

УДК 616.699

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО РЕЦЕПТОРА CD95 И ЕГО ЛИГАНДА CD95L НА СПЕРМАТОЗОИДАХ МУЖЧИН РАЗНОЙ ФЕРТИЛЬНОСТИ

^{1,2}Плосконос М.В., ³Терентьев А.А.

¹ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: ploskonoz@mail.ru;

²ФГБОУ ВО «ВГУВТ» Каспийский институт морского и речного транспорта, Астрахань;

³ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

Проведено определение на поверхности сперматозоидов 80 бесплодных мужчин с разными формами субфертильности (с олигозоо-, астенозоо-, тератозооспермией) и сперматозоидов 46 фертильных мужчин рецептора инициации апоптоза CD95 и иницирующего молекулярного компонента апоптоза – лиганда CD95L. Определение экспрессии CD95 и CD95L проводилось соответствующими моноклональными антителами методом флуоресцентной микроскопии. Экспрессия CD95 на сперматозоидах фертильных мужчин наблюдалась чаще, чем у бесплодных. Однако у здоровых доноров маркированных CD95 клеток в эякуляте было менее 10%, а у бесплодных – превышало 10%. Между группами субфертильных пациентов достоверных различий в экспрессии CD95 на гаметях не обнаружено. CD95L обнаружен лишь на сперматозоидах фертильных мужчин. Полученные результаты могут быть использованы в практической андрологии, чтобы повысить информативность исследования причин мужского бесплодия.

Ключевые слова: CD95, CD95L, апоптоз, сперматозоиды, фертильность

DETERMINATION OF THE CD95 RECEPTOR AND ITS LIGAND CD95L ON SPERMATOZOA OF MEN DIFFERENT FERTILITY

^{1,2}Ploskonos M.V., ³Terentev A.A.

¹Astrakhan State Medical University Health Ministry of Russian Federation, Astrakhan, e-mail: ploskonoz@mail.ru;

²Volga State University of Water Transport Caspian Institute of Sea and River Transport, Astrakhan;

³Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

80 infertile men with different forms of subfertility (with «oligozoo», «astenzoo», «teratozoospermia») and spermatozoa of 46 fertile men of the receptor for apoptosis initiation of CD95 and the initiating molecular component of apoptosis – ligand CD95L were determined on the surface of spermatozoa. The expression of CD95 and CD95L was determined by the corresponding monoclonal antibodies by fluorescence microscopy. Expression of CD95 on spermatozoa of fertile males was observed more often than in infertile men. However, in healthy donors labeled CD95 cells in the ejaculate were less than 10%, and in infertile – exceeded 10%. Between groups of subfertile patients, no significant differences in the expression of CD95 on gametes were found. CD95L is found only on spermatozoa of fertile men. The results obtained can be used in practical andrology to increase the informative value of research on the causes of male infertility.

Keywords: CD95, CD95L, apoptosis, spermatozoa, fertility

Цикл жизни многих клеток, в том числе и половых, зависит от присутствия факторов смерти, которые могут управлять запрограммированной гибелью клетки.

Одними из основных молекул инициации процесса программируемой гибели клеток являются рецептор инициации апоптоза CD95(Fas) и иницирующий молекулярный компонент апоптоза – лиганд CD95L (FasL) [1, 2].

CD95 – гликозилированный поверхностный белок мембраны клеток, принадлежит к семейству рецепторов фактора некроза опухолей/ фактора роста нервов. CD95 экспрессируется на кортикальных тимоцитах, на поверхности В- и Т-лимфоцитов, на миелоидных клетках, а вне иммунной системы представлен на

различных типах нормальных человеческих клеток, включая диплоидные фибробласты, гепатоциты, кератиноциты, некоторые типы эпителия и паренхиматозные клетки. Антиген присутствует также на опухолевых клетках гематологической и негематологической природы.

CD95L – трансмембранный специфический белок, относится к семейству TNF-подобных цитокинов. Члены суперсемейства TNF-лиганда являются мембранными гликопротеидами II типа с ограниченной гомологией к TNF (общая гомология 20%) во внеклеточной области. Если одни члены суперсемейства (например, TNF) взаимодействуют как комплексы, то другие – по принципу связи один лиганд/один рецептор. Сигналы могут передаваться через один

лиганд. Суперсемейство TNF-лигандов вовлечено в индукцию секреции цитокинов, регуляцию повышения экспрессии молекул адгезии, активационных антигенов и ко-стимулирующих белков, а также всех известных усиливающих и регулирующих сигналов, которые появляются во время иммунного ответа [1].

CD95L экспрессируется преимущественно на активированных лимфоцитах (CD8+ Т-лимфоциты, в меньшей степени CD4+ Т-лимфоциты, NK-лимфоциты) и клетках некоторых «забарьерных» органов: фолликулярных клетках семенников – клетках Сертоли, эпителии роговицы, сетчатке, кератиноцитах [1, 2]. CD95L опосредует гибель клеток путём перекрёстного связывания с CD95-рецептором в апоптоз-чувствительных CD95-положительных клетках.

CD95-рецепторно-лигандная система используется при управлении апоптозом в процессе сперматогенеза у множества млекопитающих и у человека. Нормальное функционирование этой системы поддерживает гомеостаз в репродуктивной системе организма, а при нарушении функций этой системы развиваются многочисленные нарушения сперматогенеза.

В частности, этой системе принадлежит ключевая роль в регуляции численности сперматогенных клеток и обеспечении удаления повреждённых гамет. CD95 и CD95L вовлечены в защиту от иммунологических реакций в иммунологически привилегированных яичках [2].

Обзор литературы свидетельствует о том, что данные о наличии маркёров апоптоза CD95 и CD95L на сперматозоидах довольно противоречивы. Экспрессию этих маркёров на гаметам исследователям не всегда удавалось выявить, что, вероятно, связано с применением различных антител для обнаружения CD95 и CD95L [3, 4]. Поэтому к настоящему времени нет единого мнения об экспрессии CD95 и его лиганда в репродуктивной системе мужчин, что говорит об актуальности исследования и необходимости расширения работы в этой области.

Кроме того, обнаружено, что при различных нарушениях сперматогенеза наблюдается изменение экспрессии маркёров апоптоза CD95 и CD95L на гаметам, отражая активность патологических процессов, протекающих в мужской репродуктивной системе [2, 4].

Следует сказать, что выявление CD95-рецептора на гаметам не свидетельствует об апоптозе, а говорит лишь о готовности клетки к CD95-зависимому рецепторному апоптозу.

Цель исследования состояла в определении на поверхности сперматозоидов мужчин разной фертильности рецептора инициации апоптоза CD95 и иницирующего молекулярного компонента апоптоза – лиганда CD95L.

Материалы и методы исследования

Состояние фертильности обследованных мужчин оценивали по результатам исследования эякулята согласно нормативам ВОЗ [5]. Были исследованы физико-химические (цвет, вязкость, время разжижения и pH эякулята) и морфо-функциональные показатели качества эякулятов (двигательные и морфологические параметры, концентрация сперматозоидов в эякуляте).

Сперматозоиды выделяли из спермы 46 фертильных доноров (контрольная группа) и 80 бесплодных мужчин с разными формами субфертильности путём её центрифугирования с последующим отмыванием половых клеток в фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,4) [6, 7]. В зависимости от показателей спермограммы были выделены несколько групп субфертильных пациентов: с олигозоо-, с астенозоо- и тератозооспермией. Средний возраст всех обследованных мужчин составил $33,5 \pm 0,7$ лет.

Для определения CD95 и CD95L использовали моноклональные антитела (CD95-PE, IgG1, Caltag Labs.), биотин-конъюгированные мышинные моноклональные антитела IgG₁ против FasL человека (clone NOK-1 Pharmingen; BD, USA) и стрептавидин-фикоэритриновую (PE) тест-систему (Sav-PE; BD), согласно инструкции производителя. Микроскопические исследования проводили на флуоресцентном микроскопе «МИКРОМЕД 3 ЛЮМ» (Санкт-Петербург).

При статистической обработке полученных данных о достоверности различий показателей в сравниваемых группах судили по величине t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. Расчёт достоверности долей проводили, используя критерий z.

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании физико-химических показателей эякулята в исследуемых группах мужчин данные показатели были в норме. Возрастных различий между субфертильными мужчинами из разных групп сравнения и мужчин из контрольной группы не выявлено.

Однако все обследованные группы пациентов достоверно отличались между собой по концентрации, содержанию живых, атипичных и активно подвижных сперматозоидов.

Из обследованных групп бесплодных мужчин состояние астенозооспермии было самым распространенным нарушением, снижающим фертильность сперматозоидов.

Группа «астенозооспермия» отличалась от контрольной группы здоровых мужчин не только по числу прогрессивно подвижных форм сперматозоидов, но и по кон-

центрации гамет в эякуляте и количеству морфологически атипичных клеток, хотя последние два показателя были в пределах нормативных значений ВОЗ.

В группе «тератозооспермия», отличающейся высоким содержанием морфологически дефектных гамет, концентрация спермиев статистически достоверно не отличалась от таковой в контрольной группе мужчин, но отличия выявлены по числу прогрессивно подвижных гамет ($p < 0,001$).

Все эякуляты группы бесплодных пациентов имели низкое содержание прогрессивно подвижных гамет и существенно отличались по этому показателю от контрольной группы мужчин ($p < 0,001$).

Таким образом, эякуляты мужчин в контрольной фертильной группе и в группах «олиго-», «астено-», «терато-» достоверно отличались по морфо-функциональным показателям качества сперматозоидов и не отличались по физико-химическим критериям качества спермы.

Было обнаружено, что примерно у 90% здоровых фертильных мужчин, в эякулятах которых содержалось более 15 млн/мл сперматозоидов, меньше 10% гамет оказались несущими на поверхности рецептор инициации апоптоза CD95. У 20% этих фертильных мужчин на сперматозоидах выявлен иницирующий молекулярный компонент апоптоза CD95L.

У 53% бесплодных мужчин более 10% свежeweделенных сперматозоидов имели CD95-рецептор. CD95L на сперматозоидах бесплодных мужчин нами не обнаружено.

Экспрессия рецептора инициации апоптоза CD95 на гаметax в каждой из исследованных групп бесплодных мужчин наблюдалась в меньшем числе случаев по сравнению с фертильными пациентами. CD95 выявлен примерно у 50% субфертильных мужчин в каждой исследованной группе. Между группами субфертильных пациентов достоверных различий в экспрессии рецептора инициации апоптоза CD95 на сперматозоидах не обнаружено.

Таким образом, в сперме фертильных мужчин присутствуют сперматозоиды, содержащие на поверхности либо рецептор инициации апоптоза CD95, либо иницирующий молекулярный компонент апоптоза CD95L, а также сперматозоиды, не имеющие таких биомаркёров апоптоза. В сперме бесплодных мужчин выявляются сперматозоиды, несущие на поверхности CD95, а также гаметы без таких биохимических маркёров.

Вполне вероятно, что одной из функций иницирующего молекулярного ком-

понента апоптоза CD95L, экспрессированного на гаметax только здоровых мужчин, может быть функция самозащиты половой клетки от антиспермальных активированных лимфоцитов, причём как в мужском, так и в женском половом тракте. Таким образом, нельзя исключать, что экспрессия CD95L на сперматозоидах является фактором, помогающим выживанию мужских половых клеток [2, 8, 9].

Однако CD95L выявлен на клетках не у всех здоровых пациентов: очевидно, что при подготовке спермы к исследованию в течение 30 мин при комнатной температуре в результате процесса разжижения спермы CD95L мог быть переведён в его растворимую форму. Но разжижение в норме происходит и в женском половом тракте. Следовательно, частичная локализация CD95L у здоровых мужчин говорит о возможном присутствии других защитных механизмов для иммупротекции сперматозоидов в женском половом тракте [2, 9].

Возможно сперматозоиды, имеющие на поверхности мембраны CD95L, являются клетками, участвующими в уничтожении через механизм апоптоза сперматозоидов, имеющих на поверхности мембраны рецептор CD95. Таким образом CD95-рецепторно-лигандная система, контролирующая качество гамет, функционирует не только в период сперматогенеза, но и после него, по всему половому тракту. Функции иницирующего молекулярного компонента апоптоза CD95L, экспрессирующегося на сперматозоидах, заключаются в контроле за качеством гамет и в защите от иммунного наблюдения [2, 9].

Заключение

В результате проведённого исследования выявленные различия в экспрессии белков маркёров апоптоза – CD95 и его лиганда CD95L на поверхности сперматозоидов фертильных и бесплодных мужчин могут представлять интерес для диагностического использования в практической андрологии, а полученные результаты дополняют диагностический арсенал при исследовании мужской репродуктивной функции, повысив информативность исследования причин мужского бесплодия [10].

Список литературы

1. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. – М.: Эдиториал УРСС, 2002. – 320 с.
2. Плосконос М.В. Исследование экспрессии белков – маркёров апоптоза Fas и FasL на человеческих сперматозоидах // Проблемы репродукции. – 2015. – Т. 21, № 2. – С. 94–97.

3. McVicar CM., McClure N., Williamson K. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 81, 1. – P. 767–774.
4. Francavilla S., D’Abrizio P., Rucci N. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2000. – Vol. 85. – P. 2692–2700.
5. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – 5th ed. – WHO (Geneva), 2010. – Vol. 270.
6. Плосконос М.В. Экстернализация фосфатидилсерина на поверхность мембран сперматозоидов под действием оксидативного стресса // *Российский иммунологический журнал.* – 2015. – Т. 9, № 1(1) (18). – С. 156–157.
7. Kyrylkova K., Kyryachenko S., Leid M. Detection of apoptosis by TUNEL assay // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 887. – P. 41–47.
8. Green D.R., Ferguson T.A. The role of Fas ligand in immune privilege // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 917–924.
9. Плосконос М.В., Николаев А.А. Мембранная и растворимая форма FasL и активность матрилизина в репродуктивной системе мужчин // *Астраханский медицинский журнал.* – 2011. – № 3. – С. 43–47.
10. Полунин А.А., Мирошников В.М., Воронина Л.П., Садретдинов Р.А., Браташ В.И., Асфандияров Ф.Р. Сравнительный анализ фертильности у мужчин с хроническим простатитом // *Астраханский медицинский журнал.* – 2014. – Т. 9, № 2. – С. 63–68.