

УЧАСТИЕ ПОЛИАМИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК

М.В. Плосконос

д.б.н., профессор,
кафедра химии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Астрахань)
E-mail: ploskonoz@mail.ru

А. Хиляль

аспирант,
кафедра биохимии им. академика Березова Т.Т., ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (Москва)
E-mail: D.helal.sy.77@gmail.com

Актуальность. Высокое содержание в семенной плазме мужчин представителей класса полиаминов (ПА) – спермина (Sp) и спермидина (Spd), по сравнению с другими биологическими жидкостями организма человека, а также изменения в концентрации ПА при различных нарушениях фертильности говорят о чрезвычайной важности этих биологически активных веществ для мужской репродуктивной системы. Вместе с тем функции Sp и Spd в эякуляте малоизучены. С этих позиций изучение способности ПА принимать участие в регуляции жизнеспособности половых клеток представляется весьма актуальным вопросом.

Цель работы. Сравнить содержание ПА в семенной плазме мужчин разной фертильности и определить связь между уровнем ПА в исследуемых эякулятах и апоптозом у гамет.

Материал и методы. Исследованы эякуляты 34 фертильных мужчин и 40 бесплодных. Определение ПА проводили методом электрофоретического фракционирования в агаровом геле. Апоптоз определяли по экстернализации фосфатидилсерина (ФС) на внешнюю сторону мембраны сперматозоидов.

Результаты. Выявлено изменение концентрации ПА в семенной плазме и соотношения между Sp и Spd с преобладанием первого, а также наличие большего числа апоптотических сперматозоидов в эякулятах бесплодных мужчин по сравнению с фертильными донорами. Обнаружена связь между экстернализацией ФС у гамет и концентрацией Sp в спермоплазме ($r=0,5$; $p<0,01$). На модели апоптоза лимфоцитов периферической крови 30 доноров показано, что физиологические концентрации Sp и Spd снижают апоптоз клеток, а большие дозы активируют апоптоз. Более выраженным стимулирующим действием при этом обладает Sp. Реализация таких эффектов наблюдается после 24-часовой инкубации клеток с ПА.

Выводы. Изменение концентрации полиаминов в семенной жидкости мужчин является одним из факторов регуляции апоптоза половых клеток

Ключевые слова: полиамины, семенная плазма, сперматозоиды, лимфоциты, апоптоз, фертильность.

Для цитирования: Плосконос М.В., Хиляль А. Участие полиаминов в регуляции жизнеспособности клеток. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020; 23(7):40–44. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-07-07>

К представителям класса полиаминов (ПА) относятся, например, спермин (Sp) и спермидин (Spd), которые обнаруживаются во всех биологических жидкостях организма [1]. Это низкомолекулярные алифатические амины, имеющие углеродные цепи различной длины с двумя первичными NH_2 -группами:

$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ Спермин

$\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ Спермидин

Полиамины чрезвычайно важны для репродуктивной функции человека, особенно мужской, о чём говорит тот факт, что их содержание в эяку-

лятах значительно превышает таковое в других биожидкостях организма человека: так, содержание Sp и Spd в эякуляте варьирует от 138 до 2175 нмоль/мл, а например, концентрация ПА в крови – не более 1 нмоль/мл [2].

Полиамины уrogenитального тракта вырабатываются предстательной железой. Их функции в эякуляте малоизучены, известно, например, что Sp и Spd способны защищать половой тракт мужчин от инфекционных агентов, стабилизировать структуру ДНК мужских гамет, активизировать их подвижность и предотвращать преждевременную капацитацию и акросомальную реакцию. Одним из примечательных свойств этих органических поликатионов является способность участвовать в

регуляции целостности мембран половых клеток мужчин во время оплодотворения [2–4].

При различных формах нарушения фертильности у мужчин выявлены изменения в концентрации ПА в семенной жидкости. Избыточный синтез ПА может быть токсичен для клеток, однако недостаток Sp и Spd также способен влиять на жизнеспособность гамет. Таким образом ПА в семенной плазме могут принимать участие в регуляции жизнеспособности половых клеток [5, 6].

Адекватность оценки ПА, как регуляторов жизнеспособности клеток, представлялось возможным проверить, используя в качестве экспериментальной клеточной модели лимфоциты периферической крови человека, так как они устойчивы к апоптозу при культивации в течение суток и активируют его только при внесении в культуру клеток индукторов апоптоза [7, 8].

Цель исследования – определение связи между уровнем ПА в сперме мужчин разной фертильности и апоптозом у гамет, для доказательства которой проводилась оценка влияния *in vitro* различных концентраций ПА на клетки крови человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследована сперма здоровых фертильных мужчин ($n=34$) и бесплодных пациентов ($n=40$), давших согласие на проведение исследований. Возраст всех мужчин составил от 22 до 40 лет. Оценка показателей стандартной спермограммы проводили по нормативам ВОЗ [9].

Эякуляты центрифугировали 15 мин (12000 об/мин) [10]. Полиамины экстрагировали *n*-бутанолом из полученной семенной плазмы, с последующим их разделением на Sp и Spd методом электрофореза в агаровом геле (Патент на изобретение RUS № 2225981 от 28.02.2002). Выявляли ПА в виде розовато-фиолетовых пятен после окраски нингидрином. Фракции Sp и Spd идентифицировали при помощи стандартных препаратов («Fluka», Швейцария).

После сканирования электрофореграмм на ПЭВМ определяли количество ПА в спермоплазме каждого мужчины с помощью компьютерной программы «ПН 5108» (Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RUS 2003612170 от 21.07.2003). Концентрации Sp и Spd рассчитывали по калибровочным графикам.

Лимфоциты выделяли из гепаринизированной периферической крови здоровых людей ($n=30$), используя фиколл–верографин (плотность 1,077), и ресуспендировали в питательной среде: среда RPMI 1640 («Flow», Великобритания), 10%-ная сыворотка эмбрионов телят («Sigma», США), 2 мМ L-глутамин («Flow»), 20 мМ HEPES («Sigma») и 80 мкг/мл гентамицина («Фармахим», Болгария). Использовали клетки с жизнеспособностью не менее 90%.

Влияние ПА на лимфоциты крови определяли после 24-часовой инкубации клеток в течение суток при 37 °С в атмосфере 5%-ного CO₂ с 10⁻⁶, 10⁻⁵ и 10⁻³ моль/л солянокислых производных Sp и Spd («Fluka», Швейцария) (опыт). Полученные результаты сравнивали с уровнем апоптоза в контроле (без добавлений ПА) [8].

Апоптоз клеток оценивали с помощью меченого флуоресцеином Аннексина V (AnV), связывающегося с остатками фосфатидилсерина (ФС) на мембранах апоптотных клеток, и йодида пропидия (PI) – флуоресцентного красителя ДНК, позволяющего дифференцировать клетки с поврежденной мембраной (BD, США). На ранней стадии апоптоза клетки связывают AnV, но, как и живые, непроницаемы для PI, поэтому расцениваются как (AnV+/PI-)–клетки. Отношение числа таких клеток к общему числу клеток в мазке выражали в процентах [6, 8, 11].

Микроскопические исследования проводили на флуоресцентном микроскопе «МИКРОМЕД 3 ЛЮМ» (Санкт-Петербург).

Статистическую обработку осуществляли после проверки распределения на нормальность. Значимость различий между исследуемыми величинами оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Данные представляли в виде $M \pm m$. Взаимосвязь показателей определяли с использованием коэффициента корреляции (*r*) Пирсона.

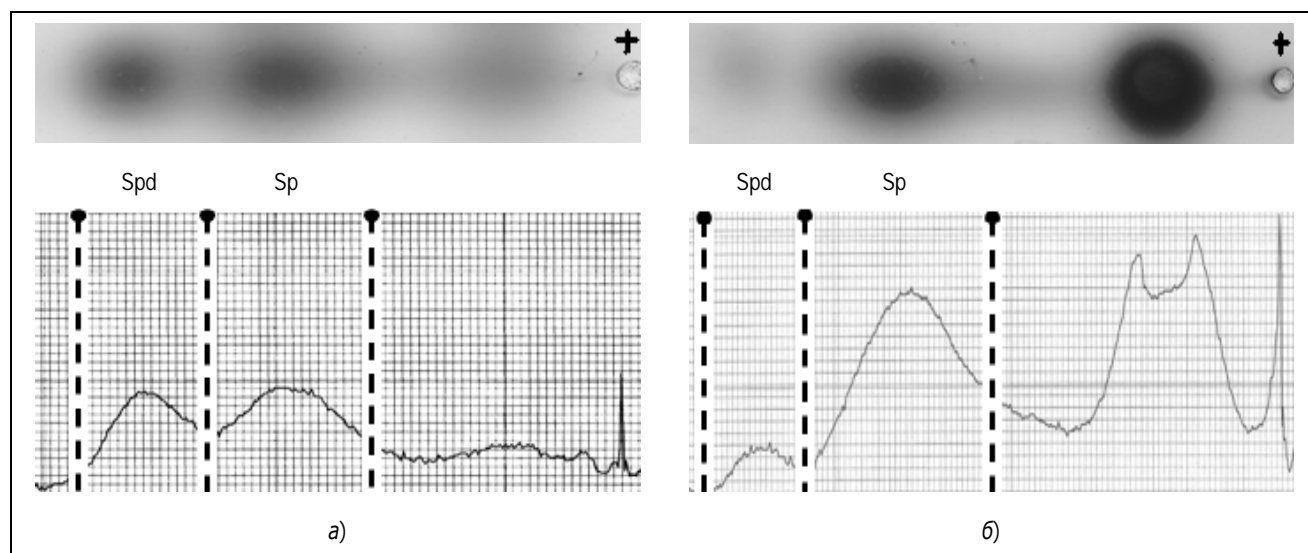
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка содержания ПА в спермоплазме мужчин показала, что концентрации Sp и Spd у бесплодных пациентов ниже, чем у фертильных мужчин ($p < 0,001$). Так, концентрации Sp составили 127,2±10,7 и 242,1±22,4 мкг/мл, а концентрации Spd – 27,5±3,0 и 184,0±21,8 мкг/мл соответственно. Однако соотношение Sp/Spd было почти в 4 раза выше, чем у фертильных мужчин (табл. 1).

Таблица 1. Содержание ПА и (AnV+/PI-)–сперматозоидов в эякулятах мужчин разной фертильности

Пациенты	Количество (AnV+/PI-)–сперматозоидов, %	Концентрация ПА, мкг/мл		Sp/Spd
		Sp	Spd	
Фертильные мужчины (n=34)	10,1±0,4	242,1±22,4	184,0±21,8	1,1–2,6
Бесплодные мужчины (n=40)	17,8±1,5*	127,2±10,7*	27,5±3,0*	4,4–10,2

Примечание: * – $p < 0,001$.



Электрофореграмма и денситограмма ПА спермоплазмы мужчин: а – фертильного; б – бесплодного

На рисунке приведены электрофореграммы и денситограммы ПА спермоплазмы фертильного и бесплодного мужчин.

Ранним признаком апоптоза, начавшегося в клетке, является перемещение ФС на внешнюю сторону мембраны клетки [11].

Установлено, что у бесплодных мужчин содержание (AnV+/PI-)–сперматозоидов в эякулятах почти в 2 раза выше, чем у фертильных ($p < 0,001$): 17,8±1,5 и 10,1±0,4% соответственно (табл. 1).

Корреляционный анализ выявил положительную зависимость между содержанием в эякулятах бесплодных пациентов (AnV+/PI-)–сперматозоидов и концентрацией Sp спермоплазмы ($r = 0,5$; $p < 0,01$).

Изучение влияния ПА на ктоточную жизнеспособность показало, что в эксперименте *in vitro* совместная инкубация клеток с Sp и Spd приводит к дозозависимому повышению содержания лимфоцитов крови, вступивших в апоптоз. Так, уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов крови при инкубации в полной культуральной среде в течение суток составил 1–4 (AnV+/PI-)–клеток на 100

клеток. При инкубации клеток с ПА в концентрации 10^{-3} моль/л апоптозу подверглось от 8 до 14 клеток из 100 клеток в зависимости от используемого ПА, а при концентрации ПА 10^{-5} моль/л всего лишь от 5 до 7 клеток ($p < 0,05$). Наиболее выраженное апоптогенное действие при этом проявлял Sp. Содержание ПА в дозе 10^{-6} моль/л (доза близка к физиологической) в среде с лимфоцитами тормозило апоптоз клеток до 2%.

Для наглядности полученных результатов был применен индекс апоптоза (ИА): отношение апоптоза в опыте к апоптозу в контроле.

Значение ИА при концентрациях ПА 10^{-3} и 10^{-5} моль/л было больше единицы, что говорит об активации апоптоза, а при концентрации ПА 10^{-6} моль/л – меньше единицы, что свидетельствует о торможении апоптоза физиологическими концентрациями Sp и Spd (табл. 2).

При пониженной концентрации ПА в эякуляте у бесплодных мужчин по сравнению с фертильными выявлено изменение соотношения Sp/Spd с преобладанием Sp в семенной жидкости. Это служит инициирующим фактором для запуска

апоптоза у гамет и началом изменения в динамике липидов мембраны клетки.

Таблица 2. Значения индекса апоптоза лимфоцитов после инкубации с полиаминами

ПА	Доза ПА, моль/л		
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻³
Sp	0,6 ± 0,01*	1,7 ± 0,05*	3,6 ± 0,04*
Spd	0,6 ± 0,02*, ≠	1,2 ± 0,02*, ≠	2,1 ± 0,01*, ≠

Примечание: статистически значимые различия ($p < 0,05$) между показателями выявлены: * – при разных дозах Sp и Spd; ≠ – между одинаковыми дозами Sp и Spd.

На модели апоптоза лимфоцитов периферической крови подтверждена схожесть воздействия Sp и Spd при более выраженной апоптотической активности Sp и разнонаправленность эффекта больших и физиологических доз ПА. При высоких концентрациях ПА губительно влияют на клетки, что можно объяснить образованием токсичных продуктов окислительного дезаминирования ПА: альдегидов, акролеина и кислородных радикалов, так как в среду инкубации добавлялась сыворотка, содержащая в том числе и аминоксидазы [4, 12, 13]. Ответом клетки на такое токсическое воздействие является активация суицидной программы – апоптоза [14, 15]. Однако механизм регуляции апоптоза ПА может иметь и опосредованный характер.

Выводы

1. Концентрация ПА – не только фактор для фертилизации сперматозоидов, но и фундаментальный механизм контроля и регуляции жизнеспособности гамет. Очевиден отрицательный эффект изменения в соотношении между Sp и Spd в семенной жидкости мужчин, вследствие сбоев в регуляции их синтеза. Данные, полученные в исследовании, подтверждают, что одной из основных внутриклеточных мишеней ПА является программа апоптоза.
2. Результаты исследования подтверждают высокую активность ПА на клеточном уровне и являются основанием для дальнейшего обсуждения возможных механизмов действия

ПА на гаметы, а также делает ПА не просто объектом исследования, но и возможным инструментом для применения в андрологии.

Литература

1. Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008; 228: 367–381.
2. Силачев Д.Н., Плотников Е.Ю., Горюнов К.В., Романов А.Ю., Плосконос М.В., Долгушина Н.В., Николаев А.А., Торев Д.Б., Сухих Г.Т. Роль полиаминов в жизнедеятельности клеток репродуктивной системы. *Цитология*. 2018; 60:3: 164–172.
3. Ramani D., De Bandt J.P., Cynober L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clin Nutr*. 2014; 33(1): 14–22.
4. Coburn R.F. Polyamine effects on cell function: possible central role of plasma membrane PI(4,5)P2. *J Cell Physiol*. 2009; 221: 544–551.
5. Minois N. Molecular basis of the 'anti-aging' effect of spermidine and other natural polyamines - a mini-review. *Gerontology*. 2014; 60(4): 319–326.
6. Плосконос М.В. Влияние миллиметрового электромагнитного излучения низкой интенсивности на процесс апоптоза мужских половых клеток. *Успехи современного естествознания*. 2015; 1: 6:974–976.
7. Smolewska E., Brozik H., Smolewski P. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Diseases*. 2003; 62: 761–763.
8. Плосконос М.В. Маркёры апоптоза и их экспрессия на сперматозоидах человека. *Российский иммунологический журнал*. 2015; 9(18):1(1): 154–155.
9. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO (Geneva). 2010: 270.
10. Плосконос М.В. Сравнительная характеристика методов выделения сперматозоидов из нативного эякулята мужчин. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61:6: 342–347.
11. Плосконос М.В. Экстернализация фосфатидилсерина и функционально-морфологические нарушения сперматозоидов у мужчин, состоящих длительное время в бесплодном браке. *Урология*. 2016; 4: 87–91.
12. Agostinelli E., Marques MP., Calheiros R. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*. 2010. 38: 393–403.
13. Alm K., Oredsson S. Cells and polyamines do it cyclically. *Essays Biochem*. 2009; 49:4663–4676.
14. Белишук Н.Н., Хасан Хамад А., Северин С.Е. Молекулярные основы апоптоза. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 1998; 4: 15.
15. Немцова М.В., Быков И.И., Чекунова Н.В., Залетаев Д.В., Глухов А.И., Хоробрых Т.В. Системы молекулярно-генетических маркеров при раке желудка. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2013; 10:067–072.

Поступила 24 апреля 2020 г.

PARTICIPATION OF POLYAMINES IN THE REGULATION OF CELL VIABILITY

© M.V. Ploskonos, Abdullah Hilal, 2020

M.V. Ploskonos

Ph.D. (Biol.), Professor,

Department of Chemistry, Astrakhan State Medical University Health Ministry of Russian Federation (Astrakhan)

E-mail: ploskonoz@mail.ru

Abdullah Hilal

Post-graduate Student,

Department of Biochemistry n.a. academician Berezov T.T. Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (Moscow)

E-mail: D.helal.sy.77@gmail.com

Relevance. The high content in the seminal plasma of men of the representatives of the class of polyamines (PA) - spermine (Sp) and spermidine (Spd), in comparison with other biological fluids of the human body, as well as changes in the concentration of PA with various impaired fertility, indicates the extreme importance of these biologically active substances for the male reproductive system. However, the functions of Sp and Spd in the ejaculate are poorly understood. From this perspective, the study of the ability of PA to participate in the regulation of germ cell viability seems to be a very topical issue.

Objective: Compare the content of PA in the seminal plasma of men of different fertility and determine the relationship between the level of PA in the studied ejaculates and apoptosis in gametes.

Material and methods. Ejaculates of 34 fertile men and 40 infertile were examined. PA was determined by agar gel electrophoretic fractionation. Apoptosis was determined by the externalization of phosphatidylserine (FS) on the outside of the sperm membrane.

Results. A change in the concentration of PA in the seminal plasma and the relationship between Sp and Spd with a predominance of the first, as well as the presence of a larger number of apoptotic spermatozoa in the ejaculates of infertile men compared with fertile donors were revealed. A connection was found between the externalization of PS in gametes and the Sp concentration in the sperm plasma ($r = 0,5$; $p < 0,01$). On a model of peripheral blood lymphocyte apoptosis model of 30 donors, it was shown that physiological concentrations of Sp and Spd reduce cell apoptosis, and large doses activate apoptosis. In this case, Sp. Realization of such effects is observed after 24-hour incubation of cells with PA.

Conclusion. A change in the concentration of PA in the seminal fluid of men is one of the factors regulating apoptosis of germ cells.

Key words: polyamines, seminal plasma, sperm, lymphocytes, apoptosis, fertility.

For citation: Ploskonos M.V., Hilal Abdullah. Participation of polyamines in the regulation of cell viability. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(7):40–44. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-07-07>

REFERENCES

1. Kusano T., Berberich T., Tateda C., Takahashi Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*. 2008; 228: 367–381.
2. Silachev D.N., Plotnikov E.Ju., Gorjunov K.V., Romanov A.Ju., Ploskonos M.V., Dolgushina N.V., Nikolaev A.A., Torov D.B., Suhij G.T. Rol' poliaminov v zhiznedejatel'nosti kletok reproduktivnoj sistemy. *Citologija*. 2018; 60:3: 164–172.
3. Ramani D., De Bandt J.P., Cynober L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. *Clin Nutr*. 2014; 33(1): 14–22.
4. Coburn R.F. Polyamine effects on cell function: possible central role of plasma membrane PI(4,5)P2. *J Cell Physiol*. 2009; 221: 544–551.
5. Minois N. Molecular basis of the 'anti-aging' effect of spermidine and other natural polyamines - a mini-review. *Gerontology*. 2014; 60(4): 319–326.
6. Ploskonos M.V. Vlijanie millimetrovogo jelektromagnitnogo izluchenija nizkoj intensivnosti na process apoptoza muzhskih polovih kletok. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*. 2015; 1: 6:974–976.
7. Smolewska E., Brozik H., Smolewski P. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Ann. Rheum. Diseases*. 2003; 62: 761–763.
8. Ploskonos M.V. Markjory apoptoza i ih jekspressija na spermatozoidah cheloveka. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal*. 2015; 9(18):1(1): 154–155.
9. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO (Geneva). 2010: 270.
10. Ploskonos M.V. Sravnitel'naja karakteristika metodov vydelenija spermatozoidov iz nativnogo jejakuljata muzhchin. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2016; 61:6: 342–347.
11. Ploskonos M.V. Jeksternalizacija fosfatidilserina i funkcional'no-morfologicheskie narushenija spermatozoidov u muzhchin, sostojashhih dlitel'noe vremja v besplodnom brake. *Urologija*. 2016; 4: 87–91.
12. Agostinelli E., Marques MP., Calheiros R. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*. 2010. 38: 393–403.
13. Alm K., Oredsson S. Cells and polyamines do it cyclically. *Essays Biochem*. 2009; 49:4663–4676.
14. Belushkina N.N., Hasan Hamad A., Severin S.E. Molekuljarnye osnovy apoptoza. *Voprosy biologicheskij, medicinskoj i farmacevticheskij himii*. 1998; 4: 15.
15. Nemcova M.V., Bykov I.I., Chekunova N.V., Zaletaev D.V., Gluhov A.I., Horobryh T.V. Sistemy molekuljarno-geneticheskij markerov pri rake zheludka. *Voprosy biologicheskij, medicinskoj i farmacevticheskij himii*. 2013; 10:067–072.