

Протективное действие дозированной физической нагрузки при окислительном стрессе сперматозоидов

Э.Ф. Галимова, В.Н. Павлов, Ш.Н. Галимов

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа

Контакты: Шамиль Нариманович Галимов sngalim@mail.ru

Иммобилизационный стресс сопровождается нарушениями количественных и качественных характеристик эякулята, дисбалансом про- и антиоксидантных систем в сперматозоидах и повышением содержания биомаркера окислительного повреждения ДНК 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина. Дозированная физическая нагрузка приводила к нормализации параметров спермы и свободнорадикального гомеостаза сперматозоидов. Наибольшим протективным эффектом обладает предварительная тренировка, которая способствует более раннему восстановлению изученных показателей.

Ключевые слова: окислительный стресс, сперматозоиды, физические упражнения, крысы

Protective effect of measured physical oxidative stress load spermatozoa

E.F. Galimova, V.N. Pavlov, Sh.N. Galimov

Bashkortostan State Medical University, Ministry of Health of Russia, Ufa

The immobilization stress is accompanied by disturbances of quantitative and qualitative ejaculate characteristics, the imbalance between pro- and antioxidant systems in sperm and elevated biomarker of oxidative DNA damage-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. The dosed physical load leads to normalization of semen parameters and free radical homeostasis in sperm. The greatest protective effect has pre-training, which contributes to early recovery of the studied parameters.

Key words: oxidative stress, sperm, exercises, rats

Введение

Сперматозоиды – это первые клетки, в которых была обнаружена способность к продукции свободных радикалов [1]. В настоящее время накоплен значительный объем информации о роли активных форм кислорода (АФК) в процессе оплодотворения и сделано заключение о необходимости коррекции окислительного стресса как одной из основных причин мужского бесплодия [2, 3]. Однако единого мнения об эффективности антиоксидантной терапии не сформировано [4]. Это диктует необходимость поиска новых средств коррекции окислительного стресса в сперматозоидах, включая немедикаментозные подходы.

Так, имеются сведения о существовании ассоциаций между физической активностью и качеством спермы [5, 6]. Анализ влияния физической нагрузки различной интенсивности на параметры эякулята и роли окислительного стресса в этих процессах положен в основу настоящей работы.

Материал и методы

Объектом исследования служили 60 половозрелых самцов белых крыс массой 200–260 г. Животные были разделены на 4 группы по 15 особей.

Животных 1-й группы для создания модели иммобилизационного стресса закрепляли брюшком кверху на лабораторных станках и держали их в таком положении 6 ч в первые сутки эксперимента. Животные 2-й группы (престрессовый тренинг) находились в условиях дозированной физической нагрузки – плавательный тест по 15 мин в сутки в течение 5 дней – с последующей иммобилизацией. У животных 3-й группы (постстрессовый тренинг) вызывали иммобилизацию, после чего моделировали плавательный тест по описанной методике. Все животные наблюдались в течение 1 мес с мониторингом показателей эякулята и окислительного стресса. Интактные животные были выделены в отдельную группу.

Общее количество сперматозоидов, их подвижность и подсчет патологических форм определяли в камере Горяева. Проводили количественное определение продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, – ТБК-реактивных продуктов (ТБК-РП). Определяли содержание маркера окислительного повреждения ДНК 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-oxodGu), общую антиокислительную активность (ОАА) в эякуляте. О состоянии ферментативного зве-

на антиоксидантной защиты судили по активности Cu/Zn-супероксиддисмутаза (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатион-S-трансферазы (ГСТ). Определяли активность СОД, общую активность ГСТ, ГПО, каталазы [7].

Для статистической обработки использован пакет программ Statistica 6.0. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Установлены выраженные изменения параметров семенной жидкости и ее оксидативного статуса в различных условиях физической активности (табл. 1 и 2).

В условиях иммобилизационного стресса через сутки после воздействия количество сперматозоидов уменьшалось – до 30 % от уровня контроля; при этом жизнеспособность и относительное содержание под-

Таблица 1. Параметры эякулята крыс при различных режимах физической активности

Группа животных	Сутки наблюдения	Показатель			
		Количество, млн	Патологические формы, %	Подвижные формы, %	Жизнеспособность, %
Интактные		43,9 ± 5,2	5,9 ± 0,6	80,2 ± 5,8	85,7 ± 4,6
1-я	1-е	13,2 ± 2,5*	19,6 ± 2,1*	22,3 ± 3,3*	41,6 ± 4,7*
	7-е	11,4 ± 1,9*	16,4 ± 1,7*	25,9 ± 2,7*	40,1 ± 3,2*
	14-е	15,6 ± 2,7*	20,3 ± 2,7*	21,0 ± 3,1*	49,8 ± 2,2*
	30-е	16,0 ± 2,1*	18,1 ± 1,1*	30,5 ± 2,9*	55,8 ± 3,6*
2-я	1-е	36,8 ± 3,6	6,2 ± 0,7	81,6 ± 3,1	80,5 ± 3,9
	7-е	35,1 ± 4,0	7,5 ± 0,3	73,9 ± 2,7	86,2 ± 4,6
	14-е	44,9 ± 2,4	6,6 ± 0,5	78,0 ± 3,1	88,0 ± 4,3
	30-е	39,5 ± 2,8	6,9 ± 0,7	75,5 ± 2,9	83,4 ± 3,8
3-я	1-е	16,7 ± 2,2*	18,3 ± 1,5*	24,6 ± 3,7*	37,5 ± 4,1*
	7-е	35,0 ± 3,3	13,2 ± 0,7*	34,0 ± 3,6*	44,2 ± 2,3*
	14-е	39,5 ± 3,0	5,6 ± 0,9	70,1 ± 4,7	81,7 ± 2,7
	30-е	42,4 ± 5,1	7,3 ± 0,8	77,2 ± 2,9	78,4 ± 2,4

Примечание (здесь и в табл. 2). * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Таблица 2. Параметры свободнорадикального гомеостаза сперматозоидов при различных режимах физической активности

Группа животных	Сутки наблюдения	Показатель						
		ТБК-РП, нМ/мл	8-oxodGu, нг/мл	ОАА, нМ/мл	СОД, Е/мг белка	Каталаза, нКат/мг белка	ГПО, Е/мг белка	ГСТ, нг/мл
Интактные		3,5 ± 0,4	32,1 ± 1,7	44,1 ± 5,3	202 ± 14,3	3,8 ± 0,5	22,3 ± 2,4	64,2 ± 5,6
1-я	1-е	5,9 ± 0,4*	41,6 ± 2,2*	29,4 ± 2,6*	143 ± 7,5*	3,1 ± 0,3	9,6 ± 0,8*	27,6 ± 2,7*
	7-е	6,5 ± 0,7*	82,5 ± 3,9*	27,2 ± 3,1*	135 ± 10,8*	2,7 ± 0,4	8,6 ± 0,8*	30,5 ± 2,4*
	14-е	5,6 ± 0,5*	70,3 ± 2,0*	30,4 ± 2,8*	129 ± 8,2*	2,1 ± 0,2*	8,3 ± 0,7*	34,7 ± 3,9*
	30-е	6,0 ± 0,5*	74,1 ± 3,6*	26,2 ± 2,1*	139 ± 8,7*	2,2 ± 0,3*	9,2 ± 0,8*	32,5 ± 2,9*
2-я	1-е	3,2 ± 0,4	30,2 ± 1,4	46,7 ± 4,9	192 ± 15,6	3,9 ± 0,6	24,4 ± 2,6	58,2 ± 5,1
	7-е	3,6 ± 0,4	28,5 ± 2,7	40,4 ± 3,6	195 ± 9,7	3,5 ± 0,5	25,2 ± 2,8	61,3 ± 4,8
	14-е	4,3 ± 0,5	35,7 ± 2,1	42,0 ± 4,8	209 ± 14,2	3,1 ± 0,4	20,4 ± 2,3	60,8 ± 5,5
	30-е	3,9 ± 0,4	33,6 ± 2,8	39,3 ± 3,4	213 ± 16,1	3,6 ± 0,3	23,2 ± 3,0	65,1 ± 6,3
3-я	1-е	6,1 ± 0,5*	44,3 ± 2,3*	31,5 ± 3,7*	154 ± 9,5*	2,4 ± 0,2*	10,6 ± 1,8*	40,2 ± 3,6*
	7-е	6,2 ± 0,4*	47,7 ± 3,4*	37,0 ± 3,2	161 ± 11,7*	3,0 ± 0,3	9,7 ± 0,9*	37,4 ± 3,1*
	14-е	4,0 ± 0,5	36,5 ± 2,2	45,6 ± 4,4	186 ± 12,1	3,2 ± 0,4	18,1 ± 2,2	55,1 ± 4,3
	30-е	3,4 ± 0,4	31,1 ± 1,9	41,2 ± 3,9	178 ± 9,9	3,7 ± 0,4	19,8 ± 2,3	57,9 ± 3,7

вижных клеток также существенно снижались на фоне прироста патологических форм сперматозоидов. Полученные результаты не противоречат данным других авторов о влиянии ограничения двигательной активности на сперматогенез [8].

Были изучены также активность свободнорадикальных процессов и антиоксидантных систем сперматозоидов. Установлено, что при иммобилизации происходит накопление продуктов липопероксидации ТБК-РП и биомаркера окислительного повреждения ДНК 8-oxodGu с максимумом на 7-е сутки до 183 % и 257 % соответственно.

Определение ОАА необходимо для интегральной оценки состояния неферментативного звена антиоксидантной защиты и рекомендовано в качестве надежного теста в диагностике мужской инфертильности [9]. Обнаружено, что при ограничении двигательной активности на первые сутки после воздействия происходит уменьшение ОАА в гаметех в 1,5 раза по сравнению с контролем с сохранением этого тренда в течение всего периода наблюдения.

Можно констатировать, что при иммобилизационном стрессе складываются условия для интенсификации свободнорадикального окисления сперматозоидов, обусловленного напряжением и истощением антиокислительных систем. Эта гипотеза подтверждается результатами определения СОД, ГПО, ГСТ и каталазы, активность которых уменьшалась во все сроки наблюдения. При этом обращало на себя внимание рассогласование функционирования антиоксидантных ферментов: снижение активности СОД в различные сроки эксперимента составило от 29 до 36 %, в то время как ГСТ – 46–57 %, ГПО – 57–64 %. Различная степень ингибирования ферментов первой и 2-й линий антиоксидантной защиты создает предпосылки для накопления липоперекисей, H_2O_2 и образования гидроксильного радикала.

Перекись водорода выступает в качестве ключевого инициатора негативных эффектов окислительного стресса в эякуляте, вызывая тем самым инактивацию энзиматических систем антиокислительной защиты сперматозоидов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, СОД, ГСТ и ГПО, формируя, таким образом, порочный круг. Исследование протеома селензависимых ферментов позволило идентифицировать несколько разновидностей ГПО, функция которых заключается, наряду с нейтрализацией липоперекисей, в активации фактора транскрипции NF-карраВ, угнетении циклооксигеназы-2 и модуляции биосинтеза эйкозаноидов, а также в участии в процессах эмбрио- и сперматогенеза [10].

В определенных условиях основная роль в детоксификации пероксидов органических кислот принадлежит неселеновой пероксидазе – ГСТ, а также каталазе, активность которых в некоторых тканях может даже увеличиваться [11]. Однако в сперме при иммо-

билизационном стрессе мы наблюдали одновременное снижение функции каталазы, ГПО и ГСТ, что, вероятно, является отражением высокой чувствительности гамет к окислительному стрессу.

Принципиально иной была динамика исследуемых показателей у животных 2-й и 3-й групп. Предварительная дозированная тренировка животных обладала выраженным защитным действием, практически полностью предотвращая развитие патологии сперматогенеза при иммобилизации. При постстрессовом тренинге качественные и количественные характеристики сперматозоидов в первые 7 сут эксперимента были достоверно ниже показателей интактных животных, однако уже к 14 суткам наблюдалось восстановление исходных значений, т. е. тренировка приводила к существенному сокращению темпов нормализации параметров эякулята.

Сдвиги свободнорадикального гомеостаза сперматозоидов у тренированных животных в целом соответствовали параметрам эякулята. Так, во 2-й группе (престрессовый тренинг) уровни показателей окислительного стресса и ферментов антиоксидантной защиты были статистически одинаковы ($p > 0,05$) и до тренировки, и после, а также после иммобилизации. В 3-й группе (постстрессовый тренинг) обездвиживание сопровождалось существенным приростом уровня 8-oxodGu – биоиндикатора окислительного повреждения ДНК, однако он снизился уже на 14-е сутки эксперимента, т. е. раньше, чем в группе нетренированных животных. Средний уровень ТБК-РП также значительно увеличился после иммобилизации и достоверно уменьшился после плавательной нагрузки. Аналогично, иммобилизация способствовала угнетению антиоксидантной защиты, но после тренировки к 14 суткам отмечено повышение активности антиоксидантных ферментов и ОАА.

Выводы

Резюмируя представленный материал, необходимо отметить, что экстремальные режимы двигательной активности тесно сопряжены с развитием дисбаланса систем антиоксидантной защиты и генерации свободных радикалов с повреждением ДНК сперматозоидов. Предшествовавшие исследования выявили негативное влияние окислительного стресса на фертильность эякулята в естественном цикле и при экстракорпоральном оплодотворении, а также неоднозначную эффективность фармакологической коррекции [12, 13]. Малоподвижный образ жизни – гиподинамия либо, напротив, чрезмерные физические нагрузки – непрерывные спутники современного мужчины. Полученные результаты раскрывают молекулярные механизмы протективного действия регулярных упражнений при активации свободнорадикальных процессов в эякуляте, что может являться дополнением или альтернативой лекарственной терапии.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943;138:512–8.
2. Галимов Ш.Н., Громенко Д.С., Галимова Э.Ф. и др. Влияние L-карнитина на показатели эякулята у мужчин из бесплодных пар. *Урология* 2012;1:47–51.
3. Agarwal A., Allamaneni S. Free radicals and male reproduction. *J Indian Med Assoc* 2011;109(3):184–7.
4. Agarwal A., Sekhon L. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified? *Indian J Urol* 2011;27(1):74–85.
5. Tartibian B., Maleki B. Correlation between seminal oxidative stress biomarkers and antioxidants with sperm DNA damage in elite athletes and recreationally active men. *Clin J Spor Med* 2012;22(2):132–9.
6. Wise L., Cramer D., Hornstein M. et al. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2011;95(3):1025–30.
7. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник. СПб.: Интермедика, 1999. 656 с.
8. Потемина Т.Е. Нарушение сперматогенеза в условиях стресса у самцов крыс. *Бюл экспер биол* 2008;6:645–7.
9. Mahfouz R., Sharma R., Sharma D. et al. Diagnostic value of the total antioxidant capacity (TAC) in human seminal plasma. *Fertil Steril* 2009;91(3):805–11.
10. Brigelius-Flohe R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 2006;387(10–11):1329–35.
11. Попова Т.Н., Рахманова Т.И., Сафонова О.А. Активность систем детоксикации пероксидов в тканях крыс при алкогольной детоксикации. *Наркология* 2008;2:32–5.
12. Артифексов С.Б. Фармакотерапия в андрологии. М.: Медицинская книга, 2008. 216 с.
13. Gharagozloo P., Aitken R. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011;26(7):1628–40.