

О. І. Цебржинський

Оксидативна активність у сперматозоїдах

Согласно НСТ-тесту, сперматозоиды способны к спонтанной продукции активных форм кислорода, что связано с митохондриальной электронно-транспортной цепью. Обсуждается физиологическое значение выявленного феномена.

Вступ

Вільнорадикальне перекисне окиснення ініціюється активними формами кисню та обмежується антиоксидантним захистом [10]. Найменш вивчені ці процеси у спермі [6]. Основним антиоксидантом сперми є лужний тіол ерготіонеїн [10]. У спермі проходять процеси пероксидації [2], що спричинюють зниження життєздатності сперміїв. Це гальмується додаванням антиоксидантів (токоферолу, кверцетину, цистеїну, але не емоксипіну) [12]. Є відомості, що стимуляція кальцієвим іонофором активує спонтанну хемілюмінесценцію сперміїв, підсилену люмінолом [13]. У хворих на безпліддя збільшена продукція активних форм кисню, у тому числі лейкоцитами сперми [18], а також сперміями, що реєструється хемілюмінесценцією. У сім'яній плазмі таких хворих знижена активність каталази, супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази, вміст сульфгідрильних груп [14]. Мембрани сперматозоїдів мають багато поліненасичених жирних кислот, слабку репараційну здатність у зв'язку з швидким виснаженням антиоксидантного захисту та розвитком оксидативного стресу, особливо внаслідок старіння, екзогенних інтоксикацій, лейкоцитоспермії, інфекційних і запальних захворювань сечостатевої системи [19]. Стимуляція формілметіоніллейцилфенілаланіном або ефірами форболу посилює продукцію активних форм кисню сперміями, що у пацієнтів з астеноспермією пригнічується пентоксифіліном, який підвищує рухливість сперматозоїдів [17]. Можна припустити, що зниженню фертильності сперми сприяє пероксидація, котра може бути пов'язана з наявністю в ній лактоферину (0,4–1,5 г/л) або електронно-транспортних ланцюгів окиснення. Але джерела активних форм кисню в спермі не відомі [6]. З метою їх визначення проведені досліди *in vitro*.

Методика

Використовували сперму кнурів (Інститут свинарства УААН, Полтава) з життєздатністю 80 %, концентрацією сперміїв 50 і 160 млн/мл, рН 7,4. У спермі проводили тест з тетразолієм нітросинім (НСТ) за різних умов, причому за основу взяли методику Metcalf із співавт. [16] у нашій модифікації. У I серії дослідження сперму (0,2 мл) преінкубували 5 хв при 37 °С. Далі додавали 0,1 мл 0,2 % НСТ на тріс-НСІ буферному розчині (рН 7,4) та інкубували 5, 10, або 30 хв у темряві при 37 °С. Потім утворений формаза

© О. І. Цебржинський

елюювали 3 мл діоксану п'ятихвилинним збовтуванням і фотометрували на СФ-46 при 515, або 545, або 615 нм проти розчинника. В інших серіях дослідів використовували по 0,1 мл: у II — фізіологічного розчину, у III — 3 %-го розчину НАДФН, 1 ммоль/л, у IV — 3 %-го розчину НАДН, у V — залізо-аскорбатного (Fe/АК), буферного розчину (тріс-НСІ, рН 7,4), що продукує супероксиданіонрадикал, у VI — 1,5 %-го розчину фториду натрію (NaF), у VII — 3 %-го розчину ціаніду калію (KCN), у VIII — 25 ммоль/л розчину хлориду кальцію (CaCl₂), у IX — розчину цАМФ, кінцева концентрація в інкубаційному середовищі 1 ммоль/л, у X — 45 ммоль/л розчину хлориду калію (KCl). Всі розчини розведені фізіологічним. Використовували також цитохімічний НСТ-тест, досліджували активність ксантиноксидази [8], цитохромоксидази [20], вміст РНК і сульфгідрильних груп [9].

Результати та їх обговорення

З'ясовано, що активність цитохромоксидази становила в індофенольних одиницях 0,190–0,275 на 10 млн спермійв. Активність ксантиноксидази майже не виявлялася. Візуально на 30-й хвилині вміст пробірок мав виражене синьо-фіолетове забарвлення, ледь помітне забарвлення було на 5-й хвилині. Мікроскопічно на 30-й хвилині інкубації проб з НСТ відмічалася велика кількість темних гранул біля ядра майже по всій цитоплазмі (рисунк). Найбільш інформаційними умовами дослідів виявилися 10-хвилинна інкубація з НСТ та фотометрування при 515 нм. Якщо НСТ-тест суцільної сперми давав екстинкцію 0,08–0,095, то сім'яна плазма — 0,035–0,039, а відмиті спермії — 0,195–0,207 при 10-хвилинній інкубації з НСТ (табл. 1).

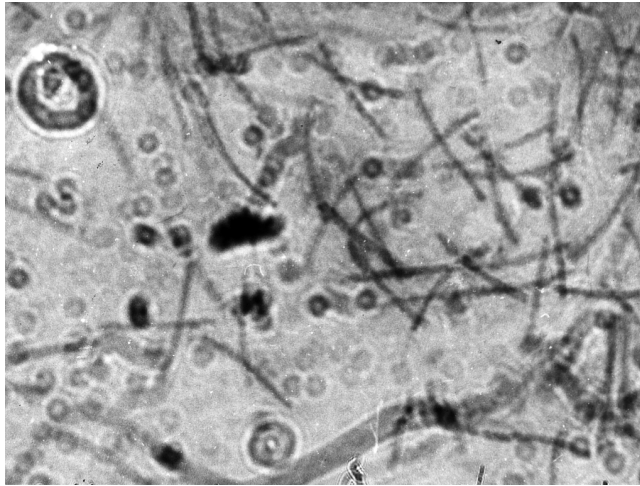
Найбільше значення НСТ-тесту дали проби, в які додавали розчин НАДН як стимулятор мітохондріального окиснення. Близькі кількісно ефекти додавання розчинів НАДФН (субстрату НАДФН-цитохром Р-450 і НАДФН-цитохром В245(558) електронно-транспортних ланцюгів), цАМФ (вторинного месенджера катаболічних реакцій), Fe/АК буферного розчину

Таблиця 1. НСТ-тест при інкубації сперми за різних умов

Схема дослідів	Екстинкція діоксанового елюату (515 нм)	Відсоток до норми
Сперма з концентрацією спермійв 50 млн/мл		
Контроль (I)	0,084±0,0040	100
Введення розчинів		
фізіологічного (II)	0,115±0,0010*	137
НАДФН (III)	0,190±0,0070*	226
НАДН (IV)	0,240±0,0090*	286
Fe/АК (V)	0,180±0,0010*	214
NaF (VI)	0,120±0,0010*	143
Сперма з концентрацією спермійв 160 млн/мл		
Контроль (I)	0,091±0,0022	100
Введення розчинів		
KCN(VII)	0,065±0,0023*	71
CaCl ₂ (VIII)	0,092±0,0047	101
цАМФ (IX)	0,189±0,0100*	208
KCl (X)	0,127±0,0071*	140

Примітка. У дужках позначено номер серії, * P<0,05.

Цитохімічний НСТ-тест спермійв, збільшення 120×6,3. Темні гранули формазану розташовані в головці сперматозоїдів.



(продуцента активних форм кисню). Вплив фториду натрію (блокатора гліколізу, стимулятора надходження іонів кальцію у клітину, активатора аденілатциклазної системи [11]), фізіоло-

гічного розчину та хлориду калію (стимулятора капацитації — здатності проникнення спермійв крізь оболонку в яйцеклітину [1]) близькі. Відсутні зміни при дії хлориду кальцію без іонофору. Під впливом ціаніду калію (інгібітора мітохондріального окиснення) значення НСТ-тесту знизилося. Відмиті спермії у 5,5 раза активніші при НСТ-тесті, ніж сім'яна плазма. Ефект останньої може бути пов'язаний з ерготіонеїном, який здатний легко віддавати водень для відновлення кисню, але більш вірогідніше припущення про залишкову активність уламків спермійв. Можна вважати, що майже всі зміни зовнішнього середовища активують продукцію супероксиданіон-радикала сперміями.

Сперматозоїди на етапі після виходу з сім'яних придатків для енергетики використовують фруктоліз [4], але наші результати свідчать про активність цитохромоксидази. Сперматозоїди здатні продукувати супероксиданіон-радикал, на що вказують позитивні результати НСТ-тесту. Супероксиданіон-радикал є попередником інших активних форм кисню. Вважають, що супероксид має месенджерні властивості [3]. Враховуючи, що найбільше підвищення значень НСТ-тесту спостерігається під впливом НАДН та інгібується ціанідом, можна припустити, що джерелом активних форм є електронно-транспортні ланцюги мітохондрій. Оскільки цитохромоксидаза успішно конкурує з солями тетразолію за водень [5], інгібується ціанідами, у середовище інкубації не вносили субстрати оксидаз і дегідрогеназ, можливе припущення, що відновлені цитохроми, одноелектронним переносом на кисень, утворюють супероксиданіон-радикал, який відновлює тетразолій нітросиній у формазан. За результатами НСТ-тесту супероксиданіон-радикал реєструє при дихальному вибуху лейкоцити, з супероксиду утворюються інші активні форми кисню — пероксид водню, гідроксил-радикал, що ініціюють пероксидацію. Лужність середовища при рН 7,4 не сприяє спонтанному відновленню тетразолію нітросинього у формазан.

Згідно з результатами (табл. 2) годинна інкубація сперми, як інтактна, так і з різними добавками, призводить до зниження вмісту сульфгідрильних груп, активності цитохромоксидази (за виключенням додавання фториду натрію); вміст РНК зменшився лише при інкубації з НАДН та НАДФН. Ці зміни можуть бути пов'язані з дією активних форм кисню.

Таблиця 2. Вміст SH-груп, РНК і активність цитохромоксидази сперми після 1 год інкубації з біоактивними речовинами

Показник	Вихідний стан	Інкубація	Інкубації з додаванням розчинів			
			НАДН	НАДФН	Fe/АК	NaF
Цитохром-оксидаза, Од/хв·мл	0,476±0,011	0,133±0,071*	0,111±0,020*	0,200±0,020*	0,389±0,030**	0,416±0,076
РНК, мг/г	0,485±0,060	0,511±0,002	0,241±0,012**	0,385±0,004	0,407±0,093	0,351±0,011
SH-групи, ммоль/л	299,4±3,2	154,8±20,1*	184,0±0,1*	188,4±9,2*	168,0±1,8*	166,5±0,1*

*P<0,001, ** P<0,05.

Фізіологічне значення ефекту генерації активних форм кисню сперміями можна оцінити гіпотетично. По-перше, це може бути активація акросомальної системи, яка аналогічна лізосомальній. Акросома — це модифікований апарат Гольджі, котрий є джерелом лізосом. Можливо, існує механізм капацитації, як здатності перфорації мембрани, проникнення крізь оболонку в яйцеклітину, для окиснення SH-груп оболонки яйцеклітини, що перешкоджає проникненню інших сперміїв. При цьому з поверхні сперміїв можуть зникати речовини, що блокують акросомні реакції (механізми капацитації активуються іонами калію або кальцію у діапазоні рН 7,3—7,7 [1]). Не виключений механізм руйнування фактора декапацитації. По-друге, це може бути механізмами конкуренції з іншими сперматозоїдами, апоптозу сперміїв, деградування позаядерних цитоплазматичних структур. По-третє, це може мати значення для елімінації сторонніх клітин сперми та фолікулярної рідини, для деполімеризації середовища свого руху. По-четверте, не виключена можливість оксидативного механізму посилення нестабільності геному. Останнє підтверджено при інкубації сперміїв у ксантин — ксантиноксидазній або залізо — перекис водню системах генерації гідроксил-радикала, внаслідок чого не тільки збільшується вміст малонового діальдегіду в спермі, але й 8-гідроксигуаніну в ДНК сперміїв [15]. У свою чергу 8-гідроксигуанін не депуринізується, є комплементарним не до цитозину, а до аденіну [7], що призводить до мутацій.

Можна провести деяку аналогію між сперміями та лейкоцитами, у яких завдяки кальцієвій месенджерній системі розвивається дихальний вибух, тобто різке посилення продукції активних форм кисню, що визначається НСТ-тестом [3, 10, 16]. Чоловічі гамети за рухливістю та продукцією супероксиду дещо нагадують лейкоцити, але відрізняються гаплоїдністю та джерелом активних форм кисню від мітохондрій, а не від НАДФН-оксидазної системи.

О. І. Tsebrzhinsky

THE OXIDATIVE ACTIVITY OF SPERMATOZOA

According to NBT-test the spermatozoa can product spontaneously the active forms of oxygen, that is connected with mitochondrial electron-transport chain. The physiological significance obtained phenomenon is discussed.

Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Биологический энциклопедический словарь*. — М.: Сов.энциклопедия, 1989. — 864 с.
2. *Гуськов А.М., Наук В.А., Букарчук М.Г. и др.* Антиокислительная активность липидов и функциональная полноценность гамет самцов сельскохозяйственных животных при криоконсервации. — В кн.: Биоантиоксидант. — М., 1989. — Т. 1. — С.215-216.
3. *Клюбин И.В., Гамалей И.А.* НАДФН-оксидаза — специализированный ферментативный комплекс для образования активных метаболитов кислорода // *Цитология*. — 1997. — **39**, № 4-5. — С. 320-340.
4. *Курило Ю.Г.* Взаимосвязь активности ферментов и концентрации метаболитов углеводного обмена в сперме хряков с качеством спермы, переживаемостью и оплодотворяющей способностью спермиев: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Харьков, 1982. — 49 с.
5. *Лойда З., Госсрау Р., Шиблер Т.* Гистохимия ферментов. Лабораторные методы. — М.: Мир, 1982. — 270 с.
6. *Маньковська І.М., Серебровська З.О.* Роль кисневих радикалів у фізіології та патології сперми людини // *Фізіол. журн.* — 1998. — **44**, № 5-6. — С. 118-125.
7. *Полтев В.И., Шулюпина Н.В., Брусков В.И.* Молекулярные механизмы правильности биосинтеза нуклеиновых кислот // *Молекуляр. биология*. — 1996. — **30**, вып. 6. — С. 1284-1288.
8. *Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині* / Під ред. О.В.Катрушова, І.П.Кайдашева, В.М.Соколенко. — Полтава, 1997. — 271 с.
9. *Современные методы в биохимии* / Под ред. В.Н.Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — 392 с.
10. *Цебржинский О.И.* Некоторые аспекты антиоксидантного статуса. — В кн.: Физиология и патология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза. — Полтава, 1992. — С. 120-155.
11. *Цебржинский О.И.* Биохимические механизмы токсичности фторид-иона. — В кн.: Фтор. Проблемы экологии, биологии, медицины, гигиены. — Полтава, 1992. — С. 95-98.
12. *Цебржинський О.І., Почерняєва В.Ф., Куценко Л.О. та ін.* Прооксидантний ефект сперми та антиоксиданти. — В кн.: Науково-виробничий бюлетень «Селекція». — К.: БМТ, 1998. — Число п'яте. — С. 246-247.
13. *Aitken R.J.* Assessment of Human Sperm Function. — In.: *The Testis*. — N.-Y.: Raven Press, 1989. — P. 441-474.
14. *Alkan I., Simsek F. et al.* Reactiveoxygen spesies production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants // *J.Urol.* — 1997. — **157**, № 1. — P. 140-143.
15. *Chen Chung-Shuny, Chao Hsiang-Tai, pan Rong-Long, Wei Yau Huei.* Hydroxyl radical-induced declin in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm // *Biochem. And Mol. Biol. Int.* — 1997. — **43**, № 2. — P.291-303.
16. *Metcalf J.A., Gallin J.I., Nauseef W.M., Root R.K.* Laboratory manual of neutrophil function. — N.-Y.: Raven Press, 1986. — 192 p.
17. *Okada H., Tatsumi N., Kanzaki M. et al.* Formation of reactive oxygen species by spermatozoa from asthenospermic patiens: response to treatment with pentoxifylline // *J. Urol.* — **157**, № 6. — P. 2140-2146.
18. *Sharma R.R., Agarwal A.* Role of reactive oxygen species in male infertility // *Urology*. — 1996. — **48**, № 6. — P. 835-850.
19. *Sikka S.C.* Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function // *Front. Biosci.* — 1996. — № 1. — P. 78-86.
20. *Straus W.* Colorimetric microdetermination of cytochrom oxydase // *J. Biol. Chemistry*. — 1954. — **207**, № 2. — P. 733-743.

Укр. мед. стомат. академія
М-ва охорони здоров'я, Полтава

Матеріал надійшов
до редакції 18.09.97