



**ПОВЕДЕНИЕ НА ФОСФАТИДИЛСЕРИН ОТ ПЛАЗМЕНАТА
МЕМБРАНА НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ КОЧ ПРИ *IN VITRO*
ИНДУЦИРАНА АПОПТОЗА, КАПАЦИТАЦИЯ И СЛЕД
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ**

**МАРИЯ ИВАНОВА-КИЧЕВА¹, АЛЕКСАНДЪР ДИМИТРОВ¹, ИВАН
НИКОЛОВ¹, МИЛКО СЪБЕВ¹, ВАСКО ГЕРЗИЛОВ²**

¹ Криобиология на гаметите, Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. К. Братанов” – БАН, София

² Аграрен Университет Пловдив

**BEHAVIOR OF PHOSPHATIDYL SERINE FROM RAM
SPERMATOZOA PLASMA MEMBRANE DURING *IN VITRO*
INDUCED APOPTOSIS, CAPACITATION AND
CRYOPRESERVATION**

**MARIA IVANOVA-KICHEVA¹, ALEXANDER DIMITROV¹, IVAN NIKOLOV¹,
MILKO SABEV¹, VASKO GERZILOV²**

¹ Institute of biology and immunology of reproduction “Acad. K. Bratanov” –
BAS, Sofia

² Agricultural University – Plovdiv

E-mail kichevamar@abv.bg

ABSTRACT

Investigations of the behavior of PS from PM and vitality of ram spermatozoa after *in vitro* induced apoptosis, capacitation and after freeze-thawing are made. It has been shown that the protection of spermatozoa in different conditions after ejaculation may induce at the same time different changes in the biological parameters. Fresh and capacitated sperm cells preserve motility to the 5-th hour of incubation at 39°C, whereas the sperm cells motility decreased significantly after *in vitro* inducing of apoptosis ($p<0.05$), and after freeze-thawing in comparison to the other two groups ($p<0.001$). It is determined that in fresh semen samples the percentage of sperm cells with PS scrambling is small (2.30 ± 0.89), while in another three groups this percentage increases significantly. Capacitated sperm cells showed PS scrambling at the apical area of the sperm plasma membrane, while in spermatozoa after induction of apoptosis the scrambling of PS is observed in *mid*

piece. After freezing and thawing the PS externalization was manifested in the form of clusters and domens.

Key words: spermatozoa, ram, plasma membrane, phosphatidylserine, anti-phosphatidylserine antibody (1H6)

УВОД

Биологичните мембрани представляват фосфолипиден бислой, в сред който са разположени белтъчни молекули. Интактната плазмена мембрана (ПМ) е изключително необходима за нормалното функциониране на клетките [17]. Известно е, че фосфолипидите (ФЛ) изграждащи ПМ са асиметрично разпределени. Външният полуслой на ПМ е богат на холин съдържащи ФЛ, докато на вътрешния монослои доминират аминофосфолипидите – фосфатидилетаноламин (ФЕА) и фосфатидилсерин (ФС) [6,19]. Тази архитектура не е фиксирана статично, а функционира непрекъснат транспорт на ФЛ между двата слоя на ПМ [4]. При определени процеси настъпват изменения в липидната асиметрия, което може да представлява маркер за дисфункция на клетката [10].

Сперматозоидът е високоспециализирана полова клетка, чиято ПМ изпълнява важни функции особено по време на оплождането [21]. Установено е, че фосфолипидната асиметрия е характерна за ПМ на сперматозоидите. При някои процеси, като например апоптоза или криоконсервация е възможно да се индуцира промяна в липидната асиметрия, което е сигнал за смущения в оплодителния потенциал на мъжките гамети.

Апоптозата е механизъм, който контролира броя на клетките в тъканите, като елиминира увредените клетки и по този начин поддържа хомеостазата в организма [20, 11]. Наличието на процес подобен на апоптозата при сперматозоиди, е все още спорен и не добре проучен въпрос. Съвременни изследвания показват, че в еякулирани сперматозоиди от инфертилни мъже се наблюдава транслокация на ФС от вътрешния на външния монослои на ПМ. Тази транслокация се счита за типичен ранен белег на апоптоза при соматични клетки [22]. Съществуват данни, че процентът апоптотични сперматозоиди корелира положително с ниската концентрация и слабата подвижност, които се наблюдават при инфертилни пациенти [13,18]. Някои автори предполагат, че сперматозоиди, при които апоптотичният процес е включен, първоначално спират да се движат настъпателно, а след това прекратяват изцяло движението си [16]. Това предполага, че транслокацията на ФС може да е свързана с оплодителния потенциал на мъжките полови клетки. При индуциране *in vitro* на апоптоза в сперматозоиди след третиране с H_2O_2 , циклохексимид и други (вещества които са добре познати като апоптоза индуциращи съединения) или след UV облъчване се наблюдава повишаване на броя полови клетки със специфична транслокация на ФС на външния монослои и намаляване на процента подвижни сперматозоиди.

Капацитацията е процес, при който сперматозоидите на бозайниците придобиват способността да се прикрепват към zona pellucida и да оплодят яйцеклетката [5] По време на този процес се наблюдават промени в клетките, които засягат архитектурата на ПМ (транслокация на ФС) и подвижността на

сперматозоида. Има твърдения, че скрамблнга на ФС не е белег за апоптоза понеже се наблюдава в подвижни клетки с нормално функциониращи митохондрии и интактна ДНК. Счита се, че по време на капацитацията промяната на положението на ФС е с цел да направи плазмената мембрана по-фузогенна и по този начин да улесни сливането на ПМ с външната акрозомна мембрана, по време на акрозомната реакция [8].

Друг случай, при който се наблюдава промяна в липидната асиметрия на ПМ на сперматозоида, е след криоконсервация [3, 9]. Известно е, че замразяването и размразяването на сперматозоиди има негативен ефект върху качеството на spermata. Съществуват данни, че подвижността на половите клетки намалява след криоконсервация. От изследвания на някои автори е установено, че при сперматозоиди броят на клетките с транслоциран ФС нараства. Счита се, че тези промени в структурите на сперматозоиди настъпват в следствие на формирането на кристали и свободни радикали в средата, в която се замразяват половите клетки [14].

Целта на настоящето изследване е да се проследи поведението на ФС от ПМ и виталитета на сперматозоиди от коч след "in vitro" индуцирана апоптоза, капацитация и след замразяване и размразяване.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Получаване и обработка на сперма от коч

В изпълнение на поставените задачи е работено със сперма от полово зрели кочове, порода фризийска и черноглава плевенска. За провеждането на експериментите са получени еякулати от 5 коча, като са спазвани стандартните процедури за съхранение на биологичната пълноценост на гаметите. Еякулатите са събиирани, чрез изкуствена вагина в стъклени чашки. Извършена е микроскопска преценка на основните параметри – подвижност, концентрация, мъртви сперматозоиди, pH наличие на клетъчни елементи и аглутинация. За целта е работено с фазово контрастен микроскоп при увеличение x400. За работа са използвани еякулати имащи следните параметри: сперматозоиди с праволинейни настъпателни движения – $77.14 \pm 12.50\%$, обща концентрация – $267.66 \pm 39.49 \times 10^7$ sperm cell/ml, живи клетки – $224 \pm 36.49 \times 10^7$ sperm cell/ml, мъртви клетки $43.81 \pm 13.00 \times 10^6$ sperm cell/ml, патологични – до 15% sperm cell/ml и pH 7.10 ± 0.019 . След получаване и преценка спермените пробы се разделят на 3 равни обема. Всяка част се разрежда 1:6 съответно с: за контролата - със средата за съхранение (Na_2HPO_4 0.6 g, глюкоза 3.0 g, K_2HPO_4 0.01 g, NaCl 0.2 g, дестилирана вода 100 ml, pH 7.0), за капацитация на сперматозоидите - със средата за капацитация (NaCl 0.593 g, KCl 0.036 g, CaCl_2 0.0129 g, MgSO_4 0.029 g, NaHCO_3 0.215 g, глюкоза 0.11 g, Na - пируват 0.003 g, Tris base 0.3 g, дестилирана вода 100 ml, pH 8, BSA 3 mg/ml) и за индуциране на апоптоза - със средата за съхранение. Всички пробы се съхраняват в термостат при 37°C . Пробите, при които се индуцира апоптоза са облечени с UV за 30 min. На всички пробы е проведена термична прока за преживяемост и тестове за функционалност.

Криоконсервация на сперма от коч

Спермата от същите кочове е замразена в мини пайети, като е използвана ТГ криопротективна среда (Tris base 0.28 g, глюкоза 2.01 g, лактоза 8.0 g, 20 % яичен жълтък) чрез двустепенно разреждане. Към 250 µl сперма с около 200×10^6 sperm cell/ml са прибавени 500 µl ТГ среда. Така получените преби са евклибриирани за 3 h на 4°C. След това към тях се прибавя още 500 µl ТГ среда обогатена с 9% глицерин. Мини пайетите се пълнят с 250 µl от разредената с криопротективните среди сперма. Първоначално пайетите се замразяват на парите на течен азот на -86°C за 10 min, след което се поставят в течен азот -196°C, за продължително съхранение.

Размразяването на пайетите става, чрез потапянето им в 0.9% NaCl затоплен на 39°C.

Детекция на транслокациите на ФС, чрез използването на анти-ФС антитяло (1H6)

Предварителна подготовка на предметните стъклa: на предварително обезмаслени и добре изчистени предметни стъклa се правят 2 кръга с диаметър от 1 см. Върху всяко кръгче се накапва 50 µl poly-L-lysine (Sigma), като капката трябва да се ограничи в тези ареи. Изсушаване на стайна температура. Двукратно промиване на спермалните клетки с PBS чрез центрофугиране на 300 g (мини центрофуга тип G- 320) за 3 – 5 минути за отстраняване на спермалната плазма и средите. Сuspendиране на клетките в PBS и довеждане до крайна концентрация 1×10^6 sperm cell/ml. Нанасяне на 50 µl проба върху предметните стъклa и инкубиране на стайна температура за 15 минути. Към капката се прибавя 35 µl анти-ФС антитяло и се оставя на стайна температура за 1 h. Анти-ФС антитяло се прикрепя специфично към ФС молекули, които са транслоцирани на външния полуслой на ПМ. След това капката се промива 5 x с PBS. Инкубиране с anti-mouse IgG FITC (Sigma) за 1 h на стайна температура на тъмно. Промиване 5 x с PBS, след което се поставят 30 µl PBS, капката се покрива с покривно стъкло и се наблюдава на флуоресцентен микроскоп (Laborlux K Leica) използвайки филтър λ 530 nm. Сперматозоидите с транслоциран ФС на външния монослои на ПМ показват зелена флуоресценция.

Данните са обработени вариационно-статистически по Стюдънт.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Изследвания върху преживяемостта на сперматозоидите

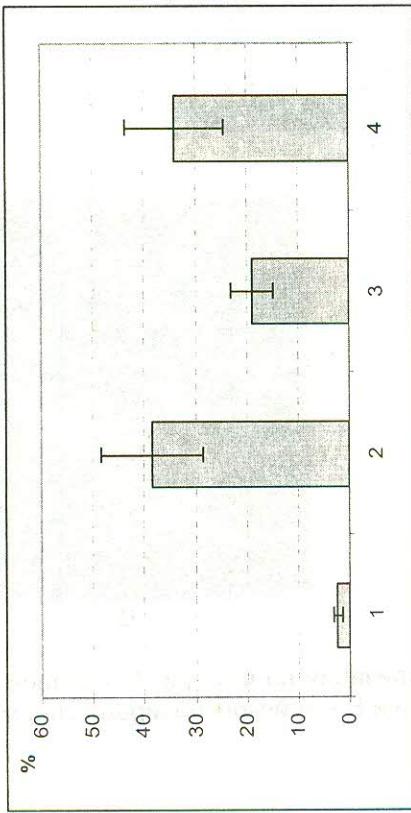
Резултатите от изследванията върху подвижността и преживяемостта на сперматозоидите са представени на Таблица 1. Установено е, че сперматозоидите от изследваните групи не показват съществени различия в първоначалната подвижност, с изключение в групата след замразяване, където достоверно е понижен % на подвижните сперматозоиди ($p < 0.001$). Известно е, че криоконсервацията и размразяването повлияват във висока степен жизнеспособността на сперматозоидите, като настъпват значителна дестабилизация на мембранныте структури и функция на гаметите. При

Таблица 1. Подвижност и преживяемост на сперматозоиди от коч

Група group	Време в минути / Time in minutes				
	10	60	120	180	240
1	80.24±2.45	80.0±4.04	75.6±3.63	50.63±6.79	40.25±4.47
2	82.5±5.00	77.5±6.61	70.0±20.61	52.5±12.65	31.25±7.53
3	73.12±8.01	71.25±10.49	58.7±18.32	30.0±5.0*	20.63±8.10
4	35.0±10.8**	30.0±8.16	30.0±8.16	21.25±6.29*	20.0±8.16

Група 1 – контрола, 2 – капацитирани сперматозоиди, 3 – UV – обльчени, 4 – сперматозоиди след криоконсервация.

* p<0.05, **p<0.001



Фигура 1. Транслокация на ФС от ГМ на сперматозоиди от коч, поставени в различни условия “*in vitro*”. 1 – контролна група, 2 – капацитирани сперматозоиди, 3 – индуцирана апоптоза, 4 – след криоконсервация.



А



Б



В

Фигура 2. Локализация на ФС при: А – капацитирани сперматозоиди; Б – облъчени с UV лъчи и В – криоконсервирани сперматозоиди.

капацитирани сперматозоиди и в контролната група не се установяват достоверни различия по отношение на промените в мотилитета на сперматозоидите. На 4-^т час от инкубацията настъпва значителен спад в процента подвижни сперматозоиди, като до 5-я час се запазват съответно $18.5 \pm 6.25\%$ подвижни сперматозоиди за контролната група и $22.5 \pm 6.89\%$ за капацитирани сперматозоиди. Тези данни са в съответствие с изследвания от други автори, според които процесът капацитация при сперматозоидите е съпроводен с промени в ПМ в областта на апикалния регион, а в същото време енергийният потенциал, необходим за осъществяването на основната функция на сперматозоида – оплождането на яйцеклетката, е съхранен.

В групата на облъчени с UV лъчи, като апоптоза индуциращ фактор се установи, че рязко спада мотилитетът на сперматозоидите на $180^{\text{-ta}}$ минута, като достига до $30.0 \pm 5.0\%$. Установени са достоверни различия по отношение на мотилитета на сперматозоидите от тази група с контролната група и групата на капацитирани сперматозоиди ($p < 0.05$). При поставянето на гамети в условия на "in vitro" индуцирана апоптоза се повлиява мотилитетът и преживяемостта, като тези параметри рязко се понижават, в сравнение с останалите групи и до 5-^т час остават само $10.88 \pm 3.66\%$ сперматозоиди със запазени активно настъпателни движения. Редица автори свързват мотилитета с оплодителния потенциал на гаметите. Намаляването на % сперматозоиди със запазени активни настъпателни движения показва, от една страна, че са намаляли клетките със съхранен енергиен потенциал, а от друга, че вероятността да се осъществи оплождане с такива еякулати се понижава значително.

Изследвания върху промените във ФЛ асиметрия на ПМ

Като маркер за начални промени в ПМ на сперматозоидите са проведените изследвания върху поведението на ФС при различни условия "in vitro" (Фигура 1). Установено е, че при свежи еякулати само незначителен брой от сперматозоидите показват поява на ФС на външния полуслой на ПМ ($2.30 \pm 0.89\%$), докато този процент нараства значително в останалите три групи.

Капацитацията е нормален физиологичен процес, при който настъпват промени в ригидността и липидната композиция на ПМ. В условия "in vitro" такива промени се индуцират под влиянието на състава на капацитиращата среда – наличието на албумин и бикарбонатни йони. С това се цели сперматозоидите да се подгответ за прикрепяне и оплождане на яйцеклетката.

На фигура 2 А е представена флуоресцентно микроскопска снимка на сперматозоиди от коч с "in vitro" индуцирана капацитация. Очевидно е наличието на транслоцирани молекули ФС на външния монослои на ПМ. От особен интерес е локализацията на молекулите ФС, която е предимно в апикалния регион на ПМ.

Наличието на бикарбонатни йони и албумин води до повишаване нивото на цАМФ, който от своя страна активира протеин киназа А зависимия път на протеин фосфорилиране [15]. Промените в ензимния статус на

сперматозоидите води до изменения в липидната архитектура на ПМ, а този момент е изключително значим за сперматозоидите, защото е свързан с моделирането на няколко важни сигнални пътища [1, 7]. Gadella and Harrison изказват становището, че въпреки появата на ФС и ФЕА на външната повърхност на ПМ не може да се твърди, че това е доказателство за включване на апоптичния механизъм понеже клетките запазват интактни митохондри и ДНК [7].

От друга страна, при UV – обльчените сперматозоиди също се наблюдават промени във фосфолипидната асиметрия на ПМ, като се регистрира екстернализация на молекули ФС на ПМ - Фигура 2 Б. От направените флуоресцентни снимки за локализацията на различни популации сперматозоиди след UV – обльчване, се установи, че транслокацията на ФС се регистрира най-вече в областта на midpiece на сперматозоидите, където са разположени митохондриите, а в отделни случаи се засяга цялата ПМ. Промените в мембранныта асиметрия на фосфолипидите се счита, че е ранен белег за апоптоза [12], понеже при тези сперматозоиди се наблюдават и промени засягащи митохондриите и ДНК.

Поведението на ФС при криоконсервация е представено на фигура 2 В. Очевидни са различията по отношение на екстернализацията на ФС на ПМ. Наблюдава се струпване на ФЛ молекули във вид на кластери по цялата ПМ. При криоконсервация в мембранията възниква преразпределение на ФЛ и белтъци, като те образуват неправилни струпвания под формата на агрегати и кластери. Те от своя страна нарушават липид-белтъчните взаимодействия и активността на мембрano свързаните ензими. Всички тези изменения водят до нарушения в нормалното функциониране на сперматозоидите и понижаване на оплодителния им потенциал [2, 14]. Замразяването и размразяването водят до нарушения във функционирането на аминофосфолипид транспортната, което причинява транслокация на ФС от вътрешния към външния монослои на ПМ и е ранен сигнал за апоптоза [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поставянето на гаметите в различни условия след еякулация, може да повлияе по различен начин на едни и същи биологични параметри. По отношение на мотилитета се установи, че неговите стойности се променят в зависимост от третирането на гаметите – криоконсервация или индуциране на апоптоза, а също и от средата за съхранение – индуцираща капацитация среда, независимо от факта, че всички проби се поставят при едни и същи условия на инкубация. В допълнение на тези твърдения е установената специфична локализация на транслоцирани молекули ФС от ПМ, което е най-ранен сигнал за предстоящи изменения в биологичната функция на сперматозоидите. Като гаметите са поставени в условия, близки до естествените физиологични условия – при капацитация напр., промените които настъпват са локализирани в апикалния регион на ПМ. Докато при “*in vitro*” индуцирана апоптоза или криоконсервация, картината коренно се различава. Промените са в областта на midpiece или засягат цялата ПМ при апоптоза, или се наблюдават специфични струпвания във вид на кластери

при криоконсервация. Следователно би могло да се отбележи, че умиращите сперматозоиди показват морфологични характеристики, които са различни от тези на клетките, със съхранен биологичен потенциал. Тези морфологични характеристики са резултат от активацията на различни ендогенни програми, които определят понататъшното поведение на сперматозоидите.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baldi E, Luconi M, Krausz C, Forti J. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Frontiers in Bioscience* 1996, 1: 189-205.
2. Barroso G, Morshed M, Oehninger S, Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2000, 15: 1338-1344.
3. Barroso G, Morshed M, Oehninger S, Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 2000, 15: 1338-1344.
4. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DWC, Zwaal RFA. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 2000 1439: 317-330
5. de Vries KJ, Wiedmer T, Smits PJ, Gadella BM. Caspase-Independent Exposure of Aminophospholipids and Tyrosine Phosphorylation in Bicarbonate Responsive Human Sperm Cells. *Biology of Reproduction* 2003, 68: 2122-2134
6. Devaux PF. Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid baitlayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1993, 3: 489-494.
7. Gadella B, Harrison RAP. Capacitation induces Cyclic Adenosine 3,5 – monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells. *Biology of Reproduction* 2002, 67:340-350.
8. Gadella BM, Harrison RAP. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 2000, 127: 2407-2420.
9. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 1999, 5:109-115.
10. Hupertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999, 200: 1-18
11. Martin SJ, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphotidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995, 182: 1545-1556.
12. Martin SJ, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphotidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995, 182: 1545-1556.
13. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison D. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Human Reproduction* 2002, 4:990-998.
14. O'Connel M, McClure N and Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction* 2002, 17(3): 704-709
15. Okamura N, Tajima Y, Sugita Y. Decrease in bicarbonate transport activities during epididymal maturation of porcine sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 1988, 157: 1280-1287.

16. Oosterhuis G.J.E, Vermes I. Apoptosis in human ejaculated spermatozoa. *J Biol Regul and Homeost Agents*. 2004; 18: 115-9.
17. Singer SJ, Nicolson GL. *Science* 1972, 175:720
18. Weng SL, Taylor S, Morshedi M, Schuffner A, Duran E, Beebe S, Oehninger S. Caspase activity and apoptotic marker in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod* 2002, 8 (11): 984.
19. Williamson P, Schlegel Ra. Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipids movement in eukaryotic cells. *Mol Membr Biol* 1994, 11: 199-216.
20. Wyllie AH, Kerr JGR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 1980 80: 251-306.
21. Vermes M, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescensein labeled Anexin V. *Immunol. Methods* 1995, 184: 39-51.
22. Yanagimachi R. Mamalian fertilization. In: *Physiology of Reproduction*. Eds Knobil E, Neill J, Raven Press, New York 1994, 189-317.
23. Vermes M, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescensein labeled Anexin V. *Immunol. Methods* 1995, 184: 39-51.