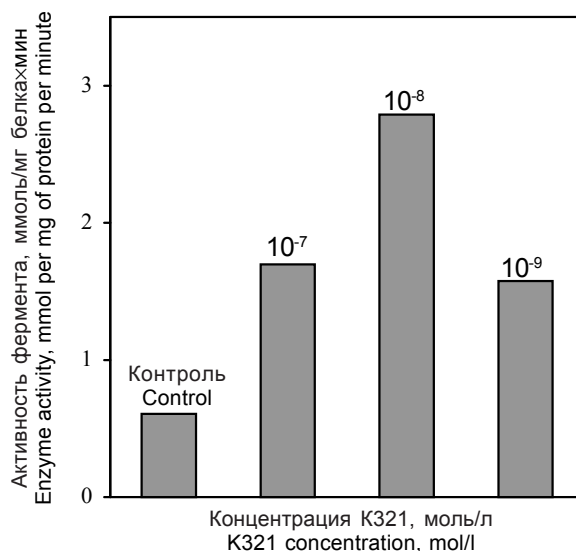
In this connection in order to find out cryoprotective properties of studied BAS there was performed a biological screening in the model of spermatozoa cryopreservation. The results of study of frozen-thawed cell motility testify to the fact, that in the sample with PF in a cryoprotective media the cell motility after

тозоидов в условиях низкотемпературного хранения может быть обеспечение клеток энергией на этапе подготовки к охлаждению, что позволит повысить их резистентность.

В связи с этим для обнаружения криопротекторных свойств исследуемых БАВ был проведен биологический скрининг на модели криоконсервирования сперматозоидов. Результаты исследования подвижности деконсервированных клеток свидетельствуют, что в образце, содержащем ПФ в криозащитной среде, подвижность клеток после отогрева понизилась на 28,8% ( $25,20 \pm 1,32$ ), тогда как К321 ( $47,3 \pm 2,15$ ) и К322 ( $51,2 \pm 2,43$ ) проявили криозащитное действие, сохранив подвижность на уровне, соответственно на 33,3 и 47,8% превышающем деконсервированный контроль ( $35,40 \pm 1,77$ ).

Так как ПФ не обладает криозащитным действием, что полностью согласуется с результатами работ [14, 15], исследования влияния вещества на ферментные системы энергообеспечения после криоконсервирования не проводили, а К321 с конечными концентрациями  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  и  $10^{-9}$  моль/л был добавлен в стандартную криозащитную среду, используемую для замораживания сперматозоидов. После отогрева в деконсервированных клетках зафиксирована сохранность активности СДГ, которая для указанных концентраций соответственно в 2,8; 4,6 и 2,6 раза была выше, чем в контрольном образце. При этом максимальный эффект наблюдался при оптимальной концентрации вещества  $10^{-8}$  моль/л (рисунок).

Аналогичная зависимость прослеживалась и после добавления веществ в суспензию деконсервированных клеток с последующей 30-минутной инкубацией при  $37^\circ\text{C}$  (табл. 4). Однако активность фермента после воздействия веществ была приблизительно в 1,4 раза ниже, чем в предыдущем опыте, что, вероятно, обусловлено участием крио-



Зависимость активности СДГ от концентрации К321, содержащегося в криозащитной среде.

Dependence of SDG activity vs. concentration of K321 in cryoprotective medium.

thawing reduced by 28.8% ( $25.20 \pm 1.32$ ), whereas K321 ( $47.3 \pm 2.15$ ) and K322 ( $51.2 \pm 2.43$ ) manifested a cryoprotective effect with keeping motility at the level, exceeding the frozen-thawed control ( $35.40 \pm 1.77$ ) by 33.6 and 44.6%, correspondingly.

As PF has no protective effect, that is completely correlated with the results of papers [14, 15], no investigation of substance effect on the enzyme systems for energy supply after freeze-thawing was performed, and K321 with  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  M/l final concentrations was added into the standard glucose-citrate cryoprotective medium, used for spermatozoa freezing. In frozen-thawed cells after thawing there was fixed the preservation of SDG activity, which was in 2.8; 4.6 and 2.6 times higher for the mentioned concentrations, correspondingly, than in the control sample. At the same

time the maximum effect was observed under optimal substance concentration of  $10^{-8}$  mol/l (Figure).

Similar dependency was also traced after substance addition into the frozen-thawed cell suspension with following 30-min incubation under  $37^\circ\text{C}$  (Table 4). However the enzyme activity after substance effect was approximately in 1.4 times lower, than in previous experiment, that is probably stipulated by the participation of cryodestructive factor in an irreversible (mechanical) enzyme inactivation.

**Таблица 4.** Восстановление активности СДГ в деконсервированных сперматозоидах после инкубации суспензии клеток с метилксантинами и гетерозидами

**Table 4.** Recovery of SDG activity in frozen-thawed spermatozoa after cell suspension incubation with methylxanthine and heterosides

Показатель Index	Контроль Control	КФ КР	К321	К322
Активность, ммоль/мг белка×мин Activity, mmol/mg of protein×min	0,61 ± 0,04	3,37 ± 0,17 <sup>1</sup>	1,88 ± 0,09 <sup>2</sup>	1,86 ± 0,10 <sup>2</sup>
Активация фермента (вн раз) Enzyme activation (n times)	—	5,5	3,2	3,0

**Примечание:** <sup>1</sup> – различия достоверны по отношению к контролю,  $p < 0,01$ ; <sup>2</sup> –  $p < 0,05$ .

**Note:** <sup>1</sup> – statistically significant differences comparing to the control ( $p < 0,05$ ); <sup>2</sup> –  $p < 0,05$ .

деструктивного фактора в необратимой (механической) инактивации фермента.

Таким образом, производные гетерозидов не только восстанавливают, но и сохраняют активность энергопродуцирующих ферментов в условиях криоконсервирования клеток, т.е. проявляют выраженный криозащитный эффект.

### Выводы

В условиях нормо-, гипотермии и криоконсервирования изучена динамика изменения активности СДГ, МДГ и ЛДГ и содержания фруктозы в сперматозоидах быка в присутствии БАВ, в результате чего экспериментально установлено и подтверждено следующее:

– охлаждение до субнулевых температур сопровождалось не только термокинетическим снижением скорости ферментативных процессов, но и более глубокими (частично необратимыми) изменениями ферментов;

– гипотермическая инактивация ферментов имела в значительной степени обратимый характер в присутствии БАВ;

– БАВ, способные восстанавливать активность энергопродуцирующих ферментов, повышали функциональную активность отогретых после гипотермии и криоконсервирования сперматозоидов;

– производные гетерозидов не являются субстратами ферментов, а выполняют регуляторную функцию.

Расширены теоретические основы направленного поиска БАВ, повышающих устойчивость клетки к воздействию охлаждения путем активации энергообеспечивающих ферментных систем. Производные гетерозидов, являющиеся активаторами энергетического метаболизма клетки, могут быть рекомендованы как добавки к криозащитным средам. Установлены оптимальные режимы их применения.

### Литература

1. *Биологические мембраны. Методы* / Под ред. Д. Финдлея, У. Эванза. – М.: Мир, 1990. – С. 27-28.
2. *Кабачний В.І., Горбунова Н.І., Лабужева Я.А.* Кризахиста та репаративна активність антиоксидантів // *Вісник фармації.* – 2001. – №3 (27). – С. 169.
3. *Кабачний В.І., Горбунова Н.І., Грицан Л.Д.* Влияние производных метилксантина на показатели, характеризующие фертилизационный потенциал деконсервированных сперматозоидов быка // *Материалы II Міжнародної науково-практичної конф. "Динаміка наукових досліджень – 2003".* – Дніпропетровськ, 2003. – Т.5. – С. 55-56.
4. *Луцко Н.А., Кучков И.Н.* Влияние кофеина и пентоксифиллина на гликолитическую функцию сперматозоидов человека, криоконсервированных в условиях сверхбыстрых скоростей охлаждения // *Пробл. криобиологии.* – 1999. – №4. – С. 8-13.

Thus, the heteroside derivatives not only recover but preserve the activity of energy-producing enzymes under conditions of cell cryopreservation, *i.e.* show a manifested cryoprotective effect.

### Conclusions

Thus, under normo-, hypothermia and cryopreservation there was studied the dynamics of activity change in SDG, MDG and LDG and fructose content in bovine spermatozoa at BAS presence, which experimentally revealed and confirmed as follows:

– cooling down to subzero temperatures was accompanied with not only thermokinetic decrease in the enzyme process rate, but deeper (partially irreversible) enzyme changes;

– hypothermic enzyme inactivation was reversible in a considerable extent at BAS presence;

– BAS, capable to recover the energy-producing enzyme activity, augmented a functional activity of frozen-thawed after hypothermia and cryopreservation spermatozoa;

– heteroside derivatives are not enzyme substrates, but realise a regulatory function.

There were extended the theoretical bases for targeted BAS search, increasing cell resistance to cooling effect by means of activation of energy-supplying enzyme systems. Heteroside derivatives, being the activators of cell energetic metabolism, may be recommended as the additives to cryoprotective media. There were established the optimal regimens for their application.

### References

1. *Biological membranes. Methods* / Edited by Findley D., Evans W. – Moscow: Mir, 1990. – P. 277-279.
2. *Kabachny V.I., Gorbunova N.I., Labuzova Ya.A.* Cryoprotective and reparative activity of antioxidants // *Visnyk farmatsii.* – 2001. – N3 (27). – P. 169.
3. *Kabachny V.I., Gorbunova N.I., Gritsan L.D.* Effect of methylxanthine derivatives on the indices, characterising fertilization potential of frozen-thawed bovine spermatozoa // *Proceedings of II International scientific practical conference "Dynamics of scientific investigations – 2003"* – Dnepropetrovsk, 2003. – Vol. 5. – P. 55-56.
4. *Luchko N.A., Kuchkov I.N.* Caffeine and pentoxifylline effect on glycolytic function of human spermatozoa cryopreserved under conditions of ultrarapid cooling rates // *Problems of cryobiology.* – 1999. – N4. – P. 8-13.
5. *Methodical instructions* on studying mineral metabolism in agricultural animals. – Borovsk, 1988. – 104 p.
6. *Moroz L.G., Shapiev I.Sh., Smirnova L.A.* Determination of total activity of lactate dehydrogenase in spermatozoa and semen plasm of different agricultural animals: *Methodical instructions on studying sperm physiology and biochemistry.* – Leningrad, 1974. – P. 4-12.
7. *Current methods in biochemistry* / Edited by Orekhovich V.N. – Moscow: Meditsina, 1977. – P. 46-47.
8. *Kharkov technology of aseptic procurement and cryopreservation of stud bulls' sperm: Methodical recommendations* / Edited by Ostashko F.I. – Kharkov, 1990. – 47 p.

5. *Методические указания* по изучению минерального обмена у сельскохозяйственных животных.- Боровск, 1988.- 104 с.
6. Мороз Л.Г., Шапиев И.Ш., Смирнова Л.А. Определение общей активности лактатдегидрогеназы в сперматозоидах и плазме семени различных сельскохозяйственных животных: Метод. указания по исследованию физиологии и биохимии спермы. – Л., 1974.– С. 4-12.
7. *Современные методы* в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича.– М.: Медицина, 1977.– С.46-47.
8. *Харьковская технология* асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: Метод. рекомендации / Под ред. Ф.И. Осташко.– Харьков, 1990.– 47 с.
9. *Пат. України №10894 А61Д19/02*. Середовище для розбавлення і заморожування сперми бугаїв / В.П. Буркат, Л.О. Бегма, А.А. Бегма, С.С. Ткачук, М.І. Іванченко. Заявлено 27.02.96. Опубл. 29.12.99. Бюл. №8.
10. Carrol J., Wood M.J., Whittinham D.G. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: protective action of certain macromolecules // Biol. Reprod.– 1993.– Vol. 48.– P. 606-612.
11. Dalvit G.C., Cetica P.D., Beconi M.T. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine sperm in vitro fertilization // Theriogenology.– 1988.– Vol. 49.– N3.– P. 619-627.
12. Gandhi K.K., Anand S.R. Regulation of glycolysis/fructolysis in buffalo spermatozoa // J. Reprod Fertil.– 1982.– Vol.64.– N1.– P. 145-150.
13. Guerin J.F., Menezo Y., Czyba J.C. Enzyme comparative study of spermatozoa and seminal plasma in normal and subfertile man // Arch. Androl.– 1979.– Vol.3.– N3.– P. 251-257.
14. Gradvil C.M., Ball B.A. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa // Theriogenology.–2000.– Vol.54.– N7.– P. 1041-1047.
15. Stanic P., Sonicki Z., Sustanek E. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa // Int. J. Androl.– 2002.– Vol.25.– N30.– P.118-190.
16. Tsekova E., Spasov Kh., Angelova M., Georgiev G.Kh. Effect of cryopreservation on the acrosomal enzyme activity of the spermatozoa of rams // Vet. Med. Nauki.– 1986.– Vol.23.– N1.– P. 73-76.

*Accepted in 19.12.2003.*

*Поступила 19.12.2003.*