УДК 616.697-021:612.616:577.15

ОСОБЕННОСТИ ЭСТЕРАЗНОГО СПЕКТРА СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ МУЖЧИН, СТРАДАЮЩИХ ИДИОПАТИЧЕСКИМ МУЖСКИМ БЕСПЛОДИЕМ

Николаев А.А., Ушакова М.В., Николаева Н.Н.

ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru

В ходе выполнения работы определен оптимум pH эстеразы семенной плазмы, который соответствует значению 7,8. Семенная плазма здоровых мужчин содержит очень высокий уровень эстеразной активности. По нашим данным, в тесте расщепления альфа-нафтилацетата она составляет в среднем 1617,5±59,0 ЕД. Анализ действии ингибиторов на эстеразу семенной плазмы показывает, что наибольшую долю в эстеразной активности семенной плазмы составляет карбоксилэстераза. Подтвержден факт гетерогенности карбоксилэстеразы семенной плазмы, минимум по двум субстратам. Впервые установлен факт появления термостабильности карбоксилэстеразы семенной плазмы у мужчин с идиопатическим бесплодием. При сравнительной оценке возможных вариантов определения активности карбоксилэстеразы показано, что лучшие результаты по специфичности и чувствительности определения термостабильного изофермента карбоксилэстеразы семенной плазмы показывает метод латекс агглютинации. В ходе разработки способа прогноза идиопатического мужского бесплодия разработан способ латекс агглютинации термостабильной карбоксилэстеразы на основе моноспецифических антител к этому ферменту. Методом ЛА в семенной плазме мужчин, страдающих идиопатическим бесплодием, термостабильная КЭ (ТКЭ) определена в 46,6% случаев, со средней концентрацией 25,8±0,8 нг/мл. В контрольной группе у фертильных мужчин ТКЭ выявлена в 1,7% случаев со средней концентрацией 5,2±0,5 нг/мл.

Ключевые слова: идиопатическое мужское бесплодие, семенная плазма, карбоксилэстераза, термостабильность, антитела, латекс агглютинация.

FEATURES OF THE ESTERASE OF SEMINAL PLASMA WITH IDIOPATHIC MALE INFERTILITY

Nikolaev A.A., Ushakova M.V., Nikolaeva N.N.

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru

In the course of the work, the optimum pH of esterase of seminal plasma was determined, which corresponds to a value of 7.8. The seminal plasma of healthy men contains a very high level of esterase activity. According to our data, in the alpha naphthylacetate splitting test, it averages 1617.5 ± 59.0 U. Analysis of the effect of inhibitors on spermatic plasma esterase shows that carboxylesterase accounts for the largest share in the esterase activity of seminal plasma. The fact of heterogeneity of carboxyl esterase of seminal plasma was confirmed, at least in two substrates. For the first time, the occurrence of the thermostability of seminal plasma carboxylesterase in men with idiopathic infertility has been established. In a comparative assessment of possible options for determining the activity of carboxylesterase, it was shown that the latex agglutination method shows the best results on the specificity and sensitivity of determining the thermostable isoenzyme of the carboxylesterase of semen plasma. During the development of a method for predicting idiopathic male infertility, a method of latex agglutination of a thermostable carboxylesterase based on monospecific antibodies to this enzyme was developed. The method of LA in seminal plasma of men suffering from idiopathic infertility is thermostable CE (TCE) determined in 46.6% of cases, with an average concentration of 25.8 ± 0.8 mg / ml. In the control group in fertile men, TCE was detected in 1.7% of cases with an average concentration of 5.2 ± 0.5mg / ml.

Keywords: idiopathic male infertility, seminal plasma, carboxylesterase, thermal stability, antibodies, latex agglutination.

Мужское бесплодие играет важную роль в 50% бесплодных браков. По данным ВОЗ [1], тщательное и полное диагностическое обследование позволяет распознавать наиболее важные причины мужского бесплодия. В таблице 1 мы привели наиболее распространенные причины мужского бесплодия по мере их встречаемости. Как видно, более чем в 30%

случаев механизм развития остается нераспознанным и попадает в категорию «мужского идиопатического бесплодия».

Таблица 1

Факторы, вызывающие мужское бесплодие, и их процентное распределение у пациентов [2]

№	Вид патологии	Доля, %
1	Идиопатическое мужское бесплодие	31
2	Варикоцеле	15
3	Гипогонадизм	8,9
4	Урогенитальные инфекции	8
5	Крипторхизм	7,8
6	Гипоспадии	5,9
7	Иммунологические факторы	4,5
8	Обструкция (непроходимость семявыносящих протоков)	1,7
9	Другие нарушения	5,5

Об идиопатическом (необъяснимом, без явно установленной причины) мужском бесплодии говорят в тех случаях, когда с помощью всех существующих современных методов исследования причину бесплодия врачу-специалисту установить не удается. Идиопатическое бесплодие у мужчин (бесплодие без выявленных причин) характеризуется необъяснимым снижением качества спермы (эякулята) и/или клиническим бесплодием без снижения качества спермы [2].

Считается, что на развитие нарушений, которые приводят к ухудшению качества спермы, без изменения спермограммы влияет комбинация внутренних и внешних факторов (образ жизни мужчины, характер питание, факторы окружающей среды) – все эти факторы могут быть ответственны за мужской фактор бесплодия.

Термин «идиопатический» используется, только если проведено комплексное обследование мужчины и при этом не установлены никакие явные причинные факторы снижения качества спермы.

На образование и созревание сперматозоидов влияет образ жизни и профессия, а также факторы окружающей среды. Неблагоприятные внешние факторы способны усиливать патологические изменения мужского полового аппарата в результате прямого токсического воздействия, гормональных нарушений и избытка активных форм кислорода. Анализ спермы является первым шагом для выявления мужского фактора бесплодия.

Цель нашей работы - оценка особенностей эстеразного спектра семенной плазмы мужчин, страдающих идиопатическим бесплодием.

Материалы методы исследования. Предпринятое исследование представляет собой лабораторное изучение белков у фертильных мужчин и мужчин, страдавших бесплодием. В работе использовано 39 образцов семенной плазмы заведомо фертильных мужчин (имеют 1-2 детей) и 332 образца семенной плазмы мужчин, обратившихся в центр планирования семьи (г. Астрахань) с января 2014 по сентябрь 2018 по поводу мужского бесплодия. Все исследованные образцы классифицировались по результатам анализа амбулаторных карт и спермограмм. В результате было сформировано 3 группы исследования:

1. Фертильные. Концентрация сперматозоидов более 20 млн. Доля подвижных более 40%. Доля морфологически нормальных сперматозоидов более 5%. Группа включает 38 образцов и служит контролем.
2. Идиопатическое бесплодие. Концентрация сперматозоидов более 20 млн. Доля подвижных более 40%. Доля морфологически нормальных сперматозоидов более 5%. Группа включает 224 образца спермы мужчин без явной объективной причины бесплодия.
3. Экскреторное бесплодие. Группа включает 218 образцов спермы мужчин с установленным диагнозом и различными нарушениями спермограммы (олигоспермия, тератоспермия, астеноспермия).

После проведения анализа спермограммы образцы спермы центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 20 минут, надосадочная жидкость (семенная плазма) собиралась, маркировалась и хранилась для дальнейшего исследования при -24 °С. Общая эстеразная активность измерялась по гидролизу 1,0 мМ раствора альфа-нафтилацетата на 0,05М трис-глициновом буфере pH=7,8 за 30 мин при 37 °С. Хромогеном служил раствор прочного синего РР. Оптическая плотность измерялась при 500 нм. За единицу активности принимали количество фермента, которое отщепляет 1.0 мкмоль альфа-нафтола в минуту при 37 °С. Известно [3], что активность эстеразы в семенной плазме проявляется в слабощелочной и щелочной области pH. Мы провели определение активности эстеразы при различных pH в препаратах семенной плазмы фертильных мужчин для определения оптимума pH. Во всех случаях использовали трис-солянокислый буфер, pH которого доводили до искомого добавлением соляной кислоты в лабораторном pH-метре HI 2210. Каждое исследование проводили на трех образцах семенной плазмы с определением среднего значения. Данные этого исследования приведены в таблице 2. Как следует из таблицы 2, оптимум pH эстеразы семенной плазмы соответствует значению 7,8.

Результаты исследования и их обсуждение. Во всех последующих определениях эстеразной активности мы использовали трис-солянокислый буфер с pH=7,8, как оптимальный для определения данного фермента.

Далее мы изучали влияние ингибиторов на эстеразу семенной плазмы, так как

эстеразы – большая группа ферментов, катализирующих расщепление сложноэфирных связей.

Таблица 2

Определение оптимума pH эстеразы семенной плазмы

pH	Активность эстеразы в ЕД/мл			Среднее
	1 образец	2 образец	3 образец	
7,4	1375,5	1386,5	1411,0	1391,0±12,0
7,6	1403,5	1366,0	1451,5	1407,0±46,0
7,8	1650,0	1609,0	1357,5	1624,0±24,0
8,0	1451,5	1472,5	1489,0	1471,0±17,0
8,2	1339,0	1395,0	1370,0	1368,0±27,0
8,4	1239,0	1309,0	1269,0	1272,3±42,1
8,6	1198,0	1215,0	1201,0	1204,7±13,2
8,8	1178,0	1191,0	1189,0	1186,0±14,0

Обычно эстеразы разделяют на четыре типа: холинэстеразы – предпочитают заряженные субстраты (эфиры холина и др.); ацетилэстеразы – предпочитают в качестве субстратов алифатические углеводороды, в частности уксусную кислоту; арилэстеразы – предпочитают в качестве субстратов ароматические углеводороды; карбоксилэстеразы – в качестве субстратов предпочитают эфиры алифатических (достаточно «длинных») соединений [4].

Все эти группы ферментов можно идентифицировать по отношению к ингибиторам. Для этого пробу семенной плазмы делили на 6 аликвот, к 5 из них добавляли различные ингибиторы до конечной концентрации, как указано в таблице 3. Анализ действий ингибиторов на эстеразу семенной плазмы показывает, что наибольшую долю в эстеразной активности семенной плазмы составляет карбоксилэстераза. Полностью отсутствует активность арилэстеразы и металлосодержащей алиэстеразы. По данным ингибиторного анализа, доля холинэстеразы в семенной плазме составляет около 10%.

Семенная плазма здоровых мужчин содержит очень высокий уровень эстеразной активности. По нашим данным, в тесте расщепления альфа-нафтилацетата она составляет в среднем 1617,5±59,0 ЕД. Мужчины, страдающие идиопатическим бесплодием, также показали высокую активность эстеразы. Она составляет в среднем 1503,5±76,5 ЕД. Это отличие недостоверно по сравнению с контролем.

На следующей стадии мы исследовали термолабильность эстеразной активности семенной плазмы. Исследование термолабильности проводили путем прогрева аликвот (0,4

мл) семенной плазмы человека в термостатируемой водяной бане от 40 до 80 °С в течение 20 мин. при каждой температуре. Семенная плазма инфертильных мужчин сохраняет 75% своей эстеразной активности при температуре 80 °С, тогда как у здоровых мужчин эта активность снижается втрое при температуре 65 °С, а при 75 °С полностью подавляется. Этот факт обнаружен нами впервые и ранее не описывался.

Образцы семенной плазмы инфертильных мужчин, обладавшие наиболее высокой эстеразной активностью, собирались нами и хранились в замороженном виде до накопления достаточного количества, необходимого для иммунизации лабораторных животных. Далее исследование проводили по определению термоустойчивости карбоксилэстеразы, т.е. в присутствии ингибитора карбоксилэстеразы 0,1М фтористого натрия в составе трис-ацетатного буфера pH=7,8, применявшегося для приготовления субстратной смеси для определения эстеразной активности. Эти эксперименты проводили с образцами спермы из 3 описанных выше групп. Из каждой группы брали по 20 образцов семенной плазмы для определения ферментативной активности. При сравнительном анализе активности КЭ в различных группах показано, что в группе идиопатического бесплодия без нарушений спермограммы достоверно ($P \leq 0{,}001$) выше активность термостабильной карбоксилэстеразы, выдерживающей нагревание до 70 и 80 °С. При сравнении остальных групп между собой достоверных различий не обнаружено ($P \geq 0{,}05$). Этот факт позволяет прогнозировать идиопатическое бесплодие у мужчин с нормальными показателями спермограммы. При использовании субстрата n-нитрофенилацетат в семенной плазме у 38 фертильных мужчин возрастной группы 20–40 лет содержание суммарной эстеразной активности (СЭА) равно 119,8±8,2 ЕД/л, интервал 84,6–156,3 ЕД/л (табл. 3). В исследуемой группе идиопатического бесплодия активность КЭ определяется в интервале 101–216 ЕД/л, среднее количество равно 188,5±6,6 ЕД/л, что на 52% ниже уровня КЭ в группе фертильных мужчин (табл. 3).

Таблица 3

Определение КЭ в семенной плазме кинетическим методом по расщеплению n-нитрофенилацетата

Контингент	Всего	ЕД/л, М ± м	Интервал, ЕД/л	p
Фертильные	36	287,7 ± 5,2	274,0 – 316,0	
Экскреторное бесплодие	115	119 ± 8,2	84,6 – 156,3	≤0,001
Идиопатическое бесплодие	140	188,5±6,6	101,0 – 216,5	≤0,01

В результате энзимоэлектрофореза в семенной плазме 38 фертильных мужчин после инкубации электрофореграмм в смеси реагентов (субстрат нафтол-AS-ацетат, диазореактив прочный синий ББ) отмечается окрашивание фракции КЭ в зоне бета – гамма глобулинов

(титр 1 - 1/2). Это не противоречит литературным данным о количестве нафтол-ацетатспецифической КЭ, равном 2–4 ЕД Боданского [4]. Мы не можем считать КЭ, выявляемую методом энзимоэлектрофореза, полностью идентичной n-нитрофенилацетатспецифической КЭ, поскольку для их идентификации используются разные субстраты и методики. Неидентичность указанных изоформ подтверждается несоответствием количественных параметров в различных группах наблюдений.

Но если мы примем за точку отсчета (за 100%) активность КЭ по расщеплению n-нафтилфацетата семенной плазмы фертильных мужчин, то выявляется другая тенденция (рис. 1).

В норме нафтол-AS-специфичная КЭ составляет по активности чуть более 8% от активности нафтилспецифической КЭ (табл. 3), а при идиопатическом бесплодии это соотношение в среднем составляет 19,5%, а в случае экскреторного бесплодия достигает 25%.

Из графика на рисунке 1 следует увеличение относительной доли нафтол-AS-специфической КЭ при идиопатическом бесплодии. Этот факт подтверждает мнение о гетерогенности [5] КЭ семенной плазмы, минимум по двум субстратам, но не представляет диагностического интереса, т.к. не позволяет выявить существенные различия.

Субстратная специфичность КЭ семенной плазмы

Ранее [6] показано существование термостабильной изоформы КЭ семенной плазмы самцов крыс, которая была выделена и очищена сочетанием методов преципитации и хроматографии, и к ней были получены поликлональные антитела. По аналогичной схеме нами выделен термостабильный изофермент КЭ семенной плазмы мужчин. На основе выделенной термостабильной изоформы КЭ и антител к ней разработан латекс-агглютинационный тест.

Особенностью латекс-агглютинационного теста на КЭ является выявление эстеразной активности, связанной антителами, фиксированными на твердой фазе. В работе использовали антитела к термостабильной КЭ, полученные из моноспецифических кроличьих антисывороток к этому белку.

Антитела выделяли на аффинном сорбенте, полученном на основе цианбромированной сефарозы CL-4B и чистого препарата термостабильной КЭ (ТКЭ), полученной в первый год работы. При постановке метода в качестве твердой фазы использовали полимерные микросферы (ПМС), предварительно активированные 2% глютаровым альдегидом. 10,0 мкг антител к ТКЭ растворяли в 2,0 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 6,8, который содержал 12,5 г/л глутаральдегида. Сенсибилизированные ПМС центрифугировали и сохраняли при 4 °С. Далее взвесь полимерных сфер промывали. К 1 г осевшей взвеси добавляли 1 мл 2М раствора 1,6-диаминогексана и перемешивали смесь в течение 2 ч при температуре 50 °С. Концентрация адсорбированного на полимерной поверхности иммуноглобулина составляла 25,5-32,8 мкг/см^3, что почти в 7 раз выше, чем при физической сорбции.

При подборе оптимальной концентрации посадочных антител использовали концентрации 5,0, 15,0, 25,0, 30,0, 40,0 мкг/мл. Концентрация антител существенно влияла наклон и рабочий диапазон калибровочной кривой при анализе на ТКЭ.

Активированные частицы ПМС промывали путем трехкратного центрифугирования, используя забуференный физиологический раствор pH=7,2, содержащий 0,5% Твин-20.

Предел чувствительности латексагглютинационного анализа на термостабильную КЭ в данном варианте метода составил 0,80 нг/мл. В отличие от ИФА наш тест втрое дешевле, не требует дополнительного оборудования и по затратам времени в 8-10 раз быстрее ИФА.

Методом ЛА в семенной плазме мужчин, страдающих идиопатическим бесплодием, термостабильная КЭ (ТКЭ) определена в 46,6% случаев со средней концентрацией 25,8±0,8 нг/мл. В контрольной группе у фертильных мужчин ТКЭ выявлена в 1,7% случаев со средней концентрацией 5,2±0,5 нг/мл.

В литературе мы не встретили аналогичных исследований изоферментов термостабильной карбоксилэстеразы в семенной плазме мужчин и считаем, что полученные результаты имеют не только научную новизну, но и практическое значение для диагностики и оценки патогенетических механизмов мужского бесплодия.

Заключение. Таким образом, в ходе выполнения работы установлены следующие характеристики эстеразы семенной плазмы мужчин: установлен средний уровень ее активности 1624,0±24,0 ЕД/мл, установлен оптимум pH, который равен 7,8. С помощью

ингибиторного анализа выяснено, что около 90% активности эстеразы семенной плазмы мужчин приходится на группу карбоксилэстераз, а 10% на холинэстеразы. При анализе температурной устойчивости образцов семенной плазмы здоровых, фертильных мужчин и мужчин с идиопатическим бесплодием впервые установлен факт появления термостабильности карбоксилэстеразы семенной плазмы у мужчин с идиопатическим бесплодием. Как известно [7], изменение температурной устойчивости белков без потери их функциональных характеристик является признаком локальных изменений третичной структуры белковой молекулы. В случае бесплодия это могут быть неизвестные продукты метаболизма, не свойственные репродуктивной системе в норме. По этой причине исследование термостабильной карбоксилэстеразы является перспективным тестом прогноза идиопатического мужского бесплодия.

Список литературы

1. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. World Health Organization. 2010. 272 p.
2. Епанчинцева Е.А., Селятицкая В.Г., Артюхова Е.М., Лебедева Е.А., Галустян Е.Ю., Кирс А.А. Частота нарушений сперматогенеза у мужчин из бесплодных пар // Репродуктивные технологии сегодня и завтра: материалы XXVI международной конференции российской ассоциации репродукции человека (Москва, 7-10 сентября 2016 г.). М., 2016. С. 39-43.
3. Николаев А.А., Луцкий Д.Л., Бочановский В.А., Ложкина Л.В. Активность ферментов спермоплазмы в эякулятах различной фертильности // Урология и нефрология. 1997. № 5. С. 35-39.
4. Chhabra M., Ferro V. The Development of Assays for Enzymatic Activity: Towards a Gold Standard. Molecules. 2018. Vol. 14. no 23. P. 1-11.
5. Бойко О.В.? Терентьев А.А., Николаев А.А. Методические аспекты использования солянокислых спермина и спермидина для идентификации уропатогенной микрофлоры // Проблемы репродукции. 2010. Т. 16. № 3. С. 77-79.
6. Bucci D., Giaretta E., Rizzato G. Characterization of alkaline phosphatase activity in seminal plasma and in fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. Theriogenology. 2016. Vol. 85. no 2. P. 288-295.
7. Sturtevant J.M. Calorimetric studies of biopolymers. Protein Sci. 2006. Vol. 5. no 2. P. 391-404.