

КРИООБНОВЛЕНИЕ КАК ОСНОВА ЭФФЕКТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

Академик НАН Украины В.И. ГРИЩЕНКО, канд. биол. наук Э.И. АЛЕКСЕЕВСКАЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

Представлен обзор данных о механизмах программированной жизни клетки. Показано, что эффективность лечения мужского бесплодия определяется динамическим взаимоотношением апоптоза и криообновления — сдвигом его в сторону криообновления.

Применение цитохрома С в концентрации $2,4 \times 10^{-3}$ мМ в качестве стимулятора активности спермиев, хранившихся в условиях гипотермии (8°C), как показали проведенные ранее исследования [1, 2], позволило повысить их оплодотворяющую способность при нормо- и патоспермии. При патоспермии она наиболее выражена. Зарубежные авторы показали, что параметры спермограммы при внутриматочной инсеминации женщин, мужа которых страдали олигоастеноспермией, были в 1,6–3,5 раза выше в размороженных спермиях, нежели в свежезаготовленных [3].

Современные проблемы эффективности лечения мужского бесплодия теснейшим образом связаны с изучением двух важнейших разнонаправленных феноменов в клеточной биологии — апоптоза (программируемая гибель клетки) и криообновления (программируемая жизнь клетки). Активация апоптоза еще в сперматогенезе может приводить к потере оплодотворяющей способности спермиев. Поэтому наиболее четко осветить механизм благоприятного действия цитохрома С и низких температур для лечения мужского бесплодия возможно, по нашему мнению, с позиции упомянутых феноменов.

Термин «апоптоз» обозначает совокупность реакций клеточной гибели, регулируемых внутренней генетической программой [4]. Пусковой механизм апоптоза — конденсация и агрегация хроматина. Потерю оплодотворяющей способности у мужчин связывают, по крайней мере, с чрезвычайной конденсацией хроматина [5], что влечет за собой нарушение ДНК-ядерных белковых связей, разрывы нитей ядерной ДНК. В результате этих процессов ядро подвергается фрагментации, распадается на части. Один из этапов апоптоза — освобождение митохондриальными мембранами цитохрома С. Цитохром С, вышедший из митохондриального матрикса, активирует каспазы в митохондриях, в результате чего повреждается ядерная ДНК, а также катализирует перекисное окисление липидов (ПОЛ). В результате активации ПОЛ в клетке образуются активные формы кислорода (АФК), вызывающие повреждение мембран [6]. У мужчин с бесплодием отмечают высокий уровень экспрессии АФК, ассоциированной с увеличением апоптоза, ведущего к повреждению ДНК, насыщение цитохромом С межмембранного пространства, активация каспазы 3 и 9. У них также уменьшена спермальная варибельность (подвижность, концентрация и морфология), которая отрицательно коррелирует с цитохромом С, каспазой 3 и 9.

В клетках, подвергшихся воздействию индуктора апоптоза, резко снижается мембранный потенциал митохондрий. Более высокий уровень цитохрома С в межмембранном пространстве у бесплодных пациентов по сравнению с контролем зарубежные авторы объясняют потерей трансмембранного потенциала, изменением проницаемости митохондриальной мембраны, освобождением цитохрома С, ведущим к повреждению электронного транспорта, что характерно для многих апоптотических клеток [7].

Криообновление представляет собой противоположность апоптозу. В основу криообновления положены новые данные о селективном свойстве криоконсервирования: отбор и изменчивость — это две стороны одного процесса (селекции), движущей силой которого является воздействие низких температур. В свое время нами были получены новые данные о селективном свойстве криоконсервирования [8], которые легли в основу создания концепции генетически детерминированных благоприятных изменений криоконсервированных биологических объектов (криообновление) [9, 10]. Недавно концепция криообновления получила дальнейшее развитие [11–13].

Термин «криообновление» (благоприятные изменения криоконсервированных клеток), введенный нами в 1989 г., обозначает совокупность реакций, активирующих жизнедеятельность клетки с последующим переводом ее на более высокий уровень гомеостаза. Под термином «обновление», согласно классической терминологии, понимается распространенное исключительно в природе состояние физиологической активации жизненно важных процессов, проявляющееся в результате самоизменения биологического объекта. Стать «обновленным» означает: 1) приобрести другой характер, 2) приобрести другой вид, 3) стать новым по составу, пополниться внесением чего-то нового в результате каких-либо перемен, изменений, преобразований.

Запуск процессов криообновления у человека и животных — это деконденсация (разрыхление) хроматина без нарушения ДНК-ядерных связей. Показана положительная корреляция между деконденсацией хроматина в спермиях человека и животных (свиньи) и их оплодотворяющей способностью [14]. Деконденсация хроматина выявлена при нормо- и патоспермии в условиях действия высоких скоростей охлаждения [15].

В обзорных работах рассматриваются функциональная и пространственная организация генов хо-

лодовой адаптации (генов-ХА) в геноме млекопитающих [16] и человека [17], а также индуцируемые ими белки холодового шока (белки-ХШ) [18, 19]. Те и другие неслучайно располагаются в человеческом геноме. Исследована структура области холодового шока (CSD) YB-1, ответственная за ДНК-связанные свойства белков. Выявлены белки-ХШ P14 kD и P20 kD, предохраняющие мембраны в спермиях животных (баранов) от повреждения [20]. Защитный эффект, по мнению авторов, обусловлен их декапацитационной ролью. Описан эффект экспрессии гена Вах и антиапоптотических белков Bcl-2 в сперматогенных стволовых клетках и их локализация на внутренней митохондриальной мембране [21]. Антиапоптотические белки блокируют выход цитохрома С из митохондриального матрикса, уничтожают вышедший в межмембранное пространство и таким образом тормозят апоптотические процессы.

Ведущий механизм криообновления — генетически детерминированное стимулирующее действие цитохрома С: низкие температуры регулируют гены, под контролем которых находятся цитохром С и никотинадениндинуклеотид Н (НАД Н), участвующий в его транспортной функции через наружную митохондриальную мембрану [22]. Цитохром С, попадая в митохондриальный матрикс, транслокационный путь которого достаточно полно описан в обзорной работе [23], блокирует процессы активации каспаз и уменьшает реакции апоптоза, направленные на уничтожение клеток.

Важная роль в осуществлении процессов криообновления принадлежит антиоксидантам. Они уменьшают апоптоз, повреждение ДНК и улучшают качество спермы: предотвращают реакции ПОЛ, не дают свободным радикалам накапливаться в организме и образовывать активные формы кислорода. Согласно нашим наблюдениям, наибольшая жизнеспособность спермиев достигается с помощью цитохрома С в концентрации $1,2 \times 10^{-3}$ мМ и α -токоферола в концентрации 0,5 мМ [24]. После их совместного действия жизнеспособность охлажденных спермиев человека повысилась на 18% ($p < 0,01$). Антиокислительная функция токоферолов, в частности α -токоферола, определяется их способностью связывать появляющиеся в клетках активные свободные феноксидные радикалы (участки ПОЛ) в относительно устойчивые и поэтому не способные к продолжению цепи.

После действия холинхлорида, вытяжки из лецитина (природного антиоксиданта) в концентрации 0,2% и α -токоферола в концентрации 0,3 мМ активность сукцинатдегидрогеназы в охлажденных спермиях повысилась соответственно на 14 и 15% ($p < 0,01$) [25]. Согласно данным зарубежных авторов, хранение спермы баранов при 5°C в присутствии антиоксидантов (супероксиддисмутаза, каталаза, цитохром С, глутатионпероксидаза) улучшало подвижность, акросомальную целостность, оплодотворяющую способность и показатели беременности [26].

Разработка методов повышения эффективности гипотермического хранения спермиев предусматривает использование показателей раннего апоптоза.

Один из них — определение активности фосфатидилсерина с помощью annexin Y-связывания и хемилюминесценции. Признаки раннего апоптоза регистрируются в том случае, когда фосфолипид, в норме присутствующий на внутренней цитоплазматической мембране здоровых клеток, передвигается в ее наружный монослой. При этом молекула фосфолипида претерпевает структурные изменения. Annexin Y-связывание было обнаружено во фракциях с высокой и низкой спермальной подвижностью до и после замораживания. Очищенная высокоподвижная популяция спермиев характеризуется значительно более высокой индукцией мембранных антиоксидантов (de novo) [27]. В течение раннего апоптоза клетка меняет свою мембранную асимметрию [28].

Характерными признаками раннего криообновления являются конформационные изменения мембранных структур без повреждения молекулы цитохрома С [29] и его транспортной функции через митохондриальные мембраны. Как следует из указанных выше работ, импорт цитохрома С через наружную митохондриальную мембрану зависит прежде всего от присутствия НАДН и коферментов фосфатадениндинуклеотид или монофосфатнуклеотида. НАДН совместно с флавиноклеотидами восстанавливает гем, которому в восстановленном состоянии необходима его ковалентная привязанность к апоцитохрому С. Данную функцию выполняет коэнзим цитохром С гемолиза для последующего передвижения цитохрома С через наружную митохондриальную мембрану. Ионотранспортная функция цитохрома С имеет существенное значение для поддержания электрохимического потенциала сопрягающей мембраны и связанного с ним процесса образования АТФ. Окисленная (ферри) и восстановленная (ферро) формы цитохрома С способны избирательно связывать различные катионы и анионы, АТФ и адениндинуклеотидфосфат, регулировать их транспорт в митохондриях. Поэтому процесс импорта цитохрома С через внутреннюю мембрану митохондрий в реакциях криообновления осуществляется при условии «энергизованного» ее состояния, т. е. способности внутренней сопрягающей мембраны к энергетическому сопряжению. Повышение мембранного потенциала как показателя раннего криообновления сопровождается усилением митохондриогенеза, образованием более компактной структуры транспорта электронов, появлением митохондрий, более устойчивых к повреждающим факторам.

Приведенные данные наглядно демонстрируют динамическое взаимодействие апоптоза и криообновления и являются экспериментальным подтверждением наших ранних представлений о низкотемпературной селекции, как факторе отбора и благоприятной изменчивости. Именно такая трактовка селекции лежит в основе программируемой жизни клетки.

Итак, показателями раннего апоптоза служат определение фосфатидилсерина с помощью annexin Y-связывания, уменьшение мембранного потенциала и потеря мембранами митохондрий цитохрома С. Освобожденный цитохром С индуцирует

процессы апоптоза в охлажденных спермиях, что может привести к потере их оплодотворяющей способности. Стимуляция цитохромом С спермиев человека, подвергшихся гипотермическому хранению, обеспечивает запуск программируемой жизни клетки, направленной на лечение мужского бесплодия.

Таким образом, определение показателей раннего апоптоза и криообновления может служить прогностическим тестом для разработки тактики успешного лечения мужского бесплодия. Выявление

раннего апоптоза позволит своевременно включить программу криообновления путем экспрессии генов ХА и белков-ХШ. Введение цитохрома С и других антиоксидантов (α -токоферол, холинхлорид), а также антиапоптотических белков уменьшит развитие апоптотических процессов в охлажденных спермиях человека. Это позволит сместить динамическое взаимодействие двух разнонаправленных процессов — апоптоза и криообновления в сторону криообновления, которое лежит в основе эффективного лечения мужского бесплодия.

Литература

1. Алексеевская Э.И., Чуб Н.Н., Крамар М.И. Влияние цитохрома С на подвижность и фертильность спермиев человека, хранившихся в условиях гипотермии и при -196°C // Пробл. криобиол.— 2002.— № 2.— С. 59–61.
2. Активность сукцинатдегидрогеназы в спермиях человека, хранившихся в условиях гипотермии / Э.И. Алексеевская, М.И. Крамар, Н.Н. Чуб и др. // Пробл. криобиол.— 2002.— № 4.— С. 98–102.
3. Cryopreservation of the occasionally improved semen samples for intrauterine insemination: a new approach in the treatment of idiopathic male infertility / M.A. Aboulghar, M.A. Sattor, N.T. Mansour et al. // Fert. and Steril.— 1991.— Vol. 56.— P. 1115–1155.
4. Kerr L.F., Wylie A.N., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-reaching implications in tissue kinetics // Brit. J. Canc.— 1972.— № 26.— P. 239–257.
5. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm / D. Roure, S. Hamamah, J. Nikolle et al. // Gamete Res.— 1988.— Vol. 21.— № 1.— P. 51–57.
6. Oxidative stress and increased levels of apoptosis (cytochrome C, caspase 3 and 9) in patients with male factor infertility / X. Wang, R.K. Sharma, P. Ranganathan. et al. // Fertil. Steril.— 2001.— Vol. 76.— P. 195.
7. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility / X. Wang, R.K. Sharma, S.C. Sikka et al. // Fertil. Steril.— 2003.— № 80 (3).— P. 531–535.
8. Панков Е.Я., Обозная Э.И. Селективное свойство низкотемпературного консервирования // Гематол. и трансфузиол.— 1984.— № 9.— С. 32–36.
9. Грищенко В.И., Панков Е.Я., Обозная Э.И. Качественное обновление свойств клеток после криоконсервирования // Усп. совр. биол.— 1989.— Т. 108, № 2.— С. 299–309.
10. Обозная Э.И., Панков Е.Я. Цитохимия костного мозга при криоконсервировании: Атлас.— К.: Наук. думка; 1989.— С. 265.
11. Грищенко В.И., Алексеевская Э.И. Криообновление — основа для прогресса современных технологий в биологии и медицине // Усп. совр. биол.— 2003.— Т. 123, № 5.— С. 435–444.
12. Грищенко В.И., Алексеевская Э.И. Апоптоз и криообновление как основа современной цитохромной терапии // Междунар. мед. журн.— 2004.— Т.10, № 4.— С. 115–118.
13. Криообновление костного мозга и апоптоз: гипотезы и реальность / В.И. Грищенко, Э.И. Алексеевская, В.И. Ващенко и др. // Пробл. криобиол.— 2001.— № 3.— С. 22–23.
14. Chan P.I., Fredway. D.R. Assotiation of human sperm nuclear decondensation and in vitro penetration ability // Andrologia.— 1992.— Vol. 24, № 2.— P. 77–81.
15. Дунаевская А.В. Влияние высоких скоростей охлаждения на морфофункциональные особенности спермиев человека при нормо- и олигоспермии: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 2001.— 19 с.
16. Фуллер Б., Грин К, Грищенко В.И. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих // Пробл. криобиол.— 2004.— № 3.— С. 58–71.
17. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1 / C.P. Kloks, C.A. Spronk, E. Lasonder et al. // J. Mol. Biol.— 2002.— Vol. 15, № 316 (2).— P. 317–326.
18. Chuang J.H., Li H. Functional bias and spatial organization of genes in mutational hot and cold regions in the human genome // PLoS Biol.— 2004.— № 2 (2).— P. 17–29.
19. Increase transkript level of RBM3 a member of the glycine-rich RNA binding protein family in human cell in response to cold stress / S. Danno, H. Nishiyama, H. Higashitsuji et al. // Biochem. Biophys. Res. Com.— 1997.— Vol. 236, № 3.— P. 804–807.
20. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock / B. Barrios, M. Fernandez-Juan, T. Muino-Blanco, J.A. Cebrian-Perez // Androl.— 2005.— № 26 (4).— P. 539–549.
21. Effect of vasostomy on expression of Bcl-2 and Bax gene in ret spermatogenic cells / H. Li, Q. Dong, Y. Yang et al. // Xi Yi Ke Da Xue Bao.— 2000.— № 31 (3).— P. 353–355.
22. Storey K.B. Freeze-included gene expression in vertebrates // Cryo-98, 35th Annual Meeting of the Society for Cryobiology.— Pittsburgh, USA, 1998.— P. 167.
23. Грищенко В.И., Алексеевская Э.И. Возможные механизмы мембранного транспорта белков: перенос цитохрома С через митохондриальные мембраны и его роль в механизме криообновления // Пробл. криобиол.— 2005.— № 1.— С. 42–49.
24. Пат. № 38000А Украины. Способ повышения жизнеспособности охлажденных спермиев человека / В.И. Грищенко, Э.И. Алексеевская, М.И. Крамар.— 01.06.2000. Бюл. № 4.
25. Стимулирующее действие цитохрома С и холинхлорида на активность сукцинатдегидрогеназы в спермиях человека, хранившихся в условиях гипотермии / Э.И. Алексеевская, Н.Н. Чуб, Г.Г. Юрченко и др. // Пробл. криобиол.— 2001.— № 3.— С. 14–15.
26. Maxwell W.M., Stojanov T. Liquid storage of ram semen in

- the absence or presence of some antioxidants // *Reprod. Fertil. Dev.*— 1996.— № 8 (6).— P. 1013–1020.
27. *McLaughlin E.A., Ford W.C.L., Hull M.G.R.* Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa // *J. Reprod Fertil.*— 1992.— № 95.— P. 527–534.
28. *Natic Kemal Duru, Mahmood Morchedi, Alessandro Schufner.* Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine // *Fertil. Steril.*— 2001.— Vol. 75, № 2.— P. 263–268.
29. *Моисеев В.А., Розанова Е.Д.* Влияние замораживания-оттаивания на функциональные характеристики цитохрома С и цитохромоксидазы // *Криобиол. и криомед.*— 1981.— № 8.— С. 4–6.

Поступила 17.10.2005

CRYO-RENEWAL AS A BASIS FOR EFFECTIVE TREATMENT FOR MALE STERILITY

V.I. Grischenko, E.I. Alexeyevskaya

Summary

The data about the mechanisms of programmed cell life are reported. It was shown that the efficacy of male sterility treatment is determined by a dynamic interrelation of apoptosis and cryo-renewal (its shift to cryo-renewal).