

УДК 577.112.4

ПАРАМЕТРЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ОРГАНИЗМА, ОТРАЖАЮЩИЕ УРОВЕНЬ КАРБОНИЛЬНОГО СТРЕССА

Вавилов Н.В.

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера»
Минздрава России, Пермь, e-mail: nikione@yandex.ru

Во всём мире активно обсуждается роль мужского фактора в структуре бесплодных браков, ВОЗ за 30 летний период регистрирует снижение показателей качества эякулята. Данный эффект можно связать с ускорением темпа жизни, урбанизацией, ухудшением экологической обстановки и т.д., что влечёт за собой декомпенсацию систем гомеостаза организма. Одним из факторов, имеющим такую многофакторную природу является оксидативный стресс, наиболее ранним маркёром которого являются продукты перекисного окисления белковых молекул. В статье предложены параметры, по которым можно оценивать уровень карбонильного стресса в биологических жидкостях организма и, в частности, представлены материалы собственных исследований крови здоровых доноров и спермоплазмы субфертильных мужчин. Установлено, что уровень кДНФн сыворотки крови здоровых доноров составил $1,24 \pm 0,15$ нмоль/мг белка, вклад кДНФо составляет $0,74 \pm 0,11$ нмоль/мг белка, а кДНФн – $0,37 \pm 0,07$ нмоль/мг белка. Таким образом, суммарная концентрация окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров равна $2,35 \pm 0,11$ нмоль/мг белка. Выявлено, что на долю кДНФн приходится 16% окисленных белков, на кДНФо – 31,5% и 52,5% на кДНФн. Соотношение окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров кДНФн:кДНФо:кДНФн составляет 1:2:3,3. Концентрация карбонил в спермоплазме равна $2,01 \pm 0,10$ для кДНФо, $0,80 \pm 0,04$ – кДНФн, $0,43 \pm 0,02$ – кДНФо и $0,23 \pm 0,01$ нмоль/мг белка для кДНФн. Суммарная концентрация окисленных белков составляет $3,47 \pm 0,4$ нмоль/мг белка. Соответственно на долю кДНФн приходится 6,5%, на долю кДНФо – 12,5%, на долю кДНФн – 23% и на долю кДНФо 58% окисленных белков. Соотношение окисленных белков спермоплазмы субфертильных доноров кДНФн:кДНФо:кДНФн:кДНФо составляет 1:1,9:3,5:8,7.

Ключевые слова: сыворотка крови, спермоплазма, эякулят, окислительная модификация белков, ДНФГ

PARAMETERS OF BIOLOGICAL LIQUIDS, REFLECTING THE LEVEL OF CARBONILE STRESS

Vavilov N.V.

Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, e-mail: nikione@yandex.ru

At the moment, the role of the male factor in the structure of infertile marriages is actively discussed, WHO for the 30-year period registers a decrease of ejaculate quality parameters. This effect can be related to the acceleration of the pace of life, urbanization, deterioration of the ecological situation, etc., which is the cause of decompensation of the organism's homeostasis systems. One of the factors that has such a multifactorial nature is oxidative stress, the earliest marker of which are the products of oxidation of protein molecules. The article suggests the parameters for estimating the level of carbonyl stress in body fluids and, in particular, the materials of own blood tests from healthy donors and spermoplasm of subfertile donors. It was found that the level of ${}^k\text{DNP}_n$ in the blood serum of healthy donors was 1.24 ± 0.15 nmol / mg protein. The level of ${}^a\text{DNP}_b$ is 0.74 ± 0.11 nmol / mg protein, and ${}^a\text{DNP}_n$ is 0.37 ± 0.07 nmol / mg protein. Thus, the total concentration of oxidized proteins of blood serum of healthy donors is 2.35 ± 0.11 nmol / mg protein. It was revealed that ${}^a\text{DNP}_n$ accounts for 16%, for ${}^k\text{DNP}_b$ – 31.5%, for ${}^a\text{DNP}_n$ – 52.5% of oxidized proteins. The ratio of oxidized proteins of blood serum of healthy donors to ${}^a\text{DNP}_n$: ${}^k\text{DNP}_b$: ${}^a\text{DNP}_n$ is 1: 2: 3.3. The concentration of carbonyls in the spermoplasm was 2.01 ± 0.10 for ${}^a\text{DNP}_b$, 0.80 ± 0.04 – ${}^k\text{DNP}_n$, 0.43 ± 0.02 – ${}^a\text{DNP}_b$ and 0.23 ± 0.01 nmol / mg protein for ${}^a\text{DNP}_n$. The total concentration of oxidized proteins is 3.47 ± 0.4 nmol / mg protein. Accordingly, the share of ${}^a\text{DNP}_n$ accounts for 6.5%, for ${}^k\text{DNP}_b$ – 12.5%, for ${}^a\text{DNP}_n$ – 23% and for ${}^a\text{DNP}_b$ 58% of oxidized proteins. The ratio of oxidized proteins of spermoplasm of subfertile donors of ${}^a\text{DNP}_n$: ${}^k\text{DNP}_b$: ${}^a\text{DNP}_n$: ${}^a\text{DNP}_b$ is 1: 1.9: 3.5: 8.7.

Keywords: Serum, spermoplasm, ejaculate, oxidative modification of proteins, DNPГ

Окислительный стресс (оксидативный стресс) – процесс повреждения клетки в результате окисления, с последующим распространением повреждения во внеклеточную среду. Изучение данного вопроса началось с середины 50х годов прошлого века, когда основным маркёром свободно-радикальных процессов служили продукты перекисного окисления липидов [4]. Под действием оксидативного стресса, так же меняется нативная конформация белковых молекул, вплоть до фрагментации, что отражается на их функции. Окислительная модификация

белков (ОМБ) – одно из основных последствий протекания свободно-радикального окисления в живых системах, опосредованное воздействием активных форм кислорода и реактивных форм азота [1].

В результате свободно-радикальных процессов могут образоваться активные формы кислорода (АФК) и активные формы азота. Эти процессы стимулируют экзогенные факторы, такие как фотохимический смог, озон, пестициды, ксенобиотики, ультрафиолетовое излучение, α - и γ -лучи (рис. 1). Кроме этого существенный вклад

вносят эндогенные факторы: продукты метаболизма митохондрий, продукты микросомальных реакций, катализируемых цитохромом P450, реакции катализируемые металлами, продукты метаболизма аргинина, продукция нейтрофилами и макрофагами, при воспалении АФК, ведущие к ОМБ [5]. В человеческом организме наиболее распространены реакции Фентона и Габера-Вейса, генерирующие гидроксил-радикалы [8].

Материалы 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 проводили согласно стандартизованным методикам, предложенным экспертами ВОЗ (2010). Исследована сыворотка периферической крови 10 практически здоровых доноров. Для оценки ОМБ использовали следующую методику [2]. Реакцию проводили с 0,1М раствором 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ). В контрольной пробе использовали растворитель ДНФГ. Известно, что для

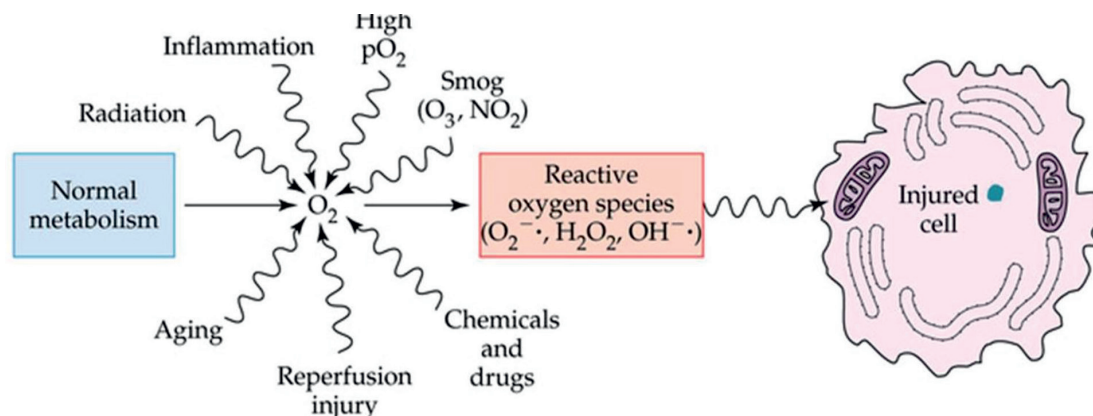


Рис. 1. Инициация свободно-радикальных процессов

В настоящее время роль мужского фактора в развитии бесплодия существенно занижена. В России зафиксировано от 10% до 17% бесплодных супружеских пар (4-4,5 млн.) [3, 7]. Из рекомендаций ВОЗ к качеству эякулята следует, что за последние 30-40 лет требования к некоторым показателям спермограммы снизились на 25-35% [6]. Это заставляет задуматься о поиске причин и механизмов повреждения сперматозоидов. Одним из таких механизмов, вероятно, может являться воздействие АФК или реактивных соединений азота на биополимерные составляющие сперматозоидов, такие как нуклеиновые кислоты, белки, углеводы и на липиды. Считается, что наиболее массивному повреждению подвергаются белковые молекулы, которые под воздействием свободных радикалов фрагментируются, с образованием карбонильных производных или же формируются внутримолекулярные сшивки, что влечёт за собой нарушения конформационной модели и сказывается на функции белков.

Цель исследования – опробовать методику определения ОМБ на сыворотке крови от здоровых доноров и в спермоплазме от субфертильных доноров, оценив при этом уровень карбонильного стресса.

алифатических альдегид-динитрофенилгидразонов (аДНФо) нейтрального характера спектр поглощения зарегистрирован при 260 нм, основного характера – 530 нм (аДНФн). Для алифатических кетон-ДНФ нейтрального характера спектр поглощения составляет 365 нм (кДНФн), основного характера – 430 нм (кДНФо). 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 результатов проводили с использованием методов описательной статистики и *t*-критерия Стьюдента для парных данных.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследований установлено, что уровень кДНФн сыворотки крови здоровых доноров составил $1,24 \pm 0,15$ нмоль/мг белка (контрольная проба $0,56 \pm 0,12$ нмоль/мг белка), что соответствует результатам, полученным как в классическом варианте реакции ($p > 0,05$) [9], так и литературным данным [10]. Уровень кДНФо составляет $0,74 \pm 0,11$ нмоль/мг белка (контрольная проба $0,36 \pm 0,07$ нмоль/мг белка), а аДНФн – $0,37 \pm 0,07$ нмоль/мг белка (контрольная проба $0,25 \pm 0,05$ нмоль/мг белка). Таким образом, суммарная концентрация

окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров составляет $2,35 \pm 0,11$ нмоль/мг белка (рис. 2). Выявлено, что на долю АДНФн приходится 16%, на долю кДНФо – 31,5%, на долю кДНФн – 52,5% окисленных белков. Соотношение окисленных белков сыворотки крови здоровых доноров кДНФн: кДНФо: АДНФн составляет 1: 2: 3,3. По техническим причинам измерение АДНФо сыворотки крови не производилось на данном этапе исследований.

Установлено, что концентрация карбониллов в спермоплазме составила $2,01 \pm 0,10$ для АДНФо, $0,80 \pm 0,04$ – кДНФн, $0,43 \pm 0,02$ – кДНФо и $0,23 \pm 0,01$ нмоль/мг белка для АДНФн. Следовательно, суммарная концентрация окисленных белков составляет $3,47 \pm 0,4$ нмоль/мг белка (рис. 2). Соответственно на долю АДНФн приходится 6,5%, на долю кДНФо – 12,5%, на долю кДНФн – 23% и на долю АДНФо 58% окисленных белков. Соотношение окисленных белков спермоплазмы субфертильных доноров АДНФн: кДНФо: кДНФн: АДНФо составляет 1: 1,9: 3,5: 8,7.

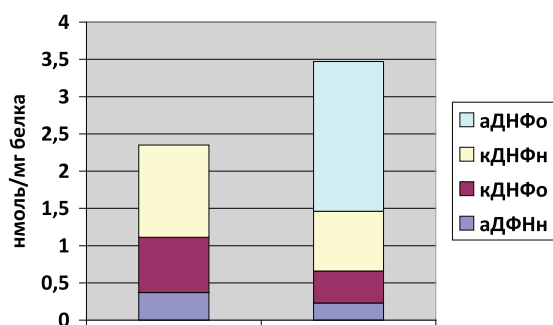


Рис. 2. Спектр окисленных белков сыворотки крови и спермоплазмы

Выводы

1. Предложенный метод оценки ОМБ пригоден для оценки карбонильного стресса эякулята.

2. Показатели карбонильного стресса эякулята ниже, чем показатели сыворотки крови, что говорит о более активной работе антиоксидантов в данной биологической жидкости.

3. При оценке уровня карбонильного стресса следует использовать параметры относительного содержания производных ОМБ и параметры соотношения фракций относительно друг друга.

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

Список литературы

1. Вавилов Н.В., Годовалов А.П. Взгляд на клиническое значение окисленно модифицированных белков // Современные научные исследования и разработки. 2017. Т. 2. № 1 (9). С. 36-39.
2. Вавилов Н.В., Шилов Ю.И. Модификация метода оценки окислительной модификации белков // Медицинская иммунология. 2017. Т. 19. № SV. С. 360.
3. 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.
4. Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлёв А.И. Радиобиология, т. 1, 1961. – 150-151с.
5. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997;272:20313– 6.
6. Esteves S.C. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination // Clinical relevance of routine semen analysis and controversies – 2014. – Vol. 40 (4) – P. 443-453
7. 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.
8. Goldstein S., Meyerstein D., Czapski G. The Fenton reagents // Free Radical Biology and Medicine. – 1993. – Vol. 15(4). – P. 435-445.
9. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay // Methods in enzymology. – Vol. 233. – 1994. – P. 357-363.
10. Sheth J.J. Genoprotective Effect of Indian Gentian in Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM): Comet Assay, Sister Chromatid Exchange and Protein Oxidation Studies // Int. J. Hum. Genet. – 2011. – Vol. 11(2) – P. 83-88.