

Воздействие пирувата на сперматозоиды человека *in vitro*

В.В. Евдокимов¹, Н.К. Исаев², В.Б. Туровецкий²

¹Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, ул. 3-я Парковая, 51, стр. 1;

²ФГБОУ «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Контакты: Валерий Васильевич Евдокимов vvevdok@mail

Цель исследования – изучить биологическое действие энергетического субстрата (пирувата) на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*.

Материалы и методы. Исследование проводили на сперматозоидах человека из 14 образцов эякулята, полученных общепринятым способом. Подвижность и жизнеспособность оценивали по рекомендациям Всемирной организации здравоохранения при увеличении в 400 раз. Из каждого образца эякулята после разжижения отбирали по 1 мл для опыта и контроля. Опыт заключался в добавлении пирувата в пробирку с эякулятом до достижения концентрации 1 ммоль.

Результаты. Уровень исходной подвижности сперматозоидов соответствовал нормозооспермии. Доля сперматозоидов с прямолинейным движением (категорий А и В) увеличилась на 24, 67 и 84 % через 30, 60 и 120 мин эксперимента. Доля сперматозоидов с непрямолинейным движением (категории С) и общая доля подвижных сперматозоидов существенно не изменились в этот период. Количество жизнеспособных сперматозоидов на протяжении опыта статистически значимо не изменилось.

Заключение. Выявлена способность пирувата повышать подвижность сперматозоидов человека *in vitro*.

Ключевые слова: сперматозоиды, подвижность, пируват, эксперимент *in vitro*

Для цитирования: Евдокимов В.В., Исаев Н.К., Туровецкий В.Б. Воздействие пирувата на сперматозоиды человека *in vitro*. Андрология и генитальная хирургия 2020;21(3):56–60.

DOI: 10.17650/2070-9781-2020-21-3-56-60



Effect of pyruvate on human sperm *in vitro*

V.V. Evdokimov¹, N.K. Isaev², V.B. Turovetsky²

¹N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 513rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia;

²Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

The study objective is to investigate the biological effect of energy substrate (pyruvate) on human sperm motility *in vitro*.

Materials and methods. The study was conducted using human sperm from 14 ejaculate samples obtained by the standard method. Motility and viability were evaluated per the World Health Organization guidelines under 400x magnification. After dilution, 1 ml was sampled from the ejaculate for the experiment and control. The experiment consisted of addition of pyruvate to the test tube with the ejaculate in final concentration of 1 mmol.

Results. The level of initial sperm motility corresponded to normozoospermia. The percentage of progressive motile sperm increased by 24, 67 and 84 % after 30, 60 and 120 min of the experiment. The percentage of non-progressive motile sperm and total percentage of motile sperm showed no significant change during this time period. The number of live spermatozoa showed no significant change during the experiment.

Conclusion. The study showed that pyruvate can stimulate motility of human sperm *in vitro*.

Key words: spermatozoa, motility, pyruvate, experiment *in vitro*

For citation: Evdokimov V.V., Isaev N.K., Turovetsky V.B. Effect of pyruvate on human sperm *in vitro*. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery* 2020;21(3):56–60. (In Russ.).

Введение

В настоящее время демографическая ситуация в стране характеризуется падением рождаемости. Эта

тенденция по оценкам демографов сохранится на протяжении нескольких лет. По данным Всемирной организации здравоохранения, бесплодными являются

10–15 % браков. В Российской Федерации, по сведениям Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова, это число выше 17 %; более чем у 4 млн мужчин диагностированы различные формы бесплодия [1–3]. В последние годы нарушения репродуктивной функции у мужчин приобретают особую медицинскую и социальную значимость в связи с прогрессирующим снижением фертильных свойств сперматозоидов [4].

Ухудшение качества спермы и количества сперматозоидов (патозооспермия) выявляют у 70–88 % мужчин, состоящих в бесплодном браке [5]. При этом возможно как уменьшение количества сперматозоидов (олигозооспермия), так и снижение их подвижности (астенозооспермия) или появление большого количества сперматозоидов с патологическим строением (тератозооспермия).

Нарушения фертильности рассматривают как многофакторное состояние. Для коррекции нарушений и нормализации структурно-функционального состояния мужских половых клеток используют гормональные препараты, витамины, микроэлементы, антиоксиданты и др. Однако эффект такого лечения не всегда удовлетворяет и пациента, и врача, поэтому одна из актуальных задач современной андрологии заключается в поиске агентов, способных повышать подвижность сперматозоидов, а также их устойчивость к воздействию повреждающих факторов различной природы. Ранее нами было выполнено исследование, направленное на поиск способов повышения мужской фертильности путем увеличения подвижности сперматозоидов при помощи регуляторных пептидов [6] или белково-пептидного комплекса, выделенного из семенников быка [7]. Продемонстрировано, что регуляторные пептиды и препараты на основе белково-пептидного комплекса обладают ярко выраженной способностью увеличивать число активно-подвижных сперматозоидов и общее число подвижных сперматозоидов. Кроме того, нам удалось показать, что повысить подвижность сперматозоидов можно с помощью веществ, которые способны непосредственно влиять на функционирование митохондрий. Например, метиленовый синий способен оказывать положительный эффект в тех случаях, когда повреждение клеток связано с нарушением митохондриальных функций [8, 9]. Однако мы предположили, что наиболее простой путь увеличения энергетических потенциалов митохондрий — это применение естественных метаболических субстратов, используемых этими органеллами. Одним из таких субстратов является пируват — конечный продукт метаболизма глюкозы в процессе гликолиза. Одна молекула глюкозы превращается при этом в две молекулы пирувата, которые далее используются митохондриями для продукции аденозинтрифосфата (АТФ).

Цель данного исследования — изучить биологическое действие энергетического субстрата (пирувата) на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*.

Материалы и методы

Исследование проводили на сперматозоидах человека из 14 образцов эякулята, полученных общепринятым способом. Подвижность и жизнеспособность оценивали в соответствии с руководством Всемирной организации здравоохранения 5-го пересмотра с использованием микроскопа Amplival (Karl Zeiss, Германия) при увеличении в 400 раз. Из каждого образца эякулята после разжижения отбирали по 1 мл для опыта и контроля. Опыт заключался в добавлении в пробирку пирувата до достижения концентрации 1 ммоль.

Результаты представлены в виде среднего арифметического значения и их среднеквадратической ошибки. Различия параметров обрабатывали с использованием критерия ANOVA с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

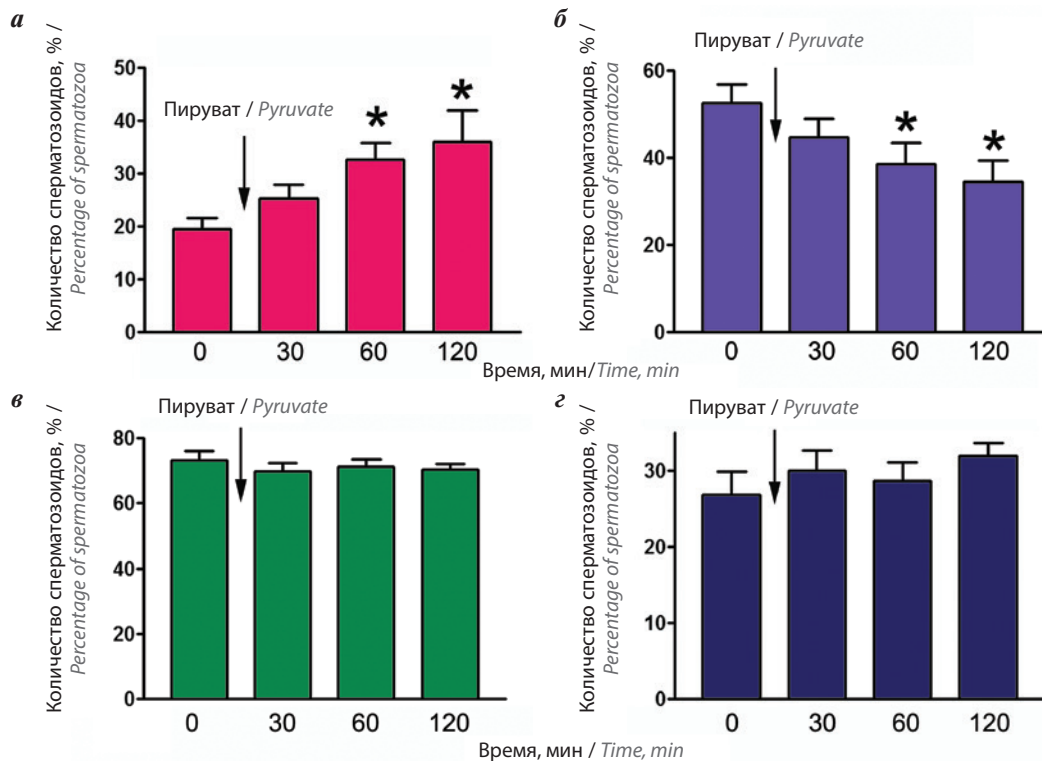
Результаты

Мы провели ряд экспериментов со сперматозоидами с исходной нормальной подвижностью. Доля сперматозоидов разных категорий (активно-подвижных, с малой подвижностью) и общее количество подвижных клеток рассчитывали в процентах.

Активно-подвижные сперматозоиды составляли $20 \pm 2 \%$, с малой подвижностью — $53 \pm 4 \%$, что в сумме составляло $73 \pm 3 \%$ (см. рисунок). Таким образом, исходно подвижность сперматозоидов соответствовала нормозооспермии. В течение последующих 2 ч подвижность клеток не изменялась. Однако если в исследуемую фракцию вносили пируват до конечной концентрации 1 ммоль, то доля активно-подвижных сперматозоидов возрастала через 30 мин до $25 \pm 2 \%$, через 60 мин — до $33 \pm 3 \%$, через 120 мин — до $36 \pm 6 \%$. Доля сперматозоидов с малой подвижностью статистически значимо не изменялась в присутствии пирувата, а доля клеток со средней подвижностью статистически значимо снижалась через 30 мин до $45 \pm 4 \%$, через 60 мин — до $38 \pm 5 \%$, через 120 мин — до $36 \pm 5 \%$. Суммарная доля сперматозоидов с активной подвижностью и сперматозоидов со средней подвижностью на протяжении всего эксперимента оставалась постоянной (см. рисунок).

Таким образом, добавление пирувата в эякулят с инкубацией в течение 30–120 мин селективно изменяло подвижность сперматозоидов с исходно нормальной активностью, не влияя на подвижность клеток с исходной низкой активностью.

В контрольных образцах эякулята ($n = 11$) подвижность сперматозоидов на протяжении эксперимента не изменялась по отношению к исходному уровню. Отмечено незначительное увеличение фракции



Изменение доли сперматозоидов при воздействии пирувата: а – активно-подвижные сперматозоиды; б – сперматозоиды с малой подвижностью; в – все подвижные сперматозоиды; г – сперматозоиды с нарушенной подвижностью. Стрелкой указан момент добавления пирувата. Различия по сравнению с исходным значением статистически значимы ($p < 0,05$)

Changes in the percentage of spermatozoa after addition of pyruvate: а – progressive motile sperm; б – non-progressive motile sperm; в – all motile sperm; г – immotile sperm. Arrow shows addition of pyruvate. Significant changes compared to the baseline ($p < 0,05$)

сперматозоидов с нарушенной подвижностью (с 22,0 до 23,6 %) через 2 ч наблюдения. Количество живых клеток в период проведения эксперимента оставалось на уровне 74–76 %.

Обсуждение

В человеческих сперматозоидах, в отличие от сперматозоидов ряда животных, анаэробный гликолиз играет более важную роль, чем окислительное фосфорилирование [10]. Однако окислительное фосфорилирование является наиболее экономным с точки зрения распада углеводов и наиболее эффективным процессом, снабжающим спермию энергией. Человеческие сперматозоиды способны использовать экзогенный пируват для повышения гликолитической продукции АТФ, а следовательно, и своей подвижности. Кроме того, одним из ферментов гликолиза является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, которая весьма чувствительна к повреждающему действию активных форм кислорода [11]. Ранее нам удалось показать, что увеличить подвижность сперматозоидов можно с помощью веществ, которые способны непосредственно влиять на функционирование митохондрий. Один из таких агентов – метиленовый синий [8]. Мы предположили, что использование естественных

метаболических субстратов, используемых этими органеллами, например пирувата, может увеличить энергетические потенциалы митохондрий. Полученные нами экспериментальные данные показали, что реакция сперматозоидов на воздействие пирувата различается. Наиболее заметно в первые 30–120 мин опыта увеличилась фракция активно-подвижных сперматозоидов. Количество сперматозоидов с низкой подвижностью не изменилось, а увеличение доли сперматозоидов с высокой активностью происходило за счет фракции клеток со средней подвижностью. Этот результат имеет большое практическое значение, так как нам удалось селективно увеличить количество сперматозоидов с высокой подвижностью, не затрагивая клетки с малой подвижностью, у которых велика вероятность патологических отклонений.

Данные о благоприятном влиянии пирувата на подвижность сперматозоидов человека подтверждаются и другими исследованиями. Так, Ю.Ю. Шуцкая и соавт. установили, что обработка человеческих сперматозоидов экзогенным пируватом увеличивает внутриклеточный уровень АТФ на 56 % [12]. Кроме того, пируват улучшает жизнеспособность и целостность ДНК при криоконсервации сперматозоидов [13].

Заключение

Выявлена способность пирувата стимулировать подвижность сперматозоидов человека *in vitro*. Наблюдаемый эффект может быть связан с увеличением продукции АТФ

в сперматозоидах в процессе метаболизма пирувата. Это свидетельствует о перспективности дальнейших исследований возможности использования препарата или его аналогов в андрологической и репродуктивной медицине.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Щеплев П.А. Андрология. Клинические рекомендации. М.: Медпрактика, 2007. 154 с. [Scheplev P.A. Andrology. Clinical recommendations. Moscow: Medpraktika, 2007. 154 p. (In Russ.)].
2. Кулаков В.И. Вспомогательные репродуктивные технологии – настоящее и будущее. М.: Мединформагентство, 2005. С. 11–15. [Kulakov V.I. Assisted reproductive technologies – present and future. Moscow: Medinformagentstvo, 2005. Pp. 11–15. (In Russ.)].
3. Пашкова Е.Ю., Калинин С.Ю. Мужское бесплодие в XXI веке – реалии и перспективы. Новые возможности использования комбинированной стимулирующей терапии гонадотропинами. Эффективная фармакотерапия 2013;(1):26–32. [Pashkova E.Yu., Kalinchenko S.Yu. Male infertility in the 21st century – realities and prospects. Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy 2013;(1):26–32. (In Russ.)].
4. Овчинников Р.И., Гамидов С.И., Попова А.Ю. и др. Причины репродуктивных потерь у мужчин – фрагментация ДНК сперматозоидов. Русский медицинский журнал 2015;23(11):634–8. [Ovchinnikov R.I., Gamidov S.I., Popova A.Yu. et al. The causes of reproductive loss in men are sperm DNA fragmentation. Russky meditsinsky zhurnal = Russian Medical journal 2015;23(11):634–8. (In Russ.)].
5. Евдокимов В.В., Захариков С.В., Андреева Л.А. и др. Влияние регуляторных пептидов на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*. Экспериментальная и клиническая урология 2016;(2):67–9. [Evdokimov V.V., Zakhariikov S.V., Andreeva L.A. et al. Influence of regulatory peptides on the mobility of human sperm cells *in vitro*. Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology 2016;(2):67–9. (In Russ.)].
6. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. 127 с. [Yamskova V.P., Krasnov M.S., Yamskov I.A. New experimental and theoretical aspects in bioregulation. The mechanism of action of membranotropic homeostatic tissue-specific bioregulators. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. 127 p. (In Russ.)].
7. Евдокимов В.В., Исаев Н.К., Туровецкий В.Б., Пирутин С.К. Влияние метиленовой сини на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*. Экспериментальная и клиническая урология 2019;(3):50–3. [Evdokimov V.V., Isaev N.K., Turovetsky V.B., Pirutin S.K. Influence of methylene blue on human spermatozoid mobility *in vitro*. Eksperimentalnaya i klinicheskaya urologiya = Experimental and Clinical Urology 2019;(3):50–3. (In Russ.)].
8. Wainwright M., Amaral L. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. Trop Med Int Health 2005;10(6):501–11. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2005.01417.x.
9. Hamada A., Esteves S., Agarwal A. The role of contemporary andrology in unraveling the mystery of unexplained male infertility. Open Reprod Sci J 2011;3:27–41. DOI: 10.2174/1874255601103010027.
10. Korkmaz F., Malama E., Siuda M. et al. Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm. Anim Reprod Sci 2017;185:18–27. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.07.017.
11. Hereng T.H., Elgstøen K.B., Cederkvist F.H. et al. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. Hum Reprod 2011;26(12):3249–63. DOI: 10.1093/humrep/der317.
12. Шуцкая Ю.Ю., Элькина Ю.Л., Муронец В.И. и др. Исследование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека. Биохимия 2008;73(2):228–36. [Shutskaya Yu.Yu., Elkina Yu.L., Muronets V.I. et al. The study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human sperm. Biokhimiya = Biochemistry 2008;73(2):228–36. (In Russ.)].
13. Nascimento J.M., Shi L.Z., Tam J. et al. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. J Cell Physiol 2008;217(3):745–51. DOI: 10.1002/jcp.21549.

Вклад авторов

В.В. Евдокимов, Н.К. Исаев: разработка дизайна исследования;

В.Б. Туровецкий: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор научных публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

V.V. Evdokimov, N.K. Isaev: developing the research design;

V.B. Turovetsky: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, reviewing of publications on the article's theme.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.В. Евдокимов / V.V. Evdokimov: <https://orcid.org/0000-0001-5673-4810>

В.Б. Туровецкий / V.B. Turovetsky: <https://orcid.org/0000-0001-8427-163>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.



Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике...
Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of...