

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕАЗ СПЕРМОПЛАЗМЫ У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ

А.Ф. Иштулин

ассистент, кафедра биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО,
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ
(г. Рязань, Россия)
E-mail: a.ishtulin@yandex.ru; ORCID ID: 0000-0001-9750-1642

Н.В. Короткова

к.м.н., доцент, доцент кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО;
ст. науч. сотрудник ЦНИЛ,
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ
(г. Рязань, Россия)
E-mail: fnv8@yandex.ru; ORCID ID: 0000-0001-7974-2450

И.В. Матвеева

к.м.н., доцент, зав. кафедрой биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО,
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ
(г. Рязань, Россия)
E-mail: i.matveeva@rzgmu.ru

С.А. Исаков

д.м.н., профессор кафедры дерматовенерологии,
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ
(г. Рязань, Россия)

И.В. Минаев

студент, лечебный факультет,
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ
(г. Рязань, Россия)
E-mail: ivan.minaev98@yandex.ru; ORCID ID: 0000-0003-0728-8708

П.М. Полякова

студентка, лечебный факультет,
ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава РФ
(г. Рязань, Россия)
E-mail: pelageia18@gmail.com; ORCID ID: 0000-0002-0681-8183

Актуальность. Одной из серьезных проблем современного общества является мужское бесплодие, на долю которого приходится 7% в общей структуре бесплодных браков. Причины, приводящие к нему, не всегда понятны. Все исследования эякулята в основном базируются на химико-микроскопических исследованиях. Биохимические показатели спермы в настоящее время определяются в недостаточном объеме, поэтому введение новых биохимических маркеров для диагностики снижения фертильности у мужчин очень актуальны.

Цель работы – изучение активности катепсинов В, L и Н, содержащихся в акросоме сперматозоидов, у мужчин с нарушениями репродуктивной функции.

Материал и методы. Материалом для исследования являлась спермоплазма, которая была получена от 30 пациентов с диагнозом хронический простатит и 30 пациентов с диагнозом варикоцеле с жалобами на репродуктивное здоровье. Контрольную группу составили 30 пациентов без заболеваний мочеполовой системы при физикальном осмотре и не имеющих в анамнезе жалоб на репродуктивное здоровье. Спермоплазму получали методом центрифугирования образца спермы в течение 10 мин при скорости 1000 об/мин. Активность катепсинов В, L, Н в спермоплазме определяли спектрофлуориметрическим методом по A.J. Barrett и H. Kirschke.

Результаты. Результаты исследования показали следующее: активность катепсина В у пациентов с диагнозом хронический простатит снижена в 3,4 раза, у пациентов с диагнозом варикоцеле – в 18,5 раза; активность катепсина L у пациентов с хроническим простатитом снижена в 3,5 раза, при варикоцеле – в 20 раз; активность катепсина Н при хроническом простатите снижена в 3,3 раза, у пациентов с варикоцеле – в 25,5 раза.

Выводы. Изучена активность лизосомальных цистеиновых протеаз В, L, Н у пациентов с нарушением репродуктивной функции. Было обнаружено снижение активности катепсинов В, L, Н у данных пациентов, в отличие от пациентов без признаков наруше-

ния фертильности. Таким образом, изменение активности катепсинов В, L и Н может рассматриваться как один из возможных маркеров диагностики мужского бесплодия.

Ключевые слова: протеолиз, хронический простатит, варикоцеле, цистеиновые катепсины, спермоплазма.

Для цитирования: Иштулин А.Ф., Короткова Н.В., Матвеева И.В., Исаков С.А., Минаев И.В., Полякова П.М. Изменение активности лизосомальных цистеиновых протеаз спермоплазмы у пациентов с нарушением репродуктивной функции. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(4):23–28. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-04-04>

Бесплодие является серьезной проблемой современного общества. В его структуре доля мужского бесплодия составляет 7% [1]. Причины, приводящие к нему, различны, среди них 21–39% случаев составляет варикоцеле, 40–70% – хронический простатит [2].

Варикоцеле – патологическое увеличение вен гроздевидного сплетения в пределах мошонки и семенного канатика. Влияние варикоцеле на сперматогенез является основополагающим, но не у всех мужчин при данном заболевании нарушается фертильность, так как они имеют детей [2]. В работах многих авторов указывается на изменение количества, подвижности и морфологии сперматозоидов при варикоцеле. Часто к нарушению сперматогенеза приводят такие факторы, как механическое сдавление семявыносящих путей варикозно-расширенными венами, венозный стаз и ретроградный ток крови, в результате которого увеличивается температура яичек и нарушается синтез стероидов. Из-за повышенного венозного давления в венозную систему левого яичка попадают гормоны коры левого надпочечника. Это приводит к нарушению сперматогенеза [3].

Хронический простатит – воспалительный процесс в предстательной железе, может возникнуть по различным причинам, таким как инфекции, переохлаждение, снижение иммунитета и многие другие. По статистике воспаления предстательной железы является наиболее распространенным урологическим диагнозом у мужчин моложе 50 лет и третьим по распространенности урологическим диагнозом у мужчин старше 50 лет [4]. Во многих случаях заболевание принимает хроническую форму.

Воспалительные процессы, вызывающие поражение ткани простаты, приводят к развитию бесплодия. Было показано, что лейкоцитоспермия, цитокины и активные формы кислорода в значительной степени влияют на количество и подвижность сперматозоидов. При бактериальном воспалении изменяется секрет предстательной железы, меняются значения рН, возникает дисбаланс в количестве питательных веществ, что приводит к

снижению подвижности сперматозоидов и их жизнеспособности.

В связи с этим актуален поиск новых биохимических маркеров эякулята, применение которых в настоящее время ограничено. Функциональная активность сперматозоидов поддерживается спермоплазмой, состоящей из смеси секретов добавочных половых желез. В спермоплазме содержатся белки, микроэлементы, ферменты и различные метаболиты. Ферменты являются важными диагностическими маркерами патологии человека. Катепсины – это протеолитические ферменты, в активном центре которых присутствуют остатки цистеина, серина и аспарагиновой кислоты. Цистеиновые катепсины содержатся в лизосомах и принимают участие во внутриклеточном обмене белков, разрушая внутренние пептидные связи [5].

Цель исследования – изучение активности катепсинов В, L и Н, содержащихся в акросоме сперматозоидов, у мужчин с нарушениями репродуктивной функции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования являлась спермоплазма (смесь секретов добавочных половых желез), полученная от 30 пациентов с диагнозом хронический простатит и 30 пациентов с диагнозом варикоцеле с жалобами на репродуктивное здоровье. Указанные диагнозы подтверждены клинически и лабораторно-инструментальными методами. Контрольную группу составили 30 пациентов без заболеваний мочеполовой системы при физикальном осмотре и не имеющих в анамнезе жалоб на репродуктивное здоровье. Все пациенты проходили обследование в клинико-диагностической лаборатории ГБУ РО «ГКБ № 8» в 2021 году. Средний возраст пациентов составил 27±2 года. Все обследуемые подписали информационное согласие на участие в исследовании.

Забор эякулята проводили однократно, после 3–5 дневного полового воздержания. Сперма была получена в одноразовую посуду для сбора эякулята методом мастурбации. Исследование проводили

через 1 ч после полного разжижения спермы. Спермоплазму получали методом центрифугирования образца спермы в течение 10 мин при скорости 1000 об/мин [6]. После отделения осадка спермоплазму однократно замораживали при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения исследования.

Активность катепсинов В, L, Н в спермоплазме определяли спектрофлуориметрическим методом по А.J. Barrett и Н. Kirschke [7] с определением флюоресцирующего продукта реакции 7-амидо-4-метилкумарина, который образуется при расщеплении специфических флюорогенных субстратов: для катепсина В – Na-карбобензоксипептидин-7-амидо-4-метилкумарин (Na-CBZ-Arg-Arg-7-амидо-4-метилкумарин, Sigma, США), для катепсина L – Na-карбобензоксипептидин-7-амидо-4-метилкумарин (N-CBZ-Phe-Arg-7-амидо-4-метилкумарин, Sigma, США), для катепсина Н – аргинин-7-амидо-4-метилкумарин (Arg-7-амидо-4-метилкумарин, Sigma, США). Активность определяли на спектрофлуориметре RF-6000 (Япония). Активность катепсинов в спермоплазме рассчитывали в наномолях на час×литр (нмоль/ч×л).

Полученные данные обрабатывали с применением компьютерных программ Microsoft Office Excel 2016 и Statistica 26.0 (StatSoft Inc., США). Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Колмогорова–Смирнова. Для всех значений выборка оказалось непараметрической. Сравнение множества групп выполняли с помощью непараметрического *H*-критерия Крускал–Уоллеса. В последствии проводили апостериорное множественное сравнение по непараметрическому *U*-критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Различия между показателями считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В спермоплазме пациентов с диагнозом хронический простатит и с диагнозом варикоцеле активность катепсинов В, L, Н оказалась снижена по сравнению с контрольной группой. Это снижение явилось статистически значимым для всех изучаемых катепсинов. Активность катепсина В у пациентов с диагнозом хронический простатит снижена в 3,4 раза, у пациентов с диагнозом варикоцеле – в 18,5 раза (рисунок, а). Активность катепсина L у пациентов с хроническим простатитом снижена в 3,5 раза, при варикоцеле – в 20 раз (рисунок, б).

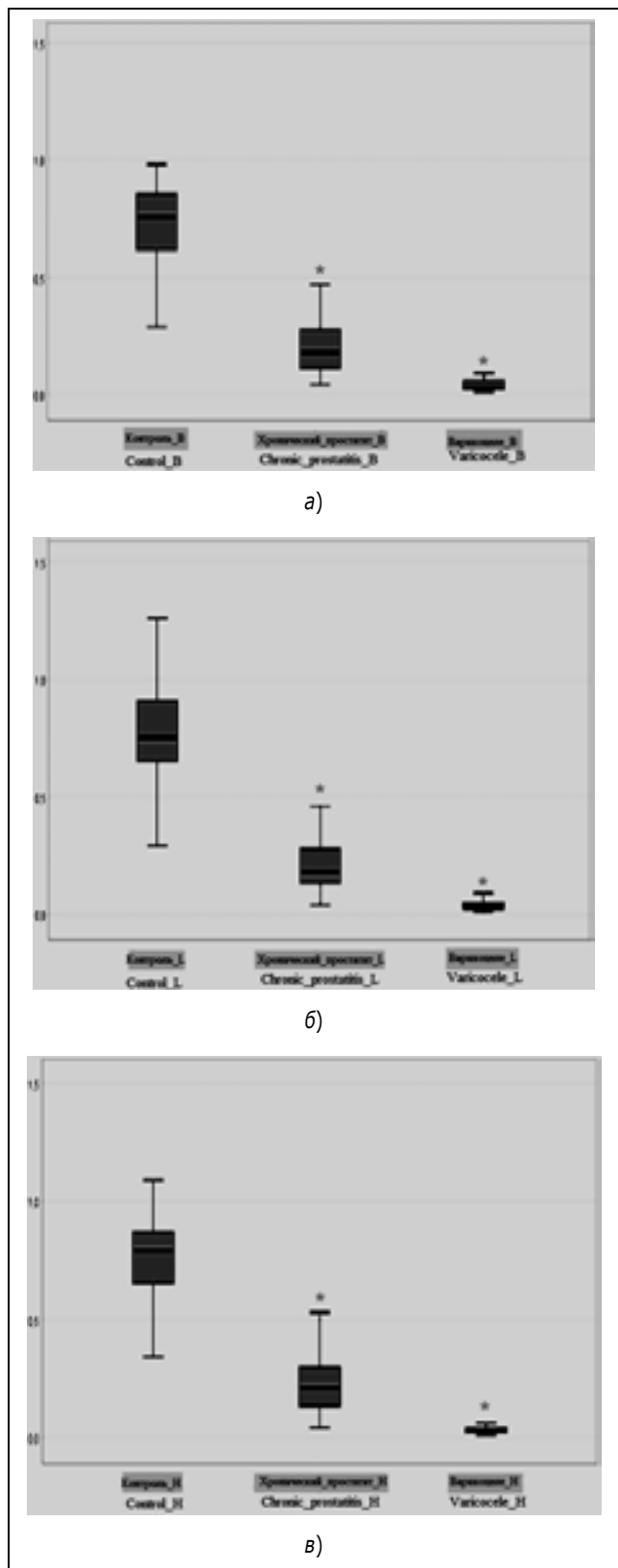


Рисунок. Активность катепсинов В (а), L (б), Н (в) в спермоплазме у пациентов с бесплодием, нмоль/ч×л; * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p \leq 0,05$)

Активность катепсина Н при хроническом простатите снижена в 3,3 раза, у пациентов с варикоцеле – в 25,5 раза (рисунок, в).

Снижение активности катепсинов В, L, Н в спермоплазме у пациентов с хроническим простатитом вызывает интерес, так как может выступать потенциальным маркером бесплодия у данной группы пациентов. В настоящее время известно, что в спермоплазме содержится большое количество белков и ферментов, секретируемых предстательной железой и семенными пузырьками. К ним относятся: фосфатазы, липазы, нейраминидаза, акрозин и гиалуронидаза. Гиалуронидаза и акрозин участвует в процессе оплодотворения путем акросомальной реакции.

Акросомальная реакция заключается в доставке содержимого акросомы для локального разрушения оболочки яйцеклетки. Акросома – это видоизмененная лизосома, в которой присутствуют лизосомальные цистеиновые протеиназы – катепсины В, L, Н. Акрозин способствует связыванию сперматозоидов с zona pellucida. В литературных источниках имеются данные, что активность акрозина снижается у мужчин, страдающих бесплодием, по сравнению с фертильными мужчинами [8]. В связи с вышеизложенным можно предположить, что катепсины В, L, Н также принимают участие в оплодотворении яйцеклетки, и снижение их активности, возможно, приводит к нарушению процесса оплодотворения.

Снижение активности катепсинов В, L, Н в спермоплазме у пациентов с варикоцеле предположительно могут иметь разный характер.

Лизосомальные цистеиновые катепсины по своей химической природе имеют белковую структуру. Следовательно, под воздействием повышенной температуры они могут подвергаться денатурации. При варикоцеле из-за переполнения венозной кровью яичек в них повышается температура. Тепловой стресс может являться причиной повышенного образования активных форм кислорода, тем самым повышая уровень окислительного стресса [9], что, в свою очередь, может привести к снижению активности катепсинов В, L, Н у пациентов с варикоцеле, страдающих бесплодием.

Снижение активности катепсинов В, L, Н при варикоцеле может также происходить в результате снижения активности сперматогенного эпителия [10]. Это приводит к уменьшению количества полноценных сперматозоидов (олигозооспермия). Сперматозоиды в своем составе имеют акросому,

которая предположительно содержит лизосомальные цистеиновые протеазы.

Еще одной причиной развития варикоцеле может являться окислительный стресс [10]. Окислительный стресс при варикоцеле развивается вследствие нарушения микроциркуляции. В активном центре катепсинов В, L, Н находятся цистеиновые группы, которые при окислении образуют дисульфидные связи, и фермент теряет свою активность.

ВЫВОДЫ

У пациентов с бесплодием активность лизосомальных цистеиновых протеаз В, L, Н в спермоплазме существенно снижается в отличие от пациентов, не имеющих нарушений репродуктивной функции. Таким образом, изменение активности катепсинов В, L и Н может рассматриваться как один из возможных маркеров диагностики мужского бесплодия.

Благодарности

Авторы выражают признательность за помощь в организации и проведении исследования ректору РязГМУ Р.Е. Калинин, а также проректору по научной работе и инновационному развитию РязГМУ И.А. Сучкову.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adeoye O., Olawumi J., Opeyemi A., et al. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod.* 2018; 22(1): 61–66. DOI: 10.5935/1518-0557.20180003.
2. Сорокина Т.М., Андреева М.В., Черных В.Б., Курило Л.Ф. Варикоцеле как одна из причин снижения мужской фертильности. *Андрология и генитальная хирургия.* 2019; 20(3): 3. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-3-00-00.
3. Собенников И.С., Жиборов Б.Н., Котанс С.Я., Черенков А.А. Диагностика и лечение мужского бесплодия у больных распространённой патологией гениталий и паховой области. *Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова.* 2017; 25(3): 460–468. DOI: 10.23888/PAVLOVJ20173460-468.
4. Khan F.U., Ihsan A.U., Khan H.U., Jana R., Wazir J., Khongorzul P., Zhou X. Comprehensive overview of prostatitis. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* 2017; 946: 1064–1076. DOI: org/10.1016/j.biopha.2017.08.016.
5. Сорокина М.Г., Фомина М.А., Петров Д.С. Современные представления о роли лизосомальных протеиназ в патогенезе болезни Альцгеймера. *Наука молодых (Eruditio Juvenium).* 2018; 6(4): 582–588. DOI: 10.23888/HMJ201864582-588.
6. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пятое издание. ISBN 978-5-905106-09-05. М.: Изд-во «КАПИТАЛ ПРИНТ», 2012; 305 с.
7. Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L. *Methods in Enzymol.* 1981; 80: 535–561. DOI: 0.1016/s0076-6879(81)80043-2.

8. Kennedy W.P., Vander Ven H.H., Straus J.W., et al. Grossypol inhibition of acrosin and proacrosin, and oocyte penetration by human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1983; 29: 999–1009.
9. Hamada A., Esteves S. C., Agarwal A. *Varicocele and Male Infertility: Current Concepts, Controversies and Consensus.* Springer International Publishing, 2016.
10. Осадчий Л.В., Попова А.В., Ворошилина Н.А. Влияние простатита и варикоцеле на репродуктивные показатели молодых мужчин. *Экспериментальная и клиническая урология.* 2014; 2: 77–81.

Поступила 22 декабря 2021 г.

CHANGES IN THE ACTIVITY OF LYSOSOMAL CYSTEINE PROTEASES OF SPERMOPLASM IN PATIENTS WITH IMPAIRED REPRODUCTIVE FUNCTION

© Authors, 2022

A.F. Ishtulin

Assistant, the Department of Biological Chemistry with Course of Clinical Laboratory Diagnostics, the Faculty of Additional Professional Education, Ryazan State Medical University named after I. P. Pavlov, (Ryazan, Russian Federation)
E-mail: a.ishtulin@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0001-9750-1642

N.V. Korotkova

Ph.D. (Med.), Associate Professor, the Department of Biological Chemistry with Course of Clinical Laboratory Diagnostics, the Faculty of Additional Professional Education; Senior Research Scientist, the Central Research Laboratory, Ryazan State Medical University named after I. P. Pavlov (Ryazan, Russian Federation)
E-mail: fnv8@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0001-7974-2450

I.V. Matveeva

Ph.D. (Med.), Associate Professor, Head of the Department of Biological Chemistry with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics, the Faculty of Additional Professional Education, Ryazan State Medical University named after I. P. Pavlov (Ryazan, Russian Federation)
E-mail: i.matveeva@rzgmu.ru

S.A. Isakov

Dr.Sc. (Med.), Professor, the Department of Dermatovenerology, Ryazan State Medical University named after I. P. Pavlov (Ryazan, Russian Federation)

I.V. Minaev

Student, Faculty of General Medicine, Ryazan State Medical University named after I. P. Pavlov (Ryazan, Russian Federation)
E-mail: ivan.minarv98@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-0728-8708

P.M. Polyakova

Student, Faculty of General Medicine, Ryazan State Medical University named after I. P. Pavlov (Ryazan, Russian Federation)
E-mail: pelageia18@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-0681-8183

Relevance. One of the serious problems of modern society is male infertility, which accounts for 7% of the total structure of infertile marriages. The reasons leading to it are not always clear. All researches of ejaculate are mainly based on chemical microscopic explorations. The biochemical indicators of sperm are currently being determined in insufficient volume, therefore the introduction of new biochemical markers for the diagnosis of decreased fertility in men is very relevant.

Object. To examine the activity of cathepsins B, L and H contained in the acrosome of spermatozoa among men with impaired reproductive function.

Materials and methods. The material for the investigation was spermoplasm. Spermoplasm was obtained from 30 patients diagnosed with chronic prostatitis and 30 patients diagnosed with varicocele with complaints of reproductive health. The control group consisted of 30 patients without diseases of the genitourinary system during physical examination and without complaints in anamnesis about reproductive health. Spermoplasm was obtained by centrifugation of a sperm sample for 10 minutes at a speed of 1000 rpm. The activity of cathepsins B, L, H in the spermoplasm was determined by the spectrofluorimetric method according to A.J. Barrett and H. Kirschke.

Results. The activity of cathepsin B among patients diagnosed with chronic prostatitis was reduced by 3.4 times, in patients diagnosed with varicocele by 18.5 times. The activity of cathepsin L among patients with chronic prostatitis is reduced by 3.5 times, with varicocele by 20 times. The activity of cathepsin H in chronic prostatitis decreases by 3.3 times, in patients with varicocele by 25.5 times.

Conclusions. The activity of lysosomal cysteine proteases B, L, H among patients with impaired reproductive function was explored. A decrease in the activity of cathepsins B, L, H was found among these patients, as distinct from the patients without signs of fertility disorders. In this way, changing the activity of cathepsins B, L and H can be considered as one of the possible markers for the diagnostics of male infertility.

Key words: *proteolysis, chronic prostatitis, varicocele, cysteine cathepsins, spermoplasm.*

For citation: Ishtulin A.F., Korotkova N.V., Matveeva I.V., Isakov S.A., Minaev I.V., Polyakova P.M. Changes in the activity of lysosomal cysteine proteases of spermoplasm in patients with impaired reproductive function. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(4):23–28. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-04-04>

REFERENCES

1. Adeoye O., Olawumi J., Opeyemi A., et al. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. JBRA Assist Reprod. 2018; 22(1): 61–66. DOI: 10.5935/1518-0557.20180003.
2. Sorokina T.M., Andreeva M.V., Chernyh V.B., Kurilo L.F. Varicocele kak odna iz prichin snizhenija muzhskoj fertil'nosti. Andrologija i genital'naja hirurgija. 2019; 20(3): 3. DOI: 10.17650/2070-9781-2019-20-3-00-00.
3. Sobennikov I.S., Zhiborev B.N., Kotans S.Ja., Cherenkov A.A. Diagnostika i lechenie muzhskogo besplodija u bol'nyh rasprostranjonnoj patologiej genitalij i pahovoj oblasti. Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik im. akademika I.P. Pavlova. 2017; 25(3): 460–468. DOI: 10.23888/PAVLOVJ20173460-468.
4. Khan F.U., Ihsan A.U., Khan H.U., Jana R., Wazir J., Khongorzul P., Zhou X. Comprehensive overview of prostatitis. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2017; 94: 1064–1076. DOI: org/10.1016/j.biopha.2017.08.016.
5. Sorokina M.G., Fomina M.A., Petrov D.S. Sovremennye predstavlenija o roli lizosomal'nyh proteinaz v patogeneze bolezni Al'cgejmera. Nauka molodyh (Eruditio Juvenium). 2018; 6(4): 582–588. DOI: 10.23888/HMJ201864582-588.
6. Rukovodstvo VOZ po issledovaniju i obrabotke jejakuljata cheloveka. Pjatoe izdanie. ISBN 978-5-905106-09-05. M.: Izd-vo «KAPITAL PRINT», 2012; 305 c.
7. Barrett A.J., Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H, cathep-sinL. Methods in Enzymol. 1981; 80: 535–561. DOI: 0.1016/ s0076-6879(81)80043-2.
8. Kennedy W.P., Vander Ven H.H., Straus J.W., et al. Grossypol inhibition of acrosin and proacrosin, and oocyte penetration by human spermatozoa. Biol Reprod. 1983; 29: 999–1009.
9. Hamada A., Esteves S. C., Agarwal A. Varicocele and Male Infertility: Current Concepts, Controversies and Consensus. Springer International Publishing, 2016.
10. Osadchij L.V., Popova A.V., Voroshilina N.A. Vlijanie prostatita i varicocele na reproduktivnye pokazateli molodyh muzhchin. Jeksperimental'naja i klinicheskaja urologija. 2014; 2: 77–81.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Элеутерококк (сухой экстракт, таблетки, покрытые оболочкой) (рег. № № 92/210/3; 92/210/7) – общетонизирующее средство, получаемое из корневищ и корней элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.).

Сабельник болотный (*Comarum palustre*) (экстракт сухой, таблетки, гель) – оказывает противовоспалительное, анальгезирующее действие. Применяется в комплексной терапии воспалительных и дегенеративных заболеваний опорно-двигательного аппарата.

Флакозид (таблетки) (рег. №№ 90/248/3; 90/248/7) – противовирусное и антигепатотоксическое средство, получаемое из листьев бархата амурского и бархата Лавалея (*Phellodéndron amurénse* и *Phellodendron amurense* var. *Lavallei* Sprague). Применяется для лечения вирусных гепатитов.

Эвкалимин (раствор, суппозитории для детей и взрослых) (рег. №№ 90/249/2; 91/194/13; 91/194/12) – антибактериальное и противовоспалительное средство, получаемое из эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru