

Процессы перекисного окисления липидов в активно-подвижной фракции спермиев человека, выделенной до и после криоконсервирования

UDC 615.38:611.013.12:612.592

V.V. PODUFALIY, I.V. CHERKASHINA, I.N. KUCHKOV*

Processes of Lipid Peroxidation in Active-Motile Fraction of Human Spermatozoa, Isolated Prior to and After Cryopreservation

Исследованы содержание малонового диальдегида, концентрация супероксиддисмутазы и общая антиокислительная активность в активно-подвижной фракции спермиев человека, выделенной до и после криоконсервирования. Показано, что процессы перекисного окисления липидов более интенсивны в образцах, выделенных из эякулятов после отогрева. Доказана неинформативность показателя подвижности для суждения об эффективности криоконсервирования активно-подвижной фракции спермиев.

Ключевые слова: активно-подвижная фракция спермиев, криоконсервирование, перекисное окисление липидов.

Досліджено вміст малонового діальдегіду, концентрація супероксиддисмутазу і загальна антиокислювальна активність в активно-рухливій фракції сперміїв людини, яка виділена до та після криоконсервування. Показано, що процеси перекисного окислення ліпідів найбільш інтенсивні в зразках, виділених із еякулятів після відігріву. Доведена неінформативність показника рухливості для судження про ефективність криоконсервування активно-рухливої фракції сперміїв.

Ключові слова: активно-рухлива фракція сперміїв, криоконсервування, перекисне окислення ліпідів.

The content of malone dialdehyde, superoxide dismutase concentration and general antioxidative activity in active-motile fraction of human spermatozoa isolated prior to and after cryopreservation has been studied. It has been shown that the lipid peroxidation processes are more intensive in the samples isolated from ejaculates after thawing. The non-informativity of motility index for statement about the cryopreservation efficiency of active-motile fraction of spermatozoa has been established.

Key-words: active-motile fraction of spermatozoa, cryopreservation, lipid peroxidation.

В настоящее время не вызывает сомнений, что процессы свободнорадикального окисления (СРО) чрезвычайно важны в регуляции нормального функционирования спермиев. Это связано с тем, что реакции СРО являются необходимым этапом различных метаболических процессов, причиной либо следствием патологических изменений в спермиях. Избыточное накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) приводит к деформации липопротеинового мембранного комплекса, повышению его проницаемости для протонов и воды, ингибированию активности мембрано-связанных ферментов, появлению трансмембранных дефектов, которые могут вызвать цитоллиз. Стимуляция ПОЛ может происходить под влиянием любого стрессорного агента, в частности холодогового [6].

Известно, что спермии человека не способны оплодотворить ооцит сразу после эякуляции, а приобретают такую способность в сложном процессе посттестикулярного созревания (капацитации) [4]. Гетерогенность эякулята по форменным элементам предполагает, что через некоторое время к

процессу оплодотворения готова только небольшая часть – активно-подвижная фракция (АПФ) спермиев [5]. Капацитация в эякулированных спермиях предотвращается по крайней мере одним из факторов семенной плазмы [17]. Известно, что длительная экспозиция в семенной плазме может ингибировать способность спермиев к акросомальной реакции *in vitro* [15] и снижать оплодотворяющую способность [9]. В женском репродуктивном тракте подвижные спермии самостоятельно отделяются от семенной плазмы, неподвижных сперматозоидов и дебриса путём активной миграции в цервикальную слизь, что приводит к отбору прогрессивно-подвижных спермиев и позволяет им капацитировать [5]. Из-за ингибирующего влияния семенной плазмы на функцию спермиев их целесообразно выделять из эякулята немедленно после разжижения для использования в процедурах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО, ICSI) или криоконсервирования [12].

Цель работы – сравнение эффективности выделения из эякулята активно-подвижной фракции

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
kuchkov@yahoo.com

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: kuchkov@yahoo.com

спермиев человека до и после криоконсервирования.

Задачи исследования:

1. Определить эффективность выделения АПФ спермиев из эякулята до или после низкотемпературного воздействия.

2. Исследовать интенсивность процессов ПОЛ в АПФ спермиев человека в зависимости от способа выделения.

Материалы и методы

Объектом исследования служили эякуляты человека при нормоспермии. Параметры спермограмм были получены при помощи автоматического анализатора спермы SQA-V (Израиль). Интенсивность процессов ПОЛ устанавливали по активности супероксиддисмутазы (СОД, КФ1.15.1.1), концентрации малонового диальдегида (МДА) и общей антиоксидантной активности.

Активность супероксиддисмутазы в эякуляте определяли по восстановлению красителя нитросинего тетразолия феназинметасульфатом и выражали в условных единицах, где за 1 у. е. принимали 50% ингибирования окислительно-восстановительной реакции [13].

Общую антиоксидантную активность определяли в модельной системе суспензии желточных липопротеидов и выражали в процентах от 50% ингибирования ПОЛ в модельной системе по сравнению с классическим антиоксидантом – ионолом.

Сверхбыстрое охлаждение замораживаемых образцов спермы осуществляли с помощью модифицированного метода, разработанного ИПКиК НАН Украины [2, 18]. Сверхвысокие скорости охлаждения (3000°С/мин) достигались погружением

контейнеров в охлажденный до температуры жидкого хладагента твердый хладоноситель. Композиционный криоконсервант содержал глицерин в качестве криопротектора. Замораживание осуществляли в полипропиленовых стерильных криопробирках (“Sarsted”, Германия) объемом 1 мл. Размораживали образцы, помещая контейнеры на 5 мин в водяную баню при 41°С.

Для выделения АПФ спермиев использовали метод всплывания (“swim up”) [16]. Исследования проводили на разделенных эякулятах. Полученные образцы разделили на 2 равные части. В первом случае из нативного образца выделяли АПФ спермиев, которую впоследствии криоконсервировали, во втором – криоконсервировали весь эякулят, а после отогрева выделяли АПФ.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью анализа данных компьютерной программы Microsoft Excel 2003. В качестве критерия достоверности различий принимали уровень 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Развитие процессов ПОЛ характеризуется на первом этапе образованием первичных (диеновые, триеновые, тетраеновые конъюгаты) и вторичных продуктов. Одним из таких соединений является промежуточный продукт этапа ферментного окисления арахидоновой кислоты и конечный продукт окислительной деградации липидов – МДА.

Результаты исследований содержания МДА в АПФ спермы представлены на рис. 1.

Концентрация МДА в АПФ спермиев после криовоздействия была достоверно выше, чем в клетках, выделенных до криоконсервирования. Следует обратить внимание на тот факт, что спермии, освобожденные от семенной плазмы, характеризуются высоким уровнем образования МДА. Для клеток крови этот показатель находится в пределах нормы 2,5–6,0 мкмоль/л, а для АПФ спермиев в зависимости от способа выделения 7,9–9,8 мкмоль/л. Такое увеличение концентрации МДА можно объяснить метаболической активностью спермиев, которая в АПФ особенно велика. Известно, что сочетание высокого уровня подвижности с присутствием в цитоплазматической мембране спермиев человека большой доли специфических полиненасыщенных жирных кислот [8] приводит к интенсивному течению процессов ПОЛ. В нашем случае это выразилось в увеличении образования МДА.

Фермент СОД относится к группе антиоксидантных ферментов водной фазы. Вместе с каталазой и другими антиоксидантными ферментами она защищает клетки от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов [13].

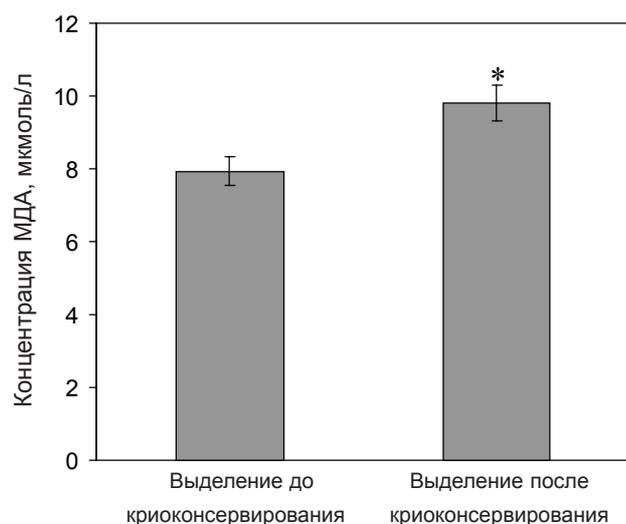


Рис. 1. Концентрация малонового диальдегида в активно-подвижной фракции спермиев человека в зависимости от способа выделения: * – статистически достоверные различия между группами, $p < 0,05$.

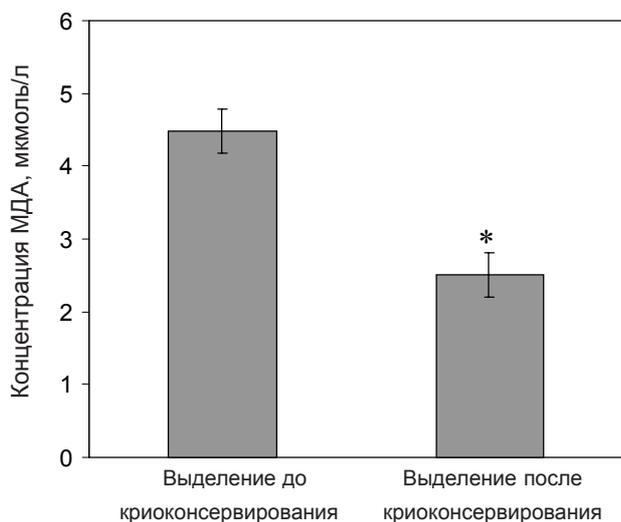


Рис. 2. Активность СОД в активно-подвижной фракции спермиев человека в зависимости от способа выделения: * – статистически достоверные различия между группами, $p < 0,05$.

Полученные нами данные активности СОД в фракции активно-подвижных спермиев (рис. 2) свидетельствуют о том, что активность фермента в суспензии активно-подвижных спермиев, выделенных после замораживания-отогрева достоверно снижена по сравнению с активностью СОД в суспензии клеток, полученных до криоконсервирования. Повышенная активность СОД свидетельствует о пониженном образовании супероксидных анион-радикалов в спермиях и соответственно низкой концентрации перекиси водорода. Напротив, суспензия активно-подвижных спермиев, выделенных до криоконсервирования, также подвергалась криообработке, однако активность СОД в этом случае была достоверно высокой. Факторы внеш-

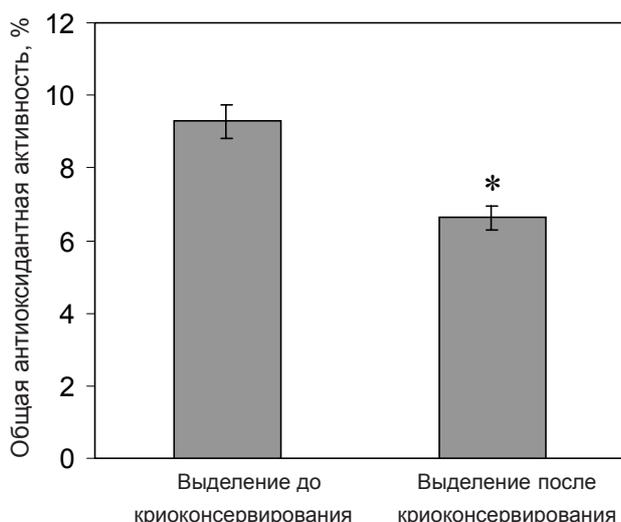


Рис. 4. Подвижность активно-подвижной фракции спермиев человека в зависимости от способа выделения: * – статистически достоверные различия между группами, $p < 0,05$.

ней среды, среди которых основную роль играет замораживание-отогрев, могут существенно снизить активность антиоксидательных ферментов [3]. В процессе замораживания-отогрева спермии теряют СОД вследствие увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны [11]. Изменения подвижности и оплодотворяющей способности имеют не только температурную зависимость, но и временную, и характеризуются как сублетальные криповреждения [14]. Активность СОД положительно коррелировала с концентрацией подвижных спермиев [10]. Таким образом, выделенные из общего числа подвижных клеток активно-подвижные спермии также имеют тенденцию к увеличению активности СОД. Установлена небольшая вероятность выделения достаточного количества активно-подвижных спермиев после отогрева.

Уровень ПОЛ, например липидов спермы, определяется, с одной стороны, процессами радикало- и перекисеобразования, а с другой – состоянием эндогенных систем антиоксидантной защиты [7], поэтому оценка общей антиоксидательной активности (АОА) этих систем имеет практическое значение.

Данные определения АОА представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, в выделенной до криоконсервирования активно-подвижной фракции спермиев АОА была достоверно высокой по сравнению с активностью в клетках, выделенных после отогрева. В условиях замораживания, которые исключают поэтапное снижение температуры образца, скорость развития процессов ПОЛ должна быть минимальной. Наблюдаемое в наших экспериментах снижение АОА в группе выделенных после криоконсервирования спермиев опровергает это предположение. Данное противоречие можно объяснить исходя из сравнения изменений морфофункциональных свойств спермиев вследствие окислительного стресса и после криовоздействия. Следует отметить, что происходящие при этих процессах изменения (окисление тиоловых групп мембранных белков, повреждение переносчиков, появление проницаемости для ионов, повреждение транспортных АТФаз, увеличение микровязкости мембран, изменение поверхностного заряда мембран и липопротеинов, уменьшение гидрофобного объема, увеличение полярности липидной фазы, увеличение проницаемости для ионов водорода и кальция) имеют сходный характер и могут не только дополнять, но и усиливать друг друга.

Подвижность и переживаемость спермиев имеют высокую корреляцию с оплодотворяющей способностью ($r = 0,7-0,8$) и, по данным [1], являются достаточными для оценки спермы некоторых видов животных. Чем дольше спермии сохраняют активность *in vitro*, тем выше их устойчивость к

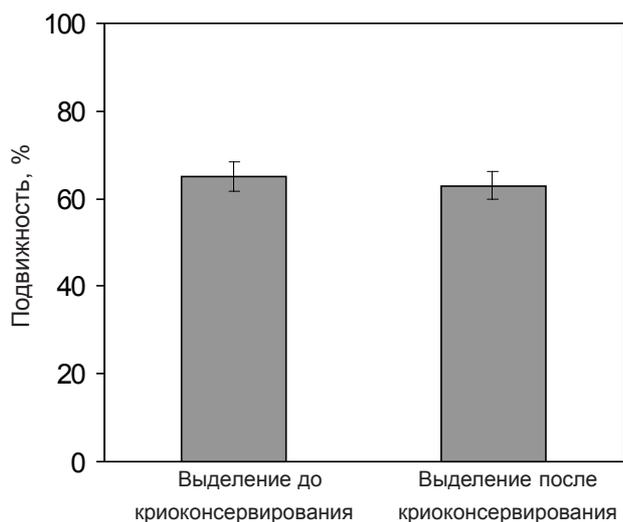


Рис. 4. Подвижность активно-подвижной фракции спермиев человека в зависимости от способа выделения.

внешним воздействиям, в том числе и низким температурам.

Полученные в наших экспериментах данные изменения подвижности представлены на рис. 4.

Характерно, что показатели подвижности выделенных спермиев не отражали в полной мере изменения, выявленные нами при изучении состояния ПОЛ в мембранах, и оставались на высоком уровне как в суспензии, выделенной до криоконсервирования, так и у спермиев, полученных после отогрева. Выявленное несоответствие мы связываем с вторичным криоповреждением систем энергообеспечения спермиев по сравнению с изменениями в мембранах клеток, которые происходят на первых этапах процессов замораживания-отогрева.

Выводы

1. Выделение активно-подвижной фракции спермиев из эякулята для использования её во вспомогательных репродуктивных технологиях с применением методов криоконсервирования – необходимый этап на стадии подготовки спермы *in vitro*.

2. В активно-подвижной фракции спермиев человека, выделенной после криоконсервирования эякулята, более интенсивно накапливаются вторичные продукты перекисного окисления липидов на фоне снижения показателей активности супероксиддисмутазы и общей антиоксидантной активности.

3. Данные подвижности не являются критерием оценки эффективности выделения активно-подвижной фракции спермиев из эякулята.

4. Наиболее эффективным является криоконсервирование выделенной активно-подвижной фракции спермиев человека.

Литература

1. Белоус А.М., Грищенко В.И., Паращук Ю.С. Криоконсервация репродуктивных клеток. – Киев: Наук. думка, 1986. – 208 с.
2. Грищенко В.И., Калугин Ю.В., Лучко Н.А. Некоторые аспекты криоконсервации эмбрионов и спермы // Пробл. криобиологии. – 1994. – №2. – С.29–37.
3. Alvarez J.G., Storey B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation // J. Androl. – 1992. – Vol. 13, N3. – P. 232–241.
4. Austin C.R. Observations on the penetration of sperm into the mammalian egg // Aust. J. Sci. Res. (B). – 1951. – Vol. 4, N4. – P. 581–596.
5. Chang M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes // Nature. – 1951. – Vol. 168, N4277. – P. 697–698.
6. de Lamirande E., Gagnon C. The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function: From Basic Science to Clinical Applications / Ed. C. Gagnon, Cache River Press, 1999. – P. 455–467.
7. Ford W.C.L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species // Hum. Reprod. Update. – 2004. – Vol. 10, N5. – P. 387–399.
8. Geva E., Lessing J.B., Lerner-Geva L., Amit A. Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications // Hum. Reprod. – 1998. – Vol.13, N6. – P. 1422–1424.
9. Kanwar K.C., Yanagimachi R., Lopata A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa // Fertil. Steril. – 1979. – Vol.31, N3. – P. 321–327.
10. Kobayashi T., Miyazaki T., Natori M., Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa // Hum. Reprod. – 2000. – Vol. 6, N7. – P. 987–991.
11. Lasso J.L., Noiles E.E., Alvarez J.G., Storey B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation // J. Androl. – 1994. – Vol. 15, N3. – P. 255–265.
12. Mortimer S.T., Swan M.A., Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa // Hum. Reprod. – 1998. – Vol. 13, N8. – P. 2139–2146.
13. Nissen H., Kreysel H.W. Superoxide dismutase in human semen // Klin. Wochenschr. – 1983. – Vol. 61, N1. – P. 63–65.
14. Overstreet J.W., Drobnis E.Z. Sperm transport in the female tract / In: Advances in Donor Insemination. Ed. by C.L.R. Barratt, I.D. Cooke. – Cambridge: Cambridge University Press, 1992. – P. 33–49.
15. Rogers B.J., Perreault S.D., Bentwood B.J. Variability in the human-hamster *in vitro* assay for fertility evaluation // Fertil. Steril. – 1983. – Vol. 39, N2. – P. 204–211.
16. World Health Organization (WHO) laboratory manual for examination of human semen and cervical mucus interaction. 4th ed. – Cambridge: Cambridge University Press, 1999. – 128 p.
17. Yanagimachi R. Mammalian fertilization / In: The physiology of reproduction / Ed. by E. Knobil, J.D. Neil. 2nd ed. – New York: Raven Press, 1994. – P. 189–317.
18. US Patent N 4965186. Method for low-temperature preservation of spermatozoa / V.I. Grischenko, Ju.V. Kalugin, Ju. S. Paraschuk et al. Filed: 21.06.1988; Appl. No.: 209574; Date of patent: 23.10.1990.

Поступила 08.07.2008