



Характеристика глутатіонпероксидази сперматозоїдів інфертильних чоловіків

Роман Фафула, Олена Онуфрович, Уляна Єфремова, Зіновій Воробець

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів, Україна

Адреса для листування: roman_fafula@ukr.net

Отримано: 08.09.18; прийнято до друку: 06.10.18; опубліковано: 26.12.18

Резюме. Загальновідомо, що порушення балансу між інтенсивністю процесів ліпопероксидації та активністю систем антиоксидантного захисту призводить до оксидативного стресу, який є потенційною передумовою в розвитку дисфункції сперматозоїдів. Особлива роль у системі антиоксидантного захисту належить глутатіоновій системі, зокрема глутатіонпероксидазі, що здійснює інактивацію активних форм Оксигену з одночасним окисненням відновленого глутатіону (GSH). **Мета роботи** – вивчення кінетичних властивостей глутатіонпероксидази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків із різними формами патоспермії.

Активність глутатіонпероксидази визначали за кількістю GSH, який використано для нейтралізації пероксиду водню в глутатіонпероксидазній реакції. Уявні кінетичні параметри, які характеризують глутатіонпероксидазну реакцію – уявну константу спорідненості до GSH і початкову максимальну активність ензиму визначали в обернених координатах Лайнуївера-Берка.

З'ясовано, що підвищення концентрації GSH у середовищі інкубації призводить до поступового збільшення ензиматичної активності глутатіонпероксидази з виходом на плато. Максимальну активність глутатіонпероксидази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків простежено за наявності 5 мМ GSH в інкубаційному середовищі. Значення початкової максимальної активності глутатіонпероксидази в сперматозоїдах інфертильних чоловіків із різними формами патоспермії у 2,4–4,1 нижче відносно цієї величини у фертильних чоловіків із нормозоспермією. Водночас не відзначається статично достовірної різниці у величині початкової максимальної активності глутатіонпероксидази між різними формами патоспермії. Значення уявної константи афінності (спорідненості) до GSH у сперматозоїдах інфертильних чоловіків в 1,9–4,9 раза перевищують цей показник у сперматозоїдах нормозоспермічних чоловіків, що свідчить про зниження спорідненості ензиму до GSH при патоспермії.

При інтерпретації отриманих кінетичних параметрів, визначених за GSH, показано, що при патоспермії інгібування активності глутатіонпероксидази відбувається за змішаним типом – як за рахунок зменшення числа обертів ензиму, так і за рахунок зниження спорідненості ензиму до субстрату.

Ключові слова: глутатіонпероксидаза, антиоксидантна система, неплідність чоловіків, патоспермія.

Characteristics of Glutathione Peroxidase of Spermatozoa of Infertile Men

Roman Fafula, Olena Onufrovych, Ulyana Iefremova, Zinoviyy Vorobets

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Correspondence: roman_fafula@ukr.net

Abstract. It is well known that the unbalancing between the intensity of lipoperoxidation processes and the activity of antioxidant defense systems leads to the development of oxidative stress, which is a potential prerequisite for the development of sperm dysfunction. A special role in the system of antioxidant protection belongs to the glutathione system, in particular glutathione peroxidase, which inactivates the active forms of Oxygen with the simultaneous oxidation of reduced glutathione. The aim of present work is to study the kinetic properties of glutathione peroxidase of spermatozoa in fertile and infertile men with different forms of pathospermia.

The activity of glutathione peroxidase was determined by the amount of reduced glutathione (GSH) that was used to neutralize hydrogen peroxide in the glutathione peroxidase reaction. The apparent kinetic parameters characterizing the glutathione peroxidase reaction - the apparent affinity constant for GSH and the maximum reaction rate were determined in the Lineweaver–Burk plot (or double reciprocal plot).

It was found that increasing the concentration of GSH in the incubation medium leads to a gradual increase in enzymatic activity of glutathione peroxidase reaching the plateau. The maximum activity of glutathione peroxidase of sperm cells in fertile and infertility men was noted in the presence of 5 mM GSH in the incubation medium. The value of maximum reaction rate for glutathione peroxidase of infertility men with different forms of pathospermia was 2,4–4,1 fold lower compared to this value in fertile men with normospermia. At the same time, there was no statistically significant difference in maximum reaction rate between different forms of pathospermia. The value of the apparent affinity constant for GSH in the spermatozoa of the infertility men was 1,9–4,9 fold higher that of the spermatozoa of the normozoospermic males, indicating a decrease in the enzyme affinity for GSH in the pathospermia.

In interpreting the obtained kinetic parameters determined by GSH, it has been shown that in the pathospermia the inhibition of glutathione peroxidase occurs in a mixed type-both by reducing the reaction rate of the enzyme and by reducing the affinity constant to the substrate.

Key words: glutathione peroxidase, antioxidant system, male infertility, pathospermia.

Вступ

Нині інтенсивно вивчають роль активних форм Оксигену, процесів ліпопероксидації та механізмів антиоксидантного захисту у функціонуванні сперматозоїдів у нормі й при патології [1]. Низькі концентрації активних форм Оксигену необхідні для підтримання фертилізаційного потенціалу сперматозоїдів [2; 3]. З іншого боку, високий рівень активних форм Оксигену знижує активність і життєздатність сперматозоїдів, призводить до інтенсифікації процесів ліпопероксидації, розвитку оксидативного стресу та чоловічої неплідності [4]. Ліпопероксидації в спермальних мембранах є автокаталітичним процесом, у результаті якого виникає ризик клітинної дисфункції.

Розвиток оксидантного стресу є результатом порушення рівноваги між продукцією активних форм Оксигену та їх нейтралізацією антиоксидантними системами. Особливу роль у системі антиоксидантного захисту відіграє глутатіонова система, яка включає неenzиматичні (глутатіон) та enzymатичні компоненти (глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіон-S-трансфераза [5]. Глутатіонпероксидаза (EC 1.11.1.9) є найбільш активним антиоксидантом, що здійснює інактивацію активних форм Оксигену, зокрема перекису водню й гідроперекисів з одночасним окисненням відновленого глутатіону (GSH). Зниження активності ензиму призводить до розвитку вільнорадикальної патології [6]. Глутатіонпероксидаза здатна відновлювати також пероксинітрил (високореакційноздатну молекулу), який викликає нітрування тирозину протеїнів, що беруть участь у моториці та капацитації сперматозоїдів [7].

У попередніх наших дослідженнях виявлено, що зниження концентрації спермато-

зоїдів в еякуляті та їх рухливості, порушення їхньої структури супроводжуються підвищенням інтенсивності вільнорадикального окиснення й зниженням активності ензимів глутатіонової антиоксидантної системи, зокрема глутатіонпероксидази [8]. Нами встановлено, що найбільш виражені зміни в активності глутатіонпероксидази сперматозоїдів простежено в інфертильних чоловіків із поєднаними формами патоспермій і лейкоцитоспермією [9].

Проте достовірно невідомо, які біохімічні механізми зумовлюють порушення функціональної активності глутатіонпероксидази. **Мета роботи** – вивчення кінетичних властивостей глутатіонпероксидази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків із різними формами патоспермій.

Матеріали та методи

Дослідження проведені на сперматозоїдах 72 чоловіків, котрі проходили первинне обстеження в консультативній поліклініці Львівської обласної клінічної лікарні у зв'язку з непліддям. Середній вік пацієнтів – 26,2±4,2 років. Критерії включення є такі: вік 21–39 років, неплідність у шлюбі – 1–10 років, чоловічий фактор неплідності. Існують винятки: неплідність у шлюбі понад 10 років, азооспермія, надмірне вживання алкоголю та вплив будь-яких шкідливих фізико-хімічних чинників.

Усім пацієнтам проведено аналіз спермограми та виконано біохімічні дослідження, що характеризують окисні процеси в спермі й стан глутатіонової антиоксидантної системи сперматозоїдів. Відповідні діагнози встановлено на базі загальноновизнаних критеріїв. У роботі використано критерії ВООЗ (2010) для оцінки морфологічних характеристик сперматозоїдів [10].

Усіх пацієнтів розділено на чотири групи: олігозооспермія (зниження концентрації сперматозоїдів в еякуляті), астенозооспермія (зниження рухливості сперматозоїдів), олігоастенозооспермія (поєднана форма патоспермії) та лейкоцитоспермія (уміст лейкоцитів в еякуляті $> 1,0 \cdot 10^6$ /мл, що свідчило про наявність запального процесу). До контрольної групи ввійшло 20 соматично здорових чоло-віків віком від 22 до 39 років зі збереженою фертильністю й нормозооспермією та підтвердженим батьківством (перебувають у шлюбі протягом 3–10 років і мають 1–3 здорових дітей).

Сперматозоїди відмивали від плазми еякуляту за допомогою триразового центрифугування при 3000 g протягом 10 хв у середовищі, яке містило (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 30, Hepes (pH 7,4) – 30. Уміст загального протеїну в пробах визначали методом Лоурі з використанням набору виробництва НВФ «Simko Ltd» (Україна). Для пермеабілізації мембран сперматозоїдів і розкриття глутатіонпероксидазної латентної активності до суспензії сперматозоїдів додавали 0,2 % розчин сапоніну. Активність глутатіонпероксидази визначали за кількістю GSH, який використано для нейтралізації пероксиду водню в глутатіонпероксидазній реакції з урахуванням розведення біологічного матеріалу в пробі й коефіцієнта мікромолярної абсорбції тіонітрофенільного аніона при довжині хвилі 412 нм ($11,4 \text{ см}^2/\text{мкМ}$) [11].

Вивчення кінетичних властивостей глутатіонпероксидази сперматозоїдів проводили в стандартному середовищі інкубації, що модифіковане за концентрацією субстрату – GSH. Уявні кінетичні параметри, які характеризують реакцію, каталізовану глутатіонпероксидазою – уявну константу спорідненості до GSH та максимальну швидкість реакції, визначали в координатах Лайнуївера-Берка $\{1/V \text{ від } 1/S\}$, де S – задана концентрація субстрату, а V – швидкість реакції при заданій концентрації реагенту [12]. Кінетичні та статистичні розрахунки проводили в режимі програмного забезпечення MS Office. Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t -критерію Стюдента.

Результати досліджень

З'ясовано, що підвищення концентрації GSH у середовищі інкубації в діапазоні концентрацій призводить до поступового збільшення ензиматичної активності глутатіонпероксидази

з виходом на плато (рис. 1). Максимальну активність глутатіонпероксидази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків простежено за наявності 5 мМ GSH в інкубаційному середовищі. Подальше зростання GSH у середовищі інкубації не призводить до підвищення активності глутатіонпероксидази.

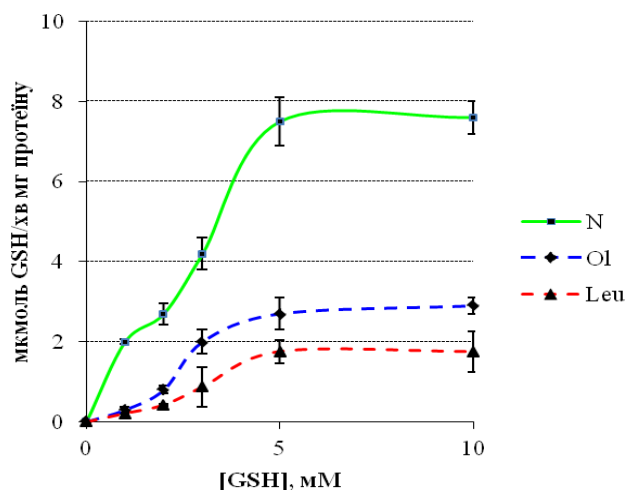


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу GSH на глутатіонпероксидазну активність сапонін-пермеабілізованих сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія, N) та інфертильних (олігозооспермія Ol; лейкоцитоспермія Leu) чоловіків, $M \pm m$, $n = 8-12$.

Дані на рис. 1 свідчать, що у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій GSH глутатіонпероксидазна активність сперматозоїдів пацієнтів з олігозооспермією та лейкоцитоспермією є зниженою, порівняно з її величиною в сперматозоїдах фертильних чоловіків. Концентраційна залежність впливу GSH на активність глутатіонпероксидази сперматозоїдів інфертильних чоловіків з астеною та астенозооспермією має схожий характер. Оптимальна концентрація субстрату для функціонування ензиму становить 5 мМ для нормозоо- та патоспермічних зразків.

Для з'ясування можливого механізму змін ензиматичної активності глутатіонпероксидази сперматозоїдів інфертильних чоловіків криві концентраційних залежностей (зображені на рис. 1) лінеаризовано в координатах Лайнуївера-Берка (рис. 2). Як видно з рис. 2, криві залежностей $\{1/V; 1/[GSH]\}$ відрізняються тангенсом нахилу й перетинають вісь абсцис та ординат у різних точках.

Ця залежність відповідає змішаному типу інгібування глутатіонпероксидази спермато-

зоїдів за умов патоспермії. Подібна концернтраційна залежність і характер лінеаризації характерні для глутатіонпероксидази сперматозоїдів неплідних чоловіків з астено- й анте-нозооспермією. За допомогою лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуївера-

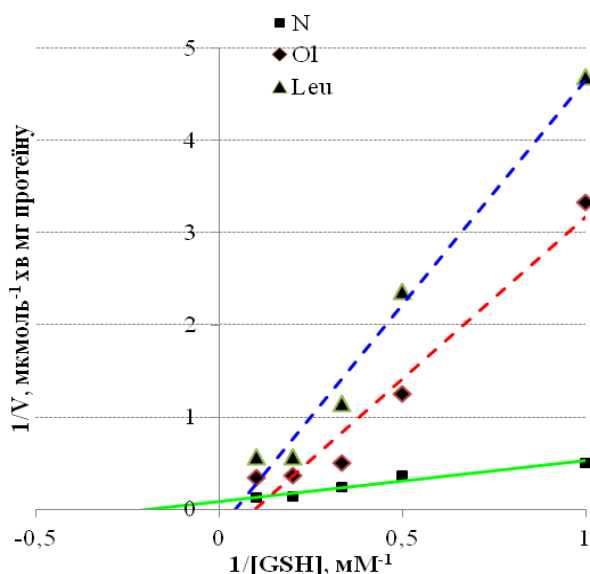


Рис. 2. Лінеаризація концентраційних кривих, зображених на рис. 1 у координатах Лайнуївера-Берка

Берка визначено основні кінетичні параметри глутатіон-пероксидазної реакції в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків (табл. 1). Як випливає з табл. 1, значення початкової максимальної активності глутатіонпероксидази в сперматозоїдах інфертильних чоловіків із різними формами патоспермії у 2,4–4,1 нижче відносно цієї величини у фертильних чоловіків із нормозооспермією. Водночас не простежено статично достовірної різниці у величині початкової максимальної активності ензиму між різними формами патоспермії. Значення

уявної константи афінності (спорідненості) глутатіонпероксидази до GSH у сперматозоїдах інфертильних чоловіків в 1,9–4,9 раза перевищують цей показник у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків, що свідчить про зниження спорідненість ензиму до GSH при патоспермії.

Обговорення результатів

Відомо, що глутатіонпероксидаза каталізує реакції відновлення глутатіоном нестійких органічних гідропероксидів. Цей процес здійснюється за допомогою використання водню відновленого глутатіону, до якого цей ензим проявляє високу спорідненість [13]. З огляду на це, зміни концентрації GSH в інкубаційному середовищі впливають, вірогідно, на швидкість реакції, яка каталізується глутатіонпероксидазою.

Важливою характеристикою глутатіонпероксидази є залежність активності ензиму від концентрації субстрату в середовищі інкубації, яка визначається величиною уявної константи спорідненості (афінності) до субстрату (K_{GSH}). Останню розраховували за допомогою визначення глутатіонпероксидазної активності в середовищі інкубації, яке містило GSH у діапазоні концентрацій від 1 до 10 мМ (за сталої концентрації реактиву Еллмана (0,01 М розчин 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти на метанолі). Отримані величини уявної константи афінності перебувають у субмілімолярному діапазоні концентрацій, що узгоджується з даними інших дослідників [14; 15].

Отримані результати вказують, що за умов патоспермії в сперматозоїдах інфертильних чоловіків пригнічення активності глутатіонпероксидази відбувається за рахунок зменшення числа обертів ензиму (значення початкової максимальної активності знижується), так і за

Таблиця 1

Кінетичні параметри, що характеризують глутатіонпероксидазну реакцію в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків ($M \pm m, n = 8-12$)

Кінетичні параметри	Фертильні чоловіки (нормозооспермія)	Інфертильні чоловіки			
		оліго-зооспермія	астено-зооспермія	олігоастено-зооспермія	лейкоцитоспермія
V_{max} , мкмоль GSH / хв на 1 мГ протеїну	11,9±1,1	2,9±0,8 *	4,2±0,8 *	3,1±0,5 *	4,9±1,2 *
K_{GSH} , мМ	5,3±0,1 ***	10,3±0,8 *	21,6±4,2 *	26,0±3,5 *	23,9±0,1 *

Примітка. V_{max} – початкова максимальна активність ензиму визначена за GSH; K_{GSH} – уявна константа спорідненості до GSH. Зміни вірогідні стосовно величин у сперматозоїдах фертильних чоловіків * $p < 0,001$.

рахунок зниження спорідненості ензиму до субстрату (значення уявної константи афінності (спорідненості) глутатіопероксидази до GSH зростає).

Висновки

Під час інтерпретації отриманих кінетичних параметрів, визначених за GSH, показано, що при патоспермії інгібування активності глутатіонпероксидази відбувається за змішаним типом – як за рахунок зменшення числа обертів ензиму, так і за рахунок зниження спорідненості ензиму до субстрату.

У роботі вміщено результати досліджень НДР «Молекулярно-біологічні регуляторні механізми порушення запліднювальної здатності сперматозоїдів і розробка нових імунобіохімічних методів діагностики фертильності в чоловіків», що проведена за грантом Президента України (розпорядження № 97/2016-рп від 13.04.2016) та фінансується Державним фондом фундаментальних досліджень (договір № Ф63/97-2016 від 10.08.2016).

Література

1. Abdallah, B. F.; Fetoui, H.; Zribi, N.; Fakfakh, F.; AmmarKeskes, L. (2011) Antioxidant supplementations in vitro improve rat sperm parameters and enhance antioxidant enzyme activities against dimethoate-induced sperm damages. *Andrologia*, 44(1), pp 272–279. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01177
2. de Lamirande, E.; O'Flaherty, C. (2008) Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784(1), pp 106–115. DOI:10.1016/j.bbapap.2007.08.024
3. Agarwal, A.; Virk, G.; Ong, Ch.; S du Plessis S. (2014) Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), pp 1–17. doi: 10.5534/wjmh.2014.32.1.1
4. Aitken, R. J.; Baker, M. A. (2013) Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: Relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. *Journal of Reproductive Immunology*, 100(1), pp 11–19. doi: 10.1016/j.jri.2013.06.005
5. Cacciatore, I.; Cornacchia, C.; Pinnen, F.; Mollica, A.; Di Stefano, A. (2010) Prodrug approach for

increasing cellular Glutathione levels. *Molecules*, 15, (3), pp 1242–1264. doi: 10.3390/molecules15031242

6. Лавришин, Ю. Ю.; Вархоляк, І. С.; Мартишук, Т. В.; Гута, З. А.; Іванків, Л. Б.; Паладійчук, О. Р.; Мурська, С. Д.; Гутий, Б. В.; Гуфрій, Д. Ф. (2016) Біологічне значення системи антиоксидантного захисту організму тварин. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького*, 18, 2(66), с. 100–111. doi:10.15421/nvlvet6622

7. Morielli, T.; O'Flaherty, C. (2015) Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. *Reproduction*, 149(1), pp 113–123. doi: 10.1530/REP-14-0240

8. Онуфрович, О. К.; Фафула, Р. В.; Воробець, Д. З. (2013) Стан глутатіонової антиоксидантної системи сперматозоїдів при екскреторно-токсичній формі неплідності чоловіків. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, 2, с. 148–151.

9. Онуфрович, О. К.; Фафула, Р. В.; Наконечний, Й. А.; Воробець, Д. З.; Єфремова, У. П.; Воробець, З. Д. (2016) Активність глутатіонзалежних ензимів сперматозоїдів за умов патоспермії. *Медична та клінічна хімія*; 18(4), с. 5–10. doi:10.11603/mcch.2410-681X.2016. v0.i4. 7246

10. *WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen*, in 5th ed. World Health Organization Geneva; 2010, 271 p.

11. Моин, В. М. (1986) Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное дело*, 12, с. 124–126.

12. Keleti, T. (1986) Basic enzyme kinetics *Academiai Kiado*; Budapest, pp 112–129.

13. Muller, F. L.; Lustgarten, M. S.; Jang, Y.; Richardson, A.; Van Remmen, H. (2007) Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), pp 477–503 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034

14. Freedman, J. E.; Frei, B.; Welch, G. N.; Loscalzo, J. (1995) Glutathione peroxidase potentiates the inhibition of platelet function by S-nitrosothiols. *Journal of Clinical Investigation*; 96(1), pp 394–400. doi: 10.1172/JCI118047

15. Concetta, E. A.; Mantilacci, L.; Mauro, N.; Principato, G. (2000) Association of glutathione peroxidase activity with an acidic glutathione S-transferase in carp liver. *Italian Journal of Zoology*; 67(1), pp 39–43. doi: 10.1080/11250000009356292