

Влияние биофлавоноидов прополиса на антиоксидантный потенциал эякулята и окислительное повреждение ДНК сперматозоидов

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

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

Контакты: Шамиль Нариманович Галимов sngalim@mail.ru

Целью исследования явилась оценка молекулярных механизмов антиоксидантного действия биофлавоноидов прополиса при патоспермии. В работу включены данные обследования 75 бесплодных и 36 фертильных мужчин. Применение препарата в суточной дозе 40 мг в течение 3 мес сопровождалось нормализацией показателей эякулята, уменьшением содержания биомаркеров окислительного повреждения белков и ДНК сперматозоидов, восстановлением антиоксидантного статуса спермоплазмы.

Ключевые слова: прополис, биофлавоноиды, бесплодие, сперма, окислительный стресс, 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, карбонильный стресс

Effect of propolis bioflavonoids on the antioxidant potential of ejaculate and on oxidative sperm DNA damage

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

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

The investigation was undertaken to assess the molecular mechanisms of antioxidant action of propolis bioflavonoids in pathospermia. It included the data of examining 75 infertile males and 36 fertile ones. The 3-month administration of the agent in a daily dose of 40 mg resulted in normalization of ejaculate parameters, a reduction in the levels of biomarkers for oxidative protein and sperm DNA damage, and recovery of the antioxidant status of seminal plasma.

Key words: propolis, bioflavonoids, infertility, sperm, oxidative stress, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, carbonyl stress

Введение

Способность генерировать активные формы кислорода (АФК) — фундаментальное свойство сперматозоидов млекопитающих и основная причина окислительного стресса, ответственного за нарушение их функции [1–4]. Результатом гиперпродукции АФК является повреждение митохондрий, ДНК и инициация апоптоза, в результате чего сперматозоиды теряют подвижность и жизнеспособность. Этот путь приводит также к экстернализации фосфатидилсерина, который способствует фагоцитозу сперматозоидов после оплодотворения, что предопределяет иммунный ответ на спермальные антигены и прогноз фертильности [5]. Несмотря на чувствительность к окислительному стрессу, функция сперматозоидов зависит от генерации АФК, необходимых для активации сигнальных путей, связанных с капациацией [6]. Поэтому модуляторы генерации АФК могут иметь клиническое применение для регуляции оплодотворяющей способности сперматозоидов и предотвращения развития антиспермального иммунитета. Достижение этих целей требует систематической оценки про- и антиоксидантных стратегий *in vivo* и *in vitro*.

Перспективными средствами коррекции антиоксидантного статуса при инфертильности являются биофлавоноиды прополиса [7, 8]. Молекулярные механизмы действия биофлавоноидов при окислительном стрессе сперматозоидов остаются малоизученными, что и предопределило цель выполнения настоящей работы.

Материалы и методы

Обследовано 75 пациентов клиник вспомогательных репродуктивных технологий в возрасте 23–42 лет, состоящих в бесплодном браке от 1 до 8 лет. Критериями исключения были тяжелая соматическая патология, заболевания яичек и их придатков. В работе была использована монотерапия препаратом биофлавоноидов прополиса, которые назначались перорально в суточной дозе 40 мг в течение 3 мес, что соответствует продолжительности цикла сперматогенеза. Выбор схемы лечения и дозы препарата был обусловлен собственным положительным опытом его применения в эксперименте и клинике при различной патологии, а также данными литературы [7–9]. Группу сравнения составили 36 фертильных мужчин, имеющих от 1 до

3 здоровых детей. Исследование спермы проводили по протоколу ВОЗ (2010).

Уровень гидропероксидов липидов (LPx) в эякуляте определяли по J. Nourooz-Zadeh et al. [10], содержание маркера окислительного повреждения ДНК 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-oxodGu) — методом иммуноферментного анализа, степень окисления белков — методом карбонил-ELISA [11], общую антиокислительную активность (ОАА) — по обесцвечиванию радикал-катиона ABTS.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ MS Excel 2003 SPSS 12.0 для Windows. О достоверности различий между средними величинами судили по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Введение препарата не приводило к статистически значимым изменениям объема эякулята (табл. 1). В то же время на фоне биофлавоноидов отмечено достоверное увеличение концентрации сперматозоидов (на 34 %) и уменьшение доли их патологических форм (на 20 %). Тем не менее средние значения обоих показателей не достигали уровня фертильных доноров, хотя и соответствовали параметрам ВОЗ. Вместе с тем прием биофлавоноидов сопровождался увеличением количества активно-подвижных сперматозоидов на 45 % ($p < 0,05$).

Таблица 1. Показатели эякулята обследованных мужчин до и после приема биофлавоноидов

Показатель	Фертильные доноры, $n = 36$	Бесплодные мужчины, $n = 75$	
		до лечения	после лечения
Объем эякулята, мл	$3,6 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,2$
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	$41,8 \pm 5,3$	$22,9 \pm 2,3^*$	$30,6 \pm 2,4^{*,**}$
Патологические формы, %	$52,0 \pm 2,9$	$80,3 \pm 4,1^*$	$64,5 \pm 4,9^{*,**}$
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	$29,1 \pm 3,2$	$22,5 \pm 2,4^*$	$32,7 \pm 2,9^{**}$

Примечание (здесь и в табл. 2). * — $p < 0,05$ по сравнению с фертильными донорами; ** — $p < 0,05$ по сравнению с состоянием до лечения.

Параметры окислительного статуса эякулята до и после назначения биофлавоноидов приведены в табл. 2. У бесплодных пациентов исходный уровень LPx, первичных продуктов окисления липидов, был существенно выше, чем у фертильных доноров. После приема биофлавоноидов прополиса он снизился и статистически не отличался от контрольных значений ($p > 0,05$). Гидропероксиды нестабильны и превращаются в агрессивные вторичные продукты свободнорадикального окисления: малоновый диальдегид, наиболее мутагенный агент, и 4-гидроксинафеналь, обладающий

высокой токсичностью и способный прямо подавлять подвижность сперматозоидов [12].

Таблица 2. Параметры свободнорадикального гомеостаза эякулята обследованных мужчин до и после приема биофлавоноидов прополиса

Показатель	Фертильные доноры, $n = 36$	Бесплодные мужчины, $n = 75$	
		до лечения	после лечения
LPx, нМ/л	$18,1 \pm 1,9$	$25,1 \pm 1,8^*$	$20,1 \pm 1,3^{**}$
Карбонилы, нМ/мг	$26,3 \pm 3,1$	$42,5 \pm 3,6^*$	$35,4 \pm 3,2^*$
8-oxodGu, нг/мл	$39,8 \pm 2,3$	$68,6 \pm 6,2^*$	$41,5 \pm 2,7^{**}$
ОАА, нМ/мл	$2,74 \pm 0,26$	$1,21 \pm 0,09^*$	$2,51 \pm 0,32^{**}$

У пациентов с бесплодием также обнаружено увеличение в эякуляте концентрации биомаркера окислительного повреждения ДНК 8-oxodGu (в 1,7 раза по сравнению со здоровыми донорами). Образование окисленных аддуктов ДНК, уровень которых коррелирует с плотностью упаковки, степенью протаминирования и фрагментации хроматина, — частое явление в сперматозоидах при различной патологии. Некоторые авторы предлагают этот тест для контроля эффективности антиоксидантной терапии бесплодия [13]. В отличие от соматических клеток сперматозоиды могут удалять 8-oxodGu с помощью 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы, поэтому дефектное основание быстро появляется во внеклеточном пространстве и становится доступным для сравнительно простой детекции [14]. Однако сперматозоиды не имеют механизмов восстановления окислительных повреждений ДНК, что делает их особенно уязвимыми к экзогенным воздействиям [2, 15]. По нашим данным, поступление биофлавоноидов приводило к падению содержания 8-oxodGu практически до уровня фертильных мужчин ($p < 0,05$). Необходимо отметить, что, несмотря на антиоксидантный потенциал, флавоноиды прополиса в больших дозах способны индуцировать окислительное повреждение ДНК в некоторых клетках [16], поэтому при их назначении важно точно следовать рекомендациям лечащего врача.

Другой молекулярной мишенью в половых клетках, одной из первых подвергаемой окислительной атаке, являются белки, боковые цепи которых карбонируются с потерей биологической активности и последующей протеолитической деградацией [17]. Поэтому карбонилы в белках могут выступать индикаторами окислительного повреждения. В данной работе мы установили, что уровень карбонильных остатков у фертильных доноров составил $26,3 \pm 3,1$ нМ/мг, в то время как у бесплодных мужчин он возрастал до $42,5 \pm 3,6$ нМ/мг ($p < 0,05$). Среднее значение карбониллов после лечения уменьшилось до $35,4 \pm 3,2$ нМ/мг, но это снижение не достигало уровня статистической значимости. Персистенция карбонилпептидов может быть следствием изменения активности лизосомаль-

ных протеаз и обновления спермальных белков с развитием карбонильного стресса в репродуктивных органах.

Оценка окислительного стресса подразумевает определение как интенсивности свободнорадикальных процессов, так и антиоксидантного статуса. Спермаплазма обладает большим набором антиоксидантов со сходным механизмом действия, поэтому их изолированное определение не всегда соответствует актуальному состоянию антиокислительных систем. Более предпочтителен анализ ОАА, который позволяет дать обобщенную оценку неферментативного звена антиоксидантной защиты и применяется в качестве вспомогательного теста в диагностике мужской инфертильности [18]. Нами констатировано более чем двукратное уменьшение этого показателя при бесплодии, что свидетельствует об истощении антиокислительного потенциала семенной плазмы при репродуктивной патологии. Использование биофлавоноидов оказывало положительное воздействие, которое заключалось в достоверном повышении величины ОАА в эякуляте.

В настоящее время для коррекции окислительного статуса сперматозоидов предложен широкий спектр биологически активных соединений, действующих на различные мишени и обладающих различной эффективностью [19–22]. Обсуждая молекулярные механизмы действия биофлавоноидов, следует подчеркнуть, что они обусловлены влиянием на целый ряд ключевых метаболических процессов [23]. Во-первых, хризин, кверцетин, пиноцембрин, апигенин и другие соединения флавоноидной группы, содержащиеся в прополисе, связывают ионы железа — индукторы свободнорадикальных реакций; во-вторых, они обладают мембраностабилизирующим эффектом, опосредованным увеличением микровязкости мембран; в-третьих, нормализуют функции митохондрий путем восстановления их трансмембранного потенциала; в-четвертых, регулируют активность апоптоза, пре-

пятствуя выходу цитохрома С и ингибируя каспазы 3 и 9; наконец, повышают уровень тестостерона благодаря модуляции ферментов его метаболизма СYP3A4, СYP19 и 5 α -редуктазы. С другой стороны, согласно современным представлениям, флавоноиды взаимодействуют с компонентами редокс-чувствительной системы Keap1/Nrf2/ARE, являющейся химическим сенсором внутриклеточного гомеостаза, активируя транскрипцию генов ферментов антиоксидантной защиты, репарации ДНК и изменяя интенсивность воспалительных и иммунных процессов [24]. Очевидно, протективное действие флавоноидов обусловлено как нормализацией антиоксидантного статуса, так и регуляцией путей передачи сигнала и экспрессии генов в клетке.

Заключение

Несмотря на то что связь инициации свободнорадикальных процессов с бесплодием супружеской пары в настоящее время не подвергается сомнению, многие вопросы остаются без ответа. Стратегия диагностики и коррекции окислительного стресса должна быть направлена на снижение степени повреждений ДНК, белка и других макромолекул в сперматозоидах [25, 26]. Однако простой и надежный метод регистрации АФК, доступный в любой клинической лаборатории, до сих пор не разработан. Кроме того, несмотря на наличие большого количества препаратов, а список антиоксидантов, предложенных для лечения инфертильности, включает десятки наименований, лишь некоторые из них обладают признанной фармакотерапевтической активностью [22]. Исходя из этого, существует настоятельная необходимость проведения масштабных рандомизированных контролируемых мультицентровых исследований для поиска комбинаций и дозировок антиоксидантов, включая флавоноиды прополиса, позволяющих оптимально защитить сперматозоиды от окислительного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Raheem A., Ralph D., Minhas S. Male Infertility. *J Clin Urol* 2012;5:254–68.
2. Lavranos G., Balla M., Tzortzopoulou A. et al. Investigating ROS sources in male infertility: a common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol* 2012;34(3):298–307.
3. Божедомов В.А., Громенко Д.С., Ушакова И.В. и др. Причины окислительного стресса сперматозоидов. *Пробл репродукции* 2008;6:67–73.
4. Громенко Д.С., Галимов Ш.Н., Шемагонов Д.В., Фархутдинов Р.Р. Роль активных форм кислорода в формировании мужской инфертильности. *Казан мед журн* 2007;4:23–4.
5. Barroso G., Morshedi M., Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1338–44.
6. Жабин С.Г., Трещенков Э.А., Артифесков С.Б. и др. Капацитация сперматозоидов (обзор литературы). *Пробл репродукции* 2005;2:32–8.
7. Capucho C., Sette R., de Souza Predes F. et al. Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2012;50(11):3956–62.
8. Галимов Ш.Н., Громенко Д.С., Мухамедзянов Р.М. Влияние препарата пропофлан на фертильность эякулята при идиопатическом бесплодии. *Пробл репродукции* 2003;5:37.
9. Громенко Д.С., Громенко Ю.Ю., Галимов Ш.Н. и др. Воздействие биофлавоноидов прополиса на процессы липопероксидации в гонадах крыс при интоксикации полихлорированными бифенилами. *Вопр питания* 2008;77(6):9–13.
10. Nourooz-Zadeh J., Tajadini-Sarmadi J., Wolff S. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous



oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. Anal Biochem 1994;220(2):403–9.

11. Carty J., Bevan R., Waller H. et al. The effects of vitamin C supplementation on protein oxidation in healthy volunteers. Biochem Biophys Res Commun 2000;273:729–35.

12. Aitken R., Gibb Z., Mitchell L. et al. Sperm motility is lost *in vitro* as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. Biol Reprod 2012;87:110.

13. Aitken R., De Iuliis G., Finnie J. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. Hum Reprod 2010;25(10):2415–26.

14. Smith T., Dun M., Smith N. et al. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. J Cell Sci 2013;126:1488–97.

15. Променко Д.С., Галимов Ш.Н., Амирова З.К. и др. Гонадотоксическое действие полихлорбифенилов. Бюл экспер биол 2008;7:76–9.

16. Tsai Y., Wang Y., Liou C. et al. Induction of oxidative DNA damage by flavonoids of propolis: its mechanism and implication about antioxidant capacity. Chem Res Toxicol 2012;25(1):191–6.

17. Hawkins C., Davies M. Generation and propagation of radical reactions on proteins. Biochim Biophys Acta 2001;1504(2–3):196–219.

18. Kashou A., Sharma R., Agarwal A. Assessment of oxidative stress in sperm and semen. Methods Mol Biol 2013;927:351–61.

19. Hamada A., Montgomery B., Agarwal A. Male infertility: a critical review of pharmacologic management. Expert Opin Pharmacother 2012;13(17):2511–31.

20. Галимов Ш.Н., Променко Д.С., Галимова Э.Ф. и др. Влияние L-карнитина на показатели эякулята у мужчин у бесплодных пар. Урология 2012;1:47–51.

21. Латыпова Г.М., Пильмутдинова Л.Т., Закиева С.В. и др. Антиоксидантное

средство растительного происхождения. Патент на изобретение RUS № 2372931 от 23.06.2008.

22. Agarwal A., Sekhon L. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified? Indian J Urol 2011;27(1):74–85.

23. Farooqui T., Farooqui A. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. Front Biosci (Elite Ed) 2012;4:779–93.

24. Jacob J., Tiwari K., Correa-Betanzo J. et al. Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. Annu Rev Food Sci Technol 2012;3:79–104.

25. Божедомов В.А., Липатова Н.А., Спориш Е.А. и др. Роль структурных нарушений хроматина и ДНК сперматозоидов в развитии бесплодия. Андрол и генит хир 2012;3:82–92.

26. Aitken R., Bronson R., Smith T., De Iuliis G. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. Mol Hum Reprod 2013;19:475–85.