

Л.И. Колесникова¹, О.А. Вантеева¹, Н.А. Курашова¹, Б.Г. Дашиев²

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Российская Федерация

² Республиканский перинатальный центр, Улан-Удэ, Республика Бурятия, Российская Федерация

Глутатионзависимые ферменты и глутатион при бесплодии мужчин с различной массой тела

Цель исследования: изучить глутатиондисульфидную систему антиоксидантной защиты у мужчин с различными индексами массы тела и бесплодием. **Методы:** обследовано 60 мужчин с бесплодием — 30 с нормальной массой тела и 30 с избыточной, а также 30 фертильных мужчин контрольной группы. В качестве материала для исследований использовали гемолизат, приготовленный из эритроцитов. Содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG), а также активность глутатионзависимых ферментов определяли на спектрофлуориметре SHIMADZU-1501 (Япония). **Результаты:** у мужчин с бесплодием с нормальной массой тела снижение содержания GSH на 15,35% сочеталось со снижением активности глутатионредуктазы (GR) на 53,41%, глутатионпероксидазы (GPO) на 51,44% и повышением активности глутатион-S-трансферазы (GST) на 31,52% по сравнению с показателями контрольной группы. В группе мужчин с бесплодием с избыточной массой тела по сравнению с фертильными мужчинами имело место снижение активности GR на 56,77% и GPO на 56,22% на фоне стабильного содержания GST. Концентрация GSH в группе с бесплодием была снижена на 20,08%, а концентрация GSSG повышена на 20,38%. **Заключение:** установлено, что у мужчин с бесплодием и избыточной массой тела наиболее выражено нарушение баланса в системе глутатиона по сравнению с бесплодными мужчинами с нормальной массой тела.

Ключевые слова: глутатион, глутатионзависимые ферменты, антиоксидантная защита, мужское бесплодие.

(Вестник РАМН. 2015; 1: 12–16)

12

Обоснование

Частота бесплодного брака в России составляет 15–17%, при этом показатель равный 15% — критический [1]. Таким образом, проблема бесплодия приобретает масштабы государственной [1, 2]. Традиционно ответственность за неудачу в наступлении беременности падает на женщину. Тем не менее, по данным некоторых исследований, установлено, что мужчины являются причиной бесплодного брака в 50% случаев [3, 4].

Вместе с проблемой бесплодия имеет место и увеличение числа людей, имеющих избыточную массу тела. Ис-

следователи из Национального института наук о гигиене окружающей среды США обнаружили, что выходящий за пределы нормы индекс массы тела (ИМТ) у мужчин можно расценивать как совершенно самостоятельный фактор риска формирования бесплодия [5].

Взаимосвязь избыточного веса и бесплодия у мужчин обусловлена различными причинами, к которым относят: гормональный статус, социально-культурные факторы, рацион питания, а также изменение активности системы перекисного окисления липидов — антиоксидантной защиты (ПОЛ—АОЗ). Эта система — важная метаболическая характеристика для обоих изучаемых состояний [6, 7].

L.I. Kolesnikova¹, O.A. Vanteeva¹, N.A. Kurashova¹, B.G. Dashiev²

¹ Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russian Federation

² Republican Perinatal Center, Ulan-ude, the Republic of Buryatia, Russian Federation

Glutathione-Dependent Enzymes and Glutathione in Infertility of Men with Different Body Mass

Objective: Our aim was to investigate the glutathione-disulfide system of antioxidant defense in men with different body mass index and infertility.

Methods: 60 men with infertility were examined — 30 with normal weight and 30 with overweight. 30 fertile men were included in the control group. Hemolysate made from red blood cells was used as a material for study. The level of reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), and glutathione activity was determined by enzyme spectrofluorophotometer SHIMADZU-1501 (Japan). **Results:** In infertile men with normal body weight decrease of GSH to 15.35% was combined with a decrease in the activity of enzymes — glutathione reductase (GR) to 53.41%, glutathione peroxidase (GPO) to 51.44%, and increased activity of glutathione-S-transferase (GST) to 31.52% as compared with the control group. In the group of infertile men with overweight a decrease in the activity of GR, 56.77% and 56.22% at the GPO on the background of a stable level of GST was detected in comparison with fertile men. The concentration of GSH in infertile group decreased by 20.08%, and the concentration of GSSG increased by 20.38%. **Conclusion:** It has been established that imbalance in the glutathione system is the most prominent feature in men with infertility and overweight as compared to infertile men with normal body weight.

Key words: glutathione, glutathione enzymes, antioxidant protection, male infertility.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015; 1: 12–16)

Вместе с тем конкретные детали состояния процессов липопероксидации в контексте взаимосвязи избыточного веса и бесплодия у мужчин изучены недостаточно, что сдерживает разработку оптимальных режимов воздействия на редокс-системы организма с целью решения проблемы infertility.

В патогенезе мужского бесплодия одну из главнейших ролей играет активация процессов ПОЛ, которая приводит к развитию окислительного стресса [4, 8]. Усиление процессов липопероксидации может быть связано со снижением мощности антиоксидантной защиты, в частности тиолдисульфидной системы, которая не справляется с гиперпродукцией активных форм кислорода, а соответственно, и с процессами окислительной модификации липидов.

По-прежнему остается актуальной разработка дополнительных диагностических и прогностических критериев, позволяющих создавать алгоритмы обследования и лечения бесплодия с учетом индивидуальных особенностей мужчин и женщин.

Целью настоящей работы стало изучение глутатиондисульфидной системы антиоксидантной защиты у мужчин с различными ИМТ и бесплодием.

Методы

Дизайн исследования

В исследовании типа «случай—контроль» приняли участие мужчины репродуктивного возраста, которые по результатам клинико-лабораторного исследования были разделены на 3 группы: мужчины с бесплодием и избыточной массой тела, мужчины с бесплодием и нормальной массой тела и фертильные мужчины (группа сравнения). Всем мужчинам было проведено исследование системы глутатиона.

Критерии соответствия

Критерии включения в группу с бесплодием:

- возраст от 22 до 37 лет;
 - неспособность зачать ребенка в течение 1 года и более;
 - патозооспермия;
 - информированное согласие пациента на исследование.
- Критерии включения в контрольную группу:
- возраст от 22 до 37 лет;
 - реализованная фертильная функция;
 - нормозооспермия;
 - отсутствие на момент обследования острого заболевания или обострения хронического заболевания;
 - информированное согласие пациента на исследование.
- Критерия исключения:
- несоответствие критериям включения;
 - наличие тяжелых соматических заболеваний;
 - эндокринное бесплодие.

Условия проведения

Пациенты были обследованы на базах Центра инновационной медицины (Иркутск, Российская Федерация) и Бурятского филиала НЦ ПЗСРЧ (Улан-Удэ, Республика Бурятия, Российская Федерация). Проведение исследований системы глутатиона осуществляли в лаборатории патофизиологии репродукции НЦ ПЗСРЧ.

Продолжительность исследования

Исследование проводили в 2011–2013 гг.

Исходы исследования

Результаты исследования подтверждают необходимость изучения системы глутатиона у мужчин с бесплодием.

Методы регистрации исходов

В качестве материала для биохимических исследований использовали гемолизат, приготовленный из эритроцитов. Содержание восстановленного (GSH) и окисленного глутатиона (GSSG) определяли методом P.J. Hissin и R. Hilf [9]. Активность глутатионзависимых ферментов определяли по методу А.И. Карпищенко [10]. Измерения проводили на спектрофлуорофотометре SHIMADZU-1501 (Япония), состоящего из двух блоков: спектрофотометра UV-1650PC и спектрофлуориметра RF-1501.

Этическая экспертиза

Получение информированного согласия на участие в исследовании было обязательной процедурой при включении мужчин в одну из групп. В работе с больными соблюдены этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2008).

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов выполняли с применением пакета прикладной программы STATISTICA v. 6.1 (Statsoft Inc., США). Тип распределения устанавливали по критерию Колмогорова—Смирнова. Данные представлены в виде среднегрупповых значений показателей и стандартного отклонения ($M \pm \sigma$, где M — среднее арифметическое, σ — стандартное отклонение). Для оценки статистически значимых различий полученных данных использовали критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Участники исследования

Для исследования состояния системы антиоксидантной защиты обследовано 60 мужчин с бесплодием, которые были разделены на 2 группы: 1-я группа — пациенты ($n = 30$) с нормальным значением ИМТ = 18,5–24,9 кг/м² в возрасте $29 \pm 0,63$ года; 2-я группа — пациенты ($n = 30$) с повышенным значением ИМТ = 25,0–29,9 кг/м² в возрасте $27 \pm 0,63$ года. Контрольную группу составили практически здоровые мужчины ($n = 40$) с ИМТ = 18,5–24,9 кг/м² в возрасте $30 \pm 0,69$ лет с доказанной фертильностью на момент исследования. ИМТ рассчитывали по G. Vrey (1978): масса тела (кг) / рост (м²). Основопологающим методом диагностики мужского бесплодия было исследование эякулята, которое проводили согласно Руководству ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята и спермо-цервикального взаимодействия (ВОЗ, 2001) двукратно с минимальным интервалом 2 нед [11].

Основные результаты исследования

Результаты исследования, характеризующие состояние системы глутатиона у исследуемых пациентов, представлены в табл.

Установлено, что в группе бесплодных мужчин с нормальной массой тела содержание GSH на 15,35% ниже ($p = 0,001$), а у мужчин с избыточной массой тела его концентрация снижена на 20,08% ($p = 0,000$) по сравнению с контролем. В группе мужчин с увеличенным ИМТ содержание GSSG достоверно выше на 20,38% ($p = 0,000$) по сравнению с контрольной группой

Таблица. Содержание компонентов глутатионовой системы у мужчин с бесплодием в зависимости от величины индекса массы тела

Показатель	Контрольная группа M ± σ (1)	Группа с бесплодием, M±σ		p < 0,05
		ИМТ 18,0–24,9 (2)	ИМТ 25,0–29,9 (3)	
GSH, ммоль/л	2,15±0,07	1,82±0,06	1,72±0,04	1–2; 1–3
GSSG, ммоль/л	2,11±0,05	2,15±0,08	2,54±0,05	1–3; 2–3
GR, мкмоль в мин/л	1364,30±330,55	635,63±195,55	589,80±158,41	1–2; 1–3; 2–3
GST, мкмоль в мин/л	492,33±215,76	647,53±202,65	495,37±124,58	1–2; 2–3
GPO, мкмоль в мин/л	357,73±96,87	173,70±39,02	156,61±36,19	1–2; 1–3

и на 15,35% ($p = 0,000$) – по сравнению с пациентами с нормальным значением ИМТ.

Концентрация глутатиона в условиях патологического состояния в большей степени зависит от изменения активности ферментных систем, которые регулируют соотношение его окисленной и восстановленной форм. Соответственно, если происходит изменение его содержания в клетке, то можно говорить и о нарушении в ферментативном звене системы антиоксидантной защиты. При исследовании глутатионзависимых ферментов установлено, что у мужчин с бесплодием (ИМТ 18,0–24,9) активность глутатионредуктазы (GR) была достоверно снижена на 53,41% ($p = 0,000$), глутатионпероксидазы (GPO) — на 51,44% ($p = 0,000$) по сравнению с контрольной группой. Также выявлено увеличение активности глутатион-S-трансферазы (GST) на 31,52% в группе мужчин с бесплодием ($p = 0,006$).

У пациентов с избыточной массой тела выявлено достоверное снижение содержания GR на 56,77% ($p = 0,000$) и GPO — на 56,22% ($p = 0,000$) по сравнению с таковыми в контрольной группе. Недостаток GSH (субстрата для GPO) приводит к снижению активности фермента в эритроцитах мужчин с бесплодием. GPO — основной фермент, катаболизирующий перекись водорода и обладающий заметно большим сродством к ней, чем, например, каталаза. GR, восстанавливающая GSSG, также находится в угнетенном состоянии, и ее содержание снижено. Активность GST практически не изменилась. Следует отметить, что продукты перекисного окисления липидов детоксицируются посредством конъюгации с GSH, катализируемой GST. Стабильное содержание фермента говорит о том, что он не расходуется и не выполняет своих функций в полном объеме. Для регуляции многих процессов в клетках важно постоянное соотношение окисленных и восстановленных SH-групп.

Обсуждение

Сложная многокомпонентная антиоксидантная система служит своего рода буфером, препятствующим переходу ПОЛ из физиологического состояния в патологическое. Поэтому сбой в работе механизмов АОЗ приводит к формированию окислительного стресса той или иной степени тяжести, который, как правило, сопровождает течение классического стресса (по Г. Селье), а иногда может становиться и ведущим фактором в течении патологического процесса [12]. Такой вариант рассмотрения взаимоотношения двух составляющих единого механизма напряжения всех физиологических систем с большой степенью вероятности характерен для мужчин с высоким ИМТ и бесплодием. Вероятность возникновения окислительного стресса при длительном бесплодии значительно увеличивается за счет нарушения редокс-метаболизма и формирования невротических расстройств.

В системе АОЗ выделяют так называемую непрямую АОЗ, заключающуюся в оптимизации функционирования базового метаболизма, который не предполагает генерации избыточных количеств активных форм кислорода и продуктов липопероксидации. Следуя этой логике, можно представить, что изменение мощности «митохондриальной базы» (числа, качества и активности митохондрий), как бы оно ни происходило, служит фактическим способом регулирования кислородно-перекисного состояния и зависимых от него сигнальных путей, влияющих на ход всех фундаментальных клеточных процессов [13].

Прямая антиоксидантная защита состоит из комплекса макро- и низкомолекулярных соединений, которые имеют эндогенное происхождение и частично поступают с пищей. Важнейшая роль в системе АОЗ принадлежит антиоксидантным ферментам, к которым относят супероксиддисмутазу [14, 15], комплекс ферментов системы функционирования глутатиона, включающий GPO, GR, GST [16], а также каталазу, пероксидазу [17], параоксоназу, миелопероксидазу, аконитазу и некоторые другие, которые часто представляют собой факторы первой линии обороны от продуктов свободнорадикального окисления, в том числе и ПОЛ [18, 19].

Исследование системы глутатиона в эритроцитах бесплодных мужчин показало снижение активности важнейшего компонента антиоксидантной системы — GSH, что может быть следствием повреждающего действия активных форм кислорода. Уменьшение содержания GSH ведет к повышению доступности мембраны для токсического воздействия продуктов перекисного окисления липидов, а увеличение содержания GSSG — это результат снижения антиоксидантной защиты клеток. Повышение концентрации GSSG в крови может вызывать окисление тиоловых групп белков и их инактивацию, что приведет к ускорению развития окислительного стресса.

Определение общей активности GST в крови, а также содержание тех или иных форм фермента приобретает в настоящее время большую диагностическую значимость, так как глутатион-S-трансферазной активностью обладают многие белки, локализованные в различных тканях и внутриклеточных компартментах. GPO — фермент, участвующий в процессе инактивации перекиси водорода. Поскольку это гидрофильное соединение, его проникновение в липидный слой мембран затруднено, а основная часть фермента локализована в цитозоле, а остальная — в митохондриях. Во многих реакциях, катализируемых, например, GPO или GST, две молекулы GSH соединяются дисульфидной связью и образуют GSSG. Повышение активности GST в крови мужчин с бесплодием можно объяснить истощением пула GPO. В нормально функционирующей клетке эти два фермента работают совместно: восстанавливая глутатион, они предупреждают прогрессирование пероксидации и появление ее вторичных метаболитов. При снижении активности GPO GST мобилизуется, и ее активность

увеличивается. GST — важный компонент антиоксидантной защиты от реакционных эндогенных метаболитов, образующихся при окислительном стрессе [20]. Для восстановления окисленного глутатиона в клетках существует специальный фермент — GR [21]. Снижение активности GR, возможно, связано с его активным участием в процессе биорегенерации GSSG, концентрация которого в эритроцитах возрастает при окислительном стрессе.

Многокомпонентная система антиоксидантной защиты позволяет поддерживать интенсивность свободнорадикальных процессов на оптимальном уровне, без угрозы их резкой активации и участия в развитии различных патологических состояний. Глутатион и глутатионзависимые ферменты представляют собой универсальную антиоксидантную систему и функционируют во всех компартментах клетки. Этой системе, несомненно, принадлежит главная роль в контроле содержания гидроперекиси.

Заключение

При нарушении клеточного редокс-баланса происходит срыв работы антиоксидантной системы, вызываемый снижением содержания антиоксидантов

и ингибированием антиперекисных ферментов. Таким образом, система ферментов и антиоксидантов, обеспечивающих постоянство антиперекисного и антирадикального потенциалов клеток, не справляется с защитой организма от необратимых перекисных процессов.

Роль тиолдисульфидной системы и окислительной модификации липидов как в норме, так и при бесплодии остается недостаточно изученной. Выявление взаимосвязей между дисбалансом тиолдисульфидной системы и степенью окислительной модификации липидов в условиях окислительного стресса, сопровождающего развитие патологического процесса, весьма перспективно. Избыточный вес и ожирение как факторы риска развития мужской инфертильности могут быть ассоциированы с дисбалансом редокс-статуса организма, одним из центральных компонентов которого, а также его своеобразным маркером следует считать состояние глутатионовой системы.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки / конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вантеева О.А., Курашова Н.А., Дашиев Б.Г. Анализ состояния системы антиоксидантной защиты у мужчин с бесплодием различных этнических групп. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2013; 4 (92): 102–105.
2. Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Labygina A.V., Suturina L.V., Dolgikh M.I., Shiphineeva T.I., Darzhaev Z.Yu., Tsyrenov T.B., Rinchindorzhieva M.P. Activity of lipid peroxidation in infertile women from different populations. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012; 154 (2): 203–205.
3. Курашова Н.А. Оценка репродуктивного потенциала мужского населения. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2014; 2 (96): 104–109.
4. Колесникова Л.И., Гребёнкина Л.А., Даренская М.А., Власов Б.Я. Окислительный стресс как неспецифическое патогенетическое звено репродуктивных нарушений. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2012; 32 (1): 58–66.
5. Sallmen M., Sandler D.P., Hoppin J.A., Blair A., Baird D.D. Reduced Fertility Among Overweight and Obese Men. *Epidemiology*. 2006; 17 (5): 520–523.
6. Вантеева О.А., Курашова Н.А., Дашиев Б.Г. Липопероксидация у мужчин с бесплодием. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2014; 2 (96): 12–15.
7. Хлякина О.В. Состояние репродуктивной системы мужчин с метаболическим синдромом, проживающих в экологически неблагоприятном регионе. *Вестник восстановительной медицины*. 2011; 4: 63–66.
8. Brody S.A. Мужское бесплодие и окислительный стресс: роль диеты, образа жизни и пищевых добавок. *Андрология и генитальная хирургия*. 2014; 3: 33–41.
9. Hissin P.J., Hilf R. Fluometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Ann. Biochem.* 1976; 74 (1): 214–226.
10. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. СПб.: *Интермедика*. 2002. 600 с.
11. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. 4-е изд. Под ред. Л.Ф. Курило. М.: *Мед-Пресс*. 2001. 144 с.
12. Колесникова Л.И., Осипова Е.В., Гребёнкина Л.А., Власов Б.Я. Окислительный стресс как индуктор патологических нарушений в организме человека. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2009; 2: 48–49.
13. Лю Б.Н., Исмаилов С.Б., Лю М.Б. Состояние цитоскелета: связь с «кислородно-перекисными» эффектами в норме, при клеточных патологиях и апоптозе. *Биомедицинская химия*. 2008; 1: 58–77.
14. Cord J.M., Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocoupein. *Biol. Chem.* 2000; 244: 6049–6055.
15. Miao L., Clair D.K. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 47: 344–350.
16. Толпыгина О.А. Роль глутатиона в системе антиоксидантной защиты. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2012; 2–2: 178–180.
17. Bednarek-Tupikowska G., Tupikowski K., Bidzińska B., Bohdanowicz-Pawlak A., Antonowicz-Juchniewicz J., Kosowska B., Milewicz A. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol. Endocrinol.* 2004; 19: 57–63.
18. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: role in neutrophil-mediated toxicity. *Mol. Biol. Infect. Dis.* 2006; 14: 283–289.
19. Ефимцева Э.А., Челпанова Т.И. Параоксоназа: молекулярно-генетические аспекты и клиническое значение. *Успехи современной биологии*. 2012; 132: 282–296.
20. Sharma R., Yang Y., Sharma A., Awasthi S., Awasthi Y.C. Antioxidant role of glutathione-S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid. Redox. Signal.* 2006; 6: 289–300.
21. Агарков А.А., Попова Т.Н., Верёвкин А.Н., Матасова Л.В. Активность глутатионовой антиоксидантной системы и НАДФН-генерирующих ферментов в сыворотке крови крыс при сахарном диабете 2-го типа и воздействии препаратов, корригирующих уровень мелатонина. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157 (2): 158–162.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Колесникова Любовь Ильинична, доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, директор НЦПЗСРЧ

Адрес: 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16, **тел.:** +7 (3952) 20-76-36, **e-mail:** iphr@sbamsr.irk.ru

Вантеева Ольга Андреевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии репродукции НЦПЗСРЧ

Адрес: 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, д. 16, **тел.:** +7 (3952) 20-76-36, **e-mail:** olga_tolpygina@mail.ru

Курашова Надежда Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории патофизиологии репродукции НЦПЗСРЧ

Адрес: 664003, Иркутск, ул. Тимирязева, д.16, **тел.:** +7 (3952) 20-76-36, **e-mail:** nakurashova@yandex.ru

Дашиев Баир Гомбоевич, кандидат медицинских наук, врач уролог-андролог Республиканского перинатального центра

Адрес: 670002, Республика Бурятия, Улан-Удэ, ул. Комсомольская, д. 1/Б, **тел.:** +7 (3012) 55-36-23,

e-mail: bairdashiev@mail.ru