

Влияние регуляторных пептидов на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*

В.В. Евдокимов¹, С.В. Захариков¹, Л.А. Андреева², Н.Ф. Мясоедов², В.Б. Туровецкий³

¹НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России,

²ФГБУ институт молекулярной генетики РАН,

³МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет биологии

Сведения об авторах:

Евдокимов В.В. – доктор мед. наук, главный научный сотрудник НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Evdokimov V.V. - MD, PhD, chief researcher at N. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology & Interventional Radiology –branch of the federal state budgetary institution "National Medical Research Radiological Center" of the Ministry of health care of Russia.

Захариков С.В. – научный сотрудник НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Zakharikov S.V. - researcher at N. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology & Interventional Radiology –branch of the federal state budgetary institution "National Medical Research Radiological Center" of the Ministry of health care of Russia.

Андреева Л.А. – кандидат биологических наук, ученый секретарь института молекулярной генетики РАН, Andreeva L.A. - PhD, Scientific Secretary of the Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences

Мясоедов Н.Ф. – академик РАН, руководитель отдела химии физиологически активных веществ института молекулярной генетики РАН

Mysaev N.F. - Academician of Russian Academy of Sciences, head of the chemistry department of the physiologically active substances of the Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences

Туровецкий В.Б. – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник МГУ имени М.В. Ломоносова, кафедра биофизики биологического факультета

Turovetsky V.B. - PhD, senior researcher of Moscow State University named after MV Lomonosov Moscow State University, Department of Biophysics, Faculty of Biology

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что в последние десятилетия снижается уровень мужской фертильности, что в значительной степени определяет число бесплодных браков в разных странах мира. Демографическая ситуация в нашей стране в настоящее время характеризуется снижением рождаемости, ведущей причиной которого является мужской фактор. По данным ВОЗ уровень мужской фертильности снижается, что создает проблему медико-социальной направленности [1]. Одной из актуальных задач современной андрологии является поиск агентов, способных повышать подвижность сперматозоидов, а также увеличивать их устойчивость к действию повреждающих факторов различной природы. Значительный практический интерес в этом плане представляют регуляторные олигопептиды, некоторые из них обладают способностью повышать выживаемость отдельных типов клеток при неблагоприятных воздействиях [2-6]. Важным аспектом этих исследований является отбор из большого числа как уже существующих, так и вновь синтезируемых пептидов, тех, которые обладают максимально выраженным эффектом в отношении данного типа клеток.

В связи с вышеизложенным нами было изучено влияние ряда регуляторных олигопептидов на подвижность сперматозоидов человека *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на сперматозоидах человека из эякулята, полученного общепринятым способом. После разжижения через 40-60 мин эякулят микроскопировали в проходящем свете при увеличении $\times 400$ на микроскопе Amplival. Оценку подвижности сперматозоидов и другие параметры эякулята осуществляли по стандарту ВОЗ 4-го издания [1].

Подвижность сперматозоидов (общая и активная) рассчитывалась как содержание в эякуляте подвижных клеток на 100 проанализированных. Эксперименты были проведены на эякулятах от 10 пациентов. Эксперименты проводили при температуре 20–22°C. Из полученного образца эякулята отбирали по 1 мл для опыта и контроля. В опытную пробирку вносили тот или иной пептид в соответствующей концентрации, что отражено в таблицах 1-3. Пептиды синтезированы в отделе химии физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Инсти-

тута молекулярной генетики Российской академии наук (руководитель – академик РАН Н.Ф. Мясоедов).

Полученные результаты представлены в виде средних арифметических значений исследованных параметров и их среднеквадратических ошибок. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. Различия между средними арифметическими значениями параметров считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные, полученные при изучении влияния *гептапептида семакса* на подвижность (активную и общую) сперматозоидов человека представлены в таблице 1. Очевидно, что действие этого гептапептида приводит к существенному (в 3-5 раз) возрастанию активной подвижности сперматозоидов по сравнению с исходным уровнем уже через 1 час инкубации. Этот эффект пептида оказывается существенно менее выраженным в случае рассмотрения общей подвижности сперматозоидов. Выраженность стимулирующего действия гептапептида на оба типа подвижности не меняется при возрастании времени инкубации от 1-го до 3-х часов. Однако подвижность

сперматозоидов несколько возрастает при увеличении концентрации пептида от 10 до 1000 мкг/мл.

Пептид селанк практически не оказывал существенного влияния на подвижность сперматозоидов, за исключением небольшого повышения их активной подвижности при 3-х часовой инкубации эякулята с пептидом в концентрации 1000 мкг/мл (табл. 2).

Влияние на подвижность сперматозоидов группы **синтезированных пептидов** – Pro-Gly-Pro, Arg-Pro-Gly-Pro, Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro, Phe-Gly-Gly-Phe-Val-Gly-Pro – изучалось при их концентрации во всех случаях 1000 мкг/мл (табл. 3). Как видно из данных, приведенных в таблице, инкубация сперматозоидов с исследованными пептидами в течение одного и трех часов не приводила к суще-

ственному возрастанию их подвижности, которая приближалась к уровню контроля. Достоверный эффект стимуляции подвижности наблюдался лишь при 30-ти минутной инкубации клеток с пептидами Pro-Gly-Pro, Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro и Phe-Gly-Gly-Phe-Val-Gly-Pro. При этом, как и в случае с семаксом, возрастание активной подвижности сперматозоидов было более выражено, чем общей. В случае тетрапептида Arg-Pro-Gly-Pro возрастания подвижности сперматозоидов не наблюдалось.

Таким образом, представленные в нашей работе данные показали, что действие ряда регуляторных пептидов приводит к возрастанию относительного содержания в популяции сперматозоидов клеток с высокой скоростью движения. При анализе полученных

данных следует отметить, что, как было ранее показано Э.Р. Сафаровой и соавт. для культивируемых клеток феохромоцитомы крысы PC12, пептид семакс способен не только предотвращать повреждение клеток, но и активировать процессы, ведущие к восстановлению ранее поврежденных клеток [7]. В этой связи, полученные нами результаты позволяют предположить, что действие некоторых пептидов вызывает восстановление нарушенной по каким-то причинам подвижности сперматозоидов. К сожалению, вопрос о механизмах защитного и восстанавливающего действия пептидов на клетки еще не решен, однако, в литературе имеются указания на то, что эти свойства пептидов (в частности семакса и pro-gly-pro) в определенной степени связаны с их влиянием на кальциевый гомеостаз и функциональное состояние митохондрий [8]. Кроме того, как известно, подвижность сперматозоидов обеспечивается за счет энергии гликолиза, одним из ферментов которого является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа – ГАФДс, прочно связанная в сперматозоиде с фиброзным слоем жгутика [9-11]. По мнению авторов, подвижность сперматозоидов в существенной степени зависит от активности этого фермента, который весьма чувствителен к повреждающему действию активных форм кислорода (АФК). Это позволяет предположить, что возрастания подвижности сперматозоидов можно добиться с помощью ряда агентов (в том числе, возможно, и некоторых регуляторных пептидов), снижающих повышенную продукцию АФК, которая отмечается при ряде заболеваний, в том числе и органов уrogenитальной системы.

Таким образом, проведенные исследования выявили способность некоторых регуляторных олигопептидов стимулировать подвижность сперматозоидов человека. Хотя механизм наблюдаемого эффекта остается пока неясным, полученные данные показывают перспективность использования пептидов в андрологической и репродуктивной практике, в клиниках вспомогательных репродуктивных технологий. ■

Таблица 1. Влияние гептапептида семакса на подвижность сперматозоидов

Показатель	Исходные данные	Время инкубации				Контроль (3 часа)
		1 час		3 часа		
Концентрация пептида, мкг/мл	0	10	1000	10	1000	0
Активная подвижность, %	12,5±1,2	53,0±10,1*	63,2±10,0*	51,1±10,5*	64,4±9,7*	24,4±4,9*
Общая подвижность, %	39,1±1,9	68,7±7,1*	75,9±6,7*	64,9±8,0*	77,4±6,4*	42,8±4,0

* различия величин подвижности по сравнению с исходным уровнем достоверны

Таблица 2. Влияние пептида селанка на подвижность сперматозоидов

Показатель	Исходные данные	Время инкубации				Контроль (3 часа)
		1 час		3 часа		
Концентрация пептида, мкг/мл	0	10	1000	10	1000	0
Активная подвижность, %	16,6±2,6	20,4±3,1	21,6±3,8 130%	17,2±2,4	23,8±4,5*	15,6±1,8
Общая подвижность, %	42,3±3,4	44,7±4,3	49,3±4,8	40,7±5,1	49,4±5,2	40,8±3,7

* различия величин подвижности по сравнению с исходным уровнем достоверны

Таблица 3. Влияние регуляторных пептидов на подвижность сперматозоидов

Показатель	Исходные данные	Время инкубации			Контроль (3 часа)
		30 мин	1 час	3 часа	
Pro-Gly-Pro					
Активная подвижность, %	20,5±3,6	35,3±10,3*	24,7±2,7	26,0±3,4	21,6±2,9
Общая подвижность, %	41,2±4,1	54,1±7,7*	46,5±2,2	49,2±3,2	43,0±2,7
Arg-Pro-Gly-Pro					
Активная подвижность, %	20,6±5,1	21,2±4,7	20,6±5,1	23,5±6,0	21,3±4,3
Общая подвижность, %	42,3±5,6	43,5±4,8	22,0±3,5	39,8±6,6	42,6±3,3
Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro					
Активная подвижность, %	21,1±5,2	60,6±9,8*	22,2±3,6	22,2±4,8	21,3±4,3
Общая подвижность, %	43,3±5,4	79,6±10,3*	44,6±4,2	41,3±5,3	41,5±3,1
Phe-Gly-Gly-Phe-Val-Gly-Pro					
Активная подвижность, %	18,3±2,2	38,2±13,9*	21,2±3,8	18,0±3,7	16,6±2,5
Общая подвижность, %	40,6±3,8	53,7±11,1	40,2±5,3	36,5±4,9	35,7±4,0

* различия величин подвижности по сравнению с исходным уровнем достоверны

Резюме:

Актуальной задачей современной андрологии и репродукции человека является поиск агентов, способных повышать подвижность сперматозоидов, а также увеличивать их устойчивость к действию повреждающих факторов различной природы. Важной проблемой андрологии и репродукции человека остается сохранение параметров фертильности, в частности, подвижности и жизнеспособности сперматозоидов.

Целью предпринятой работы явилось проведение изучения некоторых регуляторных олигопептидов, влияющих на подвижность сперматозоидов человека (семакс, селанк, pro-gly-pro, arg-pro-gly-pro, arg-glu-arg-pro-gly-pro, phe-gly-gly-phe-val-gly-pro). Материалом для опытов служил эякулят мужчин с патоспермией в форме астенозооспермии. Опыты с пептидами проводили при комнатной температуре. Концентрация регуляторных пептидов во всех примерах составляла 1000 мкг/мл эякулята. В случае пептида семакса использовали 2 концентрации: 10 и 1000 мкг/мл эякулята. Действие пептида семакса через 1 час инкубации приводило к существенному повышению активной подвижности (в 3-5 раз) и в меньшей степени – общей подвижности. Повышающий эффект зависел от концентрации пептида. Влияние пептида селанка было выражено менее значительно, не более 30 – 43%. Воздействие других исследуемых пептидов на подвижность сперматозоидов приводило к кратковременному эффекту: повышение подвижности сперматозоидов наблюдали в течение первых 30 минут. Через 1 и 3 часа инкубации подвижность сперматозоидов приближалась к контрольному уровню.

Механизм подобного действия остается неясным, однако, полученные результаты показывают перспективность использования пептидов в андрологической и репродуктивной практике.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Summary:**Influence of regulatory peptides on the mobility of human sperm cells in vitro**

Number of infertile marriages has increased in the world in the last decades, largely associated with a male factor due to a decline in parameters of fertility of the ejaculate, mostly in the form of asthenoteratozoospermia.

Actual problem of modern andrology and human reproduction is the search for agents that can increase sperm motility and to increase their stability to action of damaging factors of different nature. An important problem for andrology and human reproduction remains the preservation of fertility parameters, particularly motility and viability of sperm.

The aim of the undertaken study was to evaluate the influence of some regulatory oligopeptides on human sperm motility.

Material for the study was the ejaculate of men with pathospermia in the form of asthenozoospermia. Experiments with peptides were performed at room temperature. The concentration of regulatory peptides in all the examples was 1000 µg/ml of the ejaculate. In the application of semax peptide we have used 2 concentrations: 10 and 1000 µg per ml of the ejaculate. The semax peptide after 1 hour of incubation led to a significant increase in active sperm motility (3-5 times) and to lesser extent in overall motility. This effect was dose-dependent. The effect of peptide drug selank was less pronounced, no more than increase up to 30 - 43%. The effects of the other investigated peptides on sperm motility were graded as short-term: increase in sperm motility observed during the first 30 minutes. After 1 and 3 hours of incubation sperm motility was close to the control level.

The mechanism of the action remains unclear, however, the results show the promise of using the peptides in andrology and reproductive practices, in the clinics utilizing assisted reproductive technologies.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

Ключевые слова: сперматозоиды, подвижность сперматозоидов, пептиды.

Key words: sperm, sperm motility, peptides.

ЛИТЕРАТУРА

1. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. 4-е изд. М., 2001, 143.
2. Гривенников И.А., Долотов О.В., Гольдина Ю.И. Факторы пептидной природы в процессах пролиферации, дифференцировки и поддержания жизнеспособности клеток нервной системы млекопитающих. *Молекулярная биология* 1999;33(1):120-126.
3. Одгаева А.В., Исаев Н.К., Туровецкий В.Б., Каменский А.А. Нейропротекторное действие гептапептида семакс при H2O2-индуцированном повреждении клеток в культурах гиппокампа и септума крыс линии Вистар. Материалы Всерос. конф. «Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга». Москва, 2007. С. 458 – 462.
4. Одгаева А.В., Туровецкий В.Б., Каменский А.А. Влияние тафцина на выживаемость перитонеальных макрофагов мышей при окислительном стрессе. Сб. тезисов докладов XX съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова, Москва, 2007. С. 360.
5. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Одгаева А.В., Каменский А.А. Влияние пептида семакса на индуцированное UF-излучением повреждение плазматических мембран перитонеальных макрофагов мышей. *Вестник МГУ* 2007; серия 16, биология(3):3-5.
6. Евдокимов В.В., Туровецкий В.Б., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние регуляторных пептидов на сперматозоиды человека. Матер. Первого национального форума «Репродуктивное здоровье как фактор демографической стабилизации», Ростов-на Дону, 2012, с. 158 – 159.
7. Сафарова Э.Р., Шрам С.И., Золотарев Ю.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние пептида семакса на выживаемость культивируемых клеток феохромоцитомы крысы при окислительном стрессе. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2003;135(3):309-313.
8. Сторожевых Т.П., Тухбатова Г.Р., Сенилова Я.Е., Пинелис В.Г., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние семакса и его фрагмента pro-gly-pro на кальциевый гомеостаз нейронов и их выживаемость в условиях глутаматной токсичности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2007;143(5):538-541.
9. Элькина Ю.Л., Атрошенко М.М., Брагина Е.Е., Муронец В.И., Шмальгаузен Е.В. Окисление глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы приводит к снижению подвижности сперматозоидов. *Биохимия* 2011;76(2):326-332.
10. Шущкая Ю.Ю., Элькина Ю.Л., Куравский М.Л., Брагина Е.Е., Шмальгаузен Е.В. Исследование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека. *Биохимия* 2008;73(2):228-236.
11. Kuravsky M.L., Aleshin V.V., Frishman D., Muronetz V.I. Testis-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase oridin and evolution. *BMC Evol Biol* 2011;11:160. 15 p. doi: 10.1186/1471-2148-11-160.

REFERENCES (1-10)

1. Rukovodstvo VOZ po laboratornomu issledovaniyu eyakulyata cheloveka i vzaimodeystviya spermatozoidov s tservikalnoy slizyu. [WHO guidelines for laboratory investigation of human jaculate and sperm interaction with cervical mucus. 4th ed.] M., 2001, 143 p. (In Russian)
2. Grivennikov I.A., Dolotov O.V., Goldina Yu.I. Faktory peptidnoy prirody v protsessah proliferatsii, differentsirovki i podderzhaniya zhiznesposobnosti kletok nervnoy sistemyi mlekopitayuschih. [Factors peptide in proliferation, differentiation and maintenance of viability of the mammalian nervous system cells]. *Molekulyarnaya biologiya* 1999;33(1): 120-126. (In Russian)
3. Odgaeva A.V., Isaev N.K., Turovetskiy V.B., Kamenskiy A.A. Neyroprotektornoe deystvie heptapeptida semaks pri N2O2-indutsirovannom porezhdenii kletok v kulturah gippokampa i septuma krysis linii Vistar. [Neuroprotective effect of heptapeptide semaks with H2O2-induced damage to cells in the cultures of the hippocampus and septum Wistar rats]. Materialy Vseros. konf. «Strukturno-funktsionalnyie, neyrohimicheskie i immunohimicheskie zakonomernosti asimetrii i plastichnosti mozga». Moskva, 2007. S. 458 – 462. (In Russian)
4. Odgaeva A.V., Turovetskiy V.B., Kamenskiy A.A. Vliyaniye taftsina na vyzhivaemost peritonealnykh makrofagov myshishey pri oksiditelnom strese. [Tuftsins Impact survival of mice peritoneal macrophages under oxidative stress]. Sb. tezisov dokladov XX s'ezda Fiziologicheskogo obshchestva im. I.P.Pavlova, Moskva, 2007. p. 360. (In Russian)
5. Pirutin S.K., Turovetskiy V.B., Odgaeva A.V., Kamenskiy A.A. Vliyaniye peptida semaksa na indutsirovannoe UF-izlucheniem povrezhdenie plazmaticheskikh membran peritonealnykh makrofagov myshishey. [The effect of peptide Semax on UV-induced damage to the plasma membranes of mouse peritoneal macrophages]. *Vestnik MGU* 2007; seriya 16, biologiya (3):3-5. (In Russian)
6. Evdokimov V.V., Turovetskiy V.B., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. Vliyaniye regulatorynykh peptidov na spermatozoidy cheloveka. [Influence of regulatory peptides on human sperm]. Mater. Pervogo natsionalnogo foruma «Reproduktivnoe zdorovie kak faktor demograficheskoy stabilizatsii», Rostov-na Donu, 2012. p. 158 – 159. (In Russian)
7. Safarova E.R., Shram S.I., Zolotarev Yu.A., Myasoedov N.F. Vliyaniye peptida semaksa na vyzhivaemost kultiviruyemykh kletok feohromotsitomyi kryisy pri oksiditelnom strese. [The effect of peptide Semax on the survival of cultured cells of rat pheochromocytoma under oxidative stress]. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* 2003;135(3): 309-313. (In Russian)
8. Storozhevykh T.P., Tuxhatova G.R., Senilova Ya.E., Pinelis V.G., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. Vliyaniye semaksa i ego fragmenta pro-gly-pro na kaltsievyy gomeostaz neyronov i ih vyzhivaemost v usloviyakh glutamatnoy toksichnosti. [Effect semax and fragment thereof pro-gly-pro on the neuronal calcium homeostasis and survival under glutamate toxicity]. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* 2007;143(5):538-541. (In Russian)
9. Elkina Yu.L., Atroschenko M.M., Bragina E.E., Muronetz V.I., Shmalgauzen E.V. Okislenie glitseraldegid-3- fosfatdegidrogenazy privodit k snizheniyu podvizhnosti spermatozoidov. [Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase leads to a decrease in motility of spermatozoa]. *Biohimiya* 2011;76(2):326-332. (In Russian)
10. Shutskeya Yu.Yu., Elkina Yu.L., Kuravskiy M.L., Bragina E.E., Shmalgauzen E.V. Issledovanie glitseraldegid-3- fosfatdegidrogenazy iz spermatozoidov cheloveka. [Study glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human spermatozoa]. *Biohimiya* 2008;73(2):228-236. (In Russian)