

УДК 616.697-078

**ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И МИКРОБНЫЙ ПЕЙЗАЖ
ЭЯКУЛЯТА ПРИ МУЖСКОМ БЕСПЛОДИИ**

Вавилов Н.В.¹, Степанов М.С.¹, Бушкова Е.Ю.¹

¹ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера” Минздрава России, Пермь, Россия

(614000, Пермь, ул. Петропавловская, 26), e-mail: nikione@yandex.ru

Вавилов Н.В. (Vavilov N.V.) – студент лечебного факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера” Минздрава России;

Степанов М.С. (Stepanov M.S.) – студент лечебного факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера” Минздрава России;

Бушкова Е.Ю. (Bushkova E.Yu.) – студент лечебного факультета ФГБОУ ВО “Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера” Минздрава России

Для корреспонденции: Вавилов Никита Васильевич, 614000, г. Пермь, ул. Екатерининская 85, e-mail: nikione@yandex.ru, тел: +79028309716

Известно, что 10-17% семей бесплодны и в половине случаев установлена связь с нарушением репродуктивного здоровья мужчин. Наиболее частая причина мужского бесплодия - воспалительные поражения мочеполовой системы. Поскольку многие микроорганизмы являются условно патогенными, для доказательства участия в патологическом процессе недостаточно только демонстрации их наличия в эякуляте. В ходе проведенных исследований показано, что у 91,3% субфертильных мужчин в эякуляте обнаружены микроорганизмы, среди которых лидирующее положение занимали *Staphylococcus* spp., а в трети случаев – представители семейства *Enterobacteriaceae*. Присутствие в эякуляте субфертильных мужчин грамотрицательных микроорганизмов, как правило, характеризуется более выраженными нарушениями морфологии и параметров подвижности сперматозоидов. Одной из возможных причин изменения характеристик половых клеток может быть окислительная модификация белка, которая развивается как при прямом воздействии микроорганизмов, так и опосредованно, например, через активацию синтеза АФК лейкоцитами.

Ключевые слова: бессимптомная бактериоспермия, *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, подвижность сперматозоидов, морфология сперматозоидов, окислительная модификация белков.

Специальность 03.00.07 – Микробиология

OXIDIZING MODIFICATION OF PROTEINS AND MICROBIAL LANDSCAPE OF THE EJACULATE AT MALE STERILITY

Vavilov N.V.¹, Stepanov M.S.¹, Bushkova E.Yu.¹

¹Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia
(614000, Perm, Petropavlovskaya street, 26), e-mail: nikione@yandex.ru

It is known that 10-17% of families are sterile and in half of cases the connection with the violation of men's reproductive health is established. The most frequent reason of male sterility is inflammation of the urogenital system. As many microorganisms are conditionally pathogenic, for the proof of their participation in pathological process it isn't enough only to demonstrate their existence in an ejaculate. During the research it is shown that microorganisms have been found in 91,3% of subfertile men in an ejaculate. Leading position has been occupied by Staphylococcus spp. and in a third of cases – representatives of the Enterobacteriaceae family. Presence in ejaculate of subfertile men of Gram-negative microorganisms is, as a rule, characterized by more expressed disturbances of morphology and parameters of mobility of spermatozoons. Oxidizing modification of protein which develops as at direct influence of microorganisms, so indirectly (for example, through activation of synthesis of ROS leucocytes) can be one of the possible reasons of changing characteristics of sex cells.

Keywords: asymptomatic bacteriospermia, Staphylococcus spp., Enterobacteriaceae, mobility of spermatozoons, morphology of spermatozoons, oxidizing modification of proteins.

В России среди населения страны прочно утвердилось мнение о значительном превалировании в этиологии бесплодных браков «женского» фактора. Однако, согласно опубликованным данным [1, 3, 4, 5, 8, 9], от 10% до 17% семей бесплодны и в половине случаев установлена связь с нарушением репродуктивного здоровья мужчин. Наиболее частая причина мужского бесплодия - воспалительные поражения мочеполовой системы [7–9]. Продолжается дискуссия о возможных инфекционных агентах, которые способны повлиять не только на фертильность мужчины, но и стать причиной воспалительных процессов в репродуктивных органах женщины [2, 6]. Поскольку многие микроорганизмы являются условно патогенными, для доказательства участия в патологическом процессе недостаточно только демонстрации их наличия в эякуляте [3, 9, 11]. Отсутствуют убедительные доказательства, указывающие на то, что бессимптомная бактериоспермия (ББ) может послужить этиопатогенетическим фактором, способным оказывать влияние на качество эякулята, и стать причиной мужского бесплодия.

Известно, что многие виды микроорганизмов образуют активные формы кислорода (АФК), как вследствие своего метаболизма, так и благодаря наличию фермента супероксиддисмутазы. Кроме этого АФК образуются при респираторном взрыве – реакции фагоцитарных клеток при встрече с объектом фагоцитоза, в частности микроорганизмами. В результате своей гиперактивности АФК способны взаимодействовать практически с любой молекулой. Наиболее изучено влияние АФК на липиды, но белковые молекулы подвергаются более раннему воздействию кислородных соединений, что влечёт за собой необратимые изменения, сказывающиеся, в свою очередь, на их функции [10].

Цель исследования: Изучить микробный пейзаж, двигательные и морфологические характеристики сперматозоидов эякулята субфертильных мужчин, а также определить

уровень окислительной модификации белков (ОМБ) спермоплазмы.

Объекты и методы исследования. Проведено лабораторное исследование образцов эякулята 92 мужчин, состоящих в бесплодном браке, средний возраст которых составил $37,7 \pm 0,7$ года. Взятие материала и его исследование проводили согласно стандартизованным методикам, предложенным экспертами ВОЗ (2010).

При микроскопическом исследовании мазков из нативного материала оценивали общее число сперматозоидов, мазки окрашенные эозином использовали для анализа жизнеспособности клеток. Для оценки клеточного состава и морфологических исследований готовили препараты, окрашенные по методу Романовского-Гимзе. Для бактериологического анализа готовили десятикратное разведение исходного материала. Стрепто- и энтерококки изолировали на кровяном агаре, стафилококки выделяли на желточно-солевом агаре (ЖСА), грибы рода *Candida* - на среде Сабуро, энтеробактерии определяли при высеве на агар Эндо, анаэробы - на обогащенной среде для контроля стерильности, разлитой «высоким столбиком» по пробиркам.

Для оценки ОМБ использовали методику Reznick A.Z. *et al.* (1994) в нашей модификации. Реакцию проводили с 0,1М раствором 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). В контрольной пробе использовали растворитель ДНФГ. Из данных литературы [10] известно, что для алифатических альдегид-денитрофенилгидразонов (ДНФ) нейтрального характера спектр поглощения зарегистрирован при 260 нм, основного характера – 430 нм. Для алифатических кетон-ДНФ нейтрального характера спектр поглощения составляет 365 нм, основного характера – 430 нм. Содержание карбониллов вычисляли из пика поглощения при соответствующих длинах волн. Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка. Общий белок в спермальной жидкости определяли с помощью биуретовой реакции (Вектор-Бест, Новосибирск).

Статистический анализ проводили с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты исследований. Средний объем эякулята составил $3,7 \pm 0,2$ мл, pH $7,8 \pm 0,02$, количество сперматозоидов $81,9 \pm 7,1$ млн/мл, в том числе $84,8 \pm 1,7\%$ живых. Средняя линейная скорость движения сперматозоидов $12,6 \pm 0,6$ мкм/сек. При оценке морфологических характеристик почти у половины ($46,1 \pm 1,8\%$) сперматозоидов обнаруживали те или иные изменения, среди которых наиболее существенное место занимали дефекты головки - $40,3 \pm 1,7\%$. Доли повреждений средней части и хвоста оказались равнозначными - $8,3 \pm 0,7\%$ и $9,5 \pm 0,7\%$ соответственно. Число лейкоцитов в эякуляте не превышало $1,4 \pm 0,5$, а макрофагов $0,60 \pm 0,04$ в поле зрения.

В 91,3% случаев в эякуляте субфертильных мужчин присутствовали микроорганизмы. Микроорганизмы одного вида обнаружены в 53,3%, двух – в 32,6%, трех - в 5,4% случаев. У

70,7% мужчин из спермоплазмы выделены только грамположительные микроорганизмы. Среди них преобладали представители рода *Staphylococcus* (62%) с высокой встречаемостью *S. epidermidis* (25%), *S. haemolyticus* (19,6%) и *S. aureus* (6,5%). Бактерии рода *Streptococcus* изолированы у 18,5% (*S. agalactiae* - 4,3%, *S. viridans* - 6,5%; *S. mitis* – 3,3%), *Enterococcus* – у 5,4% мужчин (*E. faecalis* - 4,3%). У трети мужчин (27,1%) в эякуляте присутствовали только грамотрицательные микроорганизмы. Среди них встречалась: *Escherichia coli* – 15,2%, бактерии рода *Enterobacter* – 5,4% (*E. aerogenes* - 3,3%, *E. cloacae* et *E. sakazakii* – по 1,1%), *Neisseria* spp. – 4,3%, *Citrobacter* spp. – 4,3% (*C. diversus* - 2,2%; *C. farmeri* et *C. freundii* - 1,1%), *Klebsiella pneumoniae* – 3,3%. Кроме того, в эякуляте 1,1% мужчин выделены микроорганизмы рода *Gemella* или *Candida albicans*.

В пробах с преобладанием грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов количество сперматозоидов, а также их жизнеспособность статистически значимо не различались ($p > 0,05$). В образцах эякулята с наличием грамотрицательных палочек обнаружено $14,6 \pm 4,9$ млн/мл непоступательно подвижных клеток, а при выявлении грамположительных кокков – $6,0 \pm 1,2$ млн/мл ($p < 0,05$), соответственно сперматозоидов с дефектами зарегистрировано $53,9 \pm 16,0$ млн/мл и $26,6 \pm 4,9$ млн/мл ($p < 0,05$). У мужчин с грамотрицательными палочками в спермоплазме статистически значимо чаще встречались дефекты всех частей сперматозоида ($p < 0,05$).

Установлено, что концентрация окисленных белков в спермоплазме составила $1,96 \pm 0,10$ нмоль/мг белка для основных альдегид-ДНФ, $0,78 \pm 0,05$ – для нейтральных кетон-ДНФ, $0,42 \pm 0,03$ – для основных кетон-ДНФ и $0,23 \pm 0,01$ нмоль/мг белка для нейтральных альдегид-ДНФ. В образцах спермоплазмы с преобладанием грамположительных кокков уровень ОМБ оказался ниже, чем в пробах с доминированием грамотрицательных палочек. Так, уровень основных альдегид-ДНФ в 1-й группе составил $1,77 \pm 0,09$, во 2-й – $2,17 \pm 0,20$ нмоль/мг белка ($p < 0,05$), а концентрация основных кетон-ДНФ – $0,38 \pm 0,02$ и $0,48 \pm 0,05$ нмоль/мг белка соответственно ($p < 0,05$). Аналогичная ситуация характерна и для нейтральных кетон- и альдегид-ДНФ.

Выводы. 1. У 91,3% субфертильных мужчин в эякуляте обнаружены микроорганизмы, среди которых лидирующее положение занимали *Staphylococcus* spp., а в трети случаев – представители семейства *Enterobacteriaceae*.

2. Присутствие в эякуляте субфертильных мужчин грамотрицательных микроорганизмов, как правило, характеризуется более выраженными нарушениями морфологии и параметров подвижности сперматозоидов.

3. Одной из возможных причин изменения характеристик половых клеток может быть окислительная модификация белка, которая развивается как при прямом воздействии

микроорганизмов, так и опосредованно, например, через активацию синтеза АФК лейкоцитами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Пермского края в рамках научного проекта «р_а 16-44-590429».

Список литературы

1. Богданов Ю.А., Карпунина Т.И., Зуева Т.В. К вопросу о распространенности мужского бесплодия // Медицина и образование в Сибири. – 2013. – №5. – С. 16.
2. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Микробиота эякулята мужчин с бесплодием в условиях крупного промышленного города // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Социальные, гуманитарные, медико-биологические науки. – 2015. – Т.17, №5-2. – С. 338-343.
3. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Опыт изучения образцов эякулята инфертильных мужчин с бессимптомной бактериоспермией // Электронный научно-образовательный вестник Здоровье и образование в XXI веке. – 2015. – Т.17, №11. – С. 19-24.
4. Годовалов А.П., Карпунина Т.И., Даниелян Т.Ю. *Candida albicans* при сниженной фертильности у мужчин // Успехи медицинской микологии. – 2016. – Т. XV. – С. 248-250.
5. Годовалов А.П., Мальцева Н.А., Голосова Ю.А., Отинова М.А., Лебединская О.В. Изучение распространённости факторов, способствующих развитию мужского бесплодия среди молодых людей Пермского края // Андрология и генитальная хирургия. – 2011. – №2. – С. 122-123.
6. Даниелян Т.Ю., Годовалов А.П., Быкова Л.П. Клинико-микробиологическая характеристика неспецифических уретритов у мужчин // Андрология и генитальная хирургия. – 2011. – №2. – С. 116.
7. Даниелян Т.Ю., Годовалов А.П., Быкова Л.П., Смирнов М.В. Роль антиспермальных антител в нарушении функций сперматозоидов // Медицинская иммунология. – 2015. – Т.17, №5. – С. 265.
8. Зуева Т.В., Богданов Ю.А., Карпунина Т.И. Эпидемиологическая оценка заболеваемости болезнями предстательной железы на территории г. Перми // Медицинский альманах. – 2013. – №2(26). – С. 120-122.
9. Касимова Т.В., Богданов Ю.А., Кузнецов И.Д., Карпунина Т.И. Микрофлора эякулята как потенциальная причина репродуктивных проблем // Фундаментальные исследования. – 2012. – №2-2. – С. 308-310.
10. Копытова Т.В., Пантелеева Г.А., Дмитриева О.Н., Коткова Е.В. Оценка окислительной модификации белков у больных хроническими распространёнными

дерматозами // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. – №2. – С. 41-44.

11. Godovalov A.P., Karpunina T.I. Microbiological and morpho-functional features of ejaculate from infertile men with asymptomatic bacteriospermia // Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – №9-3(51). – С. 34-38.