

Особенности ферментного профиля и энергетического статуса спермальной плазмы при идиопатическом бесплодии

Э.Ф. ГАЛИМОВА, В.Н. ПАВЛОВ, А.З. АБДУЛЛИНА, Ш.Н. ГАЛИМОВ

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

При идиопатическом бесплодии в спермальной плазме установлено угнетение ферментов энергетического обмена на фоне дефицита АТФ и цАМФ, активация ферментов — маркеров незавершенного гаметогенеза и повреждения сперматозоидов, стимуляция метаболизма аминокислот и ингибирование α -глюкозидазы — индикатора фрагментации ДНК. Выявленные нарушения метаболических процессов представляют интерес с позиций поиска молекулярных мишеней для коррекции репродуктивной патологии.

Ключевые слова: идиопатическое бесплодие, спермоплазма, ферменты, АТФ, цАМФ.

Главным вопросом репродуктивной медицины является бесплодие, которым страдают 10–15% супружеских пар с приблизительно равным вкладом обоих полов [1, 2]. Существует и иное мнение, согласно которому мужской фактор считается ведущей причиной бесплодия [3]. По расчетам экспертов РАМН, мужская инфертильность явилась причиной нерождения в России 3,5–4,0 млн детей за последние 15–20 лет [4]. Дефекты сперматогенеза имеют мультикаузальный характер и возникают вследствие воздействия комплекса внешних и внутренних факторов (средовых, поведенческих, алиментарных, наследственных и др.).

У значительного контингента пациентов не удается зафиксировать явных дефектов типа эндокринопатий, варикоцеле, гипотрофии яичек и т.д., а стандартные показатели спермограмм нередко варьируют в пределах нормы. В этих случаях речь идет об идиопатическом бесплодии, прогресс в изучении которого был связан с доказательством роли свободных радикалов в возникновении мужской инфертильности, а также с достижениями генетики [5, 6]. Вместе с тем лечение бесплодия неустановленной этиологии до настоящего времени носит эмпирический характер с непрогнозируемым результатом [7]. Широкое использование генетической эпидемиологии способствовало лучшему пониманию природы идиопатической патоспермии, однако эта методология должна быть дополнена углубленным исследованием биохимического состава эякулята и молекулярных механизмов сперматогенеза в норме и при патологии, которые все еще недостаточно изучены.

Цель настоящей работы — анализ метаболических особенностей спермальной плазмы как нутритивного и протективного окружения сперматозоидов у фертильных доноров и при бесплодии неясного генеза.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 68 пациентов (20 здоровых мужчин с доказанной фертильностью (контрольная группа) и 48 с идиопатической патоспермией). Анализ эякулята проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ [8]. Спермоплазму получали центрифугированием эякулята при 400 об/мин в течение 20 мин.

В спермальной плазме определяли активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), γ -глутамилтрансферазы (ГГТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), α -амилазы, малатдегидрогеназы (МДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), нейтральной α -глюкозидазы и креатинфосфокиназы (КФК) на полуавтоматическом биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+ (США).

Концентрацию циклического аденозин-3,5-монофосфата (цАМФ) определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора фирмы «BCM Diagnostics» на анализаторе Anthos-2020 (Австрия). Содержание АТФ находили биoluminesцентным методом наборами АТФ Bioluminescent Assay Kit фирмы «Sigma-Aldrich Corporation».

Статистическую обработку результатов проводили с помощью параметрических методов анализа с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика спермограммы обследованных с идиопатическим бесплодием и контрольной группы представлена в **табл. 1**. В группе пациентов с патоспермией достоверно снижена (на 64,3%) концентрация сперматозоидов и повышен (в 2,2 раза) уро-

e-mail: sngalim@mail.ru

Таблица 1. Параметры спермограммы обследованных пациентов ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n=20)	Пациенты с бесплодием (n=48)
Объем эякулята, мл	3,6±0,2	3,4±0,2
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	70,3±5,2	25,1±2,4*
Морфологические повреждения, %	33,6±2,4	76,4±5,7*
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	46,3±2,8	42,1±1,9

Примечание: Здесь и в табл. 2: * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 2. Содержание некоторых ферментов и нуклеотидов в спермоплазме обследованных мужчин ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n=20)	Пациенты с бесплодием (n=48)
ЛДГ, нмоль/мин на 1 мг белка	212±19,4	126±11,3*
МДГ, нмоль/мин на 1 мг белка	10,5±1,2	4,9±0,6*
Г-6-ФДГ, пмоль/мин на 1 мг белка	43,6±3,7	39,1±3,5
КФК, нмоль/мин на 1 мг белка	304±42,7	938±61,1*
АСТ, нмоль/мин на 1 мг белка	125±9,7	159±11,8*
АЛТ, нмоль/мин на 1 мг белка	33,7±2,8	52,2±6,1*
ГГТ, нмоль/мин на 1 мг белка	296±32,5	474±53,2*
α -Амилаза, нмоль/мин на 1 мг белка	6,2±0,5	13,6±0,9*
ЩФ, нмоль/мин на 1 мг белка	230±12,5	314±21,7*
α -Глюкозидаза, Е/л	332±26,4	219±26,4*
АТФ, нмоль/мл	52,3±7,1	35,0±4,2*
цАМФ, пмоль/мл	27,9±2,4	14,6±1,8*

вень клеток с морфологическими повреждениями. В то же время по объему эякулята и содержанию прогрессивно-подвижных клеток статистически значимых различий не выявлено.

В табл. 2 приведены результаты изучения некоторых ферментативных систем спермоплазмы. Как видно, бесплодие неустановленной этиологии сопровождается выраженными сдвигами их активности. Если для фертильных доноров характерна высокая активность окислительно-восстановительных ферментов, то при патоспермии обнаружено угнетение активности ЛДГ (на 43%) и МДГ (на 53%) при интактной Г-6-ФДГ, что указывает на высокую уязвимость преимущественно процессов энергетического, но не пластического обмена.

ЛДГ принадлежит эссенциальная роль в реакциях гликолитической оксидоредукции и биосинтеза АТФ [9], которые необходимы для нормального функционирования сперматозоидов. Подавление активности ЛДГ может свидетельствовать об ограничении использования лактата на энергетические цели в мужских гаметах, где он является более предпочтительным субстратом для окисления в митохондриях, нежели фруктоза, глюкоза или пируват [10]. В опубликованных ранее работах [11] сообщалось об активации ЛДГ при некоторых формах патоспермии. Вероятно, несовпадение наших результатов и данных литературы может быть обусловлено более глубокой альтерацией биохимических процессов при идиопатическом бесплодии.

Скорость реакций, катализируемых трансферазами АСТ, АЛТ и ГГТ, также претерпевала опреде-

ленные изменения. Активность ГГТ, центрального фермента катаболизма и межорганного обмена глутатиона увеличивалась до 162% контрольных величин. Восстановленному глутатиону принадлежит важная роль в связывании токсичных и реактивных продуктов, генерируемых в реакциях биотрансформации ксенобиотиков. Показано, что при идиопатической патоспермии содержание этого эндогенного биоантиоксиданта в сперматозоидах, как и других тиолов, изменяется в широком диапазоне [12, 13]. Не исключено, что повышение скорости ГГТ-реакции отражает ускорение кругооборота глутатиона и имеет компенсаторное значение. Кроме того, ГГТ осуществляет транспорт аминокислот в сперматозоиды. Поэтому повышение активности ГГТ может свидетельствовать о возрастании энергетической роли аминокислот в гаметативных клетках в условиях блокады гликолиза, что согласуется с обнаруженной стимуляцией трансаминаз — АСТ до 127%, АЛТ до 155%.

Наряду с этим нельзя исключить возможность проникновения трансфераз в спермоплазму из поврежденных клеток. Подтверждением этой мысли является продемонстрированная нами активация мембраносвязанной ЩФ, которая рассматривается в качестве одного из маркеров целостности сперматозоидов [14].

Что касается другой изученной гидролазы — α -глюкозидазы, то ее активность является не только индикатором функции эпидидимуса, но и показателем степени фрагментации ДНК сперматозоидов [15]. Поэтому ингибирование этого фермента при

идиопатическом бесплодии может быть интерпретировано и как признак секреторной дисфункции придатка яичка, и как патология генетического аппарата гамет.

У фертильных мужчин активность α -амилазы по сравнению с другими энзимами семенной жидкости оказалась существенно более низкой ($6,2 \pm 0,5$ нмоль/мин на 1 мг белка). Однако у пациентов с бесплодием неясного генеза была установлена более чем двукратная стимуляция фермента. Одно из объяснений этого феномена, учитывая отсутствие гликогена в зрелых сперматозоидах, может быть связано с блокадой сперматогенеза и выбросом низкодифференцированных половых клеток, содержащих гликоген — субстрат для амилазы.

Эти данные хорошо согласуются с результатами изучения активности КФК — чувствительного биохимического критерия созревания сперматозоидов [16]. По-видимому, повышенный уровень КФК отражает не столько напряженность биоэнергетических процессов, сколько степень ретенции цитоплазмы, хотя ингибирование фермента и истощение гамет по креатинфосфату или АТФ сопровождается гибелью клеток [17].

По данным литературы [18], концентрация АТФ в семенной жидкости при бесплодии может не отличаться от нормы или даже превышать ее, что, вероятно, обусловлено различными временными промежутками между моментом взятия биоматериала и выполнением процедуры определения макроэрга.

Установлено, что уровень обоих изученных нуклеотидов при бесплодии неясной этиологии статистически значимо снижался: АТФ до 67%, цАМФ до 52% относительно показателей контрольной группы. Оптимальная концентрация этих веществ выступает в качестве предпосылки нормальной двигательной активности гамет [19]. В последнее время происходит переоценка роли гликолиза как единственного источника энергии для обеспечения способности фибриллярных структур жгутика сперматозоида к сокращениям, что объясняется появлением новых фактов [20]. Во-первых, показано, что спермии могут сохранять подвижность в течение длительного периода в среде, свободной от глюкозы; во-вторых, эксперименты с α -хлоргидрином — ингибитором глицеральдегидфосфатдегидрогеназы — продемонстрировали, что мужские гаметы остаются мобильными, несмотря на полный блок гликолиза; в-третьих, в условиях низкой скорости диффузии АТФ от митохондрий в дистальные отделы жгутика быстрый синтез макроэрга достигается за счет работы аденилаткиназного шунта.

В свою очередь цАМФ в сперматозоидах повышает скорость утилизации субстратов, является индуктором биосинтеза белка, стимулирует прогрессивную подвижность, ингибирует преждевременную

капацитацию, на этапе созревания в эпидидимисе инициирует двигательную активность иммобилизованных гамет и т.д. [21, 22]. Поэтому дефицит цАМФ, равно как и АТФ, вносит определенный вклад в нарушение репродуктивной функции.

Важная роль в ограничении популяции тестикулярных зародышевых клеток и, в конечном итоге, сперматозоидов, принадлежит апоптозу, поэтому его дисрегуляция в различных экстремальных ситуациях ассоциирована с мужским бесплодием. Убыль АТФ, независимо от первопричины, сопровождается подавлением апоптоза и активацией некроза аналогично действию токсических концентраций свободных радикалов или лактата, выполняющих функцию переключателя между этими состояниями [23]. Следовательно, недостаток АТФ в семенной плазме может указывать на сбой естественных механизмов удаления дефектных сперматозоидов при идиопатическом бесплодии. Очевидно, в мужском репродуктивном тракте АТФ выполняет протекторную функцию, управляя интенсивностью апоптоза в извитых канальцах, эпидидимальных и эякулированных сперматозоидах [24]. В практическом отношении это означает, что нормализация метаболизма адениловых нуклеотидов или введение экзогенного АТФ могут улучшить оплодотворяющую способность. Эффективность такого решения продемонстрирована, в частности, в модельных экспериментах, целью которых было совершенствование методов экстракорпорального оплодотворения [25].

Таким образом, биохимические методы позволяют получить дополнительную информацию о состоянии репродуктивной системы, что необходимо для совершенствования диагностики бесплодия и разработки патогенетически обоснованных подходов к его коррекции. Вместе с тем в контексте данного сообщения нельзя не упомянуть о возможностях более углубленного анализа молекулярных основ патологии репродукции, которые связаны с приоритетным развитием протеомики, транскриптомики, метаболомики, липидомики, гликомики, реактомики как составных частей современной биологии — биомики [26—28]. Ключевая проблема репродуктивной биомики заключается в определении биологической функции многих тысяч спермальных белков и метаболитов, идентифицированных в норме и при патологии. Например, протеом хвоста человеческого сперматозоида содержит 1049 белков, половина которых вовлечена в процессы генерации энергии (что было ожидаемой находкой) и окисления липидов, но не углеводов (что явилось сюрпризом) [29]. Очевидно, расшифровка взаимосвязей в сложной сети метаболических процессов при инфертильности неустановленной этиологии является областью приложения как классической биохимии, так и молекулярной биологии и биомики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Singh K., Jaiswal D. Human Male infertility: A Complex Multifactorial Phenotype. *Reprod Sci* 2011; 18: 418—425.
2. Visser L., Repping S. Unravelling the genetics of spermatogenic failure. *Reproduction* 2010; 139: 303—307.
3. Simon L., Proutski I., Stevenson M. et al. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod BioMed Online* 2012; [http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(12\)00590-1/abstract](http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(12)00590-1/abstract).
4. Артюхин А.А. Роль андрологии как составной части репродуктивной медицины в решении демографических проблем России. *Вестн РАМН* 2007; 11: 50—52.
5. Божедомов В.А., Громенко Д.С., Ушакова И.В. и др. Оксидативный стресс сперматозоидов в патогенезе мужского бесплодия. *Урология* 2009; 2: 51—56.
6. Pastuszak A., Lamb D. The genetics of male fertility — from basic science to clinical evaluation. *J Androl* 2012; 10.2164/jandrol.112.017103.
7. Ko E., Siddiqi K., Brannigan R., Sabanegh E. Empirical medical therapy for idiopathic male infertility: a survey of the American Urological Association. *J Urol* 2012; 187: 973—978.
8. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO (Geneva) 2010; 270.
9. Tomar R., Jain A., Mohanty N. Assessment of Succinate Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase Enzyme in Idiopathic Aesthenozoospermia. *Biol Reprod* 2010; 83: 550.
10. Miki K. Energy metabolism and sperm function. *Soc Reprod Fertil* 2007; 65: 309—325.
11. Микашинович З.И., Абу-Мустафа Х.Ю., Белоусова Е.С. и др. Особенности метаболических процессов в спермоплазме при варикоцеле. *Пробл репрод* 2007; 4: 81—84.
12. Ebisch I., Peters W., Thomas C. et al. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod* 2006; 21: 1725—1733.
13. Atig F., Raffia M., Habib B. et al. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC Urol* 2012; 12: 6.
14. Juyena N., Stelletta C. Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *J Androl* 2012; 33: 536—551.
15. Watanabe M., Roussev R., Ahlering P. et al. Correlation between neutral alpha-glucosidase activity and sperm DNA fragmentation. *Andrologia* 2009; 4: 316—318.
16. Cayli S., Sakkas D., Vigue L. et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl_{XL} levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 365—372.
17. Froman D., Feltmann A. A new approach to sperm preservation based on bioenergetic theory. *J Anim Sci* 2010; 88: 1314—1320.
18. Hofmann R., Lehmer A., Gurster E., Hartung R. Adenosine triphosphate and adenosine diphosphate in human semen: correlation with sperm count and motility. *Urol Int* 1992; 48: 391—394.
19. Ramalho-Santos J., Varum S., Amaral S. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells et al. *Hum Reprod Update* 2009; 15: 553—572.
20. Ford W. Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum Reprod Update* 2006; 12: 269—274.
21. Fraser L., Adeoya-Osiguwa S., Baxendale R. et al. First messenger regulation of mammalian sperm function via adenylyl cyclase/cAMP. *J Reprod Dev* 2005; 51: 37—46.
22. Signorelli J., Diaz E., Morales P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res* 2012; 349: 765—782.
23. Erkkila K., Kytanen S., Wikstrom M. et al. Regulation of human male germ cell death by modulators of ATP production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 290: E1145—E1154.
24. Aziz N., Said T., Paasch U., Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod* 2007; 22: 1413—1419.
25. Rodriguez-Miranda E., Buffone M., Edwards S. et al. Extracellular Adenosine 5'-Triphosphate Alters Motility and Improves the Fertilizing Capability of Mouse Sperm. *Biol Reprod* 2008; 79: 164—171.
26. Brewis I., Gadella B. Sperm surface proteomics: from protein lists to biological function. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 68—79.
27. Thacker S., Yadav S., Sharma R. et al. Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertil Steril* 2011; 95: 2745—2748.
28. Croft D., O'Kelly G., Wu G. et al. Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes. *Nucl Acids Res* 2011; 39: D691—D697.
29. Amaral A., Castillo J., Estanyol J. et al. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Mol Cell Proteomics* 2012; 10.1074/mcp.M112.020552.