

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ В РЕГУЛЯЦІЇ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ ТА ЗАПЛІДНЕННІ У ССАВЦІВ

А. М. ШОСТЯ

Інститут свинарства ім. О. В. Квасницького УААН, Полтава, Україна;

e-mail: pigbreeding@ukr.net

В огляді розглянуто сучасні уявлення про біологічне значення активних форм кисню у процесах формування, дозрівання і зберігання спермій та їхньої рухливості. Визначено роль спермальної плазми. Показано властивість спермій продукувати вільні радикали, яким належить провідна роль у трансдукції сигналів у таких процесах, як фосфорилування тирозину протеїнів p81 і p105 у сперміях через cAMP/РКА-сигнальний шлях, активації протеїніназ і фосфатаз мембран, cAMP, які забезпечують гіперактивацію і капацитацію спермій, розвиток акросимальної реакції та проходження в ооцит, а також вплив на ці процеси різних біологічно активних речовин. Висвітлено роль різних змін рівноваги прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу у зниженні біологічної повноцінності спермій: порушенні процесів їхнього формування, здатності до запліднення, цілісності ДНК, що є однією з причин загибелі зигот, ембріонів і аномалій в потомства.

Ключові слова: вільнорадикальне пероксидне окислення ліпідів, активні форми кисню, фосфорилування тирозину, апоптоз, cAMP, антиоксиданти, спермії, капацитація, запліднення.

У продовж останнього десятиріччя накопичено значну кількість експериментальних даних щодо пошкоджувальної дії активних форм кисню (АФК) на основні процеси життєдіяльності тварин. Однак пізнання впливу цих речовин, тільки як негативного фактора, унеможлиблює всебічне розкриття значення їх у біологічних системах. Результати дослідження останніх років сприяли розкриттю і пізнанню позитивної ролі АФК у процесах формування та синтезу ензимів у м'язах, печінці, серцево-судинній системі та, особливо, у процесах розмноження. Оскільки АФК суттєво впливають на перебіг процесів запліднення, актуальним є вивчення їхньої ролі у процесах формування спермій, капацитації та розвитку ембріонів.

Ми зробили спробу узагальнити основні дані, які є в сучасній науковій літературі щодо з'ясування ролі АФК у процесах дозрівання спермій, що дозволить глибше зрозуміти деякі процеси репродукції у тварин. З'ясування окремих механізмів матиме важливе значення для глибшого розуміння процесів, які відбуваються під час потрапляння спермій у статеві шляхи самки та заплідненні, а також для розроблення підходів до регуляції їх і прогнозування.

Статеві клітини, особливо спермії, є найчутливішими до перебігу процесів вільнорадикального пероксидного окислення ліпідів

(ВРПО) в організмі тварин. Вочевидь саме АФК часто виконують сигнальну роль у регуляції життєздатності спермій [1, 2]. Однак надмірний вміст їх у зовнішньому і внутрішньому середовищах таких клітин може спричинювати порушення їхнього функціонування.

Встановлено, що джерелами АФК є мітохондрії і плазматичні мембрани спермій, а також лейкоцити. Спермії за здатністю до руху та властивістю продукувати супероксид нагадують лейкоцити, але вони відрізняються гаплоїдним набором хромосом і тим, що джерелом АФК у них є мітохондрії.

Спермії продукують АФК двома способами: 1 — на рівні плазматичних мембран NAD(P)H-оксидаза, яка продукує значно нижчі рівні цих сполук, ніж лейкоцитарна [3, 4]; 2 — на рівні мітохондріальної системи — головного джерела АФК, надлишок яких може призвести до зниження їхньої запліднювальної здатності, а у наступному — до безпліддя тварин [5]. Доведено існування негативної кореляції між порушеннями в мітохондріях і відсотком мертвих спермій [6].

Для контролю за загальним рівнем перебігу процесів пероксидації у сперміях використовують здатність їх до хемілюмінесценції. Встановлено, що рівень хемілюмінесценції вищий у плазмі сперми людей із низькою запліднювальною здатністю та підвищеною інтенсивністю пероксидації ліпідів [7, 8].

Визначення АФК у самих сперміях проводять з використанням нітросинього тетразоліа (НСТ-тесту). Антиоксидантний статус сперми оцінюють за рівнем активності супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази, а також за вмістом неензимних антиоксидантів — вітаміну Е і С, глутатіону (Glu) та продуктів пероксидного окислення — гідропероксидів ліпідів і малонового діальдегіду (MDA).

Головним джерелом токсичного продукування АФК у спермі є лейкоцити, які виділяються значною мірою простатою і сім'яними залозами. В період активізації лейкоцитів під час дихального вибуху концентрація АФК значно підвищується, що спостерігається при лейкоспермії, епідидимітах, а також різноманітних маніпуляціях зі спермою. Лейкоцити, які виділяються зі спермою, перетравлюють спермії, що загинули від апоптозу [9]. R. J. Aitken та інші [10] стверджують, що при олігоспермії інтенсивна генерація АФК відбувається зі сперміїв і лейкоцитів, а за норми — тільки з лейкоцитів.

Найчутливішими до окислювального пошкодження у сперміїв є плазматичні мембрани, особливо ті, що вкривають акросому та хвіст (у них велика кількість ненасичених жирних кислот, сильна ліпідна течія) [11, 12], і цитоплазма, в якій низька концентрація антиоксидантних ензимів [13]. У спермі тварин функцію антиоксидантного захисту виконує плазма сперми, яка вміщує значну кількість антиоксидантів, що захищають спермії від окислювального стресу, компенсуючи нестачу ендоплазматичних ензимів [14]. Плазма сперми містить СОД, каталазу, глутатіонпероксидазу та глутатіонредуктазу, які виробляються простатою та додатковими залозами, а також неензимні антиоксиданти: Glu, вітаміни С і Е [15]. Активність СОД у спермі дуже варіабельна, а глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази більш стабільні. Встановлено, що активність СОД прямо пропорційна життєдіяльності і рухливості сперміїв [16].

У процесі формування сперміїв рівень продукування кисневих радикалів сперматозоїдами значно змінюється на різних стадіях їхнього дозрівання. Доведено, що рівень генерування АФК незрілими сперміями з аномальною морфологією є досить високим [17]. Це може стати важливою причиною зниження якісних показників сперми. Спільне проходження нормальних та аномальних сперміїв від сім'яних каналців до придатка сім'яників може стати причиною окислювального пошкодження дозрілих сперміїв внаслідок

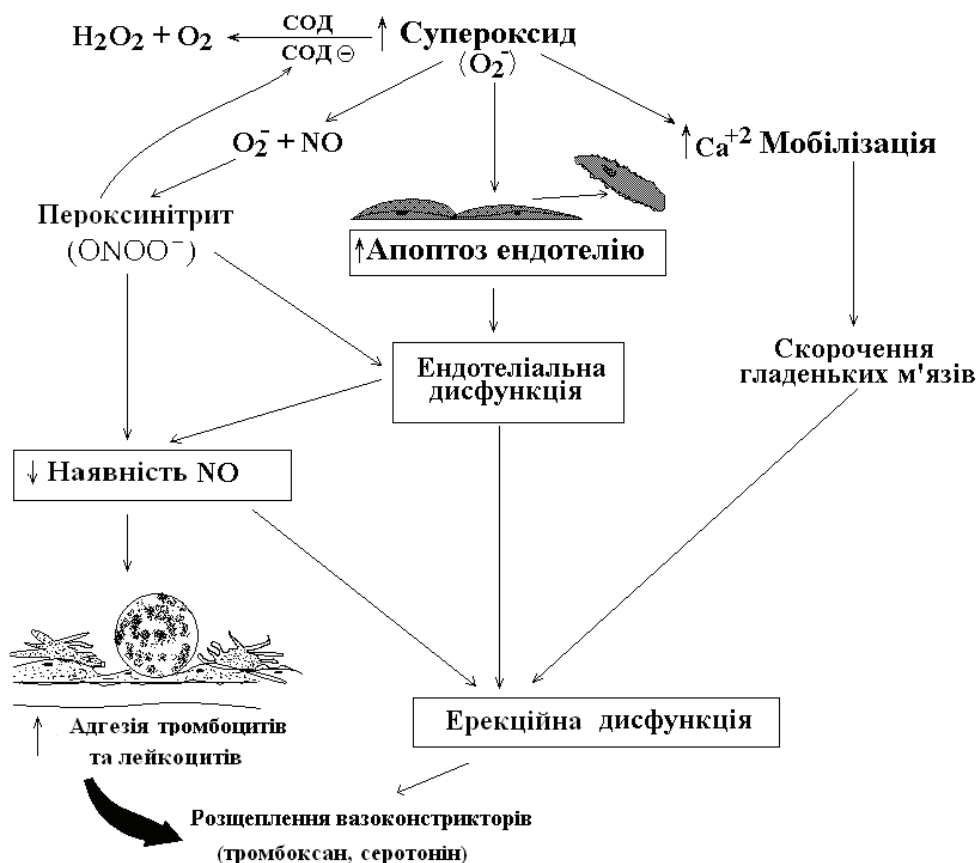
доку продукування АФК їхніми незрілими формами. Використання цієї закономірності може стати одним із шляхів, спрямованих на корекцію антиоксидантного статусу сперми внаслідок збільшення рівня антиоксидантів у мембранах дозрілих статевих клітин упродовж сперматогенезу або виділення сперміїв з непошкодженою ДНК в умовах *in vitro* методами розподілу в тих випадках, коли процеси регулювання сперматогенезу спонукають до збільшення продукування АФК незрілими сперміями [18].

Під час проходження спермія від головки до хвоста епідидиміса відбувається конденсація ядерного хроматину за рахунок формування дисульфідних зв'язків, що потребує повторного окислення та наявності NAD(P)⁺. Однак після запліднення відбувається відновлення NAD(P)⁺, що потребує NAD(P)H-мембранозв'язаної оксидази, яка може розміщатись в ядро [19].

Зниження антиоксидантних властивостей клітин епідидиміса через підвищений рівень АФК спричинює виникнення апоптозу гамет і може бути одним із основних факторів зниження їх запліднювальної здатності [20, 21] та порушення ерекційної функції у ссавців [22].

Супероксидрадикалу ($O_2^{\cdot-}$) і оксиду азоту (NO) належить провідна роль у розвитку патофізіологічних механізмів ерекційної функції тварин (рисунк) [22]. Джерелом $O_2^{\cdot-}$ у судинах кавернозних тіл є тромбоцити та лейкоцити. Цей радикал здатний впливати на мобілізацію іонів Ca^{2+} , що спричинює скорочення гладеньких м'язів, та ініціювати апоптоз ендотеліальних клітин. Останнім властива функція продукування NO — фактора, що запобігає адгезії тромбоцитів і лейкоцитів, вивільненню вазоконстрикторів (тромбоксану, серотоніну), а також здатний викликати релаксацію кавернозного гладенького м'яза, що сприяє порушенню ерекційної функції. Дані радикали здатні взаємодіяти між собою, утворюючи пероксинітрит ($OONO^{\cdot-}$), який має властивість інактивувати СОД та спричинювати, на відміну від NO, довготривалий глибокий релаксувальний ефект, що є основою порушення фізіологічного механізму ерекції.

Численні дані літератури свідчать про те, що АФК через зміну окислювально-відновного потенціалу мембран можуть бути одним із шляхів трансдукції сигналу під час апоптозу, при цьому провідна роль належить мітохондріям, ДНК яких є більш вразливою ніж ядерна [23]. Порушення функції цих органел призводить до виходу прокаспаз, цитохрому c,



Схематична модель впливу АФК на порушення ерекційної функції у тварин

апоптозіндукувального фактора в цитозоль, що спричинює апоптоз [24]. Автори вважають, що пошкоджена мітохондріальна ДНК є біологічним маркером окислювального стресу. Нещодавно було визначено, що підвищення рівня АФК сигналізує й активує гени синтезу протеїну p53, який є регулятором процесів транскрипції та спричинює дисбаланс роботи генів ДНК і може стимулювати початок апоптозу [25]. Ушкоджена ДНК спермій (найчастіше у хромосомі Y) після мейозу може потрапляти до зиготи, далі такі пошкодження викликають порушення розвитку ембріонів, переривання вагітності та виникнення різних патологій в нащадків [26, 27].

Пошкодження ДНК відбувається шляхом її гідроксидування та утворення 8-оксигуаніну, що є біологічним маркером окислювального пошкодження [28]. Встановлено статистично достовірну негативну кореляцію між рухливістю спермій та вмістом 8-оксигуаніну, а також між інтенсивністю ВРПО та рухливістю спермій. Крім цього, збільшення інтенсивності пероксидації ліпідів та рівня пошкодження ДНК

супроводжується зниженням запліднювальної здатності спермій [29, 30].

В епідидимісі сім'яного придатка від голови до хвоста спермії проходять окремі стадії дозрівання в різних умовах середовища, де можуть знаходитись досить довго. При цьому вони мають бути добре захищені від окислювального стресу, який сповільнює або погіршує дозрівання. Результати експериментів G. Haidi і C. Orper [31] свідчать про нерівномірний розподіл фосfolіпідів і ненасичених жирних кислот у різних ділянках епідидиміса. У сперміях, що містяться у хвостовій частині епідидиміса, рівень фосфатидилсерину, фосфатидилетаноламіну і сфінгомієліну вищий відносно голівки. Вміст насичених жирних кислот вищий в голівці, а ненасичених довголанцюгових кислот — у хвостовій частині.

Дослідженнями F. Tramer та інші [32] встановлено, що в голівці епідидиміса рівень глутатіонпероксидази, СОД і вітаміну Е в декілька разів вищий, ніж в його тілі та хвості, тоді як активність каталази і глутатіонредуктази у всіх ділянках майже не змінюється. Дослідниками

визначено високий рівень використання вітаміну Е у хвостовій частині епідидиміса. Таким чином, у хвостовій частині придатка перебіг процесів ВРПО відбувається більш інтенсивно.

Еякульовані спермії ссавців нездатні через певний період запліднити яйцеклітину за причини необхідності протікання ряду перетворень у статевих шляхах самки. Наявність фізіологічних рівнів АФК є необхідним фактором капацитації спермій, їхньої реакції прилипання до зони пелюциди ооцита, стимуляції процесів гіперактивації, акросомної реакції та злиття з ооцитом. Інтенсифікація перебігу ВРПО на фоні виснаження системи антиоксидантного захисту може стати причиною втрати рухливості спермій та запліднення [33], через реакції, що пов'язані з фосфорилуванням протеїнів у мітохондріях [21], пошкодження мембран та фрагментації їхньої ДНК [34].

Капацитація і акросомна реакція спермій відбувається в разі глибоких змін за інертної до транскрипції сильно конденсованої ДНК. Ці зміни досягаються шляхом модифікування протеїнів не на генетичному рівні, а через моделювання сигналами зовнішнього середовища, особливо АФК.

До регуляторів капацитації спермій поряд з АФК відносять позаклітинну сигнально-регулювальну міогенактивну протеїнкіназу (МАРК). АФК за дії на МАРК регулюють процес фосфорилування на позаклітинному рівні, що є проміжним етапом між попереднім перетворенням та наступним фосфорилуванням тирозину, пов'язаним із капацитацією [35]. Вважають, що активність МАРК є індикатором сповільнення капацитації спермій шляхом підвищення рівня O_2^- [36].

С. Lawson, S. Goupil та P. Leclerc [37] встановлено новий вид SRC-тирозин-кінази, яка знаходиться на мембранах акросоми і хвоста спермій. Активність цього ензиму зростає при капацитації та акросомній реакції, залежить від підвищення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} і стимулюється сАМР/РКА-шляхом. Саме при зменшенні активності цього ензиму знижується рівень фосфорилування цитоскелетних протеїнів p81 і p105 у мембранах головки і хвоста.

Капацитація спермій тісно корелює з активацією сАМР/РКА-залежного сигнального шляху, що призводить до фосфорилування тирозину протеїнів, які забезпечують гіперактивацію та запліднення [38].

Упродовж останніх років було з'ясовано, що АФК (O_2^- , H_2O_2) належить провідна роль у трансдукції сигналів таких процесів, як фос-

форилування протеїнів, активація протеїнкіназ мембран і сАМР [36]. Саме ці радикали регулюють процеси гіперактивації, капацитації спермій та фосфорилування тирозину в основній частині та двох протеїнів хвостової частини p81 і p105 у спермі через сАМР/РКА-сигнальний шлях [37, 39–41] та модулюється сАМР, АФК та Ca^{2+} [37].

Крім цього, фосфорилування тирозину протеїну спермій залежить від сумісної активності протеїнтирозинкіназ та протеїнтирозинфосфатаз, де перша стимулює фосфорилування, а друга — його інгібує [37]. У зниженні активності протеїнтирозинфосфатаз ключову роль відіграють АФК, які шляхом окислення в них активного центру цистеїну сповільнюють її активність, тим самим створюючи умови для підвищення рівня фосфорилування протеїнкіназою [42, 43].

Внутрішньоклітинне передавання сигналів відбувається за допомогою сАМР, який діє на комплекс залежних тирозинкіназ, які каналізують фосфорилування протеїну по залишках тирозину (Тур 518/519). Цим самим сАМР стимулює передавання сигналів на протеїнфосфатазу С-кальцій через активацію кіназ тирозину у сперміях кнурів [44].

АФК здатні ініціювати синтез сАМР та фосфорилування протеїнів. Так, доведено, що додавання NADPH-оксидази, як генератора O_2^- , що є необхідним фактором для капацитації, призводить до підвищення внутрішньоклітинної сАМР. Цьому процесу сприяє вихід внутрішньоклітинних запасів Ca^{2+} . Такі перетворення стимулюють продукування H_2O_2 , який, у свою чергу, прискорює кінази фосфорилування тирозину, забезпечуючи капацитацію [43].

Спермії, за надходження у жіночі статеві шляхи, попадають у середовище з високим вмістом вільних радикалів, що продуковані нейтрофілами. АФК часто перешкоджають зливанню ооцита зі сперміями, знижують їхню рухливість та руйнують ДНК. Однак спермії, які пройшли стадію капацитації, майже не руйнуються фагоцитами [45]. Виявлено, що навіть у разі пошкодження вільними радикалами ДНК спермії можуть проникати в ооцити [26]. У бугаїв плазма сперми за антиоксидантної властивості інгібує активність нейтрофілів і таким чином захищає спермії від пероксидного ушкодження та фагоцитозу, а також тих патогенних організмів, які мають менший потенціал ніж гамети [46].

Однією з умов злиття спермій з ооцитом є продукування власного низького рівня реак-

тивного кисню і пероксиду водню, які є необхідними відповідно при капацитації та розвитку акросомної реакції [47]. У процесі виходу АФК із сперміїв їх значно інактивують тіолові сполуки, СОД і каталаза.

Тіоловим сполукам, особливо Glu, належить провідна роль у забезпеченні окисно-відновного потенціалу мембран сперміїв. Як окремо, так і у складі глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази, Glu виконує захисну роль у разі пошкодження АФК ненасичених жирних кислот, сульфгідрильних сполук і ядерної ДНК та провідну роль у процесі конденсації хроматину сперміїв [48, 49]. Відновлення Glu у клітинах забезпечує глутатіонредуктаза, яка локалізується у клітинах Сертолі. Синтез і рівень цього ензиму дуже високий в епідидимісі, сім'явиносних протоках та передміхуровій залозі [50]. Встановлено, що рівень Glu та вітаміну С завжди вищий у спермі з високою запліднювальною здатністю [51]. Встановлено суттєвий взаємозв'язок між вмістом Glu у плазмі і рухливістю сперміїв, що складає $r = 0,50$ [52].

Glu, як сильний внутрішньоклітинний антиоксидант, є необхідним для процесу деконденсації ядерного хроматину у спермі і овульованих ооцитах хом'яка. Він також активно втручається у процес розходження материнських хромосом і формування другого полярного тільця в ооцитах. Цю закономірність підтверджено дослідженнями В. Jeong і Х. Yang [53], Н. Funahashi і Т. Sano [54], G. Stradaol та ін. [55], в яких використання цистеїну, як окремо так і у комплексі з Glu, як компонентів середовища, покращує процеси дозрівання ооцитів та сперміїв у свиней, а при заплідненні сприяє кращому розвитку бластоцист та проходженню процесів дроблення.

Ензим СОД підтримує баланс між супероксидом і пероксидом, однак високі концентрації цих метаболітів пов'язано зі сповільненням рухливості сперміїв [56], пошкодженням ДНК та зниженням рівня капацитації [57]. Виявлено, що активність цього ензиму у сперміях негативно корелює із їхньою рухливістю та злиттям з ооцитами, а позитивно — з прискоренням ВРПО [58].

Продуктування достатньої кількості пероксиду сперміями може відбуватись в умовах низького рівня каталази у спермі, активність якої знаходиться під генетичним контролем, а рівень успадкування складає $r = 0,48$ [59]. Введення каталази до складу середовища для розбавлення сперми сприяє покращенню їхньої життєздатності, підвищує рівень акросомної

реакції та знижує рівень фрагментації ДНК [60, 61]. Додавання цього ензиму в середовище зі сперміями призводить до сповільнення розвитку акросомної реакції, а наступне введення пероксиду водню прискорює її протікання. Отже, генеровані сперміями пероксидази відіграють важливу роль у розвитку капацитації, а можливо і мембранній реорганізації, що сприяє полегшеному злиттю ооцита після екзоцитозу акросоми [62].

Серед найбільш частих причин, що викликають інтенсифікацію процесів ВРПО, є варикозне розширення вен сім'яного канатика. Воно супроводжується зменшенням кількості антиоксидантів у плазмі сперми, пошкодженням ДНК, збільшенням вмісту діоксигуаніну, апоптозом сперматид та зниженням запліднювальної здатності сперміїв [63–66]. Налаштування нормального кровотоку по венах сім'яного канатика призводить до зниження рівня MDA, пероксиду водню і 8-оксидигуаніну у плазмі сперми та зростання СОД, каталази, глутатіонпероксидази і вітаміну С [67, 68].

За вмістом АФК у плазмі сперми можна прогнозувати фертильність у тварин, а їхній рівень є незалежним маркером безпліддя [69]. Сперма, яка характеризується високою запліднювальною здатністю сперміїв за високого рівня АФК і системи антиоксидантного захисту, забезпечує нормальне запліднення, а виснаження останньої може викликати безпліддя [70, 8]. При цьому значно зростає вміст 8-гідроксил-2-деоксигуанозину, який є сигнальною молекулою пошкодження ДНК, а додатковим підтвердженням те, що концентрація Glu, антиоксиданту, в людини є низькою при безплідді [71]. Введення пацієнтам відновленої форми Glu до сперми знижує пошкодження їхніх мембран [72].

При олігоспермії в людей відзначається надвисока концентрація реактивних кисневих радикалів у спермі, в результаті чого при заплідненні *in vitro* отримують низький результат. Це пов'язано з кисневим пошкодженням сперміїв. Інкубація таких сперміїв у 5%-му атмосферному кисні сприяє зростанню, порівняно з 20%-м, рівня гіперактивації і настанню акросомної реакції, що підтверджено дослідженнями [73, 74].

Доведено, що рівень MDA у спермі може стати інформативним біохімічним індексом її якості. Так, при використанні штучної стимуляції ВРПО кількість MDA зростає з паралельним зниженням рухливості сперміїв ($r = -0,62$). Така закономірність спричинена деструктивними змінами мембран сперміїв. Автори вважа-

жають, що рухливість і патологічні зміни у сперміях та в'язкість сперми тісно пов'язані з пероксидацією ліпідів [75–77].

Одним із перспективних напрямків біотехнології останніх десятиріч є дослідження властивостей еякульованої сперми та її збереження. Для стимуляції процесів ВРПО в умовах *in vitro* використовують FeSO_2 , аскорбат натрію та ксантиноксидазу. Культивування спермій з ксантиноксидазою протягом години призводить до зростання АФК (особливо пероксидів) та пошкодження ДНК шляхом фрагментації, а додавання антиоксидантів сприяє репарації та відновленню їхньої рухливості [78, 79].

Досліди за введення глюкози, Glu і глутатіонтрансферази в середовище для культивування сперми показали зниження рівня продукту пероксиду і альдегідів та сповільнення настання апоптозу, що сприяє її збереженню [80, 81].

Додавання в середовище для інкубування аскорбінової кислоти та токоферолу суттєво знижує рівень пошкодження ДНК, спричинених наявністю АФК у сперміях [82]. Введення цих речовин у культуральне середовище після запліднення призводить до збільшення відсотка утворених бластоцист [83]. Цю закономірність підтверджують результати експериментів [84], в яких визначено, що включення до складу розбавника сперми α -токоферолу у процесі збереження сприяє зменшенню накопичення MDA та зниженню окислення ненасичених жирних кислот 22:6 n-3, що містяться в фосфоліпідах — структурних компонентах спермій. Однак, на відміну від наведених даних, було встановлено, що введення згаданих вітамінів безпосередньо в середовище для культивування спермій бика та коня при заплідненні інколи не впливає або знижує результати, одержані в умовах *in vitro* [85, 86].

Іншим важливим питанням, що потребує вирішення, є зниження рівня пошкоджувальної дії АФК, які інтенсивно утворюються в разі заморожування та розморожування спермій і можуть бути головною причиною пошкодження мембран та втрати їхньої рухливості [87]. Встановлено існування негативної кореляції у спермі барана між інтенсивністю перебігу ВРПО та рухливістю, відсотком життєздатних спермій і ступенем пошкодження ДНК [88, 89]. Додавання до розбавника токоферолу, Glu і СОД є ефективним при проведенні цих маніпуляцій зі спермою [90–92].

Розбавлення або заморожування сперми кнура знижує рухливість і життєздатність спермій [91]. Однак введення в розріджувач Glu,

як антиоксиданта, дозволяє значною мірою знизити негативні ефекти [90]. Охолодження спермій цього виду тварин до температури 5 °С призводить до пошкодження мембрани, а при 15 °С ці явища не спостерігаються [93]. Однак у процесі зберігання сперми кнура при 18 °С упродовж 3 діб спостерігається уповільнення рухливості спермій, зниження у 2 рази мембранного потенціалу, а також підвищення рівня апоптозу в 3 рази. Встановлено негативну кореляцію між вмістом MDA, рухливістю і відсотком живих спермій, що складає -0,97 [94]. Додавання вітамінів С та Е до сперми при 24-годинній інкубації сприяє збереженню рухливості та зменшує утворення продуктів пероксидації. Така закономірність зберігається на 3-й і 4-й день інкубування та після кріоконсервації [95].

Схожу закономірність визначено в биків, де зберігання спермій упродовж 72 годин при 4 °С супроводжується зростанням вмісту MDA в 4 рази. Кількість MDA в цих клітинах негативно корелює з активністю СОД, глутатіонпероксидази, рухливістю і життєздатністю спермій. Проте в буйвола встановлено меншу активність цих ензимів та більший рівень перебігу процесів ВРПО [96].

У жеребців додавання аскорбінової кислоти до розбавника сперми після розведення в період зберігання при температурі 5 °С, значно збільшує відсоток непошкоджених мембран спермій ($P < 005$), а введення СА позитивно впливає на їхню рухливість і цілісність [97].

На перебіг процесів ВРПО впливають такі зовнішні фактори, як центрифугування і промивання. У процесі центрифугування значно збільшуються рівні продукту АФК і перебігу процесів пероксидації, особливо при повторних циклах, які застосовуються для підготовки сперми, що можуть спричинювати зниження рухливості спермій і фрагментацію ДНК [32, 14].

Наведені результати досліджень свідчать про те, що спермії у процесі проходження через придаток сім'яника, підлягають впливу ряду структурних перебудов: зміни складу та потенціалу мембран, конденсації хроматину, набуття властивості до руху. Всі перетворення відбуваються за участю АФК та під динамічним контролем прооксидантно-антиоксидантної системи. АФК, що генеровані сперміями, належить провідна роль у трансдукції сигналів у процесах фосфорилування тирозину білків p81 і p105 через cAMP/PKA — сигнальний шлях, активації протеїнкіназ та фосфатаз мембран, cAMP, що забезпечує їхню гіпер-

активацію, капацитацію, розвиток акросомної реакції та проходження в ооцит. Будь-які зміни рівноваги призводять до підвищення рівня АФК, які безпосередньо впливають на зниження біологічної повноцінності спермійв: порушення процесів їх формування, здатності до запліднення, цілісності ДНК, як однієї з основних причин загибелі зигот, ембріонів і аномалій в нащадків.

Подальші дослідження щодо розкриття механізмів дії АФК на сперматогенез у ссавців та впливу різних біологічно активних речовин на ці процеси, сприятимуть поглибленню уявлень щодо біологічного значення цих сполук в організмі, а також пошуку ефективних методів і препаратів спрямованого впливу на формування й дозрівання спермійв, їх зберігання поза організмом та запліднення ооцитів.

РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РЕГУЛЯЦИИ СПЕРМАТОГЕНЕЗА И ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

А. М. Шостя

Институт свиноводства им. А. В. Квасницкого
УААН, Полтава, Украина;
e-mail: pigbreeding@ukr.net

В обзоре рассмотрены современные представления о биологическом значении активных форм кислорода в процессах формирования, созревания и сохранения спермиев, а также их активности. Раскрыта роль спермальной плазмы. Показана способность спермиев производить свободные радикалы, которые играют значительную роль в трансдукции сигнала в процессах фосфорилирования тирозина белков р81 и р105 в спермиях через сАМР/РКА — сигнальный путь, активации протеинкиназ и фосфатаз мембран, сАМР, которые обеспечивают гиперактивацию и капацитацию спермиев, развитие акросомной реакции, проникновение ооцита, а также влияния различных биологически активных веществ на эти процессы.

Рассмотрена роль различных изменений равновесия прооксидантно-антиоксидантного гомеостаза и снижение биологической полноценности спермиев: нарушение процессов их формирования, способности к оплодотворению, целостности ДНК — одной из причин гибели зигот, эмбрионов и аномалий у потомства.

Ключевые слова: свободнорадикальное пероксидное окисление липидов, активные формы кислорода, фосфорилирование тирози-

на, апоптоз, сАМР, антиоксиданты, спермии, капацитация, оплодотворение.

ROLE OF ACTIVE OXYGEN FORMS IN SPERMATOGENESIS REGULATION AND FERTILIZATION IN MAMMALS

A. M. Shostya

Kvasnitsky Institute of Pig Breeding, Ukrainian
Academy of Agricultural Sciences, Poltava, Ukraine;
e-mail: pigbreeding@ukr.net

S u m m a r y

Modern ideas about biologic value of active oxygen forms in the processes of spermatozoon forming, maturation, preservation and mobility are considered in the review. Spermatozoons' ability to produce free radicals is shown. They play significant role in signal transduction in the processes of: tyrosine phosphorylation of p 81 and p 105 proteins in spermatozoons through cAMP/PKA signal path; protein kinase and membrane phosphatase, cAMP activation which promote hyperactivation and capacitation of sperm, their acrosome reaction, oocyte entry and also influence of different biologically active substances on the processes.

It is taken into consideration the role of different changes of the balance of prooxidative-antioxidative homeostasis in decreasing the biologic value of sperm cells: disturbance of formation processes, to fertilization ability, DNA integrity — one of the reasons for death of zygotes, embryos and malformities in the progeny.

Key words: free radical lipid peroxidation, active oxygen forms, antioxidants, cAMP, apoptosis, phosphorylation of tyrosine, sperm cells, capacitation, fertilization.

1. Hensley K., Robinson K. A., Gabbita S. P. et al. // Free Rad. Biol. Med. — 2000. — **28**, N 10. — P. 1456–1462.
2. Forman H. J. // Ibid. — 2007. — **42**, N 7. — P. 926–932.
3. Vernet P., Fulton N., Wallace C., Aitken R. J. // Biol. Reprod. — 2001. — **65**. — P. 1102–1113.
4. Sabeur K., Ball B. A. // Reproduction. — 2007. — **134**. — P. 263–270.
5. Agarwal A. A., Prabakaran S. A., Said T. M. // Andrology. — 2005. — **26**, N 6. — P. 654–660.
6. Donnelly E. T., O'Connell M., McClure N. // Hum. Reprod. — 2000. — **15**, N 7. — P. 1552–1561.
7. Zalata A., Hafez T., Comhair F. // Ibid. — 1995. — **10**. — P. 1444–1451.

8. Smith R., Vantman D., Ponce J., Escobar J. // *Ibid.* — 1996. — **11**. — P. 1655–1660.
9. Ricci G., Petricarari S., Giolol E., Canova S. // *Ibid.* — 2002. — **17**, N. 10. — P. 2665–2672.
10. Aitken R. J., Buckingham D., West K. et al. // *J. Reprod. Fertil.* — 1992. — N 94(2). — P. 451–462.
11. James P. S., Wolfe C. A., Mackie A., Ladha S. // *Hum. Reprod.* — 1999. — **14**, N 7. — P. 1827–1832.
12. Kankofer M., Kolm G., Aurich J., Aurich C. // *Theriogenology.* — 2005. — **63**, N 5. — P. 1354–1365.
13. Storey B. T., Alvarez J. G., Thomson K. A. // *Mol. Reprod. Dev.* — 1998. — **49**, N 4. — P. 400–407.
14. Potts R. J., Notarianni L. J., Jefferies T. M. // *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* — 2000. — **447**, N 214. — P. 249–256.
15. Saleh R. A., Agarwal A. // *J. Androl.* — 2002. — **23**, N 6. — P. 737–752.
16. Storey B. T. // *Mol. Hum. Reprod.* — **3**. — P. 203–213.
17. Sikka S. C. // *Front. Biosci.* — 1996. — **1**. — P. 78–86.
18. Gil-Guzman I. E., Ollero M. C., Lopez M. C. et al. // *Hum. Reprod.* — 2001. — **16**, N 9. — P. 1922–1930.
19. Chapman J. C., Michael S. D. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* — 2003. — N 1. — P. 1–20.
20. Vicari E. // *Hum. Reprod.* — 2001. — **15**, N 12. — P. 2536–2544.
21. Folgero T., Bertheussen K., Lindal S. et al. // *Ibid.* — 1993. — **8**. — P. 1863–1868.
22. Agarwal A., Nandipati K. C., Sharma R. K. et al. // *Andrology.* — 2006. — **27**, N 3. — P. 136–138.
23. Bennetts L. E., Aitken R. J. // *Mol. Reprod. Dev.* — 2005. — **71**. — P. 77–87.
24. Kannan K., Jain S. // *Pathophysiology.* — 2000. — **7**, N 3. — P. 153–163.
25. Liu B., Chen Y., Clair D. K. // *Free Rad. Biol. Med.* — 2008. — **44**, N 8. — P. 1529–1535.
26. Aitken R. J., Gordon E., Harkiss D., Tivigg J. P. // *Biol. Reprod.* — 1998. — **59**. — P. 1037–1046.
27. Tremellen K. // *Hum. Reprod.* — 2008. — **14**, N 3. — P. 243–258.
28. Meseguer M., Conejero J. A., O'Connor E. et al. // *Fertil. Steril.* — 2008. — **89**, N 5. — P. 1191–1199.
29. Kao S. H., Chao M. D., Chen H. W. et al. // *Ibid.* — P. 1183–1190.
30. Kasimanickam R., Kasimanickam V., Thatcher C. D. et al. // *Theriogenology.* — 2007. — **67**, N 5. — P. 1004–1012.
31. Haidi G., Oppen C. // *Hum. Reprod.* — 1997. — N 12. — P. 2720–2723.
32. Tramer C., Rocco F., Micali F. // *Biol. Reprod.* — 1998. — **59**. — P. 753–758.
33. Rhemrev J. P., Vermedenl P., Haenen G. R., Rekers-Mombarg J. J. // *Andrologia.* — 2001. — **33**, N 3. — P. 151.
34. Donnelly E. T., McClure N., Lewis S. M. // *Mutagenesis.* — 2000. — **15**, N 1. — P. 61–68.
35. O'Flaherty C., Lamirande E., Gagnon C. // *Biol. Reprod.* — 2005. — **73**. — P. 94–105.
36. Lamirande E., Gagnon C. // *Mol. Hum. Reprod.* — 2002. — **8**, N 2. — P. 124–135.
37. Lawson C., Goupi S., Leclerc P. // *BOR Papers in Press.* Published on June 18, 2008 as DOI:10.1095/biolreprod.108.070367.
38. Ecroyd H., Asquith K. L., Jones R. C., Aitken R. J. // *Dev. Biol.* — 2004. — **268**, N 1. — P. 53–63.
39. Roy S. C., Atreja S. K. // *Anim. Reprod. Sci.* — 2008. — **9**. — P. 68–84.
40. Kierszenbaum A. L. // *Mol. Reprod. Dev.* — 2006. — **73**. — P. 399–403.
41. Grasa P., Cebrión-Pérez J. B., Muico-Blanco T. // *Reprod. Fertil.* — 2006. — **132**. — P. 721–732.
42. Tonks N. K. // *Cell.* — 2005. — **121**, N 5. — P. 667–670.
43. Ford W. C. // *Hum. Reprod.* — 2004. — **10**, N 5. — P. 387–399.
44. Harayama H., Murase T., Miyake M. // *Andrology.* — 2005. — **26**, N 6. — P. 732–740.
45. Oren-Benaroya R., Kipnis J., Eisenbach M. // *Hum. Reprod.* — 2007. — **22**, N 11. — P. 2947–2955.
46. Gilbert R. O., Fales M. H. // *Theriogenology.* — 1996. — **46**, N 4. — P. 649–658.
47. Roy S. C., Atreja S. K. // *Anim. Reprod. Sci.* — 2008. — **103**, N 3–4. — P. 260–270.
48. Bansal A. K., Bilaspuri G. S. // *Ibid.* — 2008. — N 3. — P. 398–404.
49. Pfeifer H., Conrad M., Roethlein D. // *Theriogenology.* — 1999. — **52**, N 2. — P. 289–301.
50. Kaneko T., Luchi Y., Kobayashi T., Fujii T. // *Eur. J. Biochem.* — 2002. — **269**. — P. 1570–1578.
51. Lewisa S. E., Sterlinga E. S., Younga I. S. // *Fertil. Steril.* — 1997. — **67**, N 1. — P. 142–147.
52. Maarten T., Raijmakers M., Hennie M., Roelofs M. // *Ibid.* — 2003. — **79**, N 1. — P. 169–172.
53. Jeong B., Yang X. // *Mol. Reprod. Dev.* — 2001. — **59**, N 3. — P. 330–335.
54. Funahashi H., Sano T. // *Theriogenology.* — 2005. — **63**, N 6. — P. 1605–1616.
55. Stradaoli G., Noro T., Sylla L., Monaci M. // *Theriogenology.* — 2007. — **67**, N 7. — P. 1249–1255.

56. Aitken R. J., Buckingham D. W., Carrerasb A. // Free Rad. Biol. Med. — 1996. — **21**, N 4. — P. 495–504.
57. Cyrdoba M., Mora N., Beconi M. T. // Theriogenology. — 2006. — **65**, N 4. — P. 882–892.
58. Aitken R. J., Buckingham D. W., Carreras A., Irvine D. S. // Free Rad. Biol. Med. — 1996. — **21**, N 4. — P. 495–504.
59. Foote R. H., Hare E. // Andrology. — 2000. — **21**, N 5. — P. 664–668.
60. Chi H. J., Kim J. H., Ryu C. S. et al. // Hum. Reprod. — 2008. — **23**, N 5. — P. 1023–1028.
61. Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E. et al. // Theriogenology. — 2007. — **68**, N 2. — P. 204–212.
62. Bize I., Santander G., Cabello P. et al. // Biol. Reprod. — 1991. — **44**. — P. 398–403.
63. Shiou-Sheng C. // Ibid. — 2002. — **17**, N 3. — P. 718–725.
64. Sharma R. K., Pasqualotto F. F., Nelson D. R., Thomas A. J. // Ibid. — 1999. — **14**, N 11. — P. 2801–2807.
65. Wiwanitkit V. // Andrologia. — 2008. — **40**, N 3. — P. 192–194.
66. Turener T., Lysiak J., Midorikawa K., Kawanishi S. // Andrology. — 2008. — **29**. — P. 620.
67. Mostafa T., Anis T. H., El-Nashar A. et al. // Andrology. — 2001. — **24**, N 5. — P. 261.
68. Chen S. S., Huang W. J., Chang L. S., Wei Y. H. // Urology. — 2008. — **179**, N 2. — P. 639–642.
69. Agarwal A., Sharma R. K., Nallella K. P. et al. // Fertil. Steril. — 2006. — **86**, N 4. — P. 878–885.
70. Rakesh K., Pasqualotto F., Nelson D. // Hum. Reprod. — 1999. — **14**, N 11. — P. 2801–2807.
71. Ochsendorf F. R., Buhl R. // Ibid. — 1998. — **13**. — P. 353–359.
72. Lenzi A., Picardo M., Gandini L. et al. // Ibid. — 1994. — **9**. — P. 2044–2050.
73. Griveau J. F., Grizard G., Boucher D. // Ibid. — 1998. — **13**. — P. 3108–3113.
74. Emmen J. M., McLuskey A., Grootegeed J. A., Brinkmann A. O. // Ibid. — P. 1272–1280.
75. Rao S. // Gamete Res. — 1989. — **4**, N 2. — P. 127–134.
76. Tavalani H., Doosti M., Saeidi H. // Clin. Chim. Acta. — 2005. — **356**, N 1–2. — P. 199–203.
77. Aydemir B., Onaran I., Kiziler A. R. et al. // Andrology. — 2008. — **29**, N 1. — P. 35–40.
78. Lopes S., Jurisicova A., Sun J., Casper R. // Hum. Reprod. — 1998. — **13**. — P. 896–900.
79. Baumber J., Ball B. A., Gravance C. et al. // Andrology. — 2000. — **21**, N 6. — P. 895–902.
80. Agostinellia E., Przybytkowskib E., Averill-Batesb D. // Free Rad. Biol. Med. — 1996. — **20**, N 5. — P. 649–656.
81. Kondala A. V., Shaha C. // Ibid. — 2000. — **29**, N 10. — P. 1015–1027.
82. Hughes C. M., Lewis S. E., McKelvey-Martin V. J. // Hum. Reprod. — 1998. — **13**. — P. 1240–1247.
83. Hossein M. S., Hashem M. A., Jeong Y. W. et al. // Anim. Reprod. Sci. — 2007. — **7**. — P. 107–117.
84. Cerolinia S., Maldjianb A., Suraib P., Nobleb R. // Ibid. — 2000. — **58**, N 1–2. — P. 99–111.
85. Dalvita C., Cetica P. D., Beconia M. T. // Theriogenology. — 1998. — **49**, N 3. — P. 619–627.
86. Balla B. A., Medinab V., Gravancea C. G., Baumbera J. // Ibid. — 2001. — **56**, N 4. — P. 577–589.
87. Chatterje E. E., Gagnon C. C. // Mol. Reprod. Dev. — 2001. — **59**, N 4. — P. 451–458.
88. Kasimanickam R., Pelzer K., Kasimanickam V. et al. // Theriogenology. — 2006. — **65**, N 7. — P. 1407–1421.
89. Peris S. I., Bilodeau J. F., Dufour M., Bailey J. L. // Mol. Reprod. Dev. — 2007. — **74**. — P. 878–892.
90. Gadea J., Sellés E., Marco M. A. et al. // Theriogenology. — 2004. — **62**, N 3–4. — P. 690–701.
91. Breininger E., Beorlegui N. B., O'Flaherty C. M., Beconi M. T. // Theriogenology. — 2005. — **63**. — P. 2126–2135.
92. Foote R. H., Brocketta C. C., Kaprothb M. T. // Anim. Reprod. Sci. — 2002. — **71**, N 1–2. — P. 13–23.
93. Maxwell W. M., Johson L. A. // Theriogenology. — 1997. — **48**, N 2. — P. 451–458.
94. Kumaresan A., Kadirvel G., Bujarbaruah K. et al. // Anim. Reprod. Sci. — 2008. — **1**. — P. 13.
95. Golden C., Rosenkrans C. // Anim. Sci. — 2002. — **80**, N 2. — P. 10.
96. Nair S. J., Brar A. S., Ahuja C. S. et al. // Anim. Reprod. Sci. — 2006. — **96**, N 1–2. — P. 21–29.
97. Aurich J. E., Hoppe H. // Theriogenology. — 1997. — **48**, N 2. — P. 185–192.

Отримано 09.04.2008