

М.П. Антонов<sup>1</sup>, В.В. Жигулина<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИПИДОВ СПЕРМАТОЗОИДОВ И СПЕРМОПЛАЗМЫ НА ФЕРТИЛЬНОСТЬ ЭЯКУЛЯТА

<sup>1</sup> Клиническая лаборатория «Вера», г. Тверь;

<sup>2</sup> кафедра химии и биохимии ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздравсоцразвития России

Исследован методом микротонкослойной хроматографии на силикагеле эякулят фертильных мужчин и мужчин с нарушением фертильности. Обнаружены изменения липидов в половых клетках и в их окружении как у мужчин с патологией, так и при нормозооспермии.

**Ключевые слова:** липиды сперматозоидов и спермоплазмы, хроматография, бесплодие мужчин.

## EFFECT OF BIOCHEMICAL CHANGES OF SPERMATOZOON AND SPERMOPLASMA LIPIDS ON EJACULATE FERTILITY

M.P. Antonov<sup>1</sup>, V.V. Zhigulina<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Clinical laboratory «Vera», Tver

<sup>2</sup> Tver State Medical Academy

Ejaculate of fertile men and of man with fertility disorder was investigated by means of micro-thin-layer chromatography on silicogel. Lipid alterations were detected in sex cells and their surroundings both in the men with pathology and also in normozoospermia.

**Key words:** lipids of spermatozoon and spermoplasma, chromatography, male sterility.

В настоящее время актуальна проблема снижения фертильности мужчин репродуктивного возраста. При этом даже у мужчин с нормозооспермией выявлены определенные нарушения: снижение подвижности сперматозоидов (менее 20%) и их количества, наличие агрегации и агглютинации сперматозоидов, отмечены клетки сперматогенеза в большом количестве [2, 7]. Значимую роль в поддержании подвижности сперматозоидов отводят фосфолипидам (ФЛ) [6], имеющим возможность влиять на половые клетки как непосредственно, так и опосредованно – повышать репродуктивную функцию мужчин. Так, дефицит ФЛ, особенно фосфатидилхолина, может привести к бесплодию.

**Целью работы** явилось раскрыть закономерности изменений липидов эякулята у мужчин с нарушением фертильности в зависимости от характеристики эякулята.

### Материал и методы

Обследовано 68 мужчин в возрасте 21–49 лет, состоящих в бесплодных браках. Контрольную группу составили 10 здоровых мужчин с доказанной фертильностью (в течение года у половых партнеров данных лиц наступала беременность). Материалом для исследования служила сперма мужчин, обратившихся в клиническую лабораторию по поводу бесплодного брака за период 2011–2012 гг. Среди обследованных пациентов, согласно оценке спермограмм, были выделены 3 группы: подвижность сперматозоидов менее 20%, количество сперматозоидов 21–100 млн/мл, количество сперматозоидов более 101 млн/мл. У всех обследуемых лиц сперма была без воспалительных процессов. Проведение стандартного анализа спермограмм и классификацию показателей эякулята

осуществляли согласно требованиям ВОЗ [2, 3]. Для исследования липидного состава эякулят разделяли на сперматозоиды и спермоплазму центрифугированием при 400 об/мин в течение 20 мин. Сперматозоиды отмывали дважды физиологическим раствором при двукратном центрифугировании при 400 об/мин в течение 20 мин. В сперматозоидах и спермоплазме общие липиды разделяли методом микротонкослойной хроматографии на силикагеле [9]. Были идентифицированы фракции липидов: ФЛ, холестерин (Х), свободные жирные кислоты (СЖК), триглицериды (ТГ), эфиры холестерина (ЭХ). Проявление хроматограмм проводили по методу, описанному в работе В.Б. Максименко [5]. Экстракты липидов выделяли методом Фолча [8]. Положение на хроматограмме ФЛ, Х, СЖК, ТГ, ЭХ определили с помощью свидетелей.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программы Statistica версии 6,0.

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлен липидный компонент сперматозоидов и спермоплазмы мужчин контрольной группы. Как видно из данных табл. 1, в половых клетках преобладали ФЛ  $51,6 \pm 12,9\%$  (против  $33,4 \pm 6,0\%$  в спермоплазме), а в их окружении – Х  $49,1 \pm 10,2\%$  (против  $30,0 \pm 4,9\%$  в сперматозоидах). Суммарное содержание ФЛ + Х составляло в сперматозоидах  $79,5 \pm 9,6\%$ , в плазме –  $81,6 \pm 7,2\%$ , остальное – минорные фракции.

Следует отметить, что соотношение ФЛ плазмы к ФЛ сперматозоидов (ФЛ/ФЛ<sub>о</sub>) меньше 1, что, по видимому, связано с увеличением количества ФЛ в сперматозоидах. Вместе с тем в пробе № 3 соотношение ФЛ/ФЛ<sub>о</sub> больше 1, что находит объяснение в

Таблица 1

**Липиды сперматозоидов и спермоплазмы у фертильных мужчин (% $\pm$ S)**

№	Сперматозоиды	Клетки сперматогенеза	% подвижных	Агглютинация/ агрегация	Лейкоциты	Фракции липидов				
						ФЛ	Х	ФЛ + Х	ФЛ/ФЛ <sub>0</sub>	Х/Х <sub>0</sub>
1	42	4	60	Нет	2	25,0 68,6	63,8 27,0	88,8 95,6	0,36	2,36
2	110	1	48	Нет	1	28,4 68,4	63,4 29,0	91,8 97,4	0,41	2,19
3	162	1	70	Нет	1	43,5 39,7	43,7 35,3	87,2 75,0	1,09	1,24
4	120	2–4	50	Нет	1	31,9 35,4	51,4 37,4	83,8 72,8	0,9	1,37
5	200	2–4	60	Нет	1	33,1 36,8	45,1 35,8	78,2 72,6	0,9	1,26
6	108	1	70	Нет	1	39,7 53,2	41,7 28,6	81,4 81,8	0,75	1,46
7	119	1	65	Нет	1	37,5 53,0	41,2 27,1	78,7 80,1	0,71	1,52
8	112	1	65	Нет	1	28,0 45,4	56,5 26,6	84,5 72,0	0,62	2,12
9	94	1	70	Нет	1	60,6 67,4	12,0 8,5	72,6 75,9	0,9	1,41
10	184	1	70	Нет	1	33,7 48,8	35,4 23,4	69,1 71,4	0,7	1,51
	125 ± 46		62,8 ± 8,3			33,4 ± 6,0 51,6 ± 12,9	49,1 ± 10,2 30,0 ± 4,9	81,6 ± 7,2 79,5 ± 9,6	0,73 S = 0,23	1,64 S = 0,41

снижении ФЛ в сперматозоидах (39,7 против 43,5 в спермоплазме).

В табл. 2 отображен липидный состав сперматозоидов и спермоплазмы с подвижностью сперматозоидов менее 20%. Анализ данных табл. 2 показал, что в большинстве случаев наблюдалась агрегация

и/или агглютинация сперматозоидов, были выявлены клетки сперматогенеза в большом количестве.

В пробах № 1 и 8 были обнаружены аномальные соотношения ФЛ и Х в плазме и сперматозоидах: отношение ФЛ/ФЛ<sub>0</sub> больше 1, Х/Х<sub>0</sub> меньше 1. Это, вероятно, связано со снижением уровня ФЛ и возраст-

Таблица 2

**Липиды сперматозоидов и спермоплазмы у мужчин с подвижностью сперматозоидов менее 20% (% $\pm$ S)**

№	Сперматозоиды	Клетки сперматогенеза	% подвижных	Агглютинация/ агрегация	Лейкоциты	Фракции липидов				
						ФЛ	Х	ФЛ + Х	ФЛ/ФЛ <sub>0</sub>	Х/Х <sub>0</sub>
1	68	2–4	20	+ / + +	0–2	34,8 25,5	31,0 38,6	65,8 64,1	1,36	0,80
2	20	10–50	10	Нет / + +	0–1	40,0 57,7	41,8 22,2	81,8 79,9	0,69	1,88
3	74	5–10	10	Нет / + +	0–3	35,3 68,4	49,9 25,4	85,2 93,8	0,52	1,96
4	15	5–10	20	Нет	0–1	30,0 47,7	48,8 39,9	78,8 87,6	0,63	1,22
5	82	2–4	15	+ / + +	1–2	22,1 39,2	53,8 38,8	75,9 78,0	0,56	1,38
6	68	2–4	20	+ / + +	1–2	20,0 46,6	67,7 26,8	87,7 73,4	0,43	2,53
7	48	10–50	20	+ / +	0–1	29,1 56,0	47,8 23,1	76,9 79,1	0,52	2,07
8	48	5–10	20	+ / + + +	0–1	27,2 23,3	35,8 47,0	63,0 70,3	1,17	0,76
	49,7 S = 25,1		15,5 S = 5,8			29,8 S = 6,3 45,5 S = 15,7	46,7 S = 11,3 32,7 S = 9,4	76,9 S = 8,7 78,3 S = 9,4	0,73 S = 0,34	1,57 S = 0,63

Таблица 3

**Липиды сперматозоидов и спермоплазмы у мужчин с количеством сперматозоидов 21–100 млн/мл (% , X ± S)**

№	Сперматозоиды	Клетки сперматогенеза	% подвижных	Агглютинация/ агрегация	Лейкоциты	Фракции липидов				
						ФЛ	X	ФЛ + X	ФЛ/ФЛ <sub>0</sub>	X/X <sub>0</sub>
1	52	2–3	22	Нет/++	0–1	29,6 26,5	61,9 37,5	91,5 64,0	0,48	1,65
2	38	5–10	25	+ / ++	0–1	36,2 39,5	55,3 32,4	91,5 71,9	0,92	1,71
3	42	2–4	60	Нет	2	25,0 68,6	63,8 27,0	88,8 95,6	0,40	2,36
4	60	5–10	25	Нет/++	5	43,2 26,1	23,7 50,4	66,9 76,5	1,65	0,47
5	46	2–4	23	Нет/+	0–1	31,0 25,0	64,8 47,7	95,8 72,7	1,24	1,36
6	62	2–4	25	Нет	0–1	44,4 77,5	50,1 15,4	94,5 92,2	0,57	3,25
7	84	5–10	24	+ / +	0–1	31,5 41,0	43,6 30,6	75,1 71,6	0,72	1,42
8	30	0–1	50	Нет/+	0–1	26,1 28,1	63,5 23,4	89,6 51,5	0,93	2,71
9	68	2–4	20	+ / ++	0–2	34,8 25,5	31,0 38,6	65,8 64,1	1,36	0,80
10	55	2–4	34	+ / ++	0–1	45,1 53,9	48,6 19,4	93,7 73,3	0,84	2,50
11	74	5–10	10	Нет/++	0–3	35,3 68,4	49,9 25,4	85,2 93,8	0,52	1,96
12	48	5–10	35	Нет/+	0–1	40,4 38,2	48,2 48,4	88,6 86,6	1,06	0,99
13	82	2–4	15	+ / ++	1–2	22,1 39,2	53,8 38,8	75,9 78,0	0,56	1,32
14	93	2–4	50	Нет/++	0–1	27,7 32,4	51,8 37,9	79,5 70,3	0,85	1,37
15	68	2–4	20	+ / ++	1–2	20,0 46,6	67,7 26,8	87,7 73,4	0,43	2,53
16	108	5–10	26	+ / ++	0–1	34,3 29,3	62,2 38,9	96,5 68,2	1,17	1,60
17	48	10–50	20	+ / +	0–1	29,1 56,0	47,8 23,1	76,9 79,1	1,52	2,07
18	34	2–4	30	++ / +	1–3	31,2 42,2	45,2 44,2	76,4 86,4	0,74	1,02
19	48	5–10	20	+ / +++	0–1	27,2 23,3	35,8 47,0	63,0 70,3	1,17	0,76
	55,6 S = 15,6		25,0 S = 6,0			32,4 S = 7,1 35,8 S = 10,4	54,9 S = 7,9 34,4 S = 10,6	83,3 S = 10,6 77,1 S = 9,8	0,95 S = 0,41	1,59 S = 0,66

танием X в сперматозоидах. В этих же пробах (№ 1 и 8) количество минорных фракций было больше, чем в сперме с нормальными показателями.

В табл. 3 показаны липиды сперматозоидов и спермоплазмы мужчин с количеством сперматозоидов 21–100 млн/мл. В процессе обсуждения данных табл. 3 были получены следующие результаты: в пробах № 4 и 9 ФЛ плазмы преобладали над X, в пробах № 1, 4, 5, 9, 12, 14, 16, 18, 19 ФЛ сперматозоидов были ниже X, в пробах № 1, 4, 5, 9, 12, 16, 19 ФЛ плазмы были выше, чем ФЛ сперматозоидов, в пробах № 4, 9, 12, 19 X плазмы был ниже, чем X сперматозоидов.

В табл. 4 представлены результаты липидов эякулята у мужчин с количеством сперматозоидов более 101 млн/мл. Из данных табл. 4 видно, что в пробах № 6 и 8 ФЛ сперматозоидов были ниже X. В пробах № 4 и 8 ФЛ плазмы были выше, чем ФЛ сперматозоидов. Анализируя данные табл. 3 и 4, можно предположить нарушение фертильности спермы у мужчин в сравнении со спермой мужчин с нормальными показателями спермограммы.

Анализируя вышеприведенные данные, следует предположить вероятные механизмы выявленных сдвигов. При нарушении фертильности может происходить снижение количества ФЛ в сперматозоидах

Таблица 4

Липиды сперматозоидов и спермоплазмы у мужчин с количеством сперматозоидов более 101 млн/мл (% $\pm$  X) (%, X  $\pm$  S)

№	Сперматозоиды	Клетки сперматогенеза	% подвижных	Агглютинация/ агрегация	Лейкоциты	Фракции липидов				
						ФЛ	X	ФЛ + X	ФЛ/ФЛ <sub>0</sub>	X/X <sub>0</sub>
1	110	0–1	48	Нет	0–1	28,4 68,4	63,4 29,0	91,8 97,4	0,41	2,19
2	140	2–4	32	+ / ++	0–1	32,1 51,8	67,0 43,0	99,1 94,8	0,62	1,59
3	125	0–1	50	Нет / +	0–1	41,0 81,0	56,0 14,4	97,0 95,4	0,51	3,89
4	162	0–1	70	Нет	0–1	43,5 39,7	43,7 35,3	87,2 75,0	1,09	1,24
5	140	2–4	40	+ / + / +	0–1	38,8 49,5	61,0 24,6	99,8 74,1	0,78	2,48
6	126	0–1	42	+ / + / +	0–1	26,8 39,5	54,6 42,9	81,4 82,4	0,91	1,27
7	120	2–4	42	+ / +	0–1	32,7 44,2	42,4 27,5	75,1 71,7	0,74	1,54
8	108	5–10	26	+ / + / +	0–1	34,3 29,3	62,2 38,9	96,3 68,2	0,55	1,60
	129,8 S = 17,9		43,7 S = 13,2			33,5 S = 4,8 50,4 S = 16,8	56,3 S = 9,1 31,9 S = 9,9	31,0 S = 9,0 82,4 S = 11,9	0,70 S = 0,22	1,70 S = 0,46

и возрастание в них X. Наблюдаемые изменения липидов эякулята были обнаружены как у мужчин с патологией, так при нормозооспермии, что, по-видимому, указывает на причину бесплодия у мужчин с нормозооспермией. Данные изменения нарушают капацитацию и, соответственно, акросомальную реакцию и оплодотворение [1]. Установлено, что для капацитации мембрана сперматозоидов должна синтезировать достаточное количество ФЛ, удалять X, а также другие стероиды и белки [1, 10]. Следует отметить роль спермоплазмы в поддержании фертильности эякулята [4, 6, 7].

Таким образом, нарушение фертильности мужчин сопровождается определенными изменениями фракций ФЛ и X как в сперматозоидах, так и в спермоплазме. Можно предположить, что данные нарушения изменяют мембрану сперматозоидов и их функциональную активность, что, по-видимому, является одной из причин мужского бесплодия. Изучение липидов спермы может быть использовано как дополнительный метод диагностики инфертильности мужчин.

### Литература

1. Жабин С.Г., Трещенков Э.А., Артифексов С.Б. и др. Капацитация сперматозоидов (обзор литературы) // Проблемы репродукции. 2005. – Т. 11. – № 2. – С. 32–38.
2. Кужлина М.А. Об исследовании эякулята // Лабораторное дело. – 1976. – № 12. – С. 744–747.

3. Курило Л.Ф., Макарова Н.П. Руководство по проведению исследования и оценке эякулята человека. ВОЗ, пятое издание, 2010: что нового? // Андрология и генитальная хирургия. – 2010. – № 4. С. 10–13.

4. Луцкий Д.Л., Махмудов Р.М., Луцкая А.М. Исследование эякулята и его компонентов в диагностике воспалительных заболеваний мужской репродуктивной системы: ферменты, простасомы (обзор литературы) // Проблемы репродукции. – 2011. – Т. 17. – № 3. – С. 82–84.

5. Максименко В.Б. Количественная тонкослойная хроматография липидов и эфиров холестерина // Лабораторное дело. – 1983. – № 12. – С. 17–19.

6. Тулаганов К.А., Садридинов Х.Н., Ибрагимов У.К. Фертильность мужчин и биохимический состав спермоплазмы // Андрология и генитальная хирургия. – 2009. – № 2. – С. 94.

7. Хышиктуев Б.С., Кошмелев А.А. Особенности изменений фосфолипидного состава семенной жидкости у мужчин с нарушением фертильности // Клинич. лаб. диаг. – 2010. – № 7. – С. 27–30.

8. Folch J., Less M., Sloan G. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – V. 226. – № 5. – P. 497–509.

9. Hohnacki J.L., Smith S.C. Separation of six lipid classes on one thin-layer chromatogram // Journal of Chromatography. – 1974. – V. 90. – № 2. – P. 364–367.

10. Travis A.J., Kopf G.S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa // J. Clin. invest. – 2002. – V. 110. – № 6. – P. 731–736.

Жигулина Вероника Валентиновна (контактное лицо). Адрес: г. Тверь, ул. Фадеева, д. 46, кв. 50. Тел. 8-905-601-11-72. E-mail: jerlan-1991-2006@list.ru.