



**ПОВЕДЕНИЕ НА ФОСФАТИДИЛСЕРИН И ВЪТРЕКЛЕТЪЧНИ СТРУКТУРИ КАТО МАРКЕРИ ЗА
ФУНКЦИОНАЛНОСТ ПРИ *IN VITRO* СЪХРАНЕНИЕ НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ КОЧ
EXPOSURE OF PHOSPHATIDYLSERINE AND INTRACELLULAR STRUCTURES AS FUNCTIONAL MARKERS
DURING *IN VITRO* STORAGE OF RAM SPERMATOZOA**

**Мария Иванова–Кичева¹, Александър Куков¹, Деница Даскалова¹, Росен Стефанов¹, Жана Минчева¹,
Васко Герзилов²**

**Maria Ivanova–Kicheva¹, Alexander Kukov¹, Denitza Daskalova¹, Rosen Stefanov¹, Jana Mincheva¹, Vasko
Gerzilov²**

¹Институт по биология и имунология на размножаването – БАН, София

Аграрен университет – Пловдив

¹Institute of Biology and Immunology of Reproduction – Bulgarian Academy of Sciences, Sofia

²Agricultural University – Plovdiv

*E-mail: kichevamar@abv.bg; vasko@au-plovdiv.bg

Резюме

Направен е сравнителен анализ на промени във фосфолипидната асиметрия на плазмената мембрана (ПМ) и вътреклетъчните структури при *in vitro* индуцирана капацитация и криоконсервация на сперматозоиди от коч. Установена е специфична локализация на транслоцирани молекули фосфатидилсерин (ФС), която е в апикалния регион на капацитираните сперматозоиди. При криоконсервация тази локализация е в региона на mid piece или обхваща цялата плазмена мембрана. Промените в поведението на фосфатидилсерина, съпроводени със специфични фенотипни белези, като локализация в региона на mid piece, са признак за нефункционалност на вътреклетъчните структури. Считаме, че тези белези се предопределят от сигнални пътища, различни от тези, контролиращи процеса капацитация. Наличието на апоптични фенотипни белези по-скоро са вследствие на нарушения преди еякулацията и смъртта на здрави и нормални сперматозоиди настъпва повече чрез смърт, наподобяваща некроза при соматичните клетки, отколкото чрез апоптоза.

Abstract

A comparative analysis of changes in the phospholipid asymmetry of the plasma membrane (PM) and intracellular structures in *in vitro* induced capacitation and cryopreservation of ram spermatozoa was carried out. The specific localization of translocated molecules phosphatidylserine (PS) in the apical region of the capacitated spermatozoa was established. After cryopreservation PS was localized either in the mid piece region or on the whole PM. Changes in the behavior of PS molecules accompanied by specific phenotypic markers such as localization in the region of the mid piece are signs for unfunctional spermatozoa. Such sperm cells have unfunctional intracellular structures. We consider that these traits are predetermined by signaling pathways other than those controlling the process of capacitation. The presence of apoptic phenotypic markers is the result of some disorders prior to ejaculation and the death of healthy and normal sperm cells occurs in the form of death similar to somatic cell necrosis rather than apoptosis.

Ключови думи: коч, сперма, сперматозоид, плазмена мембрана, фосфатидилсерин.

Key words: ram, semen, spermatozoa, plasma membrane, phosphatidylserine.

ВЪВЕДЕНИЕ

Промяната във фосфолипидната (ФЛ) асиметрия на плазмената мембрана (ПМ) може да доведе до някои изменения в специфичните за сперматозоидите физико-химични фактори, които са необходими за оплождането на яйцеклетката (Watson et al., 1995; Anzar et al., 2002; O'Connell et al., 2002).

Поведението на спермалната ПМ след еякулация в условия на *in vitro* индуцирана капацитация или при криоконсервация е свързано с преразпределение на фосфолипидите и по-специално на фосфатидилсерина (ФС). Тези промени са съпътствани със специфични фенотипни белези, които могат да определят бъдещото поведение на сперматозоидите, при което те или са

подготвени да оплодят яйцеклетката, или са предопределени за клетъчна смърт.

Въпреки многобройните проучвания върху биологичния феномен – капацитация на сперматозоидите, все още има неизяснени моменти върху молекулярната основа на този процес. Съществуват различни трансмембранни и интрацелуларни сигнални пътища, които имат основна роля при регулацията на спермалната капацитация при бозайниците (Viskonti, P. E. et al., 1995; Viskonti, P. E. et al., 1998; Lescrerc, P., Goupil, S., 2002). Особено внимание се отделя на влиянието на бикарбонатните и калциевите йони. Присъствието им в екстрацелуларната среда води до активиране на аденилатциклазата и синтезата на цАМФ, който от своя страна осигурява хиперактивен мотилитет на сперматозоида, необходим за неговото придвижване. Друг сигнален път е свързан с цАМФ, който активира цАМФ-зависимата протеинкиназа, съпроводено с тирозиново фосфорилиране (Berger, T., Clegg, E., 1983). За протичането на тези процеси особена роля имат митохондриите.

От друга страна, прилагането на различни репродуктивни техники много често е свързано с индуциране на процеси, които увреждат гаметите. Една от тези техники е криоконсервацията на сперматозоиди. Използването на замразена сперма от коч за изкуствено осеменяване дава незадоволителни резултати, което налага провеждането на допълнителни анализи за изясняване на механизмите на криоувреждане на гаметите.

При криоконсервация на сперма от коч ПМ се оказва една от най-чувствителните структури на спермалните клетки. Това е свързано с липидния състав на мембраната, която участва в регулацията на фазовия преход, характерен при замразяването (Белоус, 1982). Възможно е в спермалната ПМ да възникне преразпределение на фосфолипиди и белтъци, които нарушават липидо-белтъчните взаимодействия и активността на мембранно свързаните ензими. По време на замразяването ПМ на сперматозоидите се дестабилизира под влияние на ниските температури и повишаването на концентрацията на соли в средата (Holt, W. V., North, R. D., 1986). Наблюдава се като разкъсване на мембраната и изливане на клетъчното съдържимо в околната среда. Тези нарушения са общи за повечето биологични мембрани.

Нашата хипотеза е, че *in vitro* третирането на сперматозоидите може да повлияе по разностранен начин на спермалната ПМ и вътреклетъчните структури, което води до промени в нормалното протичане на сигналните пътища, свързани с жизнените функции на сперматозоидите. И при двата процеса – капацитация

и криоконсервация, се регистрират промени в позицията на ФС от ПМ, при което той се експресира на външния полуслой. Все още съществуват разнообразни становища, понякога стигащи до противоречия, касаещи промените в позицията на ФС и функционалността на гаметите. Липсват убедителни данни за специфична локализация на такива промени.

Целта на изследването е да се направи сравнителен анализ на поведението на фосфатидилсерин от плазмената мембрана, интегритета на митохондриите и структурата на ДНК в условия на *in vitro* индуцирана капацитация, както и при криоконсервация, с цел разкриване на специфични фенотипни белези, които позволяват да се прогнозира функционалността на сперматозоидите.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Получаване, преценка и подготовка на спермата за провеждане на експериментите

За провеждане на експериментите се използваха 10 еякулата с нормални качествени показатели на спермограмата, получени от 5 коча от породите Източнофризийска и Черноглава плевенска. Еякулатите се получаваха чрез изкуствена вагина в стъклени чашки. След преценка пробите сперма се разделяха на 3 равни обема. Контролната проба се разреждаше 1+6 съответно - със средата за съхранение (40 mM - Na_2HPO_4 , 151 mM - глюкоза, 7 M - K_2HPO_4 , 34 mM - NaCl). Индуцираната *in vitro* капацитация на сперматозоидите се постигна със средата за капацитация (101 mM - NaCl, 0,9 mM - CaCl_2 , 25 mM - NaHCO_3 , 0,3 M Na пируват, pH - 7). При капацитираните сперматозоиди се оценяваше състоянието на акрозомата им и тези с хиперактивен мотилитет чрез тристепенен метод на оцветяване (Nikolov, I. et al., 1991). На всички проби се направиха анализи за функционалност на сперматозоидите чрез тестове за интегритета на ПМ, митохондриите и ДНК-фрагментацията.

Криоконсервация и размразяване на спермата

Криоконсервацията се извърши по следния протокол. Определен обем от всички еякулати беше центрофугиран на ниски обороти на микроцентрофуга при 200 G за отстраняване на спермалната плазма. Следваше добавяне 1+1 от криопротективната Среда 1 (натриев цитрат – 0,28 g, малтоза – 0,04 g, захароза – 0,04 g, яйчен жълтък – 2,5 g, и дестилирана вода – 10 ml). Така разредената сперма се оставяше на 4°C за еквилибрация в продължение на 45 минути. След това се пристъпваше към втория етап на разреждане с охладената до 4°C Среда 2 (натриев цитрат – 0,28 g, малтоза – 0,04 g, захароза – 0,04 g, яйчен жълтък – 2,5



g, глицерин – 0,4 ml, и дестилирана вода – 10 ml). След 75 min се пристъпваше към криоконсервация, като сперматозоидите се замразяваха под формата на пайети с обем от 250 μ l върху парите на течен азот. При достигане на температура -106°C пайетите се потапяха в течен азот при температура -196°C , където се съхраняваха за определен период от време. Размразяването на пайетите се извърши при температура 39°C на водна баня.

Изследване интегритета на ПМ с Анексин V тест - Sigma

Интегритетът на ПМ на свежи сперматозоиди (нетретиран - контрола), капацитирани сперматозоиди и след размразяване беше изследван чрез използване на Анексин VCY 3.18/ 6CFDA тест (Sigma). Бяха приложени следните процедури: двукратно промиване на спермалните клетки с прикрепящ буфер (100 mM HEPES/NaOH, 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl_2 , pH 7,5) (Sigma) чрез центрофугиране на 300 G (мини центрофуга тип 320) в продължение на 3-5 min за отстраняване на спермалната плазма и средите. Суспендиране на клетките в прикрепящ буфер 1x и довеждане до крайна концентрация $0,5-1 \times 10^6$ spz/ml. На предварително обезмаслени и добре изчистени предметни стъкла се направиха 2 кръга с диаметър от 1 cm, като върху всяко кръгче се накапваше поли L-лизин, след което следваше изсушаване при стайна температура, накапване по 50 μ l от клетъчните суспензии върху всяко кръгче, инкубиране за 30 min на 37°C , еднократно промиване с прикрепящ буфер 1x, накапване по 50 μ l от двойнообелязания оцветяващ разтвор (Ann Cy3.18 и 6-CFDA) върху всяко кръгче и поставяне на пробите в петри на тъмно, покрито с алуминиево фолио, инкубиране на стайна температура за 30 min при стайна температура и промиване 5 пъти с по 50 μ l от 1x прикрепящ буфер. Така се отстраняваше излишната боя от сперматозоидите. Следваше накапване на 35 μ l от прикрепящ буфер 1x във всяко кръгче и покриване с 24/50 mm стъкло. От всяка проба се преброяваха по 200 спермални клетки, които се диференцираха в 3 групи – живи, живи клетки с експерсия на ФС (апоптични) и мъртви. Наблюденията се извършваха с флуоресцентен микроскоп Olympus.

Определяне на митохондриален трансмембранен потенциал

За определяне на трансмембрания митохондриален потенциал беше използван Rhodamine 123 (Sigma). Клетките се суспендираха в прикрепящ буфер 1x при концентрация $0,5 - 1 \times 10^6$ spz/ml. Следваше нанасяне по 50 μ l от клетъчната суспензия върху предметни стъкла, предварително обработени с

поли L-лизин, добавяше се по 2 μ l от работния разтвор на R123 и се инкубираше за 30 min на стайна температура и на тъмно. Всяко кръгче се промиваше 5 пъти с по 50 μ l прикрепящ буфер 1x за отстраняване на излишната боя от клетките. Накапваше се по 35 μ l от прикрепящия буфер 1x върху всяко кръгче и се покриваше с 24/50 mm стъкло. Наблюдението се извършваше под флуоресцентен микроскоп Olympus, като от всяка проба се преброяваха по 200 спермални клетки. Боята R 123 се акумулира в митохондриите в отговор на електрохимичен градиент, създаден от митохондриалния мембранен потенциал. Класифицирането на сперматозоидите ставаше в зависимост от интензитета на поемане на боята R123: с “-“ се идентифицираха сперматозоидите с нефункционални митохондрии, с “+“ се определяха живите сперматозоиди, в които има известни нарушения в митохондриалния трансмембранен потенциал, и с “++“ се определяха нормалните сперматозоиди с функционално съхранени митохондрии.

Методът микрогел-електрофореза (Comet assay)

За изследване на ДНК уврежданията като маркер за апоптоза и цялост на ядрото беше използван прецизният при откриване на скъсвания във веригите на ДНК метод на микрогел-електрофорезата (Comet assay). Получените изображения се наблюдават като комети и чрез тях се анализира степента на ДНК-уврежданията. Върху предварително приготвените и обезмаслени микроскопски стъкла се накапваше по 200 μ l от 1,0% агароза с нормална точка на топене. Слайдовете се покриваха с покривни стъкла и се поставяха за 5 min при 4°C .

Обработка на клетъчните суспензии

Клетъчните суспензии – свежи сперматозоиди като контролна група, капацитирани сперматозоиди, криоконсервирани сперматозоиди и Jurkat клетки (приложени са като контрола на метода), се промиваха и центрофугираха с PBS и се довеждаха до концентрация 1×10^6 spz/ml. Сперматозоидите се инкубираха в PBS с 2% меркаптоетанол за 1 час на 4°C . Промиваха се чрез еднократно центрофугиране на 800 g за 10 min на центрофуга K 24D. Клетъчните суспензии се включваха в нискотопима агароза. За целта към 10 μ l клетъчна суспензия в PBS се добавяше 75 μ l от 0,5% агароза с ниска точка на топене. Вземаше се по 100 μ l от получената суспензия, разстиляше се върху предметните стъкла и се покриваше с покривни стъкла. Пробите се поставяха за 5 min при 4°C за полимеризиране на агарозата. Агароза с нормална точка на топене от 200 ml се разстиляше върху слайдове и се покриваше с покривно стъкло за 5 min при 4°C .

Лизиране

Слайдовете се поставяха в лизис буфер (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, DMSO 5 ml, 1% Triton-X-100, 1% NP 40, pH 10) при 4°C и внимателно се разклащаха. След 4 h пробите се поставяха във втория лизиращ буфер с протеиназа К (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, DMSO 2,0 ml containing 1 mg/ml proteinase K, pH 7,4) и се инкубираха при 37°C за 12 h. След това слайдовете се измиваха 3 пъти по 5 min с неутрализиращ буфер (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) и се поставяха за 20 min в електрофорезен буфер (300 mM sodium acetate and 100 mM Tris-HCl, pH 9.0).

Неутрална електрофореза

Електрофорезата се проведе на 12 V (0,46 V/cm, 100 mA) за 1 час. Стъклата последователно се поставяха по 5 min в 70° и 96° етилов алкохол за обезводняване. Слайдовете се оцветяваха чрез накапване върху всяко стъкло по 50 l от 20 µg/ml етидиев бромид за 5 min. Излишното количество етидиев бромид беше отстранен чрез 3-кратно промиване по 5 минути с дестилирана вода и върху слайдовете се поставиха покривни стъкла. Наблюдението се извърши под флуоресцентен микроскоп и с броене на кометите.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Еякулатите, на които се извършиха изследванията върху поведението на фосфатидилсерина от плазмената мембрана, интегритета на митохондриите и структурата на ДНК на спермалните клетки, имаха следните сперматологични параметри - сперматозоиди с праволинейни настъпателни движения – 79,24±12,25 %, обща концентрация – 257,76±11,39x10⁷ spz/ml, живи

спермални клетки - 235±13,59x10⁷ spz/ml, патологични – до 15%, и pH – 7,10±0,02.

Установихме, че при капацитация и при криоконсервация настъпват морфологични промени в композицията на ФС от ПМ (табл. 1). В свежата сперма (контролна група) процентът сперматозоиди с промени в позицията на ФС в ПМ – определени като апоптични, е сравнително нисък – 2,30±0,89. При капацитираните сперматозоиди достоверно нараства процентът на тези с промени във фосфолипидната асиметрия до 28,34±9,84% (P<0,05). При двете групи – свежи (контролна група) и капацитирани, процентът на мъртвите сперматозоиди е нисък и в близки граници. От друга страна, в криоконсервираната сперма нараства процентът на сперматозоидите с транслокация на фосфолипидите от ПМ и той достига до 31,85±4,53%, т.е. разликите в сравнение с контролната група е достоверна (P<0,001).

Визуализираните резултати при обработката на пробите с Ann VCY 3.18/6CFDA - тест (Sigma) са представени на фиг. 1. Интерес представлява специфичната локализация на експресираниите молекули ФС на ПМ. От проведения анализ се установи, че при капацитираните сперматозоиди експресията на ФС е предимно в апикалния регион, където е разположена акрозомата на сперматозоидите, и в по-малка степен – в екваториалния сегмент. При сперматозоидите след криоконсервация тази експресия се наблюдава най-вече в областта на тялото, където е разположен митохондриалният апарат. При някои сперматозоиди в по-напреднали стадии на такива промени се засяга ПМ на целия сперматозоид.

Според Martin et al. (1994) експресията на ФС на външната повърхност на ПМ е ранен белег на апоптоза и вероятно става чрез активацията на сигнални пътища, за които все още може да се

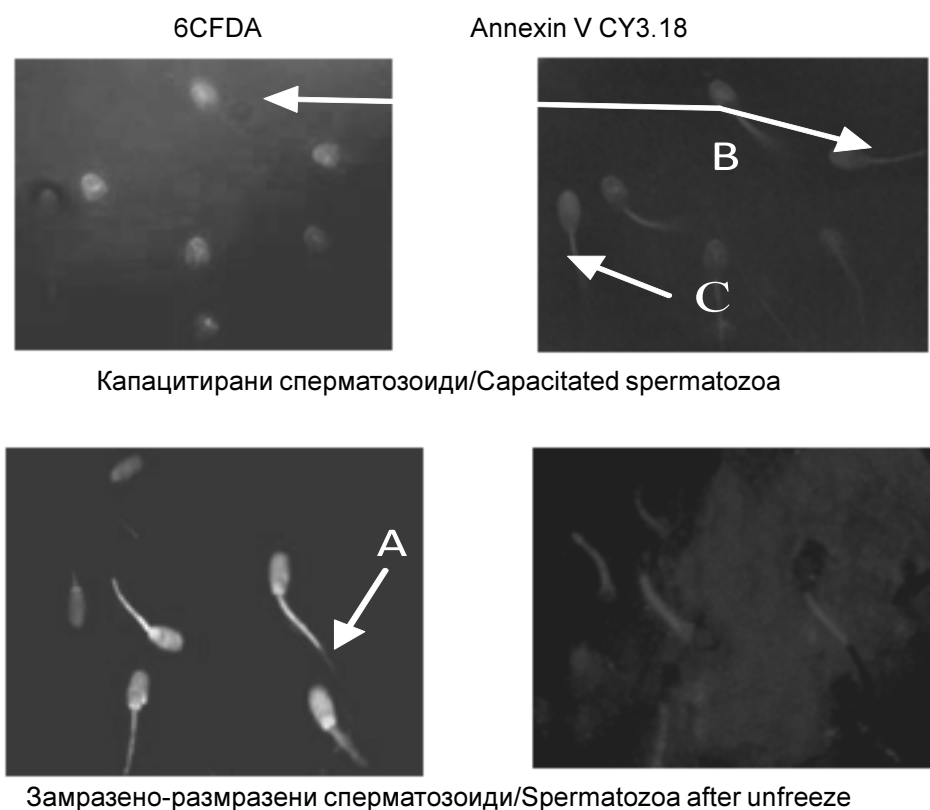
Таблица 1. Флуоресцентен анализ с двойно оцветяване - Анексин V CY3.18 и 6CFDA - тест (Sigma) на сперматозоиди от коч

Table 1. Fluorescence analysis with double staining – Annexin V CY3.18 and 6CFDA – test (Sigma) of ram spermatozoa

Състояние на сперматозоидите Status of spermatozoa	Ann V ^{+/} / 6CF ^{+/} (n = 9)		
	Мъртви/Dead Ann ⁺ /6 CF ⁻	Апоптични/Апоptic Ann ⁺ /6CF ⁺	Живи / Live Ann ⁻ / 6 CF ⁺
Сперматозоиди от свежа сперма Spermatozoa from fresh semen	6,53±2,13 ^a	2,30±0,89 ^a	90,17±5,75
Капацитирани сперматозоиди Capacitated spermatozoa	6,12 ± 3,6 ^a	28,34± 9,84 ^b	65,54±9,36
Криоконсервирани сперматозоиди Cryopreserved spermatozoa	13,74±3,82	31,85±4,53 ^c	54,44±6,16

Разликите са доказани при a ÷ b - p<0,05, a ÷ c - p<0,001 във вертикалните колони

The difference are significant at a ÷ b - p<0,05, a ÷ c - p<0,001 in vertical rows



Фиг. 1. Директна флуоресценция с Annexin VCY 3.18/6CFDA - тест (Sigma): A – живи сперматозоиди; B – апоптични сперматозоиди (с транслоциран фосфатидилсерин); C – мъртви сперматозоиди (x400)
Fig. 1. Direct fluorescence with Annexin VCY3.18/6CFDA – test (Sigma): A – live spermatozoa; B – apoptic spermatozoa (with c translocated molecules phosphatidylserine); C – dead spermatozoa (x400)

Таблица 2. Изследване с Rh 123 на митохондриалния трансмембранен потенциал на сперматозоиди
Table 2. Study with Rh 123 of mitochondrial transmembrane potential of ram spermatozoa

Състояние на сперматозоидите Status of spermatozoa	Rh 123, (n = 8)		
	(-)	(+)	(+ +)
Сперматозоиди от свежа сперма Spermatozoa from fresh semen	9,63 ± 3,73 ^a	7,30 ± 2,78 ^a	83,07 ± 5,85 ^a
Капацитирани сперматозоиди Capacitated spermatozoa	11,86 ± 4,40 ^a	23,60 ± 6,49 ^b	67,54 ± 8,60 ^a
Криоконсервирани сперматозоиди Cryopreserved spermatozoa	25,94 ± 2,77	39,00 ± 4,55	35,06 ± 3,07 ^b

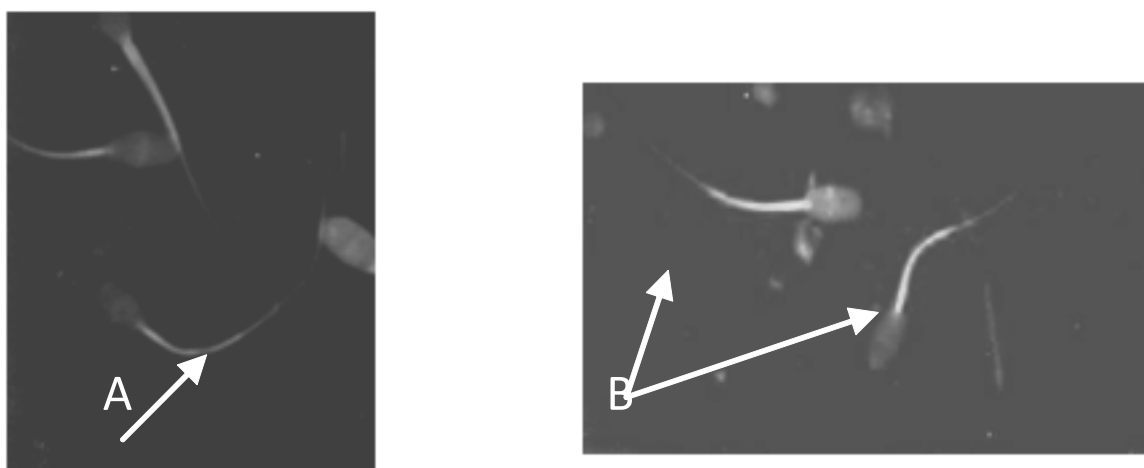
Разликите са доказани при a ÷ в - p<0,05 във вертикалните колони

The difference are significant at a ÷ в - p<0,05 in vertical rows

предполага точно какви са или става чрез апоптоза независим път. Дали тези изменения в липидната композиция на ПМ в областта на митохондриалния апарат са сигнал, детерминиращ нарушения във функциите на сперматозоида, е въпрос, който предстои да бъде изяснен. В търсене на отговор проведехме изследване на митохондриалния трансмембранен

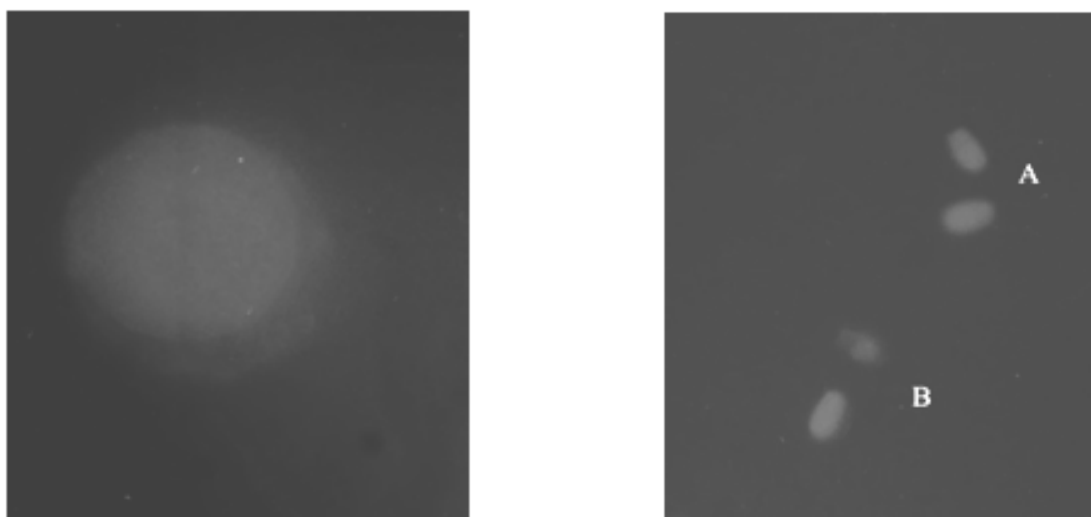
потенциал при сперматозоиди чрез прилагане на Rh123 тест – таблица 2.

От анализа на данните се установи, че при контролата и капацитираните проби процентът на сперматозоиди с добре функциониращи митохондрии е достоверно по-висок от този след криоконсервация - p<0,05. При размразената сперма се наблюдава



Фиг. 2. Флуоресценция с Rh 123 тест: А – Rh 123 (+) - живи сперматозоиди с нарушения в митохондриалния трансмембранен потенциал; В – Rh 123 (++) - нормални сперматозоиди с функционално съхранени митохондрии

Fig. 2. Fluorescence with Rh 123 test: А – Rh 123 (+) - live spermatozoa with disorders in mitochondrial potential; В – normal spermatozoa with functional storage mitochondria



Фиг. 3. ДНК интегритет на сперматозоиди чрез "Comet assay": А - сперматозоиди без нарушения в ДНК; В – сперматозоиди с нарушения в ДНК (400x и 1000x)

Fig. 3. DNA integrity of ram spermatozoa by "Comet assay": А – spermatozoa without DNA damage; В – spermatozoa with DNA damage (400x u 1000x)

увеличаване на процента на спермални клетки с нефункциониращи митохондрии, което най-вероятно ще доведе до последваща смърт – фиг. 2.

Резултатите, получени при изследване на ФЛ асиметрия чрез AnVCY 3.18/6CFDA теста, дават основание да се предположи, че транслокацията на ФС, която се наблюдава при капацитация, не е свързана с нарушения в митохондриите и не представлява фенотипен белег за клетъчна смърт. Известно е, че при

капацитация задължително митохондриите трябва да са с функционално съхранена морфологична цялост, за да може да стане хиперактивацията на сперматозоида непосредствено преди осъществяването на акрозомната реакция. В настоящите изследвания е наблюдаван хиперактивен мотилитет при капацитираните сперматозоиди. В следващите анализи е направен сравнителен анализ чрез Comet assay за определяне *in vitro* на количествени различия на



нарушения в ДНК при сперматозоиди и клетки от линията Jurkat, облъчени с UV лъчи. Резултатите показват нарастване на броя на сперматозоидите след криоконсервация и Jurkat клетките с промени в ДНК структурата в сравнение с контролната група и капацитираните, но разликите са статистически недостоверни. Възможни причини за тези резултати са изключително здравето пакетиране на ДНК в ядрото на сперматозоидите от коч или това, че се използват еякулати с добри качествени и количествени показатели за замразяване. За сравняване на данните е направен сравнителен анализ на ДНК с Jurkat клетки, при които се регистрира достоверно нарастване на ДНК кометите след поставянето им в условия, индуциращи апоптоза.

Наблюдаваните комети се определят от процента на клетките с изменено мигриране. Чрез визуалното броене на случайно избрани комети се установиха следните категории: А - ДНК остава интактна, без тя да мигрира извън клетката; В - с малко ДНК, мигрирала извън клетката, но опашката е много по-къса от диаметъра на клетката (фиг. 3).

Известно е, че при кометния метод ДНК не мигрира като фрагменти, както е при конвенционалната гелелектрофореза, където изминатото разстояние е пропорционално на размера на фрагментите. Вероятно на представените снимки се виждат свободните, скъсани краища на ДНК, издърпани в опашката. Според изследвания на Singh et al. (2003) при сперматозоиди от възрастни индивиди нарастват клетките с промени в структурата на ДНК и, което е по-интересно – увеличава се дължината на опашката на кометите. В настоящите изследвания наблюдаваната дължина на мигриране при сперматозоидите е сравнително малка, което е свързано с размера на фрагментите, както и със степента на ДНК-сшиване. Докато при Jurkat клетките кометите са с по-удължено тяло.

От изследванията върху промените във фосфолипидната асиметрия на ПМ при капацитираните и криоконсервираните сперматозоиди се установява достоверно нарастване на процента сперматозоиди с такива промени в сравнение с контролите. При капацитираните се установява достоверно по-висок брой спермални клетки с функционално съхранени митохондрии, както и единични сперматозоиди с промени в структурата на ДНК. Докато при размразените след криоконсервация значително намаляват сперматозоидите с функционални митохондрии. Подобни анализи са правени от O'Connell et al. (2002), според които при криоконсервация се повлияват морфологията, мотилитета и митохондриалната функция на сперматозоидите. Също така авторите изказват тезата, че нарушенията в структурата

на митохондриите вследствие на криоконсервацията е възможно да отключват апоптоза подобен механизъм, водещ до смърт на клетките. Затова от особено значение за сперматозоидите е да се съхрани интактноста на митохондриите.

Имайки предвид специфичната локализация на установения в настоящите изследвания ФС-скрамблинг, както и високия процент сперматозоиди със съхранен мотилитет и функционални митохондрии, бихме могли да предположим, че експресията на ФС на външния полуслой на ПМ при капацитация не винаги е фенотипен признак за апоптоза. От друга страна, при криоконсервация на сперматозоиди достоверно нараства броят на мъртвите и неподвижните, а също така и на популацията от клетки с начални промени на митохондриалния трансмембранен потенциал, но не се регистрира достоверно нарастване на сперматозоидите с промени в ДНК структурата, както това става при Jurkat клетките. Тези факти дават основание да се предположи, че след криоконсервация специфичната локализация на ФС в региона на mid piece е фенотипен белег за нефункционалност и клетъчна смърт. Считаме, че при такива сперматозоиди смъртта настъпва повече чрез механизъм, подобен на некроза при соматичните клетки, отколкото чрез апоптоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С настоящото проучване се установи, че транслокацията на ФС в региона на акрозомата на сперматозоидите не винаги означава, че е започнал процесът апоптоза. Промените в поведението на ФС, съпроводени със специфични фенотипни белези, като локализация в региона на mid piece, са белег за нефункционалност. Такива клетки носят белези за нефункционалност на вътреклетъчните структури. Считаме, че тези белези се предопределят от сигнални пътища, различни от тези, контролиращи процеса капацитация. Наличието на апоптични фенотипни белези при еякулиралите клетки по-скоро е вследствие на нарушения преди еякулацията и смъртта на здрави и нормални сперматозоиди настъпва повече чрез смърт, наподобяваща некроза при соматични клетки, отколкото чрез апоптоза.

ЛИТЕРАТУРА

- Белоус, А., В. Бондаренко, 1982. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. Киев, Наукова думка.
- Anzar, M., L. He, M. Buhr, T. G. Kroetch, K. Pauls, 2002. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. – Biol Reprod, 66: 354-360.

- Berger, T., E. Clegg, 1983. Adenilate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. – *Gamete Res* 7: 169-177.
- Holt, W. V., R. D. North, 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transition in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. – *J. Exp Zool*, 230: 473-483.
- Ivanova-Kicheva, M., A. Dimitrov, I. Nikolov, D. Daskalova, M. Petrov, 2005. Analysis of plasma membrane integrity by using of fluorescent labeled Annexin V and its relationship to other ram sperm characteristics after cryopreservation. – *Journal Central European Agriculture*, 6 (3):331-336.
- Lescrec, P., S. Goupil, 2002. Regulation of the human sperm tyrosine kinase cycles. Activation by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and inhibition by Ca²⁺. – *Biol Reprod*, 67: 301-307.
- Martin, S.J., D. Green, T. Cotter, 1994. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trends in Biochemical Sciences*, 26-30.
- Nikolov, I., M. Ivanova, N. Ivanova, Y. Nestorova, 1991. Determination of the acrosome condition of ram spermatozoa using triple stain technique. – In: *First Int. Semen Conference for Advancement of Sheep and Goat Production*, Ohrid, 111-114.
- O'Connel, M., N. McClure and S. E. M. Lewis, 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. – *Human Reproduction* 7(3): 704-709.
- Singh, N., C. Muller, M. Berger, 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. – *Fertility and Sterility*, 80 (6): 1420-1430.
- Viskonti, P. E., J. L. Bailey, G. D. Moore, D. Pad, P. Olds-Clarke, G. S. Koft, 1995. Capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. – *Development*, 121: 1129-1137.
- Viskonti, P. E., H. Galantino-Homer, G. D. Moore, J. L. Baiely, X. P. Ning, M. Fornes, G. S. Koft, 1998. The molecular basis of sperm capacitation. – *J Androl*, 19: 242-248.
- Watson, P. F., 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. – *Reprod Fertil Devel*, 7: 871-891.

**Статията е приета на 6.04.2010 г.
Рецензент – доц. д-р Иван Николов**