

Подвижность сперматозоидов при воздействии перекиси водорода

В.В. Евдокимов¹, В.Б. Туровецкий², Е.В. Шмальгаузен³, В.И. Муронец³

¹Научно-исследовательский институт урологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. П.А. Герцена» Минздрава России; Россия, 105425, Москва, 3-я Парковая ул., 51, стр. 4;

²биологический факультет ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12;

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова; Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

Контакты: Валерий Васильевич Евдокимов vvevdok@mail.ru

Работа содержит результаты исследования влияния низких концентраций перекиси водорода на подвижность сперматозоидов человека и активность специфического фермента сперматозоидов глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Показано, что инкубация сперматозоидов с перекисью водорода в низкой концентрации приводит к изменению и подвижности сперматозоидов, и активности фермента сперматозоидов. Выраженность наблюдавшегося эффекта зависела от концентрации перекиси водорода: активная подвижность повышалась на 17–19 %, а общая подвижность – на 11 %. Изменения подвижности сперматозоидов сопровождалась повышением активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы на 24 %, при нормозооспермии ответ был выше, чем при патозооспермии, и также зависел от концентрации перекиси водорода. Использование спермоанализатора позволило выявить изменения диапазона разных скоростей активной фракции сперматозоидов, которые были отмечены в первые 15 мин инкубации с перекисью водорода. Обсуждается возможный механизм действия обнаруженного эффекта. Активные формы кислорода легко окисляют фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу сперматозоидов, что приводит к потере подвижности сперматозоидов, например, при варикоцеле. Исходно низкая активность фермента при варикоцеле (патозооспермия), возможно, связана с подавлением антиоксидантной защиты сперматозоидов. Добавление низких концентраций перекиси водорода в образцы со сперматозоидами приводит к повышению концентрации восстановленного глутатиона в клетке. Увеличение подвижности сперматозоидов при этом может служить индикатором нормальной работы клеточной системы антиоксидантной защиты. Полученные экспериментальные результаты создают предпосылки для их внедрения в клиническую практику, в программы вспомогательных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: сперматозоиды, перекись водорода, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, активная подвижность сперматозоидов, общая подвижность сперматозоидов, активные формы кислорода, антиоксидантная защита, восстановленный глутатион, спермоанализатор, нормозооспермия, патозооспермия

DOI: 10.17650/2070-9781-2015-1-69-72

Sperm motility under exposure of hydrogen dioxide

V.V. Evdokimov¹, V.B. Turovetskiy², E.V. Shmalgauzen³, V.I. Muronets³

¹N.A. Lopatkin Research Institute of Urology – branch of P.A. Herzen Federal Medical Research Center, Ministry of Health of Russia; 51 Bldg. 4 3rd Parkovaya St., Moscow, 105425, Russia;

²Faculty of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Bldg. 12 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;

³A.N. Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Bldg. 40 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia

The paper contains research data on the effect of low concentrations of hydrogen dioxide on human sperm motility and specific enzyme activity of sperms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. It is shown that incubation of sperms with hydrogen dioxide in a low concentration leads to a change and motility in sperm and activity of sperm enzyme. Intensity of observed effect depended on the concentration of hydrogen dioxide: active mobility increased by 17–19 % and the total mobility – 11 %. Motility changes in sperms were accompanied by increased activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by 24 %, in normozoospermia response was higher than in pathozoospermia and also depended on the concentration of hydrogen dioxide. The use of sperm analyzer enabled revealing changes in the diapason of different speeds of the active fraction of sperm, which have been observed in the first 15 min of incubation with hydrogen dioxide. A possible mechanism of action of the detected effect is discussed. Reactive oxygen species easily oxidize enzyme for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of sperms, which leads to a loss of sperm motility, for example, in varicocele. Initially low enzyme activity in varicocele (pathozoospermia) may be associated with the suppression of sperm antioxidant defense. Addition of low concentrations of hydrogen dioxide into sperm samples leads to an increase in the concentration of reduced glutathione in a cell. Increase of sperm motility in this case can serve as an indicator of normal operation of the cellular antioxidant defense system. Obtained experimental results provide a background for their introduction into clinical practice in the program of assisted reproductive technologies.

Key words: sperm, hydrogen dioxide, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, active sperm motility, total sperm motility, reactive oxygen species, antioxidant protection, reduced glutathione, sperm analyzer, normozoospermia, pathozoospermia

По оценкам отечественных специалистов, демографическая ситуация характеризуется снижением рождаемости, и эта тенденция сохранится на протяжении многих лет. Доля бесплодных пар в РФ выше критического уровня, установленного Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) для простого воспроизводства равным 15 %. По данным Центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, в стране насчитывается более 4 млн бесплодных браков, что составляет 17 % [1, 2]. Причины, приводящие к бесплодию, многофакторны, что обуславливает трудности диагностики и лечения. При этом, по данным мировых и отечественных наблюдений, в последние годы отмечено снижение показателей мужской фертильности, и мужской фактор становится преобладающим в становлении бесплодия в браке [3, 4]. В работе М.В. Андреевой и соавт. [5] показано, что у мужчин репродуктивного возраста преобладает сниженный уровень подвижности сперматозоидов и увеличение патологических форм половых клеток. Известно, что подвижность сперматозоидов обеспечивается за счет энергии гликолиза, одним из ферментов которого является спермоспецифичная форма глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДс), прочно связанная с фиброзным слоем жгутика [6–8]. Авторы полагают, что возрастание подвижности сперматозоидов возможно при участии агентов, снижающих продукцию активных форм кислорода (АФК). На подвижность сперматозоидов отрицательно влияет избыток АФК, включая перекись водорода в клетке, который возникает при заболеваниях органов репродуктивной системы и часто сопровождается изменениями сперматогенеза в виде различных форм патоспермии [9, 10]. Однако в литературе существуют данные о повышении активности некоторых типов клеток при действии перекиси водорода в низких концентрациях и даже о возможной ее роли в регуляции клеточных функций.

Для изучения вопроса о возможной роли перекиси водорода в сохранении и поддержании параметров фертильности сперматозоидов на физиологическом уровне мы исследовали ее влияние в концентрациях 10 и 100 мкМ на один из важных параметров фертильности – подвижность клеток.

Материалы и методы

Материалом для экспериментов служил эякулят, полученный от пациентов с различными заболеваниями половых органов: хронический простатит, варикоцеле. Эякулят был получен в соответствии с рекомендациями 5-го издания ВОЗ [11].

Проводили стандартный анализ эякулята на световом микроскопе с увеличением $\times 400$. Затем разливали эякулят по 1 мл и вносили 10 мкл перекиси водорода в таком разведении, чтобы конечная концентрация перекиси водорода составила 10 и 100 мкМ. Опреде-

ляли изменение подвижности сперматозоидов через 30 мин и 1 ч инкубации при комнатной температуре 20–22 °С.

Подвижность сперматозоидов (активную и общую) рассчитывали как содержание в эякуляте подвижных клеток на 100 проанализированных. Эякулят, содержащий сперматозоиды, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с перекисью водорода в концентрациях 10 и 100 мкМ.

Контрольную пробу инкубировали в тех же условиях без добавок. Данные представлены в виде среднего значения 13 экспериментов \pm стандартная ошибка.

Определенный интерес представляло изучение изменения различных скоростей подвижности сперматозоидов. Абсолютные скорости определяли с помощью автоматического спермоанализатора АФС-500-2 (Биола, Россия).

Непосредственно после определения подвижности сперматозоидов перекись водорода удаляли добавлением каталазы (0,2 мкг на 1 мл образца) и сперматозоиды отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. После этого в тех же образцах эякулята измеряли активность фермента ГАФДс [12]. Полученные осадки суспендировали в равном объеме фосфатно-солевого буфера и разрушали ультразвуком, затем измеряли дегидрогеназную активность в суспензии разрушенных клеток. Приведены средние значения 10 независимых экспериментов \pm стандартная ошибка.

Концентрацию перекиси водорода определяли спектрофотометрически при 230 нм, считая коэффициент экстинкции равным $72,7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Полученные результаты представлены в виде средних арифметических значений исследованных параметров и их стандартных ошибок. Результаты обрабатывались с использованием критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Эякулят был получен от пациентов с нормозооспермией и с варикоцеле ($n = 13$).

На рис. 1 представлены результаты воздействия низких концентраций перекиси водорода (10 и 100 мкМ) на подвижность сперматозоидов. Как видно, через 1 ч инкубации действие перекиси водорода в обеих концентрациях приводит к некоторому возрастанию подвижности: общей – на 11 %, активной – на 17–19 %.

Результаты измерений активности фермента ГАФДс представлены на рис. 2. Число наблюдений – 10. Обнаружено повышение активности фермента на 22–24 % в тот же период времени.

Ниже приводятся результаты отдельных образцов эякулята. На рис. 3 показаны результаты воздействия перекиси водорода на активность фермента при нормозооспермии и при варикоцеле (средние результаты

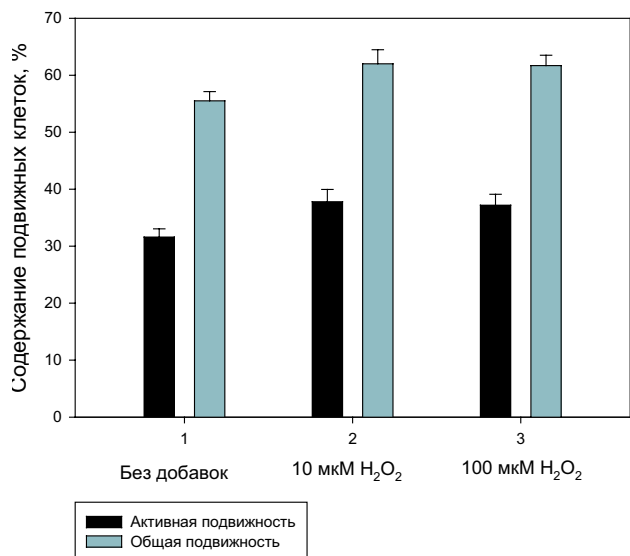


Рис. 1. Влияние перекиси водорода на подвижность сперматозоидов

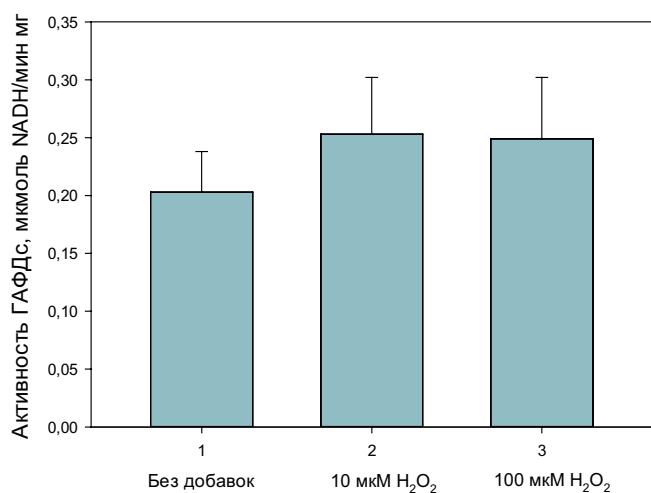
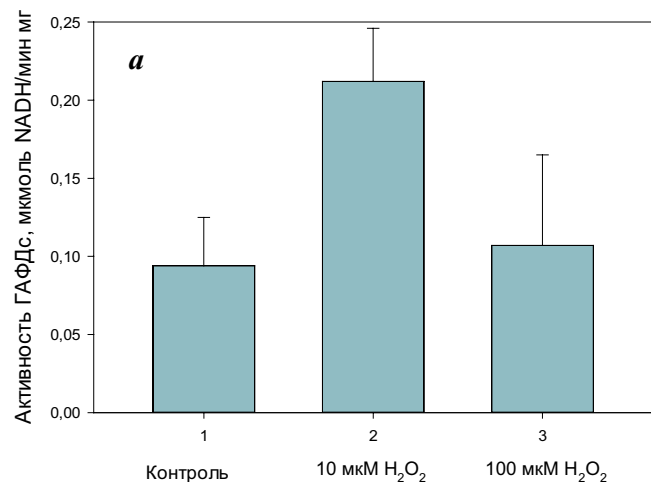


Рис. 2. Влияние перекиси водорода на активность ГАФДс



4 наблюдений). Как видно из данных, представленных на рис. 3а, активность фермента ГАФДс при нормозооспермии возрастает при действии перекиси водорода в концентрации 10 мкМ, тогда как при концентрации 100 мкМ этот эффект отсутствует. В то же время активность фермента в сперматозоидах, полученных от пациентов с варикоцеле (см. рис. 3б), практически не увеличивалась при действии перекиси в обеих использованных концентрациях.

При нормозооспермии ответ был более выразителен и по отношению к исходному уровню, и при применении различных концентраций перекиси водорода. При варикоцеле исходный уровень активности фермента был ниже, чем при нормозооспермии, и ответ был также ниже и зависел от концентрации перекиси водорода. Возможно, исходная низкая активность фермента вызвана подавлением антиоксидантной защиты при длительно существующем варикоцеле за счет высокого содержания в клетке АФК, как подчеркнуто в обзоре [10].

Как видно из таблицы, инкубация сперматозоидов в течение 15, 30 мин, 1 и 3 ч с перекисью водорода в концентрациях 10 и 100 мкМ не приводит к существенному изменению содержания подвижных клеток в различных интервалах скоростей движения. Обращает на себя внимание тот факт, что во всех случаях наблюдается некоторое возрастание содержания подвижных клеток при концентрации перекиси водорода 100 мкМ по сравнению с таковым при 10 мкМ.

Заключение

Таким образом, действие низких концентраций перекиси водорода приводит к повышению подвижности сперматозоидов в разной степени в зависимости от концентрации перекиси. При этом одновременно было обнаружено незначительное увеличение активности фермента ГАФДс. Такой эффект, исходя из исследова-

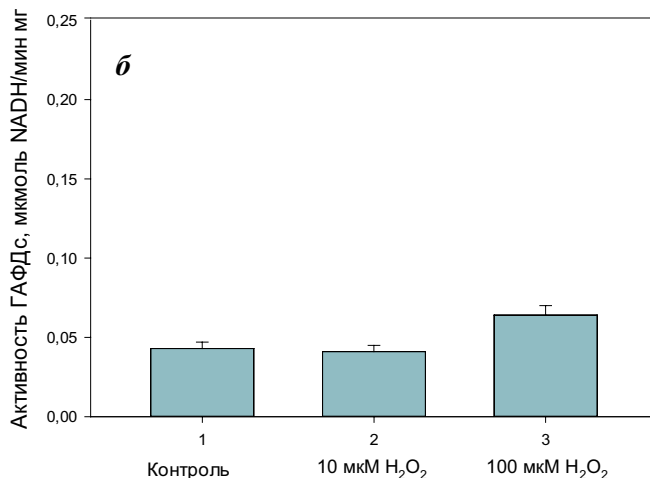


Рис. 3. Изменение активности ГАФДс после 1 ч инкубации клеток без добавок (контроль) и в присутствии 10 и 100 мкМ перекиси водорода при нормозооспермии (а) и при варикоцеле (б)



Относительное содержание в эякуляте активноподвижных сперматозоидов (%) с разными скоростями движения при воздействии перекиси водорода в различных концентрациях

Скорость движения сперматозоидов, мкм/с	Исходно	15 мин		30 мин		1 ч		3 ч		Контроль, 3 ч
		100 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	10 мкМ	100 мкМ	10 мкМ	
25–50	12,2	13,0	11,0	14,5	11,7	16,0	12,7	13,0	12,0	7,0
50–100	10,7	11,0	9,0	10,5	8,0	9,0	8,0	8,2	6,7	5,0
Выше 100	6,3	7,0	6,0	7,2	5,7	6,7	5,7	5,5	5,0	2,5
<i>Всего</i>	<i>30,2</i>	<i>31,0</i>	<i>26,0</i>	<i>32,2</i>	<i>25,4</i>	<i>31,7</i>	<i>26,4</i>	<i>26,7</i>	<i>23,7</i>	<i>14,5</i>

Примечание. Сперматозоиды инкубировали с перекисью водорода в концентрациях 10 и 100 мкМ в течение 1 ч при комнатной температуре. Нижняя строка таблицы показывает суммарное количество активноподвижных клеток, остальные клетки относятся к фракции малоподвижных и с нарушенной подвижностью.

ний, проведенных ранее, нельзя объяснить прямым взаимодействием перекиси водорода и ГАФДс. Можно предположить, что выявленный эффект связан с активацией метаболических путей, приводящих к увеличению содержания восстановленного глутатиона, т. е. с активацией системы антиоксидантной защиты сперматозоидов. Глутатион является естественным восстановителем окисленных цистеиновых остатков, поэтому его накопление может приводить к восстановлению окисленных активных центров ГАФДс и тем самым к повышению активности фермента. В этом случае положительный эффект, связанный с активизацией

фермента в сперматозоидах в присутствии низких концентраций перекиси водорода, может служить индикатором нормальной работы клеточной системы антиоксидантной защиты.

Одним из практических результатов исследования является возможность повышения подвижности сперматозоидов при исходной астенозооспермии и использование подвижных сперматозоидов в программах вспомогательных репродуктивных технологий (экстракорпоральное оплодотворение, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида, супружеская инсеминация), а также после криоконсервации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сухих Г.Т., Божедомов В.А. Мужское бесплодие. Практическое руководство для урологов и гинекологов. М.: Эксмо, 2009. С. 240. [Sukhikh G.T., Bozhedomov V.A. Male infertility. Practical guide for urologists and gynecologists. Moscow: Eksmo, 2009. P. 240. (In Russ.)].
2. Андрология. Клинические рекомендации. Под ред. П.А. Щеплева. М.: Медпрактика, 2012. С. 155. [Andrology. Clinical recommendations. P.A. Scheplev (ed.). Moscow: Medpraktika, 2012. 155 p. (In Russ.)].
3. Бесплодие. Серия технических докладов ВОЗ. 2001. С. 76. [Infertility. Technical Report Series of WHO. 2001. P. 76. (In Russ.)].
4. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. Под ред. Э. Нишлага, Г.М. Бере. М.: МИА, 2005. С. 450. [Andrology. Men's health and reproductive system dysfunction. E. Nishlag, G.M. Bere (eds.). Moscow: MIA, 2005. P. 450. (In Russ.)].
5. Андреева М.В., Шилейко Л.В., Остроумова Т.В. и др. Показатели спермограмм в летне-осенний период 2010 г. по сравнению с таковыми в 2007–2009 гг. Андрология и генитальная хирургия 2013;(1):11–4. [Andreeva M.V., Shileyko L.V., Ostroumova T.V. et al. Indicators of semen analysis in summer and autumn of 2010 as compared with those in 2007–2009. Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery 2013;(1):11–4. (In Russ.)].
6. Westhoff W., Kamp G. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. J Cell Sci 1997;110(Pt 15):1821–9.
7. Welch J.E., Brown P.L., O'Brien D.A. et al. Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells. J Androl 2000;21(2):328–38.
8. Шуцкая Ю.Ю., Элькина Ю.Л., Куравский М.Л. и др. Исследование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека. Биохимия 2008;73(2):228–37. [Shutskeya Yu.Yu., Elkina Yu.L., Kuravsky M.L. et al. Investigation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human sperm. Biokhimiya = Biochemistry 2008;73(2):228–37. (In Russ.)].
9. Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril 2003;79(4):829–43.
10. Божедомов В.А., Торопцева М.В., Ушакова И.В. и др. Активные формы кислорода и репродуктивная функция мужчин (обзор литературы). Андрология и генитальная хирургия 2011;(3):10–6. [Bozhedomov V.A., Toroptseva M.V., Ushakova I.V. et al. Active forms of oxygen and male reproductive function (literature review). Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery 2011;(3):10–6. (In Russ.)].
11. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO, 2010. P. 271.
12. Элькина М.М., Атрошенко М.М., Брагина Е.Е. Окисление глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы приводит к снижению подвижности сперматозоидов. Биохимия 2011;76(2):326–31. [Elkina M.M., Atroschenko M.M., Bragina E.E. Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase leads to a reduction in sperm mobility. Biokhimiya = Biochemistry 2011;76(2):326–31. (In Russ.)].

Анализаторы фертильности спермы БИОЛА АФС-500-2



ООО НПФ «БИОЛА»
8 (495) 414 67 47/48
www.biola.ru

Спермоанализаторы **БИОЛА АФС-500-2** предназначены для исследования сперматозоидов в неразбавленном эякуляте. Прибор позволяет быстро и точно диагностировать нарушения репродуктивной функции у мужчин и определить тактику лечения. Устройство поставляется с универсальным программным обеспечением и встроенным цифровым микроскопом.



Особенности:

- Залатентованный метод исследования: позволяет быстро и точно выявлять все дискриминационные параметры
- Возможность проводить исследования в нативной среде
- Получение воспроизводимых результатов высокой точности
- Простота в эксплуатации
- Полное отсутствие расходных материалов
- Возможность съемки фото и видео в реальном времени

Определяемые параметры:

- Общая концентрация сперматозоидов (TSC)
- Концентрация подвижных сперматозоидов (MSC)
- Концентрация функциональных сперматозоидов (FSC)
- Индекс подвижности спермы (SMI)
- Подвижность быстрых (a)
- Прогрессивная подвижность (a + b)
- Истинная подвижность (быстрее 4 мкм/с)
- Непрогрессивная подвижность + очень медленные (менее 4 мкм/с)
- Расчет сперматозоидов с нормальной морфологией
- Средняя скорость сперматозоидов
- Общее количество сперматозоидов
- Общее количество подвижных сперматозоидов (TMS)
- Общее количество функциональных сперматозоидов