DOI 10.29254/2523-4110-2025-4-179/addition-35-37
УДК 612.015.3:612.617:577.27

[1]Калейнікова О. М., [1]Срібна В. О., [2]Виноградова-Анік О. О., [1]Литвиненко А. П., [1]Блашків Т. В., [1]Вознесенська Т. Ю.

АПОПТИЧНА ТА НЕАПОПТИЧНА ЗАГИБЕЛЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИДАТКА СІМ'ЯНИКА ЗА УМОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ *IN VITRO*

[1]Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (м. Київ, Україна)
[2]Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (м. Київ, Україна)

Анотація. *Оксидативний стрес є ключовою патогенетичною ланкою, що призводить до порушення сперматогенезу, а відтак – до зниження фертильності та погіршення репродуктивного здоров'я чоловіків. Мета: визначення впливу речовин, що збільшують кількість вільних радикалів (H2O2), зокрема їх концентрацію на життєздатність сперматозоїдів придатку сім'яника для моделювання оксидативного стресу in vitro. Результати: в умовах оксидативного стресу (як «середнього», так і «сильного»), встановлено зменшення кількості живих клітин і збільшення апоптотичних, некротичних й автофагічних сперматозоїдів.*

Ключові слова: *оксидативний стрес, апоптоз, аутофігія, сперматозоїди придатка сім'яника, чоловіча фертильність.*

Abstract. *Oxidative stress is a key pathogenetic factor leading to impaired spermatogenesis and, consequently, to reduced fertility and impairment of male reproductive health. The aim of the work was to investigate the effects of substances that increase the generation of free radicals (H_2O_2), particularly their concentration, on the viability of epididymal spermatozoa in order to model oxidative stress in vitro. Results: under conditions of oxidative stress (both "moderate" and "severe"), there is a decrease in viable cells and an increase in apoptotic, necrotic, and autophagic spermatozoa.*

Key words: *oxidative stress, apoptosis, autophagy, epididymal spermatozoa, male fertility.*

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана у 2025 році в рамках договору про наукове співробітництво Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України і Національного медичного університету імені О.О.Богомольця (кафедра фізіології) та виконання наукової теми «Механізми та шляхи корекції регульованої загибелі клітин імунної (тимуса і лімфатичних вузлів) та репродуктивної (яєчників і сім'яників) систем», державний реєстраційний номер роботи 6541030 (відомча) у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України.

Вступ.

Усвідомлення науковцями та медиками чоловічого безпліддя як вагомої проблеми громадського здоров'я населення зростає дедалі більше. Зростає і сам показник безпліддя, зокрема в 2023 році згідно оцінкам ВООЗ глобальний рівень безпліддя становить 17,5% [1, 2]. Чоловіче безпліддя є багатофакторним, найпоширенішою етіологією, що становить приблизно 75% випадків, є порушення сперматогенезу [1].

Ключовою ланкою в патогенезі порушення сперматогенезу, так званим спільним знаменником, є оксидативний стрес (ОС) [3]. Відомо, що ОС виникає, коли є дисбаланс між виробленням та нейтралізацією активних форм кисню (АФК). Низькі рівні АФК є важливими для нормальних фізіологічних процесів, таких як наприклад капацитація сперматозоїдів, тоді як надмірне вироблення АФК викликає ОС та погіршує репродуктивне здоров'я [3, 4]. Внаслідок впливу надмірних АФК виникають пошкодження мітохондріальної та ядерної ДНК, що є причиною посилення апоптозу сперматозоїдів [3], дисрегуляції автофагії [5].

Вважають, що найкритичнішим наслідком ОС для сперматозоїда є пошкодження батьківського генетичного матеріалу. Залежно від інтенсивності, ОС класифікуть від простого окислення основ (гуанозин та аденозин), до фрагментації ДНК (шляхом одно- або дволанцюгових розривів) [4].

Оскільки таке оксидативне пошкодження ДНК сперматозоїдів пов'язують як з викиднями, так і з аномаліями розвитку у потомства, тому є актуальним пошук стратегій щодо зменшення такого стресу, зокрема вивчення на основі експериментальних моделей нових ефективних антиоксидантних препаратів.

Мета дослідження.

Визначення впливу речовин, що збільшують кількість вільних радикалів (H_2O_2), зокрема їх концентрацію, на життєздатність сперматозоїдів для моделювання оксидативного стресу *in vitro*.

Об'єкт і методи дослідження.

Досліди проводилися з дотриманням Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження (від 21.02.2006 р.) та принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986).

Робота виконана з використанням 30 самців мишей лінії Альба масою 20-25 г. Тварин виводили з експерименту шляхом перерізання спинного мозку під ефірним наркозом, дотримуючись правил евтаназії.

Оцінка життєздатності клітин придатку сім'яника. Суспензію клітин (50 мкл) змішували з рівним об'ємом 1% трипанового синього. Життєздатні клітини залишалися не забарвленими, тоді як не життєздатні клітини фарбувалися синім кольором. Вираховували відношення життєздатних клітин до

загальної кількості підрахованих клітин як відсоток життєздатності для кожного зразка.

Флуоресцентні барвники. Апоптотичну і не апоптотичну (некроз) загибель клітин оцінювали за морфологічними ознаками із застосуванням прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Hoechst 33342 та пропідіум йодиду(PI)), для автофагії – Monodansylcadaverin. Оцінку проводили не менш як 400 клітин за допомогою люмінесцентного мікроскопу з водно-імерсійним об'єктивом х85 та з відео системою передачі зображення на комп'ютер.

Отримані дані на нормальність розподілу перевіряли за тестом Колмогорова-Смірнова. Далі проводили дисперсійний аналіз ANOVA, Tukey's post hoc test, програма GraphPadPrism, version 8.1.0.325 for Windows (GraphPadSoftware, USA). Результати виражали як середні значення ± стандартне відхилення (M±SD).

Результати дослідження та їх обговорення.

Оцінка життєздатності сперматозоїдів за умов ОС *in vitro*.

Дані про життєздатності сперматозоїдів за умов різних концентрацій H_2O_2 представлено в **таблиці 1**.

Оцінка клітинної загибелі сперматозоїдів за умов ОС.

Дані про вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та загиблих шляхами апоптозу та некрозу сперматозоїдів представлено в **таблиці 2**.

За умов ОС «середнього» (250,0 мкМ) відбувається зменшення кількості живих клітин до 77,70±1,56% (P<0,05, n=5) і збільшення апоптотичних до 13,14±0,95% (P<0,05, n=5) та некротичних до 9,16±1,21 (P<0,05, n=5) порівняно з такими величинами в контролі (відповідно, 89,48±1,22%, 6,42±0,97% і 4,10±0,55%).

Таблиця 1 – Оцінка життєздатності сперматозоїдів (забарвлення трипановим синім) за умов різних концентрацій H_2O_2

	H_2O_2	Клітини (сперматозоїди), %	
		Життєздатні	Не життєздатні
Контроль	-	88,72±0,94	11,28±0,94
Слабий (дуже)	5,0 мкМ	88,44±0,84	11,56±0,84
Слабий	50,0 мкМ	82,72±0,70*	17,28±0,70*
Середній	250,0 мкМ	77,86±0,77*	22,14±0,77*
Сильний	500,0 мкМ	68,50±1,22*	31,50±1,22*
Сильний (дуже)	5000,0 мкМ	24,40±2,07*	75,60±2,07*

Примітки: * – p<0.05 – вірогідність відмінностей середніх груп даних у порівнянні з такими величинами у контролі; M±σ.

За умов ОС «сильного» (500,0 мкМ) відбувається зменшення кількості живих клітин до 57,54±1,57% (P<0,05, n=5), збільшення апоптотичних і некротичних, відповідно, до 26,26±1,80% (P<0,05, n=5) і 16,20±1,64% порівняно з такими величинами в контролі (відповідно, 89,48±1,22%, 6,42±0,97% і 4,10±0,55%) **(табл. 2)**.

Дані про вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та автофагічних сперматозоїдів представлено в **таблиці 3**.

За умов ОС «середнього» (250,0 мкМ) відбувається зменшення кількості живих клітин до 78,20±1,10% (P<0,05, n=5) і збільшення автофагічних до 21,80±1,10% (P<0,05, n=5) порівняно з такими величинами в контролі (відповідно, 85,40±1,14% і 14,60±1,14%) **(табл. 3)**.

За умов ОС «сильного» (500,0 мкМ) відбувається зменшення кількості живих клітин до 71,20±1,48% (P<0,05, n=5), і збільшення автофагічних до 28,80±1,48% (P<0,05, n=5) порівняно з такими величинами в контролі (відповідно, 85,40±1,14% і 14,60±1,14%) **(табл. 3)**.

Таким чином, за умов ОС як «середнього», так і «сильного», встановлено збільшення у, відповідно, 1,96 рази і 2,79 рази кількості не живих (забарвлених трипановим синім) сперматозоїдів. За умов ОС «середнього» (250,0 мкМ) відбувається зменшення у 1,15 рази кількості живих клітин (P<0,05, n=5) і збільшення у 2,05 рази апоптотичних (P<0,05, n=5) та у 2,23 рази некротичних (P<0,05, n=5) порівняно з такими величинами в контролі. За умов ОС «середнього» (250,0 мкМ) відбувається збільшення у 1,49 рази автофагічних (P<0,05, n=5) порівняно з такими величинами в контролі. За умов ОС «сильного» (500,0 мкМ) відбувається зменшення у 1,56 рази кількості живих клітин (P<0,05, n=5), збільшення у 4,09 рази апоптотичних і у 3,95 рази некротичних порівняно з такими величинами в контролі. За умов ОС «сильного» (500,0 мкМ) відбувається збільшення у 1,97 рази автофагічних (P<0,05, n=5) порівняно з такими величинами в контролі.

Таким чином, за умов ОС (як «середнього», так і «сильного»), встановлено збільшення кількості не живих (забарвлених трипановим синім) сперматозоїдів, зменшення кількості живих клітин і збільшення апоптотичних, некротичних й автофагічних сперматозоїдів.

Відомо, що за нормальних умов у спермальній плазмі присутні антиоксидантні системи, які забезпечують низькі концентрації АФК. Коли тонкий баланс між АФК та антиоксидантами порушується, наприклад рівень АФК значно зростає або рівень антиоксидантів знижується, виникає ОС [4]

Сперматозоїди демонструють виражену схильність до ОС через свої особливості біологічних властивостей. Це зумовлено зокрема високим вмістом поліненасичених жирних кислот у мембранах, які легко піддаються ушкодженню активними формами кисню, а також дуже малою кількістю цитоплазми, що обмежує можливість накопичення антиоксидантних ферментів і молекул. Джерела ОС в спермі поділяють на ендогенні та екзогенні [3]. Так, надмірне продукування активних форм кисню може спричинити посилене пошкодження мітохондріальної ДНК, запускаючи внутрішній шлях апоптозу [6]. АФК також можуть запускати зовнішній шлях апоптозу, впливаючи на рецептори смерті, такі як TNF-R1, TRAIL-R1/2 та FAS [4]. Крім активації апоптозу, ОС також може активувати аутофагію [6]. АФК функціонують як сигнальні молекули в регуляції аутофагії, впливаючи на шляхи передачі сигналів (mTOR та MAPK), транскрипційні фактори (HIF-1α) та гени аутофагії, такі як ATG4 [7]. Апоптоз та аутофагія пов'язані в різних вузлах, взаємодія між ними є багатогранною, часто суперечливою. По-перше, апоптоз та аутофагія діють кооперативно та синхронізовано, стимулюючи загибель клітин; по-друге, аутофагія може блокувати апоптотичну загибель клітин, заохочуючи виживання клітин

та одночасно врівноважуючи апоптоз; нарешті, аутофагія призводить до апоптотичної загибелі клітин у відповідь на ОС. Взаємодія між апоптозом та аутофагією – це когерентний стан між смертю та виживанням у відповідь на ОС.

Одним з відомих методів лікування чоловічого безпліддя вважається використання антиоксидантів. Так, антиоксидантна терапія може значно зменшити рівень АФК та покращує рухливість сперматозоїдів. Вивчаються також комплексні терапевтичні стратегії, спрямовані на посилення антиоксидантної здатності сперматозоїдів та покращення чоловічої фертильності [3]. Проте, необхідні подальші дослідження для глибшого розуміння зв'язку АФК з регуляцією апоптозу та аутофагії, а також їхнього взаємозв'язку з метою боротьби з чоловічим безпліддям.

Таким чином, ОС є, мабуть, ключовою ланкою різних патогенетичних ланцюгів пошкодження ДНК сперматозоїдів, і може призводити до модифікації регульованої клітинної загибелі сперматозоїдів (як апоптозу так і аутофагії) та в кінцевому результаті спричиняти чоловіче безпліддя. Тоді як зменшення такого ОС сприятиме зменшенню пошкоджень ДНК сперматозоїдів, підтриманню балансу регульованої клітинної загибелі та в цілому має позитивно впливати на чоловіче репродуктивне здоров'я. А розуміння обмежень антиоксидантної здатності сперматозоїдів та впровадження стратегій для посилення цього захисту, зокрема використання антиоксидантних добавок, модифікацій раціону та способу життя, є важливим для вирішення проблеми чоловічого безпліддя, пов'язаного з ОС.

Таблиця 2 – Вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та загиблих шляхами апоптозу та некрозу сперматозоїдів

	Клітини (сперматозоїди), %		
	Живі	Апоптоз	Некроз
Контроль:	89,48±1,22	6,42±0,97	4,10±0,55
Середній (250,0 мкМ)	77,70±1,56*	13,14±0,95*	9,16±1,21*
Сильний (500,0 мкМ)	57,54±1,57*#	26,26±1,80*#	16,20±1,64*#

Примітки: * – p<0.05 – вірогідність відмінностей середніх груп даних у порівнянні з такими величинами у контролі; # – p<0.05 – відносно величин в групі «середній»; M±σ.

Таблиця 3 – Вплив різних концентрацій H_2O_2 на частки живих та загиблих шляхом автофагії сперматозоїдів

	Клітини (сперматозоїди), %	
	Живі	Автофагічні
Контроль:	85,40±1,14	14,60±1,14
Середній (250,0 мкМ)	78,20±1,10*	21,80±1,10*
Сильний (500,0 мкМ)	71,20±1,48*#	28,80±1,48*#

Примітки: * – p<0.05 – вірогідність відмінностей середніх груп даних у порівнянні з такими величинами у контролі; # – p<0.05 – відносно величин в групі «середній»; M±σ.

Висновки.

За умов окисного стресу *in vitro*, який моделювали з використанням H_2O_2, відбувається зменшення кількості живих і збільшення апоптотичних, некротичних та аутофагічних сперматозоїдів придатка сім'яника.

Необхідні подальші дослідження для поглиблення як розуміння самого зв'язку між апоптозом та аутофагію сперматозоїдів і АФК, так і вияснення меж їх взаємозв'язку для оцінки можливості фармакологічного зсуву в бік покращення чоловічих репродуктивних параметрів.

Література

1. Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, Hotaling JM, Giwercman A, Hwang K, et al. Male infertility. Nat Rev Dis Primers. 2023;9:49. DOI: 10.1038/s41572-023-00459-w.
2. WHO. Sexual and Reproductive Health and Research. Infertility Prevalence Estimates, 1990–2021. Geneva: WHO; 2023. 98 p.
3. Zhou Y, Zhang H, Yan H, Han P, Zhang J, Liu Y. Deciphering the role of oxidative stress in male infertility: insights from reactive oxygen species to antioxidant therapeutics. Front Biosci (Landmark Ed). 2025;30(4):27046. DOI: 10.31083/FBL27046.
4. Chimento A, De Luca A, Venditti M, De Amicis F, Pezzi V. Beneficial effects of resveratrol on testicular functions: focus on its antioxidant properties. Cells. 2025;14(14):1122. DOI: 10.3390/cells14141122.
5. Cai D, Li J, Peng Z, Fu R, Chen C, Liu F, et al. Interplay of ferroptosis, cuproptosis, autophagy and pyroptosis in male infertility: molecular crossroads and therapeutic opportunities. Int J Mol Sci. 2025;26(8):3496. DOI: 10.3390/ijms26083496.
6. Sharma P, Kaushal N, Saleth LR, Ghavami S, Dhingra S, Kaur P. Oxidative stress-induced apoptosis and autophagy: balancing the contrary forces in spermatogenesis. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2023;1869:166742. DOI: 10.1016/j.bbadis.2023.166742.
7. Ornatowski W, Lu Q, Yegambaram M, Garcia AE, Zemskov EA, Maltepe E, et al. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. Redox Biol. 2020;36:101679. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101679.