

## **Внутриклеточные источники свободных радикалов в сперматозоидах при мужской инфертильности**

**Научный руководитель – Проскурнина Елена Васильевна**

***Мельников Никита Алексеевич***

*Студент (специалист)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Кафедра медицинской биофизики, Москва, Россия

*E-mail: melniko.nikita@yandex.ru*

### **ВВЕДЕНИЕ**

По накопленным научным данным, оксидативный стресс играет значимую роль в патогенезе ряда состояний, связанных с мужской инфертильностью. Особенность свободнорадикального гомеостаза в сперматозоидах состоит в их слабой внутриклеточной антиоксидантной защите, вследствие чего даже незначительное превышение продукции свободных радикалов над нормой может привести к пагубным последствиям.

Основными внутриклеточными источниками свободных радикалов в сперматозоидах можно считать митохондрии и систему микросомального окисления, а основным методом изучения свободных радикалов в живых клетках — активированную хемилюминесценцию. На основании вышеизложенного была сформулирована цель исследования.

### **ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Целью исследования явилось изучение основных внутриклеточных источников свободных радикалов в сперматозоидах — митохондрий и системы цитохрома P-450, для чего был разработан новый подход люцигенин-активированной хемилюминесценции в присутствии НАДФН.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Метод основан на регистрации спонтанного люцигенин-активированного свечения сперматозоидов в сперме, а также люцигенин-активированного свечения после добавления НАДФН. Анализ проводили не позднее 1 часа после взятия материала. Сперматозоиды отделяли по следующей методике: образец объемом 1.00 мл разделили на две равные части, смешивали с физиологическим раствором в соотношении 1:2, центрифугировали при 700 g в течение 10 мин. После отделения спермоплазмы, клетки смешивали с раствором Хенкса в соотношении 1 : 2, центрифугировали при 700 g в течение 10 мин, далее клетки помещали в пробирку, добавив среду Хенкса в соотношении 1 : 1, и инкубировали при 37°C в течение часа. Для анализа отбирали верхний слой со сперматозоидами.

В исследовании принимали участие пациенты, обратившиеся в Медико-генетический научный центр РАН (г. Москва). Общее число пациентов  $n = 34$ , из них с нормальной спермограммой  $n = 9$ , с астенозооспермией  $n = 12$ , с астенотератозооспермией  $n = 13$ .

### **РЕЗУЛЬТАТЫ**

Спонтанное люцигенин-активированное свечение позволяет оценить уровень митохондриальной продукции супероксидного анион-радикала, а НАДФН-стимулированное свечение — уровень продукции супероксида в системе цитохрома P-450. Были рассчитаны уровни спонтанного свечения, стимулированного свечения и коэффициент активации, проведено сравнение данных с данными пациентов с группой контроля — пациенты с нормозооспермией — по критерию Манна-Уитни.

В результате пациенты с нормозооспермией характеризовались показателями в относительно узких границах, а пациенты с астенозооспермией и астенотератозооспермией

разделились на две группы. Астенозооспермия — у части пациентов сперматозоиды характеризовались значимо большим собственным и стимулированным свечением («яркие» сперматозоиды), у другой части уровень стимулированного свечения незначимо отличался от группы контроля (условно «нормальные»). Однако для всех пациентов коэффициент активации был ниже, чем в группе контроля. У пациентов с астенотератозооспермией также было отмечено существование двух групп — «ярких» сперматозоидов и условно «нормальных». И в этом случае коэффициент активации был значимо ниже, чем в группе контроля. Результаты приведены в таблице.

#### ВЫВОДЫ

1) Предложена методика, основанная на регистрации люцигенин-активированной хемилюминесценции в присутствии НАДФН, которая позволяет оценить продукцию супероксидного анион-радикала в митохондриях сперматозоидов и системе цитохрома P-450.

2) У пациентов с нормозооспермией уровень собственного свечения составил  $0.07 \pm 0.04$  усл. ед., уровень стимулированного свечения  $0.29 \pm 0.04$ , коэффициент активации  $5.10 \pm 1.47$ .

3) Пациенты с астенозооспермией разделились на две группы — с усиленным собственным свечением (за счет нарушения работы митохондрий) и сниженным коэффициентом активации (ресурс системы цитохрома P-450), и с неизменным собственным свечением и сниженным коэффициентом активации.

4) Пациенты с астенотератозооспермией разделились на две группы — с усиленным собственным свечением и сниженным коэффициентом активации, и с неизменным собственным свечением и сниженным коэффициентом активации.

5) Группы астенозооспермии и астенотератозооспермии не отличались значимо друг от друга по предложенным показателям.

6) Таким образом, при нарушении спермограммы у бесплодных мужчин наблюдается в ряде случаев резкое усиление продукции супероксидного анион-радикала митохондриями (оксидативный стресс) в сочетании со снижением продукции супероксидного анион-радикала в системе цитохрома P-450.

#### Иллюстрации

Группы	Спонтанный уровень	Стимулированный уровень	Коэффициент активации	P, спонтанный уровень	P, стимулированный уровень	P, коэффициент активации
Норма (n = 9)	0.07 ± 0.04	0.29 ± 0.04	5.10 ± 1.47	-	-	-
Астено-зооспермия (n = 9)	0.25 ± 0.13	0.61 ± 0.29	2.80 ± 0.73	<b>0.01</b>	0.17	<b>0.006</b>
Астено-зооспермия «норма» (n = 7)	0.10 ± 0.05	0.25 ± 0.11	2.75 ± 1.00	0.21	0.46	<b>0.004</b>
Астено-зооспермия «яркие» (n = 5)	0.44 ± 0.25	1.12 ± 0.11	2.88 ± 1.87	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>0.016</b>
Астено-терато-зооспермия (n = 13)	0.61 ± 0.53	0.71 ± 0.52	2.50 ± 0.98	<b>0.09</b>	0.60	<b>0.007</b>
Астено-терато-зооспермия («норма») (n = 9)	0.11 ± 0.10	0.24 ± 0.11	3.16 ± 1.15	0.53	0.42	<b>0.05</b>
Астено-терато-зооспермия («яркие») (n = 4)	1.76 ± 1.39	1.78 ± 1.56	1.02 ± 0.32	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>

**Рис. 1.** Таблица. Уровень спонтанного свечения, отражающий митохондриальную продукцию супероксидного анион-радикала, уровень стимулированного свечения и коэффициент активации, отражающий ресурс системы цитохрома P-450; приведены средние значения с доверительным интервалом. P — доверительная вероятность, рассчитанная по критерию Манна-Уитни.