

УДК 591.16

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ МЫШИ ПРИ СОХРАНЕНИИ IN VITRO

С. Мохаммадзаде, Г.Ю. Максудов, В.Г. Фрунджян,
Е.Н. Калистратова, Н.Н. Угарова, Ю.К. Доронин

(кафедра эмбриологии биологического факультета МГУ,
кафедра энзимологии химического факультета МГУ;
Московский зоопарк; e-mail: doronin@soil.msu.ru)

В предыдущей работе описаны морфологические изменения элементов суспензии, полученной из эпидидимиса и выводящего протока мышей, и их динамика при содержании в питательной среде при 10 и 37° (Мохаммадзаде и др., 2007). В этой статье представлены результаты измерений ряда показателей, характеризующих функциональное состояние основных внутриклеточных компонентов спермиев.

Объекты и методы

Получение эпидидимальной суспензии, приготовление рабочей суспензии и приемы ее содержания in vitro при +10 и +37° описаны ранее (Мохаммадзаде и др., 2007). На протяжении всего срока хранения (через 2–3 ч при инкубации при +37°, ежедневно при +10°) определяли следующие функциональные показатели элементов суспензии.

1. Отношение числа проявляющих двигательную активность (поступательное движение, вращения на месте, движения хвоста в отсутствие поступательного движения) сперматозоидов к общей численности целостных сперматозоидов в поле зрения микроскопа в 20–25 неперекрывающихся полях зрения.

2. Состояние мембраны сперматозоидов (так же как ядродержащих фрагментов сперматозоидов) с помощью люминесцентного красителя йодистого пропидия. К 5 мкл суспензии, помещенной на предметное стекло между двумя покровными стеклами, добавляли 5 мкл рабочего раствора йодистого пропидия (ICN Biomedical Inc, США) на инкубационной среде “FertiCultTM” (10 мкг/мл) и накрывали третьим покровным стеклом. Препарат немедленно помещали под микроскоп и фотографировали 5 неперекрывающихся областей в видимом свете и в возбуждающем специфическое свечение свете (максимум возбуждения — 535 нм, максимум эмиссии — 617 нм). На компьютере совмещали два изображения одной и той же области и подсчитывали долю элементов (целых сперматозоидов и отдельных ядер), пометившихся йодистым пропидием;

3. Состояние митохондрий целых сперматозоидов и содержащих митохондрии фрагментов сперматозоидов (отдельные хвосты, комплекс головки с

шейкой) определяли так же как в случае с меткой йодистым пропидием. К 5 мкл суспензии добавляли 5 мкл раствора родамина 123 (10 мкг/мл) (Sigma), приготовленного на инкубационной среде. Пять полей зрения фотографировали в видимом и в возбуждающем специфическое свечение свете (максимум возбуждения — 507 нм, максимум эмиссии — 529 нм). Изображения одной и той же области совмещали и определяли долю метящихся родамином структур.

Все измерения и подсчеты производили на микрофотографиях, полученных на микроскопах “Invertascope-D” и “Axiovert 25” (Zeiss) с помощью цифровой камеры CoolPix 4500 (Nikon), снабженной специальной микроскопической насадкой (“Лаб-Метод”, Россия).

4) Концентрацию АТФ в элементах суспензии определяли биолуминисцентным методом (Угарова, 1993) на люминометре 3550i (“New Horizons Diagnostic Corp.”, США), используя “АТФ-реагент” (химический факультет МГУ).

Полученные данные обрабатывали статистически, используя пакеты программ “Stadia”, “Statistica” и “SigmaPlot”.

Результаты исследования

Доля метящихся йодистым пропидием головок (отдельных, в составе целых сперматозоидов или в комплексе с шейкой сперматозоида), так же как и доля метящихся родамином 123 структур (в целых сперматозоидах и в комплексах головки с шейкой и хвоста и шейки), сохранялись неизменно высокими на протяжении всего периода инкубирования при разных температурах (см. значения коэффициентов b в таблице). Коэффициенты наклона a в аппроксимирующих динамику этих показателей линейных уравнениях не отличаются от 0 ($p \geq 0,5$).

К 7–8-му часу инкубирования суспензии при 37° подвижные сперматозоиды исчезают. Динамика сокращения двигательной активности во времени достаточно хорошо описывается простой экспоненциальной зависимостью (таблица).

Концентрация АТФ в содержащих митохондрии элементах суспензий (целые сперматозоиды, хвосты, комплексы головки с шейкой) при 37° па-

Аппроксимирующие функции и значимость аппроксимации функциональных показателей элементов эпидидимальной суспензии мышей

Функциональный показатель	10°C		37°C	
	аппроксимирующее уравнение	значение и значимость (p) коэффициентов уравнения, достоверность аппроксимации, R^2	аппроксимирующее уравнение	значение и значимость коэффициентов уравнения, достоверность аппроксимации, R^2
Двигательная активность	—	—	$M(t) = ae^{-bt}$	$a = 0,189 \pm 0,0296, p < 0,0001$ $b = 0,306 \pm 0,0892, p = 0,0045$ $R^2 = 0,597$
Окрашиваемость йодистым пропидием	$N(t) = at + b$	$a = 0,0003 \pm 0,0004, p = 0,467$ $b = 0,797 \pm 0,057, p < 0,0001$ $R^2 = 0,030$	$N(t) = at + b$	$a = -0,0006 \pm 0,0015, p = 0,683$ $b = 0,897 \pm 0,0396, p < 0,0001$ $R^2 = 0,009$
Окрашиваемость родамином 123	$N(t) = at + b$	$a = -0,0004 \pm 0,0003, p = 0,098$ $b = 0,939 \pm 0,0370, p < 0,0001$ $R^2 = 0,138$	$N(t) = at + b$	$a = 0,0012 \pm 0,0009, p = 0,168$ $b = 0,911 \pm 0,0230, p < 0,0001$ $R^2 = 0,103$
Внутриклеточная концентрация АТФ	$C(t) = C_0 + ae^{-bt} + ce^{-dt}$	$C_0 = 0,592 \cdot 10^{-8} \pm 3,161 \cdot 10^{-9}, p = 0,0003$ $a = 1,246 \cdot 10^{-7} \pm 1,396 \cdot 10^{-8}, p < 0,0001$ $b = 3,633 \pm 0,452, p < 0,0001$ $c = 8,188 \cdot 10^{-8} \pm 9,683 \cdot 10^{-9}, p < 0,0001$ $d = 8,511 \cdot 10^{-2} \pm 2,396 \cdot 10^{-2}, p = 0,0040$ $R^2 = 0,977$	$C(t) = C_0 + ae^{-bt}$	$C_0 = 2,488 \cdot 10^{-8} \pm 8,715 \cdot 10^{-9}, p = 0,011$ $a = 6,674 \cdot 10^{-7} \pm 1,283 \cdot 10^{-7}, p < 0,0001$ $b = 1,459 \pm 0,267, p < 0,0001$ $R^2 = 0,912$

дает в течение трех часов после помещения сперматозоидов в среду (рисунок). Далее скорость падения замедляется: концентрация АТФ медленно понижается, стремясь не к нулю, а к предельному значению. Динамика изменения концентрации АТФ при этой температуре хорошо аппроксимируется трехпараметрической экспоненциальной зависимостью (таблица).

Подобным же образом (но в ином временном масштабе) изменяется концентрация АТФ в содержащих митохондрии структурах суспензий, инкубированных при 10° (рисунок). В этом случае временная последовательность значений наилучшим

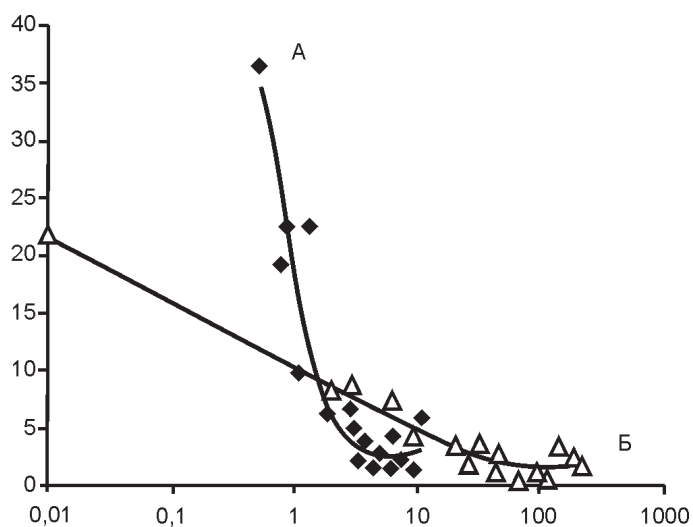
образом аппроксимируется пятипараметрической экспоненциальной зависимостью (таблица).

Через 75 ч (~3 суток) при 37° и через 250 час (~10,5 суток) при 10° суспензии погибали в результате бурного развития бактериальной инфекции.

Обсуждение

Считается, что наружная мембрана клеток непроницаема для йодида пропидия, и лишь при нарушении ее целостности краситель проникает в цитоплазму и далее связывается с ядерной ДНК. В этой связи окрашиваемость ядер йодидом пропидия полагают маркером “мертвых” клеток. Свойства мембран каждой из форм целостных сперматозоидов в суспензиях, несомненно, отличаются от общепринятого эталона. Как указывалось выше, на протяжении всего периода наблюдений все ядро-содержащие структуры суспензии активно метятся этим красителем. Мы, однако, позволим себе не согласиться с тем, что такие элементы суспензии “мертвы”. Против этого свидетельствуют: 1) существование в суспензии на протяжении 5—7 ч достаточного количества способных к движению сперматозоидов; 2) неизменно высокая специфическая активность содержащих митохондрии структур, метящихся родамином 123, и 3) наличие АТФ в элементах суспензии, уровень которого после выраженного снижения (через 2—3 ч при 37° и через 40—50 ч при инкубировании при 10°) сохраняется неизменным ($2,5 \cdot 10^{-8}$ М/л на 10^6 элементов при 37° и $1,6 \cdot 10^{-8}$ М/л на 10^6 элементов при 10°) на протяжении оставшегося периода наблюдений.

Последние величины сопоставимы с концентрацией АТФ в некоторых соматических клетках. Так,



Динамика концентрации АТФ в элементах суспензии эпидидимальных сперматозоидов при +37° (А) и +10° (Б). Ось абсцисс — время в час (логарифмическая шкала); ось ординат — концентрация АТФ в М/л на 10^6 содержащих митохондрии элементов суспензии

в эритроцитах человека содержание АТФ колеблется в пределах $1,69 \pm 0,350$ – $0,75 \pm 0,230$ пМ/л на 10^4 клеток (Petruzzi et al., 1994); в тромбоцитах человека — $3,20 \pm 0,170$ – $1,50 \pm 0,100$ мкМ/л на 10^{11} клеток (Giroto et al., 1991); в нейтрофилах человека содержится $1,60 \pm 0,700$ нМ/л на 10^6 клеток, а в нейтрофилах крысы — $2,12 \pm 0,230$ нМ/л на 10^6 клеток (Фрунджян и др., 1997). Иными словами, после расхода “резерва” АТФ на движение, в сперматозоидах устанавливается некое стабильное метаболическое состояние с энергетикой, сопоставимой с таковой у соматических клеток тепловых.

Если учитывать многообразные изменения организации плазматической мембраны сперматозоидов в связи с изменениями соотношения белков и липидов на протяжении их длительного пути из семенников (см., например, работы: Kelso et al., 1997; Barrios et al., 2000), то метод мечения йодистым пропидием представляется сомнительным для выявления “мертвых” клеток, но адекватным для интегральной оценки проницаемости мембраны. Напротив, наличие активности митохондрий и внутриклеточного АТФ однозначно свидетельствуют о жизнеспособности гамет.

Следует, однако, иметь в виду, что эти показатели демонстрируют признаки жизнеспособности не только целых сперматозоидов, но и их фрагментов. Йодистый пропидий окрашивает не только головки целых сперматозоидов, но и отдельные головки; родамин 123 — не только митохондрии цельных сперматозоидов, но и таковые в комплексах головок с шейкой и шеек с хвостами. Вероятно, в этих структурах, так же как в целостных сперматозоидах, поддерживается определенный уровень АТФ. Таким образом, метка родамином 123 и показатели АТФ не избирательны по отношению к целому сперматозоиду.

Из данных, представленных в этом и предыдущем (Мохаммадзаде и др., 2007) сообщениях, следует, что нам удалось наблюдать деградацию двигательной активности, изменение состояния плазмалеммы, стабилизацию концентрации АТФ на уровне, характерном для соматических клеток, но отнюдь не момент полной самопроизвольной деградации сперматозоидов. Наиболее устойчивыми структурами оказались митохондрии (обеспечивающие фоновый уровень АТФ) и, конечно, клеточные ядра.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мохаммадзаде С., Максудов Г.Ю., Каллистратова Е.Н., Доронин Ю.К. 2007. Морфологические изменения сперматозоидов мыши при сохранении *in vitro* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. № 2. 9–13.
- Самуилов В.Д., Олескин А.В., Лигунова Е.М. 2000. Программируемая клеточная смерть // Биохимия. 65. Вып. 8. 1029–1045.

Как же гибнут сперматозоиды? В настоящее время гибель клеток обычно связывают с явлением апоптоза. В последние годы появились сообщения о том, что для небольшой субпопуляции сперматозоидов в эякулятах бесплодных пациентов, как правило, с пониженной двигательной активностью, диагностируются транслокация фосфатидилсерина в наружных мембранах, активная каспаза-3 и фрагментация ядерной ДНК (Donnelly et al., 2000; Ricci et al., 2002; Weng et al., 2002). В то же время кинетика гибели сперматозоидов мыши *in vitro* не изменяется при добавлении в среду стаурополина, циклогексимида и пептидного ингибитора каспаз z-VAD.fmk. (Weil et al., 1998). Таким образом, если гибель зрелых сперматозоидов осуществляется посредством апоптоза, то последний протекает в форме, существенно отличающейся от дидактической.

В принципе кажется достаточно странным даже предположение о развитии генетически запрограммированной клеточной гибели в транскрипционно неактивных клетках. Между тем в работе В.Д. Самуилова (Самуилов и др., 2000) указывается на значение апоптоза не только как способа элиминации клеток, но и как одного из механизмов дифференцировки клеток. Дифференциация эпителиальных клеток при формировании хрусталика и дифференциация (и гибель) кожных кератиноцитов приводятся как примеры такой роли апоптоза. При некоторых дифференцировках, например при формировании эритроцитов, развивается особая форма апоптоза, “ядерного апоптоза” по В.Д. Самуилову, на протяжении которого вначале элиминируется генетически инактивированное ядро, а затем внутриклеточные органеллы. С такой же позиции можно рассматривать и спермиогенез. Однако в последнем случае на протяжении “дифференцирующего апоптоза” в клетке сохраняется генетически инактивированное ядро, но элиминируется большая часть цитоплазмы. Очевидная закономерность распада сперматозоидов на “стандартные блоки” (головку, комплексы головки с шейкой и хвоста с шейкой) позволяет предполагать, что деструкция этой высокоспециализированной клетки обеспечена закономерными эндогенными процессами. Не исключено, что эти эндогенные процессы — второй раунд специфической формы апоптоза (если полагать первым дифференцирующий апоптоз во время спермиогенеза).

- Угарова Н.Н. 1993. Биоаналитические применения люциферазы светляков // Прикл. биохим. и микробиол. 29. 180–192.

- Фрунджян В.Г., Романова Н.А., Деметьева Е.И., Бровко Л.Ю., Угарова Н.Н. и др. 1997. Содержание АТФ в нейтрофилах и цельной крови у населения Алтайского края, проживающего в

районах с радионуклидным загрязнением // Радиационная биология и радиоэкология. **37**. Вып. 1. 13–19.

Barrios B., Perez-Pe R., Gallego M. et al. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane // Biol Reprod. **63**. 1531–1537.

Donnelly E.T., O'Connell M., McClure N., Lewis S.E. 2000. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa // Human Reprod. **15**. 1552–1561.

Giroto S., Ferri E., Graci F.D., Cascione M.L. et al. 1991. Direct Bioluminescent ADP and ATP assay in platelets and erythrocytes: application to quality control in transfusional centers // Proceedings of 6th International Symposium on Biolum. and Chemolum. "Bioluminescence and Chemoluminescence", 1990, Cambridge / Eds. A.K. Campbell, L.J. Kircka, P.I. Stanley. Cambridge. P. 491–494.

Kelso K.A., Redpath A., Noble R.C., Speake B.K. 1997. Lipid and antioxidant change in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls // J. Reprod. Fertil. **109**. 1–6.

Petruzzi E., Rabini R.A., Orlando C., Staffolany R. et al. 1994. Erythrocyte ATP content and ATP-dependent enzyme activities on human ageing // Proceedings of 8th International Symposium on Biolum. and Chemolum. "Bioluminescence and Chemoluminescence. Fundamental and Applied Aspects", 1994, Cambridge / Eds. A.K. Campbell, L.J. Kircka, P.I. Stanley. Cambridge. P. 458–461.

Ricci G., Perticarari S., Fragonas E., Giolo E. et al. 2002. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes // Human Reprod. **17**. 2665–2672.

Weil M., Jacobson M.D., Raff M.C. 1998. Are caspases involved in the death of cell with transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes // J. Cell Sci. **111**. 2707–2715.

Weng S.L., Taylor S.L., Morshedi M., Schuffner A. et al. 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm // Mol. Human Reprod. **8**. 984–991.

Поступила в редакцию
26.04.05

FUNCTIONAL CHANGES OF MOUSE SPERMATOZOA IN VITRO

*S. Mohammadzadeh, G.Yu. Maksudov, V.G. Froundjian,
E.N. Kalistratova, N.N. Ugarova, Yu.K. Doronin*

In suspensions epididymal spermatozoa in vitro at +10°C and +37°C all nuclei- and mitochondria-containing structures (normal spermatozoa, spermatozoa with the bent and coiled tails, complexes of head and neck) are labeled by propidium iodide and rhodamine 123, correspondingly. Intracellular ATP concentration determined by a bioluminescent method in mitochondria-containing elements of suspension is decreased (essentially faster at 37°C than at 10°C) up to some unchangeable level ($2,5 \cdot 10^{-8}$ M/l at 37°C and $1,6 \cdot 10^{-8}$ M/l at 10°C at 10^6 mitochondria-containing elements). Mechanisms of spermatozoa destruction are discussed.