

ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ПІДВИЩЕННЯ ФЕРТИЛЬНОСТІ СПЕРМІЇВ І ОДЕРЖАННЯ ЯКІСНІШОГО ПОТОМСТВА З ВИКОРИСТАННЯМ КРІОБІОЛОГІЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Рецензенти: доктор біол.наук, професор Бугров О.Д.; доктор біол. наук Розанов Л.Ф.

В.І. Грищенко, Е.І. Алексєєвська

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Ф.І. Осташко

Інститут тваринництва УААН

Вивчені основні механізми принципово нового напрямку в біології, медицині і тваринництві - кріооновлення (програмоване життя клітини при дії низьких і наднизьких температур та кріоконсервування). Кріооновлення - протипага апоптозу (програмована загибель клітини). Основні механізми кріооновлення - експресія генів-холодової адаптації, індукція білків холодового шоку, деконденсація хроматину, входження цитохрому С у мітохондріальний матрикс, стимулююча дія антиоксидантів, гальмуючих апоптоз.

Підвищення фертильності спермій та отримання більш якісного потомства з використанням кріобіологічних технологій обумовлене зміщенням динамічної взаємодії апоптозу та кріооновлення у напрямі кріооновлення.

Ключові слова: спермії, кріоконсервування, цитохром С, апоптоз, кріооновлення.

За допомогою низьких температур і кріоконсервування можна зберігати біологічні об'єкти в життєздатному стані. Однак в останні роки у зв'язку з екологічними, радіаційними й іншими проблемами їхній вихідний рівень не може бути еталоном якості. Проблема підвищення фертильності спермій і одержання більш якісного потомства потребує розвитку принципово нового напрямку в сільському господарстві - кріооновлення (програмоване життя клітини під дією низьких, наднизьких температур і кріоконсервування). Кріооновлення є протипагою апоптозу (програмованої загибелі клітин).

З огляду на вищезгадане, вперше в історії кріобіологічної науки було поставлено питання, що за допомогою низьких, наднизьких температур і кріоконсервування можна не тільки зберегти, але і поліпшити морфологічно-функціональні властивості біологічних об'єктів. Тому, найактуальнішим на сьогодні є вивчення механізмів, що лежать в основі підвищення фертильності охолоджених і кріоконсервованих спермій різних видів тварин, для одержання більш якісного потомства. У зв'язку з вищевикладеним цей оригінальний фундаментальний напрям відноситься до пріоритетних розробок у вітчизняній і світовій літературі.

У даний час існує ряд передумов підвищення фертильності спермій і одержання більш якісного потомства з використанням кріобіологічних технологій у різних галузях сільського господарства. Так, у птахівництві, згідно з даними, отриманими в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, при збереженні кріоконсервованої сперми півнів протягом півроку і 9 років запліднюваність яєць збільшилася на 6 і 3%, відповідно [12]. Виводимість яєць також підвищилася на 8 і 10 %. Дані, отримані в університеті ім. Гумбольда, свідчать про те, що при використанні сперми генофондних півнів запліднюваність складала 87,5-97,2 % [46]. За цими показниками кріоконсервована сперма не

тільки не поступалася, але навіть трохи перевершувала свіжу сперму півнів тих же генотипних ліній. У рибному господарстві російські вчені встановили, що життєздатність розморожених спермій сибірського осетра і коропа складала 10-40 %, на відміну від свіжозаготовлених (90-100 %) [21]. Однак при заплідненні ікри розмороженими сперміями значно зріс відсоток викльовування личинок з ікри і їхня середня маса. Молодь коропа, отримана в результаті запліднення замороженою спермою, також відрізнялася більш високим рівнем гематологічних і біофізичних параметрів, а також підвищеною імунологічною реактивністю.

Підвищення якості потомства з використанням кріобіологічних технологій – загально біологічне явище. Так, російські вчені показали, що у потомства щурів, отриманого після кріоконсервування ембріонів гіпертензивних пацюків і трансплантації цих ембріонів нормотензивним реципієнтам, артеріальний тиск був істотно нижчий, ніж у пацюків вихідної гіпертензивної популяції [24]. Причому, цей ефект повторився в наступному поколінні. Нещодавно аналогічні дані були отримані в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у тварин (собаки). Потомство, яке було отримано після запліднення яйцеклітини кріоконсервованими сперміями, відповідно до патенту [26], характеризувалося високою життєздатністю з відсутністю ознак анемії, що має місце при використанні традиційних методів.

У дійсній роботі нами теоретично обґрунтоване підвищення фертильності спермій і одержання більш якісного потомства з позиції двох найважливіших різноспрямованих феноменів у клітинній біології – апоптозу і кріооновлення.

Апоптоз: основні механізми при дії гіпотермії та кріоконсервування.

У багатоклітинних організмів – тварин, рослин і грибів генетично закладено програму загибелі клітин. Апоптоз – природний процес, що відбувається при нормальній життєдіяльності багатоклітинного організму. Він регулює форму і розвиток організму за визначеними стадіями життєвого циклу, сприяє збереженню порядку і нормального функціонування біологічних систем, очищуючи від непотрібних, хворих, що закінчили свій життєвий цикл, чи з'явилися в результаті мутацій, потенційно небезпечних клітин. Слід зазначити, що проблемі загибелі клітин вченими наділялося значно менше уваги, ніж іншим етапам життєвого шляху клітини. Разом із тим, перші висловлювання щодо існування процесу загибелі клітин у багатоклітинному організмі з'явилися ще наприкінці XIX століття. Однак роком визнання апоптозу, як фізіологічного явища, вважається 1972 рік, коли англійські дослідники J.F Kerr, Wylie, Currie [35] представили переконливі морфологічні докази існування цього явища Термін «апоптоз» (від грецького «apoptosis» – обпадання листів) служить для характеристики процесу, протилежного мітозу. Він позначає сукупність реакцій клітинної загибелі, регульованих внутрішньою генетичною програмою. Основним сигналом більшості форм апоптозу є порушення регуляції процесу нормального клітинного циклу.

Апоптоз відіграє важливу роль у процесі ембріонального й онтогенетичного розвитку. Він спостерігається при різних морфологічних процесах. Порушення апоптозу в ембріогенезі може призводити до внутрішньоутробної загибелі плоду, чи уроджених каліцтв, різних захворювань, у тому числі й злоякісних новоутворень. У дорослому організмі апоптоз розповсюджений у різних типах тканин. При патологічних станах шляхом програмованої клітинної загибелі відбувається видалення клітин, виживання яких небажане для організмів, наприклад, мутантних клітин, чи клітин, заражених

вірусом. В останньому випадку цей процес має важливе біологічне значення, оскільки фрагментація ДНК попереджає про перенесення генетичного матеріалу в інші клітини.

Таким чином, апоптоз є широко розповсюдженим загальнобіологічним механізмом, відповідальним за підтримку сталості чисельності клітин, формування, вибракування дефектних клітин. У здоровому організмі апоптоз є механізмом для підтримки гомеостазу. Як гіпофункція, так і гіперфункція апоптозу призводять до порушення гомеостазу. Апоптоз може включитися в умовах глибокого охолодження різних біологічних об'єктів, зокрема, у паренхімальних і ендотеліальних клітинах печінки [43], а також у стовбурових кровотворних клітинах. При цьому він може відігравати як позитивну роль (знищувати ушкоджені клітини), так і негативну – знищувати і збережені клітини.

У даний час добре вивчені деякі механізми програмованої загибелі клітини. Основні механізми апоптозу – це процеси, пов'язані з конденсацією хроматину [44-45]. Хроматин, що у нормі представлений відкритими і конденсованими областями (гетеро- і еухроматин), стає суперконденсованим у формі півмісяця по периферії ядра. У цей момент починається фрагментація ДНК, структурні перетворення нуклеїнових кислот [4] порушення ДНК/ядерних білкових зв'язків, розриви ниток ядерної ДНК з її фрагментацією [49] та наступним розпадом ядра на частини. На ранніх етапах апоптозу клітина зморщується, втрачаючи до 1/3 свого об'єму за кілька хвилин. Механізм цього явища до тепер не вивчений, але, безсумнівно, у цей процес повинні включатися транспорт іонів і води. Особливістю цього процесу є зморщування цитоплазматичної мембрани, утворення складок. Надалі процеси апоптозу супроводжуються фрагментацією клітини на мембранні везикули з внутрішньоклітинним вмістом (апоптозні тільца), які фагоцитуються макрофагами і клітинами-сусідами.

Важливим механізмом апоптозу є вивільнення цитохрому С з мітохондрій з наступним роз'єднанням сполучення окисного фосфорилування і дихання. У цілому, стосовно клітин тварин і людини апоптотичні реакції пов'язані зі вивільненням цитохрому С із мітохондріальних мембран із наступною протеолітичною активацією каскаду каспаз – сімейства еволюційно-консервативних цистеїнових протеаз, що специфічно розщеплюють білки після залишків аспарагінової кислоти. Закордонні вчені показали, що втрата мітохондріальними мембранами цитохрому С в результаті зміни проникності клітинних мембран призводить до інфертильності чоловіків і, тим самим, підтвердили значимість феномену кріооновлення для підвищення якості й фертильності спермій людини, що являє собою принципово новий підхід у вивченні механізмів дії факторів кріоконсервування [50].

У 1976 р. в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України вивчений механізм кріоушкодження, у якому провідну роль відведено виходу цитохрому С з мітохондріальних мембран і зниженню активності дихальних ферментів [14]. Через 10-20 років наші дані підтвердили інші автори [40,42]. Закордонні вчені втрату запліднювальної здатності у тварин і людини зв'язують, принаймні, з надзвичайною конденсацією хроматину, високим рівнем експресії активних форм кисню, ушкодженням ДНК, насиченням цитохромом С міжмембранного простору, активацією каспази 3 і 9. [44-45]. Процеси програмованої загибелі клітин знаходяться під контролем клітинного генома [9].

Кріооновлення: основні механізми при дії гіпотермії і кріоконсервування

Програмована загибель клітин, що одержала право на життя в 1972 р., донедавна була одним з найважливіших феноменів у клітинній біології. Трохи пізніше, у 1976 р., на сторінках журналу «Проблемы гематологии и переливания крови» [14] ми представили принципово нові дані, що свідчать про сприятливу стимулюючу дію трансформуючого цитохрому С на життєздатність розморожених гемопоетичних клітин. Ці повідомлення пролили світло на існування іншого явища, яке за своєю значимістю не поступається апоптозу, тому що є його протипологом. Роком визнання феномена кріооновлення вважається 1989 р., коли на сторінках журналу «Успехи современной биологии» [5] і атласу «Цитохимия клеток костного мозга и крови при криоконсервировании» [15] були представлені й обговорені переконливі морфофункціональні дані цього явища. Під терміном «кріооновлення» ми мали на увазі сприятливі зміни біологічних об'єктів при дії низьких, наднизьких температур і кріоконсервування.

Процеси кріооновлення знаходяться під контролем клітинного генома. У цьому зв'язку одним із основних механізмів програмованого життя клітини є експресія генів холодової адаптації (генів-ХА) і індукції білків холодового шоку (білків-ХШ). Вивчені гени-ХА у клітинах ссавців [22] і людини [36]. Нещодавно закордонні вчені виявили білки-ХШ Р14 k і Р20 k, що охороняють від ушкодження мембрани в сперміях баранів [27]. Захисний ефект, на думку авторів, обумовлений їх декапацитаційною роллю. Інші дослідники припускають механізми генної регуляції адаптованих до холоду риб *T. bernacchii* [29]. Описано ефект експресії гена Вах і антиапоптотичних білків Bcl-2 у сперматогенних стовбурових клітинах і їхньої локалізації на внутрішній мітохондріальній мембрані [37,48]. Антиапоптотичні білки блокують вихід цитохрому С з мітохондріального матрикса, а також знищують той, який вийшов у міжмембранний простір, і, таким чином, гальмують апоптотичні процеси і зміщують динамічну взаємодію апоптозу і кріооновлення у бік кріооновлення.

Не менш важливим механізмом кріооновлення є відкриті нами раніше: сприятлива деконденсувальна властивість кріоконсервування та активація процесів транскрипції без порушення ДНК-ядерних зв'язків. Деконденсований хроматин зумовлює включення в роботу генів і відкриває можливість реалізації їхньої регуляторної діяльності. Набагато пізніше подібну думку висловили і закордонні автори, що показали позитивну кореляцію між деконденсацією хроматину в сперміях людини і тварин (свині) і їхню запліднювальну здатність [30]. Ступінь деконденсації хроматину добре корелює з підвищенням життєздатності спермій людини.

Провідний механізм кріооновлення – генетично детермінована стимулююча дія цитохрому С. Цитохром С, потрапляючи в мітохондріальний матрикс, блокує процеси активації каспаз і зменшує реакції апоптозу, спрямовані на знищення клітин.

Вивчено механізм проникнення цитохрому С через зовнішню і внутрішню мітохондріальні мембрани. У 70-80-х роках численні роботи закордонних учених показали, що системи перенесення цитохромів складаються, принаймні, із двох молекулярних компонентів [31-32, 34, 41]. Один із них - специфічний білок-переносник, що може визначати поліпептиди за допомогою рецепторної функції і, тим самим, полегшувати їхній рух через мембрани. Інша система забезпечує передачу енергії молекулі-переносникові, завдяки чому вона здатна переносити поліпептиди через мітохондріальні мембрани. Цитохром С, потрапляючи в мітохондріальний матрикс, відновлює процеси сполучення дихання і

фосфорилування. Докладніше ці дані представлені на сторінках журналу «Проблемы криобиологии» [8]. Нещодавно вони стали надбанням світової наукової громадськості на сторінках журналу «Успехи современной биологии» [6], «Abstracts Jopnal» [34] і в матеріалах «CryoBiomol-2003» [33].

Відомо, що цитохроми в організмі виконують роль ферментів, які каталізують реакції окислювання-відновлення і є переносниками електронів. З усіх цитохромів цитохром С - єдиний, отриманий у кристалічному вигляді. Його виділено із серцевого м'яза і дріжджів. Це гемопротеїд із молекулярною масою 13000 і містить, принаймні, 4-5 фракцій. Цитохром С існує у всіх організмів, що мають мітохондріальні дихальні ланцюги: рослин, тварин і мікроорганізмів. Він з'явився більше 1,5 млрд. років тому. Протягом усього цього періоду його функція не змінилася. Про це свідчить наступне:

1). Цитохром С будь-якого виду еукаріотів реагує *in vitro* з ЦХО будь-якого іншого досліджуваного до дійсного часу виду. Цитохром С, наприклад, із зародків пшениці реагує з ЦХО із тканини людини.

2). Близькість значення окислювально-відновного потенціалу для всіх молекул цитохрому С (біля +0,25 В).

3). Ідентичність спектрів поглинання молекул цитохрому С різних видів. Молекули цитохрому С тварин, рослин і мікроорганізмів мають у своєму складі один поліпептидний ланцюг, що містить 104 амінокислотних залишків. У цитохромах усіх цих видів 35 амінокислотних залишків абсолютно не змінюються. Молекули цитохрому С коня і дріжджів різняться між собою за 48 амінокислотними залишками; качки і курки – тільки за двома залишками; курки, індички, свині, корови і вівці – ідентичні. Багато геномів ссавців, у тому числі людини, містять 20-30 нуклеотидних послідовностей, родинних гену цитохрому С пацюка [28].

Вважається загальноприйнятим, що основна частина енергії біологічного окислювання звільняється в результаті реакцій, що каталізуються цитохромною системою, і резервні можливості дихальних ферментів дуже великі. ЦХО у фізіологічних умовах виявляє лише 5 % максимальної каталітичної активності. Активація енергоутворювальних систем у стаціонарній кінетиці перенесення електронів можлива завдяки співіснуванню двох форм дихального ланцюга – активованої і неактивованої, які переходять одна в іншу, співвідношення між якими регулюється концентрацією кисню в середовищі, або кількістю цитохрому С у клітині. Недолік їх викликає в ранній строк активацію енергоутворювальних систем. Цей стан стає високо стійким, якщо режим дефіциту кисню, або цитохрому С кілька разів повторюється. Молекулярною основою підвищення біоенергетичної активності мітохондрій є активація ферментів дихального ланцюга, що забезпечує високу швидкість транспорту електронів [23]. Виникнення активованої форми дихального ланцюга може бути результатом зміни її конформації при перенесенні електронів. На підставі побудови кінетичної моделі доведено, що перенесення електронів по дихальному ланцюгу супроводжується виникненням більш компактної форми останньої, яка характеризується підвищенням стійкості до факторів, що ушкоджують [11].

Російські вчені довели, що короткочасною відповіддю мітохондрій печінки пацюків при холодовому впливі (2-4 °С) є збільшення концентрації цитохромів, або прискорення їхнього синтезу, або уповільнення розпаду [13]. У міру впливу холоду зростання вмісту цитохромів збільшує окисний обмін і призводить до інтенсифікації мітохондріогенезу. Через місяць холодного впливу стійко збільшується концентрація цитохромів і з'являються мітохондрії з новими

властивостями [38]. Це забезпечує стабільне зростання швидкості споживання кисню печінкою.

В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України вивчено вплив гіпотермії і цитохрому С на рухливість і фертильність спермій людини. У результаті проведених досліджень нам вдалося активізувати рухливість і життєздатність спермій людини на 30-32 %. Це дало можливість підвищити фертильність чоловічих гамет і сприяло збільшенню частоти настання вагітності [1-3,10]. Примітно, що у всіх немовлят, які були отримані від цих чоловіків, відсутні ознаки асфіксії, гемолітичної жовтянки і статусу недоношеності, що нерідко трапляється при використанні традиційних методів.

Для вивчення механізму дії цитохрому С до суспензії активно-рухливих спермій додавали у кількості 5×10^{-3} М для роз'єднання дихання і фосфорилування та залишали при кімнатній температурі [10]. Виявилося, що через 3 хв після додавання 2,4-динітрофенолу рух спермій припинявся. Припустили, що роз'єднання дихання і фосфорилування лежить в основі порушення рухливості спермій при їхньому тривалому гіпотермічному зберіганні. Для уточнення цих даних до суспензії спермій ще раз додавали 2,4-динітрофенол. Через 3 хв клітини втрачали здатність до руху. Кілька разів відмивали спермії від 2,4-динітрофенолу розчином Тіроде з 15 % сироваткою і додавали цитохром С в кількості $2,4 \times 10^{-3}$ М. Через 3-5 хв рухливість спермій відновлювалася до контрольного рівня.

Отримані дані дозволили зробити висновок про те, що при тривалому гіпотермічному зберіганні настає роз'єднання дихання і фосфорилування, тому що при додаванні цитохрому С рухливість клітин відновлювалася так само, як і при додаванні цитохрому С після внесення 2,4-динітрофенолу для роз'єднання дихання і фосфорилування. Найбільш повно питання підвищення рухливості та запліднювальної здатності спермій людини за допомогою кріобіологічних технологій висвітлені нами на сторінках «Міжнародного медичного журналу» [7].

Згідно з даними закордонних авторів [47] низькі температури регулюють гени, під контролем яких знаходиться цитохром С і НАДН, що бере участь у його транспортній функції через мітохондріальні мембрани. Тому, можна припустити, що низькі температури, активно впливаючи на гени, активізують систему транспорту електронів і, тим самим, значною мірою сприяють інтенсифікації рухливості спермій та їх фертильності. Таким чином, теоретично й експериментально доведена можливість відновлення біологічних структур і функцій шляхом активації енергоутворювальних систем у стаціонарній кінетиці перенесення електронів.

Важлива роль у здійсненні процесів кріооновлення належить антиоксидантам. Останні пригнічують апоптоз, зменшують ушкодження ДНК і поліпшують якість сперми: запобігають реакції перекисного окислення ліпідів, не дають вільним радикалам накопичуватися в організмі й утворювати активні форми кисню. В Інституті тваринництва УААН на сперміях різних видів тварин (бугаїв, баранів, кнурів), а також на еритроцитах баранів, кролів і людини виявлено захисний механізм яєчного жовтка при впливі низькотемпературних, імунних, осмотичних, механічних й інших чинників. Характерно, що до складу яєчного жовтка входить велика кількість антиоксидантів (лецитин, сфінгомієлін, фосфатиділхолін тощо). З позиції концепції кріооновлення вище згадані антиоксиданти здатні гальмувати процеси апоптозу, зрушуючи тим самим динамічну взаємодію апоптозу і кріооновлення у бік кріооновлення. Цей процес лежить в основі підвищення якості охолоджених спермій тварин.

Захисна дія яєчного жовтка, цілком ймовірно, пов'язана з утворенням на поверхні плазматичної мембрани клітин додаткових структур за рахунок адсорбції ліпідів чи протеїнів, що містяться в ньому [16]. Дійсно, лецитин, що є в складі жовтка, має спорідненість із ліпопротеїдним покривом клітин, нашаровується на їхній поверхні й утворює ліпідну фазу. Крім того, при нашаруванні лецитину значно збільшується товщина клітинної оболонки. Тому, для прояву холодового удару, в оброблених жовтком клітинах необхідно створювати в кілька разів більший, ніж у необроблених, осмотичний градієнт на межі «оболонка клітини – навколишнє середовище».

На основі теорії фортифікації в Інституті тваринництва УААН розроблено спосіб консервування сперми тварин і підібрано середовище для кріоконсервування сперми [17-19]. Суть механізму фортифікації зводиться до взаємної адсорбції ліпідів навколишнього середовища з компонентами цитоплазматичної мембрани клітини за рахунок сил полярних і гідрофобних взаємодій. При цьому на поверхні клітини утворюється додаткова структура, що надає плазматичній мембрані додаткову механічну міцність й ізолює її від зіткнення з ушкоджувальними агентами.

Створено також спосіб фортифікації мембран сперміїв за допомогою моноетаноламіну [19]. Моноетаноламін є фрагментом молекули фосфоліпиду, що бере участь у фортифікації мембранного апарата. Встановлено, що введення в розріджувач для сперми бугаїв моноетаноламін-хлориду сприяє зниженню інтенсивності руйнування мембранного апарата сперміїв. При цьому вдалося запобігти зниженню активності сперміїв на 0,1-0,2 бала і зберегти на 10-12 % більше сперміїв із неушкодженою акросомою після заморожування. Запліднювальна здатність замороженої сперми бугаїв із використанням антиоксиданту моноетаноламіну виявилася на 18,4-10,9 % вищою за контрольну, яка заморожена без моноетаноламін-хлориду.

Аналогічно даним, які отримані в Інституті тваринництва УААН на сперміях різних видів тварин, відповідно до спостережень учених Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, найбільша життєздатність сперміїв людини досягається за допомогою цитохрому С у концентрації $1,2 \times 10^{-3}$ мМ і α -токоферолу в концентрації 0,5 мМ. [25]. Після спільної дії цитохрому С і α -токоферолу життєздатність охолоджених сперміїв людини підвищилася на 18 % ($p < 0,01$). Антиокислювальна функція токоферолів і, зокрема, α -токоферолу визначається їхньою здатністю зв'язувати активні вільні феноксидні радикали, які з'являються в клітинах (ділянки перекисного окислювання ліпідів) у відносно стійкі й тому не здатні до подовжування ланцюги. Після дії холінхлориду (витяжки з лецитину) у концентрації 0,2 % і α -токоферолу в концентрації 0,3 мМ активність сукцинатдегідрогенази в охолоджених сперміях підвищилася, відповідно, на 14 % і 15 % ($p < 0,01$) [3]. Згідно з даними закордонних авторів, збереження сперми баранів при 5 °С у присутності антиоксидантів (супероксиддисмутаза, каталаза, цитохром С, глутатіон, пероксидаза) поліпшували рухливість, акросомальну цілісність, запліднювальну здатність і подальші показники вагітності самиць [39].

Таким чином, із позиції концепції кріооновлення, антиоксиданти, що гальмують апоптоз, зміщують динамічну взаємодію двох різноспрямованих процесів - апоптозу та кріооновлення у бік кріооновлення, внаслідок чого підвищується якість сперміїв та їхня запліднювальна здатність.

Нещодавно закордонні вчені за допомогою кріоконсервування виділили фракції сперміїв із високою й низькою рухливістю [51]. Обидві ці фракції містили

апоптотичні білки, які з'явилися в результаті активації процесів перекисного окислювання ліпідів й утворення активних форм кисню. Це означає, що в обох фракціях включилися механізми програмованої загибелі клітин. За допомогою анексинУ-зв'язування і хемілюмінесценції встановлена також вища індукція мембранного антиоксиданту фосфатиділсерину (*de novo*) у високо рухомій популяції кріоконсервованих спермій людини в порівнянні з низько рухомою. Індукція антиоксиданту (*de novo*) є результатом активації програмованого життя клітини.

Таким чином, закордонні автори експериментально підтвердили наші попередні уявлення про селективну властивість кріоконсервування як чинника добору і сприятливої мінливості [20]. Вони також продемонстрували характер взаємодії процесів апоптозу та кріооновлення, в якому процеси оновлення відіграють провідну роль.

У цілому, в основі підвищення фертильності спермій та отримання якіснішого потомства знаходяться низка механізмів кріооновлення. Основні з них: експресія генів-ХА, індукція білків-ХІІІ, деконденсація хроматину без порушення ДНК-ядерних зв'язків, активація антиоксидантів *de novo*, що гальмують апоптоз, та входження цитохрому С у мітохондріальний матрикс із наступним відновленням процесів дихання і фосфорилування. Усі перераховані механізми програмованого життя клітини зрушують динамічну взаємодію апоптозу та кріооновлення у бік кріооновлення. Це забезпечує підвищення фертильності спермій і отримання якіснішого потомства в сільському господарстві, зокрема, у тваринництві.

Бібліографічний список

1. 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.]. // Проблемы криобиологии.- 2001.- №3.-С. 14-15.
2. Алексеевская Э.И. Влияние цитохрома С на подвижность и фертильность спермиев человека, хранившихся в условиях гипотермии и при – 196⁰С / Э.И. Алексеевская, Н.Н. Чуб, М.И. Крамар // Проблемы криобиологии.- 2002.-№2.-С.59-61.
3. Активность сукцинатдегидрогеназы в спермиях человека, хранившихся в условиях гипотермии / [Э.И. Алексеевская, М.И. Крамар, Н.Н. Чуб и др.] // Проблемы криобиологии.-2002.-№4.- С. 98-102.
4. Ващенко В.И. Сверхспиральная ДНК человека и животных при экстремальных воздействиях: автореф. дисс. на соискание учен. степ. д.-ра. биол. наук / В.И. Ващенко. - СП-б: Военно-медицинская академия и ЦНИИ рентгено-радиологический институт МЗ РФ, 2000.- 44 с.
5. Грищенко В.И. Качественное обновление свойств клеток после кріоконсервирования / В.И.Грищенко, Е.Я.Панков, Э.И.Обозная (Э.И. Алексеевская). // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 108, № 2. -С. 299-309.
6. Грищенко В.И. Кріообновление – основа для прогресса современных технологий в биологии и медицине / В.И. Грищенко, Э.И. Алексеевская // Успехи современной биологии. – 2003.- Т.123, № 5. –С. 435 - 444.
7. Грищенко В.И. Кріообновление как основа эффективного лечения мужского бесплодия / В.И. Грищенко, Э.И. Алексеевская // Международный медицинский журнал .- 2005.-№4.-С.68-71.

8. Грищенко В.И. Возможные механизмы мембранного транспорта белков: перенос цитохрома С через митохондриальные мембраны и его роль в механизме криообновления / В.И. Грищенко, Э.И. Алексеевская // Проблемы криобиологии. - 2005. - №1. - С. 42-49
9. Губский Ю.И. Токсическая гибель клетки: свободно-радикальное повреждение ДНК и апоптоз / Ю.И. Губский // Лікування та діагностика. - 2001. - №4. - С. 8-1.
10. Крамар М.И. Влияние гипотермии на морфологические и функциональные свойства спермиев человека: автореф. дис. на соиск. учен. степени канд. биол. наук. / М.И. Крамар. - Х. - 1990. - 40 с.
11. Куприянов В.В. Проявление активности дыхательной цепи в стационарной кинетике переноса электронов / В.В. Куприянов, В.Я. Сакс, В.Н. Лузиков // Митохондрии (Регуляция процессов окисления и сопряжения). - 1974. - С. 21-26.
12. Влияние длительного низкотемпературного хранения спермы петухов на её оплодотворяющую способность / [Т.П. Линник, В.И. Грищенко, А.Б. Артёменко, А.В. Терещенко]. // Проблемы криобиологии. - 2000. - №3. - С. 64-71.
13. Мохова С.Н. Концентрация цитохромов в митохондриях гомогената печени при адаптации к холоду. Митохондрии. Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов / С.Н. Мохова, И.В. Жигачева. - Москва: Наука, 1977. - С. 138-144.
14. Обозная Э.И. (Алексеевская Э.И.). Некоторые пути восстановления биоэнергетики клеток криоконсервированного костного мозга / Э.И. Обозная (Э.И. Алексеевская), О.П. Маркова // Проблемы гематологии и переливания крови. - 1976. - № 9. - С. 6-10.
15. Обозная Э.И. (Алексеевская Э.И.). Цитохимия костного мозга при криоконсервировании: Атлас. / Э.И. Обозная (Э.И. Алексеевская), Е.Я. Панков. - К.: Наук. думка, 1989. - С. 265.
16. Осташко Ф.И. О природе холодового удара живчиков. Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных: Сб. работ НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР / Ф.И. Осташко. - Х.: Книжное издательство, 1963.
17. Осташко Ф.И. Разработка вопросов теории и практики глубокого охлаждения и длительного хранения спермы производителей: автореф. дисс. на соискание учен. степени д.-ра биол. наук / Ф.И. Осташко. - Х., 1968. - 32 с.
18. Осташко Ф.И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей / Ф.И. Осташко. - К.: Урожай, 1968. - 248 с.
19. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота / Ф.И. Осташко. - К.: Аграрная наука, 1995. - 186 с.
20. Панков Е.Я. Селективное свойство низкотемпературного консервирования / Е.Я. Панков, Э.И. Обозная (Э.И. Алексеевская) // Гематология и трансфузиология. - 1984. - № 9. - С. 32 - 36.
21. Савушкина С.И. Качество молоди сибирского осетра, полученного с использованием дифростированной спермы / С.И. Савушкина / Консервация генетических ресурсов: Матер. рабочего совещания (Пушино, 13-15 октября 1998 г.). - Пушино. - 1998. - С. 101-103.
22. Фуллер Б., Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих / Б. Фуллер, К. Грин, В.И. Грищенко // Проблемы криобиологии. - 2004. - № 3. - С. 58-71.
23. Хватова Е.М. Дефицит кислорода как фактор регуляции функционального состояния митохондрий / Е.М. Хватова, Шумакова, И.С.



Воропаева //Митохондрии (Аккумуляция энергии и регуляция ферментативных процессов).-1977.-С.32-37.

24. Штейн Н.А. Эффекты криоконсервации и пересадки эмбрионов на величину артериального давления у крыс линии Нисар с наследственно обусловленной артериальной гипертензией / Н.А. Штейн, С.Я. Амстиславский, Л.Ф. Максимовский // Физиологический журнал. - 1993.-№12.-С.-51-56.

25. Пат. № 38000А Украина. МКИ CR N 5/08 Способ повышения жизнеспособности охлажденных спермиев человека /Грищенко В.И., Алексеевская Э.И., Крамар М.И.; заявл.15.05.2000, опубл. 15.05.2000, Бюл. № 4.

26. Пат. 8590 (Україна) МПК 19 А01N 1/02. Середовище Єгорова для криоконсервування сперматозоїдів собаки / Єгоров М.І., Грищенко В.І., Ліннік Т.П. та ін.; заявл. 10.01.2005, опубл. 15.08. 2005, Бюл. № 8.

27. Barrios B, Fernandez-Juan M, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock // Androl. 2005.-№26 (4).-P.539-49.

28. Brown G.G. Simpson M.V. Novel Seatures of animal mtDNA evalution as shown bysequenses of two rat cytochrome oxidase subunit genes // Proc. Nat. Acad. Sci USA. Biol. Sci.-1982.-79.-№10- P.3246-3250.

29. Buckley B.A, Place S.P, Hofmann G.E. Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii* // J. Exp. Biol.- 2004.- 207(Pt 21).- P. 3649-56.

30. Chan P.I., Fredway. D.R. Assotiation of human sperm nuclear decondensation and in vitro penetration ability // Andrologia.-1992.-24.-№2.-P. 77-81.

31. Donald W., Nikolson D.B, Walter N. Import of apocytochrome C into mitochondrial. Reaction of heme mediated by NAD.H and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome C // Proc. Natl. Acad. Sci.-1989.- 186.-12.-P.4340-44.

32. Dumont M.E, Chlichter I.V, Cardillo T S. et al. Cyc 2 encodes a factor involved in mitochondrial import of yeast cytochrome C // Mol. Cell. Biol..-1993.- 13(10).-P.6442-51.

33. Grischenko V.I., Alekseyevskaya E.I. Cryorenewal is the Base for the Progress of Current Cryobiological Technologies // Book of abstracts. Low Temperature Biology. From the low Temperature Physics and chemistry of Biological Molecules to life in Extreme Low Temperature Conditions, 14-18 September.- CryoBiomol.- 2003 Coimbra-Portugal.- P.-131.

34. Grischenko V.I., Alekseyevskaya E.I. Possible Mechanisms of Membrane Transport of Proteins: Cytochrome C Transfer Through Mitochondrial Membranes and Its Role in Cryoreneval Mechanism // Abstracts Journal, Series: Biophysics.- 2005.-№ 12.

35. Kerr L.F., Wylie A.N., Currie A.R., Apoptosis: a basec biological phenomenon with wide-rending implications in tissue kinetics // Brit. J. Cancer.- 1972.- 26.-P. 239-257.

36. Kloks C.P, Spronk C.A, Lasonder E et al. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1 // J. Mol Biol. -2002. -V. 15, № 316 (2). - P. 317- 26.

37. Li H., Dong Q, Yang Y et al. Effect of vasostomy on expression of Bcl-2 and Bax gene in ret spermatogenic cells // Xi Yi Ke Da Xue Bao.-2000.- №31(3).- P. 353-5.

38. Loncar D., Bedrika L., Mayer J. et al. The effect of intermittent cold treatment of the adipose tissue of the cat. Apparent transformation from white to brown adipose tissue // *Ultrastruct and Mol. Struct Res.*- 1986,1987.- №3.- C. 119-129.
39. Maxwell WM, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants // *Reprod Fertil Dev.*- 1996 .- №8(6) .-P.1013-20.
40. Mori Yoki, Suzuki Hiroko, Nei Tokio. Freezing injury in the yeast respiratory system // *Cryobiology.*-1986.-23.-№1.-P.64-71.
41. Nicholson D.W., Kohler H., Neupert W. Import of cytochrome C into mitochondria: cytochrome C heme lyase // *Eur. J. Biochem.*-1987.-164. – P.147-157.
42. Petrenko A.Yu, Subbota N.P. Inhibition on the activity of mitochondrial electron transport chain by low temperature: losses of cytochrome C // *Cryo-Letters.*-1986.-№7.-P.395-402
43. Rauen U., Polzar B, Stephen H. et al. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species // *FASEB.J.*-1999.-13.- P. 155-168.
44. Royère D., Hamamah S, Nikolle C., Lansac J. Influence de l'état de la chromatine sur la perte du pouvoir fécondant des spermatozoïdes après congélation // *Contracept.-Fertil.-sex.*- 1989.-17.- № 7-8.- P. 643-644.
45. Roure D., Hamamah S., Nicolle J.C., Lansac J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilising ability of human sperm // *J. Androl.*-1991.-14.-№5.-P.328-335.
46. Schramm W.P. Die Tieftemperatur Konservierung von Hahnensperma in Hinblick auf die Reproduktion von Genreserve populationen und den internationalen Spermasustausch // *Arch. Weflugelk.*-1991.-55, №6.-P. 258-260.
47. Storey K.B. Freeze-induced gene expression in vertebrates. *Cryo* – 98, 35th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 11 – 16 th July, 1998, Pittsburgh, Pennsylvania, USA: 167.
48. Sugiyama N, Obinata M, Matsui Y. Bcl-2 inhibits apoptosis of spermatogonia and growth of spermatogonial stem cells in a cell-intrinsic manner // *Mol. Reprod Dev.* –2001.- №58 (1). -P.1-3.
49. Tamer M., Uwe P., Hans-Juergen G., Ashok A. Role of caspases in male infertility // *Human Reproduction Update.*-2004.-10, №1.-P. 39-51
50. Wang X, Sharma RK, Ranganathan P. et al. Oxidative stress and increased levels of apoptosis (cytochrome C, caspase 3 and 9) in patients with male factor infertility // *Fertil, Steril.* -2001. -76.- P. 195.
51. Wang X, Sharma RK, Sikka SC et al. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility // *Fertil, Steril.* –2003.-№ 80(3).-P.531-5.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОВЫШЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ СПЕРМИЕВ И ПОЛУЧЕНИЕ БОЛЕЕ КАЧЕСТВЕННОГО ПОТОМСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРИОБИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

Грищенко В.И., Алексеевская Э.И., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Осташко Ф.И., Институт животноводства УААН

Изучены основные механизмы принципиально нового направления в биологии, медицине и животноводстве - криообновления (программированная жизнь клетки под воздействием низких и сверхнизких температур и криоконсервации). Криообновление является противовесом апоптозу (программированная гибель клетки). Основные механизмы криообновления -



экспрессия ген-холодовой адаптации, индукция белков холодового шока, деконденсация хроматина, вхождение цитохрома C у митохондриальный матрикс, стимулирующее действие антиоксидантов, подавляющих апоптоз.

Повышение фертильности спермиев и получение более качественного потомства с использованием криобиологических технологий обусловлено смещением динамического взаимодействия апоптоза и криообновления в сторону криообновления.

Ключевые слова: спермии, криоконсервирование, цитохром C, апоптоз, криообновление.

THEORETIC VALIDATION OF SPERM FERTILITY RATE BOOST & PRIME QUALITY PROGENY FORMATION BY THE FREEZING PRESERVATION TECHNIQUE USE

Grishchenko V., Alexeyevskaya E.; Institute of freezing biology and medicine affiliated to the Ukrainian academy of agrarian sciences

Ostashko F.; Institute of animal science, UAAS

This article highlights the new livestock trends. The subzero, threshold & freezing temperature impact on cell was investigated. Scientific programming on metabolic processes in the cell was elaborated. The programmed cell renovation secures cell destruction. Cell renovation implies gene expression, freezing adaptation, protein induction to freezing shock, chromatin evaporation, C cyto-chrome invasion into mytochondrial matrix. Antioxidant promotion activity was investigated. Antioxidants proved to eliminate cell destruction. The programmed cell renovation proved to advantage cell destruction due to the freezing preservation technique application. The above-mentioned technology use results in the sperm fertility rate boost & prime quality progeny formation.

Key words: spermatozoon, freezing preservation, C cyto-chrome, apoptosis, programmed cell renovation