

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ ДИНАМИКИ ФОСФОЛИПИДОВ МЕМБРАНЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ МУЖЧИН РАЗНОЙ ФЕРТИЛЬНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

М.В. Плосконос

к.б.н., доцент, профессор РАЕ, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России; Каспийский институт морского и речного транспорта – филиал ФГБОУ ВО ВГУВТ (г. Астрахань)
E-mail: ploskonoz@mail.ru

Исследовано влияние аскорбиновой кислоты (АК) на состояние фосфолипидного слоя мембраны сперматозоидов в эксперименте *in vitro*. Выявлен эффект защиты гамет фертильных мужчин при помощи АК от H₂O₂-индуцированной экспрессии маркера апоптоза – фосфатидилсерина. У бесплодных мужчин отмечено нарушение механизма апоптоза.

Ключевые слова: сперматозоиды, фертильность, апоптоз, фосфатидилсерин, оксидативный стресс, аскорбиновая кислота.

Витамины играют важную, а иногда и определяющую роль в процессе реализации репродуктивной функции человека. Витамин С – аскорбиновая кислота (АК), содержится в мужской сперме и является одним из неферментативных компонентов системы антиоксидантной защиты сперматозоидов, защищая от активных форм кислорода (ROS) и предупреждая развитие оксидативного стресса, участвует в качестве сильного восстановителя во многих метаболических процессах, протекающих в спермоплазме [1]. Уровень АК существенно влияет на двигательные характеристики гамет. Однако функциональное значение АК в семенной жидкости до конца не выяснено.

Научные достижения в области репродуктивной биологии и медицины привели к стремительному развитию техник вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). При подготовке гамет для ВРТ их отделяют от семенной плазмы, выделяя клетки с наилучшими морфофункциональными характеристиками, но при этом лишая их антиоксидантной защиты и увеличивая риск возникновения у гамет оксидативного стресса [2].

Сперматозоиды очень чувствительны к оксидативному стрессу из-за минимального количества цитоплазмы, содержащей недостаток антиоксидантов и ДНК-восстанавливающих систем [3].

Ответом половой клетки на стресс является нарушение ряда важнейших биохимических процессов, в том числе и функционирования мембранных структур, а также активация суицидной программы – апоптоза, что в свою очередь может

привести к бесплодию у мужчин [4, 5]. Апоптоз характеризуется целым набором стадийспецифических биохимических изменений, происходящих как в ядре, так и в клеточной мембране сперматозоида, среди которых, например, изменения в динамике фосфолипидов. Одним из условий жизнеспособности половых клеток является поддержание фосфолипидной асимметрии в цитоплазматической мембране: сфингомиелин и фосфатидилхолин находятся в наружном слое мембраны, а фосфатидилсерин (ФС) – исключительно во внутреннем слое.

Ранним биохимическим признаком процесса апоптоза, начавшегося в гамете, является переориентация ФС на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны, локализуясь на которой этот фосфолипид формирует специфический сигнал для распознавания апоптотической гаметы [2].

Цель исследования – в рамках изучения антиоксидантной защиты клеток от оксидативного стресса оценить влияние АК в эксперименте *in vitro* на состояние фосфолипидной асимметрии клеточной мембраны сперматозоидов мужчин с разной фертильностью.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследованы эякуляты от 10 здоровых фертильных мужчин и 10 бесплодных пациентов с астенозооспермией (подвижность спермиев ниже нормативных значений), давших информативное согласие на проведение исследований. Средний возраст мужчин составил 33,5±1,0 года. Сбор эякулятов проводился после 72 ч сексуального воз-

держания. Измерение показателей стандартной спермограммы выполняли в соответствии с нормативами ВОЗ [6].

Сперматозоиды отмывали от спермоплазмы в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4). Жизнеспособность клеток составила 80%.

Для определения ФС использовали «аннексиновый» метод, окрашивая гаметы аннексином-V, конъюгированным с флуорохромом (AnV-FITC), в комбинации с катионным красителем йодистым пропидием (PI) (BD, США), согласно инструкции изготовителя, с последующим исследованием мазков под флуоресцентным микроскопом «МИКРОМЕД 3 ЛЮМ» (Санкт-Петербург).

Живые гаметы не связывают AnV-FITC и не окрашиваются PI. Сперматозоиды на ранней стадии апоптоза связывают AnV-FITC, но, как и живые гаметы, непроницаемы для PI. Поэтому их расценивали как AnV-положительные/PI-отрицательные, т.е. (AnV+/PI-)–гаметы. Мёртвые клетки проницаемы для PI. Отношение количества (AnV+/PI-)–гамет к общему количеству гамет в мазке выражали в процентах [2].

Для индукции оксидативного стресса сперматозоиды (10^6 /мл) в течение двух часов инкубировали с 200 мкМ H_2O_2 («Sigma», Великобритания) [2].

Для исследования эффекта защиты гамет биоантиоксидантом АК от H_2O_2 -индуцированного оксидативного стресса к сперматозоидам (10^6 /мл) перед инкубацией с H_2O_2 были добавлены либо 300 мкМ, либо 600 мкМ АК («Sigma», Великобритания).

Контролем служили сперматозоиды, инкубированные в течение двух часов в среде Menezo B-2 («BioMerieux», Франция) с 5% CO_2 при 37 °C без каких-либо добавлений [7]. Сразу после инкубации исследовали жизнеспособность и двигательные характеристики сперматозоидов, подсчитывали количество сперматозоидов с признаками апоптоза.

Статистическую значимость различий сравниваемых величин оценивали, используя непараметрический критерий Вилкоксона. Определяли медиану (Me) и подсчитывали 25-(C25) и 75-процентиля (C75).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено, что в течение двух часов инкубации в контрольных образцах у фертильных и у бесплодных мужчин количество (AnV+/PI-)–гамет статистически значимо не изменялось ($p>0,05$). Однако содержание таких клеток у бесплодных мужчин было почти в два раза выше, чем у фертильных.

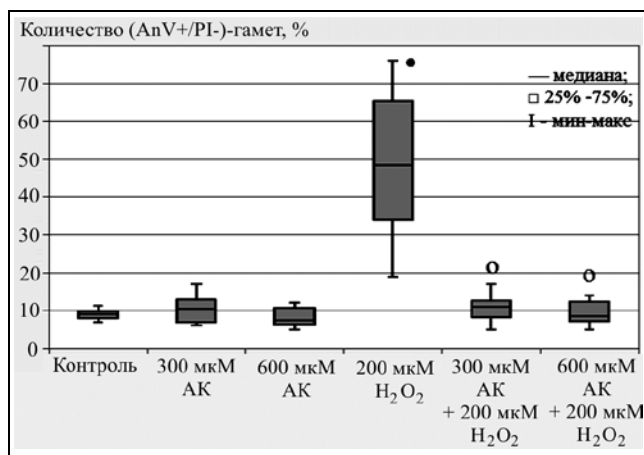


Рис. 1. Изменение количества (AnV+/PI-)–гамет после инкубации половых клеток фертильных мужчин с АК *in vitro*: $p<0,02$; • – достоверно по сравнению с контролем (инкубация без добавлений); о – достоверно по сравнению с инкубацией с 200 мкМ H_2O_2

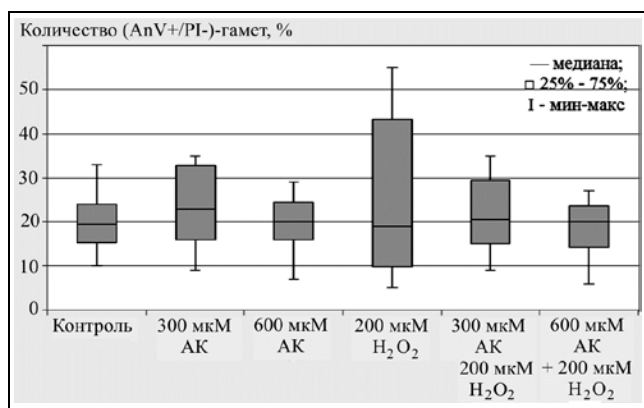


Рис. 2. Изменение количества (AnV+/PI-)–гамет после инкубации половых клеток бесплодных мужчин с АК *in vitro*

Пятиминутная инкубация гамет фертильных доноров с 200 мкМ H_2O_2 приводила к прекращению их подвижности, а после двух часов инкубации количество (AnV+/PI-)–гамет было достоверно выше, чем в контроле (рис. 1).

Статистически значимого увеличения экспрессии ФС у сперматозоидов мужчин с астенозооспермией в ответ на экспериментальный оксидативный стресс не наблюдалось (рис. 2).

После двухчасовой инкубации половых клеток либо с 300 мкМ, либо с 600 мкМ АК у фертильных и у бесплодных мужчин изменение концентрации (AnV+/PI-)–гамет по сравнению с контролем в своих группах (инкубация без добавлений) было статистически не достоверно.

Предварительное добавление к сперматозоидам фертильных мужчин АК в низких (300 мкМ) или в высоких (600 мкМ) концентрациях перед двухчасовой инкубацией клеток с H_2O_2 приводило к полной

защите гамет от H₂O₂-индуцированной экспрессии ФС. Так, концентрация (AnV+/PI-)гамет была в среднем в 5 раз ниже, чем концентрация таких клеток после воздействия H₂O₂ без предварительного добавления АК ($p < 0,02$), и достоверно не отличалась от концентрации таких сперматозоидов после инкубации с АК без добавления H₂O₂.

У бесплодных мужчин с астенозооспермией при добавлении к гаметам как низких, так и высоких концентраций АК перед инкубацией с H₂O₂ не выявлено статистически значимых изменений концентрации (AnV+/PI-)гамет по сравнению с экспериментом, в котором воздействовали H₂O₂.

Известным фактором, нарушающим фертильность и вызывающим гибель половых клеток, является оксидативный стресс, вызываемый ROS [5, 8–10].

Результаты проведенного эксперимента подтверждают, что у здоровых фертильных мужчин экспериментальный оксидативный стресс, спровоцированный воздействием *in vitro* на половые клетки H₂O₂, вызывает изменения архитектоники мембран сперматозоидов, характерные для начальных стадий апоптоза.

Гаметы имеют высокие уровни полиненасыщенных жирных кислот в мембране, поэтому наиболее очевидное влияние ROS на жизнеспособность клеток выражается в повреждении их мембран. Присутствие ROS вызывает у гамет здоровых мужчин изменение в распределении ФС, вследствие чего этот фосфолипид начинает экспрессироваться на поверхность мембраны гаметы, что приводит к увеличению количества AnV-позитивных клеток.

У бесплодных мужчин с астенозооспермией наблюдается понижение чувствительности гамет к оксидативному стрессу и, в отличие от фертильных пациентов, воздействие H₂O₂ не сопровождается активацией программы апоптоза, что может говорить о нарушении проведения сигналов апоптоза у бесплодных мужчин [11].

Для улучшения мужской фертильности и лечения бесплодия в последнее время активно применяются методы антиоксидантной терапии с помощью витамина E, C и др. [9]. Несомненно, существует множество преимуществ применения антиоксидантов как *in vivo*, так и *in vitro*, но при этом важно не превысить предел безопасной концентрации.

Добавление АК в эксперименте *in vitro* к гаметам мужчин разной фертильности не оказывает как такового статистически значимого влияния на

динамику фосфолипидов и изменения в положении ФС в мембране клеток. Гаметы фертильных мужчин чувствительны к оксидативному стрессу, поэтому возможна их защита с помощью АК от апоптогенного влияния ROS и поддержание жизнеспособности половых клеток. Данное исследование показало положительный эффект инкубации гамет здоровых доноров *in vitro* с АК для защиты половых клеток от H₂O₂-индуцированной гибели: АК предотвращает процесс экспрессии маркера апоптоза ФС на поверхность мембран гамет, вызванный индуктором оксидативного стресса.

Данные результаты не только расширяют знания в области биохимии эякулята, но могут иметь и клиническое значение. Понимание механизмов гибели клеток в результате действия различных факторов [12], например оксидативного стресса, поможет помочь в поиске маркеров для гамет, проходящих отбор для циклов ВРТ, и использовать методы антиоксидантной защиты при подготовке гамет для этих циклов.

ВЫВОДЫ

1. Ответная реакция сперматозоидов на оксидативный стресс зависит от их функционального состояния. У нормальной гаметы окислительный стресс вызывает необратимые биохимические изменения в мембране. Ответом здоровой половой клетки на этот стресс становится экстернализация на клеточную поверхность биохимического маркера апоптоза – фосфолипида ФС, что является сигналом гибели сперматозоида. У бесплодных мужчин механизм инициации апоптоза в ответ на такой апоптогенный стимул нарушен.
2. Возможным способом защиты в условиях *in vitro* нормальных фертильных сперматозоидов, отделённых от эякулята и лишённых при этом естественной антиоксидантной защиты, от апоптогенного влияния оксидативного стресса может являться добавление к клеткам АК в дозе 300 или 600 мкМ. Важно в применении этого антиоксиданта как протектора соблюдение безопасной дозировки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gutteridge J., Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000. V. 899. № 1. P. 136–147.
2. Плосконос М.В. Экстернализация фосфатидилсерина на поверхность мембран сперматозоидов под действием оксидативного стресса // *Российский иммунологический журнал*. 2015. Т. 9. № 1. С. 156–157.

- Olsen A., Lindeman B., Wiger R., Duale N., Brunborn G. How do male germ cells handle DNA damage? // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. V. 207. № 2. P. 521–531.
- Садретдинов Р.А., Полунина О.С., Воронина Л.П., Полунин А.А. Нарушение процессов перекисного окисления белков, липидов и антиоксидантной защиты при развитии бесплодия у больных хроническим простатитом на фоне инфекций, передающихся половым путём // *Кубанский научный медицинский вестник*. 2016. № 1(156). С. 121–124.
- Agarwal A., Sharma R., Nallella K., Thomas Jr A., Alvarez J., Sikka S. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility // *Fertility and Sterility*. 2006. V. 86. № 4. P. 878–885.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (2010) 5th ed., WHO (Geneva). V. 270.
- Плосконос М.В. Исследование экспрессии белков – маркёров апоптоза Fas и FasL на человеческих сперматозоидах // *Проблемы репродукции*. 2015. Т. 21. № 2. С. 94–97.
- Евдокимов В.В., Харламова Л.А., Айбяттов Д.Т. Сопоставление методов и условий для качественной оценки сперматозоидов человека // *Проблемы репродукции*. 2012. № 3. С. 68–71.
- Keskes-Ammar L., Feki-Chakroun N., Rebai T. et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men // *Arch of Andrology*. 2003. T. 49. № 2. P. 83–94.
- Широкова Л., Носков С., Широкова К., Дыбин С., Политов Я., Мокроусова М., Андрейченко Е. Показатели оксидативного стресса в динамике лечения остеоартроза симптом-модифицирующими препаратами быстрого и медленного действия // *Врач*. 2014. № 3. С. 30–34.
- Плосконос М., Николаев А. Апоптоз и мужская фертильность // *Врач*. 2014. № 3. С. 23–25.
- Терентьев А.А., Казимирский А.Н., Лычкова А.Э., Салмаси Ж.М. Усиление апоптоза лимфоцитов под влиянием синтетического пептида из альфа-фетопротеина человека (АФП 14–20) при экспериментальной язве // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014. Т. 10. № 110. С. 50–52.

Поступила 26 июля 2017 г.

THE PECULIARITIES OF THE CHANGES IN THE DYNAMICS OF THE MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS UNDER THE ACTION OF THE ASCORBIC ACID ON SPERMATOOZOA OF THE MEN OF DIFFERENT FERTILITY IN AN IN VITRO EXPERIMENT

© M.V. Ploskonos, 2017

M.V. Ploskonos

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Professor RAE, Astrakhan State Medical University; Caspian Institute of Sea and River Transport – Branch of Volga State University of Water Transport (Astrakhan)
E-mail: ploskonoz@mail.ru

In order to study the antioxidant protection of gametes from an oxidative stress, the effect of ascorbic acid (AA) on the state of the phospholipid layer of the spermatozoon membrane of the men of different fertility was investigated in an in vitro experiment. The oxidative stress was induced by an incubation of gametes of fertile men (n=10) and infertile patients (n=10) with 200 µM H₂O₂. As antioxidant protection, cells were preincubated with 300 µM or with 600 µM of AK. The externalization of phospholipid phosphatidylserine (PS) was detected by the "annexin" method. The effect of gametes protection of fertile males with AK from the H₂O₂-induced expression of the apoptosis-PS marker was observed. Infertile men showed the violation of the mechanism of apoptosis. Oxidative stress causes irreversible biochemical changes in the membrane of normal gametes and FS begins to be expressed on its surface, being a signal of sperm death. The addition of AK to gametes of fertile men does not have any effect on the change in FS distribution, but protects cells from H₂O₂-stimulated externalization of PS.

Key words: spermatozoa, fertility, apoptosis, phosphatidylserine, oxidative stress, ascorbic acid.

REFERENCES

- Gutteridge J., Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000. V. 899. № 1. P. 136–147.
- Ploskonos M.V. Jeksternalizacia fosfatidilserina na poverhnost' membran spermatozoidov pod dejstviem oksidativnogo stressa // *Rossijskij immunologicheskij zhurnal*. 2015. T. 9. № 1. S. 156–157.
- Olsen A., Lindeman B., Wiger R., Duale N., Brunborn G. How do male germ cells handle DNA damage? // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005. V. 207. № 2. P. 521–531.
- Sadretdinov R.A., Polunina O.S., Voronina L.P., Polunin A.A. Narushenie processov perekisnogo okisleniya belkov, lipidov i antioksidantnoi zashchity pri razvitiy besplodiya u bol'nykh hronicheskim prostatitom na fone infekcij, peredajushihsvja polovym putjom // *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2016. № 1(156). S. 121–124.
- Agarwal A., Sharma R., Nallella K., Thomas Jr A., Alvarez J., Sikka S. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility // *Fertility and Sterility*. 2006. V. 86. № 4. P. 878–885.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (2010) 5th ed., WHO (Geneva). V. 270.
- Ploskonos M.V. Issledovanie jekspressii belkov – markjorov apoptoza Fas i FasL na chelovecheskih spermatozoidah // *Problemy reprodukcii*. 2015. T. 21. № 2. S. 94–97.
- Evdokimov V.V., Harlamova L.A., Ajbajatov D.T. Sopotavlenie metodov i uslovij dlja kachestvennoj ocenki spermatozoidov cheloveka // *Problemy reprodukcii*. 2012. № 3. S. 68–71.
- Keskes-Ammar L., Feki-Chakroun N., Rebai T. et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men // *Arch of Andrology*. 2003. T. 49. № 2. P. 83–94.
- Shirokova L., Noskov S., Shirokova K., Dvbin S., Politov Ja., Mokrousova M., Andreichenko E. Pokazateli oksidativnogo stressa v dinamike lechenija osteoartroza svmotom-modificiruiushimi preparatami bvstroo i medlennoo deistviya // *Vrach*. 2014. № 3. S. 30–34.
- Ploskonos M., Nikolaev A. Apoptoz i muzhskaia fertil'nost' // *Vrach*. 2014. № 3. S. 23–25.
- Terent'ev A.A., Kazimirskii A.N., Lvchikova A.E., Salmasi Zh.M. Usilenie apoptoza limfocitov pod vlianiem sinteticheskogo peptida iz al'fa-fetoproteina cheloveka (AFP 14–20) pri jekspperimental'noj jazve // *Jekspperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. 2014. T. 10. № 110. S. 50–52.