

Влияние факторов различной природы на фертильность эякулята *in vitro*

В.В. Евдокимов¹, Н.К. Исаев², В.Б. Туровецкий²

¹ Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; Россия, 105425 Москва, ул. 3-я Парковая, 51, стр. 1;

² биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

Контакты: Валерий Васильевич Евдокимов vvevdok@mail.ru

Введение. Современная демографическая ситуация в стране характеризуется падением рождаемости. По данным Всемирной организации здравоохранения, частота бесплодных браков в разных странах составляет 10–15 %. В Российской Федерации, по прогнозам ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, это число достигает 17 %. Более 4 млн мужчин страдают бесплодием различной формы. Нарушения мужской репродуктивной функции в последние годы приобрели медицинскую и социальную значимость в связи с прогрессирующим снижением фертильных свойств сперматозоидов. Нарушения фертильности оценивают как многофакторное состояние, вызванное воздействием внешних и внутренних причин, приводящих к патологическим изменениям в органах половой системы. Коррекция нарушений мужской фертильности не всегда приводит к положительным результатам. В связи с этим важен поиск эффективных препаратов, влияющих на поддержание основных параметров фертильности и их исследование в эксперименте.

Цель исследования – изучение влияния различных биологических препаратов и физико-химических факторов на параметры фертильности эякулята *in vitro*.

Материалы и методы. Проведены опыты с использованием белково-пептидного комплекса (БПК), метиленовой сини и перекиси водорода на сперматозоидах человека. После разжижения эякулята образец микроскопировали и осуществляли оценку подвижности сперматозоидов и других параметров эякулята по стандарту Всемирной организации здравоохранения (5-е издание). Эксперименты проводили при температуре 20–22 °С. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия между значениями параметров считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Полученные результаты показали рост подвижности во фракции активноподвижных клеток в первые 30 мин инкубации сперматозоидов с раствором метиленовой сини. При исходной астеноспермии активная подвижность повысилась на 72 %, при нормоспермии – на 89 %. Через 2 ч все фракции подвижности находились на исходном уровне.

Опыты также показали значительные изменения подвижности сперматозоидов в присутствии в эякуляте препарата БПК: установлено повышение подвижности сперматозоидов начиная с 30-й минуты и сохранение этого уровня на протяжении 3 ч наблюдения. Более заметный сдвиг отмечен в активноподвижной фракции сперматозоидов – на 60 %, общая подвижность повышалась в пределах 30 %. Через 24 ч подвижность сперматозоидов оставалась близкой к исходному уровню, число нормальных форм сперматозоидов и живых клеток оставалось без изменений. При этом следует отметить зависимость изменения подвижности от концентрации препарата: наиболее заметный рост подвижности отмечен при добавлении БПК с концентрацией общего белка 10^{-12} мг/мл. Более высокие концентрации препарата не имели положительного эффекта в отношении подвижности сперматозоидов. В опытах с низкой концентрацией перекиси водорода установлен положительный эффект влияния на подвижность сперматозоидов.

Заключение. Известно, что подвижность сперматозоидов обеспечивается за счет энергии гликолиза, одним из ферментов которого является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, прочно связанная с фиброзным слоем жгутика сперматозоида, с активацией метаболических путей, приводящих к повышению активности фермента, а также подвижности сперматозоида. Механизм наблюдаемого эффекта до конца не ясен, однако полученные данные показывают перспективность дальнейших работ по изучению возможности использования препаратов в андрологической и репродуктивной практике, при вспомогательных репродуктивных технологиях, а также в качестве стимуляции подвижности сперматозоидов в дальнейших экспериментальных исследованиях.

Ключевые слова: факторы воздействия, сперматозоиды, подвижность, выживаемость

Для цитирования: Евдокимов В.В., Исаев Н.К., Туровецкий В.Б. Влияние факторов различной природы на фертильность эякулята *in vitro*. Андрология и генитальная хирургия 2022;23(1):45–52. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-23-1-45-52.

Effect of various factors on ejaculate fertility *in vitro*

V.V. Evdokimov¹, N.K. Isaev², V.B. Turovetskiy²

¹N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 51 3rd Parkovaya St., Moscow 105425, Russia;

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University; Bld. 12, 1 Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia

Contacts: Valery Vasilyevich Evdokimov vvevdok@mail.ru

Introduction. Current demographic situation in Russia is characterized by decreasing birth rate. According to the World Health Organization, percentage of child-free marriages in various countries is 10–15 %. In Russia, the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology, and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov states that this number is 17 %. More than 4 million men suffer from infertility of various types. In recent years, pathologies of male reproductive function have achieved medical and social significance due to progressively decreasing sperm fertility. Fertility disorders are considered multi-factor conditions caused by internal and external factors and leading to pathological changes in sex organs. Correction of pathologies of male fertility does not always lead to positive results. Therefore, it is important to develop and study effective pharmaceuticals affecting the main fertility parameters.

The study objective is to investigate the effect of various biological pharmaceuticals, physical and chemical factors on parameters of ejaculate fertility *in vitro*.

Materials and methods. Experiments with a protein-peptide complex (PPC), methylene blue, and hydrogen peroxide were performed on human semen. After semen dilution, the sample was studied under the microscope and sperm motility and other ejaculate parameters were evaluated per the 5th edition WHO standard. Experiments were performed at 20–22 °C. Statistical data analysis was performed using the Student's *t*-test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. The results show increased motility in the fraction of active motile sperm in first 30 minutes after incubation with methylene blue. In case of initial asthenospermia, active motility increased by 72 %, in case of normospermia by 89 %. After 2 hours, all motility fractions were at the baseline level.

The experiments also showed significant changes in sperm motility in the presence of PPC preparation in the ejaculate: increase in sperm motility was observed beginning at 30-minute mark and this level persisted through 3 hours of observation. A more pronounced change, by 60 %, was observed in the active motile sperm; total motility increased by up to 30 %. After 24 hours, sperm motility remained close to the baseline level, the number of normal sperm forms and live cells did not change. Dependence of the motility change on the preparation concentration should be noted: the highest increase was observed at PPC concentration with total protein level of 10^{-12} mg/mL. Higher concentrations did not have a positive effect on sperm motility. In experiments with low hydrogen peroxide concentration, a positive effect on sperm motility was observed.

Conclusions. Sperm motility is supported by glycolysis energy, and one of the glycolysis enzymes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is tightly bound to the fibrous layer of the flagellum, activation of metabolic pathways leading to increased enzyme activity, increased sperm motility. The mechanism of the observed effect is not entirely clear, however, the obtained data demonstrate potential benefits of further studies on use of pharmaceuticals in andrological and reproductive practice, assisted reproductive technologies, as well as for stimulation of sperm motility in further experimental studies.

Key words: impact factors, spermatozoa, mobility, survival

For citation: Evdokimov V.V., Isaev N.K., Turovetskiy V.B. Effect of various factors on ejaculate fertility *in vitro*. Andrologiya i genital'naya khirurgiya = Andrology and Genital Surgery 2022;23(1):45–52. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-23-1-45-52.



Введение

Современная демографическая ситуация в стране характеризуется падением рождаемости, и эта тенденция, по оценкам демографов, сохранится на протяжении нескольких лет. Демографическая проблема несет в себе сложные социально-экономические аспекты. По данным Всемирной организации здравоохранения, частота бесплодного брака в разных странах составляет 10–15 % от общего числа супружеских пар. В Российской Федерации, по данным ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, это число достигает 17 %. Более 4 млн мужчин в стране страдают бесплодием различной формы [1–3].

В последние годы нарушения репродуктивной функции у мужчин приобрели особую медицинскую и социальную значимость в связи с прогрессирующим снижением фертильных свойств сперматозоидов [4, 5]. Нарушение фертильности оценивают как многофакторное состояние, которое может быть связано с наличием патологических изменений в органах половой системы (варикоцеле, простатит, инфекции, передающиеся половым путем, крипторхизм, гипогонадизм и др.), а также влиянием внешних факторов (курение, алкоголь, гиподинамия, ожирение, электромагнитное излучение различных источников, экологические факторы, профессиональные вредности) [6]. Совокупное воздействие этих факторов приводит к высокому проценту идиопатической формы в структуре мужского бесплодия (до 30–50 %), что вызывает трудности диагностики и выбора лечебной тактики выявленных нарушений [7, 8]. Коррекция нарушений мужской фертильности не всегда приводит к положительным результатам. Для стимуляции структурно-функционального состояния мужских половых клеток используют гормональные препараты, витамины, микроэлементы, антиоксиданты и др. В связи с этим одной из актуальных задач современной андрологии и репродукции является поиск агентов, способных повышать фертильность сперматозоидов, а также увеличивать их устойчивость к действию повреждающих факторов различной природы.

Цель нашего исследования — изучение влияния различных биологических препаратов и физико-химических факторов на параметры фертильности эякулята *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования проводили на сперматозоидах человека из эякулята, полученного общепринятым способом. После разжижения эякулят микроскопировали в проходящем свете при увеличении $\times 400$ на микроскопе Amplival (Karl Zeiss Jena, Германия). Оценку подвижности сперматозоидов и других параметров эякулята осуществляли по стандарту Всемирной организации здравоохранения (5-е издание) [9]. Эксперименты проводили при температуре 20–22 °С. Из полученного образца эякулята отбирали по 1 мл для опыта и контроля.

В исследованиях применяли различную аппаратуру, излучающую электромагнитные волны (мобильный телефон, компьютер, ноутбук); разные концентрации перекиси водорода; препараты белково-пептидного комплекса (БПК), представляющего собой вытяжку из ткани семенников быка; а также метиленовую синь (МС) как потенциальный источник энергии в клетке.

В работе были использованы препараты БПК в концентрациях, соответствующих 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-12} мг/мл. Для каждой концентрации препарата ставили по 12 опытов. Изучали изменение подвижности сперматозоидов, оценивая общую и активную подвижность через 30 мин, 1 ч и 3 ч инкубации. Оценивали также сохранность жизнеспособности сперматозоидов через 24 и 48 ч инкубации образцов эякулята с препаратом при температуре 20 °С.

При изучении влияния низких концентраций перекиси водорода в 1 мл эякулята вносили 10 мкл вещества в соответствующем разведении, с тем чтобы конечная концентрация составляла 10^{-4} М и 10^{-5} М. Определяли изменение подвижности сперматозоидов через 30 мин и 1 ч инкубации. После определения подвижности сперматозоидов перекись водорода удаляли добавлением каталазы и сперматозоиды отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 3000 об/мин. Затем в сперматозоидах из тех же образцов эякулята определяли активность фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДс), как описано в работе [10].

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

Результаты

Широкое использование сотовых телефонов, компьютеров, ноутбуков и других аппаратов и приборов представляется не безвредным для человека. Многочисленные исследования в основном касаются их влияния на нервную и иммунную системы и в меньшей степени — на репродуктивную функцию [11]. Мы провели изучение влияния этой аппаратуры на эякулят человека *in vitro*. Образцы эякулята подвергали облучению сотового телефона или компьютера в течение 3 ч и затем определяли подвижность сперматозоидов — через 1, 3 и 24 ч. Общая подвижность снизилась к 3-му часу наблюдения до 57 % по отношению к исходному уровню (100 %), через 24 ч подвижность упала до 16 % (в контроле — до 34 %). Активная подвижность сперматозоидов через 3 ч достигала только 66 % от исходного уровня (100 %), через 24 ч — 8 % (в контроле — 35 %). Выживаемость сперматозоидов через 24 ч сохранялась на уровне 74 % (в контроле — 95 %). Аналогичные результаты получены и при изучении

воздействия электромагнитного излучения компьютера на эякулят.

Определение жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации представляет важную проблему в связи с широким применением метода длительного хранения спермы человека. Замораживание образцов эякулята проводили по принятой схеме. Подсчет нежизнеспособных сперматозоидов осуществляли сразу после процедуры оттаивания. Использование эозина (ЭО) выявляло 58 % мертвых клеток, использование пропидия йодида (ПИ) — 69 %. Достоверно большее количество поврежденных клеток обнаруживали при применении метода проточной цитометрии. В качестве криоконсервантов применяли стерильную среду для замораживания (Sperm Freez, Бельгия), которую используют в практике процедур вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

Параллельно с выявлением жизнеспособных сперматозоидов определяли содержание клеток с сохраненной подвижностью после размораживания. Общая подвижность сперматозоидов падала при нормозооспермии с 59 до 37 %, что составляло 64 % от исходных 100 %. Наиболее низкий уровень подвижности сперматозоидов был отмечен при варикоцеле: после размораживания их подвижность составляла 32 % от исходных 100 %. При хроническом простатите подвижность клеток сохранялась на уровне 56 %.

С целью изучения влияния на жизнеспособность сперматозоидов оксидативного стресса, создаваемого в клетках активными формами кислорода (АФК), включая перекись водорода, были проведены опыты с использованием 3 % перекиси водорода. Через 24 ч инкубации окрашивание ЭО выявляло 48 % поврежденных клеток, а применение ПИ — 86 %. И в данной серии экспериментов метод проточной цитометрии выявлял достоверно более высокий уровень повреждения сперматозоидов.

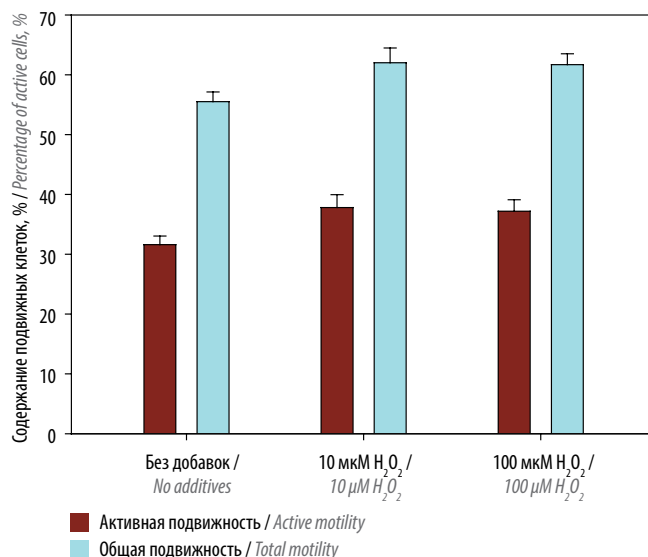
Возможной причиной расхождения результатов оценки проницаемости клеточной мембраны сперматозоида при окрашивании ПИ и ЭО, по нашему мнению, могло явиться преобладание разных форм клеточной гибели: в свежеевыделенной сперме «нежизнеспособные клетки» — это, в первую очередь, сперматозоиды на поздней стадии апоптоза, а криоконсервация и перекись водорода несомненно приводят к появлению значительного количества сперматозоидов, претерпевающих некротическую форму гибели. В этом случае флуоресцентный метод обладает большей чувствительностью.

Известно, что повышенный уровень АФК в клетках вызывает в них оксидативный стресс. Это происходит, например, при увеличении концентрации внутриклеточной перекиси водорода [12]. В нашем опыте были использованы 2 концентрации перекиси водорода: 47 мМ и 97 мМ (1,4 % и 2,9 %). После внесения в 1 мл эякулята соответствующего количества перекиси водорода

определяли через 1, 3 и 24 ч число жизнеспособных клеток при окрашивании ЭО. Через 1 ч изменения проницаемости клеточной мембраны были незначительными в обоих случаях, но через 3 ч и 24 ч повреждения мембран были существенно заметнее: при концентрации 47 мМ число живых клеток через 3 ч составляло 70 %, через 24 ч — 66 %, при концентрации 97 мМ — соответственно 71 и 57 %, в контроле в эти периоды времени оставалось 95 и 91 % соответственно.

Оксидативный стресс обусловлен нарушением равновесия между продукцией АФК и внутриклеточной антиоксидантной системой. Эти результаты совпадают с данными других наблюдений [13, 14].

В литературе имеются данные о повышении активности некоторых типов клеток при действии низких концентраций перекиси водорода [15]. В связи с этим нами были проведены эксперименты с целью изучения влияния низких концентраций перекиси водорода на подвижность сперматозоидов (см. рисунок). В 1 мл эякулята вносили 10 мкл перекиси водорода соответствующей концентрации, с тем чтобы конечная концентрация составляла 10^{-4} М и 10^{-5} М. Через 1 ч инкубации отмечено повышение общей подвижности сперматозоидов на 11 %, активной — на 19 %. В тех же образцах эякулята определяли активность ГАФДс. Обнаружено повышение активности фермента на 24 %. Таким образом, действие низких концентраций перекиси водорода приводит к повышению подвижности сперматозоидов и одновременно к увеличению активности фермента ГАФДс. На основании этих данных можно предположить, что выявленный эффект, вероятно, связан с активацией метаболических путей, сопровождающихся увеличением содержания восстановленного глутатиона, что может приводить к восстановлению окисленных



Подвижность сперматозоидов при воздействии перекиси водорода
Sperm motility under the effect of hydrogen peroxide

активных центров фермента, повышая тем самым его активность. Отмеченный эффект может также служить индикатором нормальной работы клеточной системы антиоксидантной защиты.

Проведенные опыты показали значительные изменения подвижности сперматозоидов в присутствии в эякуляте БПК (табл. 1). Для определения эффекта влияния препарата на подвижность сперматозоидов она была разделена на фракции активной и общей подвижности, что позволяло определить ответную реакцию на препарат отдельно. Было установлено изменение подвижности начиная с первых 30 мин наблюдения и сохранение подвижности в течение 3 ч наблюдения. При этом следует отметить зависимость уровня подвижности от концентрации препарата. Наиболее заметный подъем подвижности отмечен при добавлении препарата БПК с концентрацией белка 10^{-12} мг/мл. Более

низкие концентрации препарата вызывают незначительные изменения подвижности. Активноподвижная фракция сперматозоидов отвечала более высоким подъемом, чем общая фракция, в которую входит и малоподвижная фракция. Во всех исследованных концентрациях препарата подвижность сперматозоидов через 3 ч наблюдения сохранялась на более высоком уровне, чем в контрольных образцах эякулята. Через 24 ч подвижность сперматозоидов оставалась близкой к исходному уровню. Число нормальных форм сперматозоидов оставалось без изменений. Количество живых клеток также не претерпевало существенных изменений: уменьшение до 80,2 % от исходного уровня в 85,9 %.

Одним из практических приложений полученных экспериментальных результатов с регуляторными пептидами и низкими концентрациями перекиси водорода является возможность повышения подвижности

Таблица 1. Влияние препаратов белково-пептидного комплекса (БПК) на подвижность сперматозоидов

Table 1. Effect of protein-peptide complex (PPC) preparations on sperm motility

Параметр Parameter	Образцы опытной группы Samples of the experimental group				Контроль, через 3 ч Control, after 3 h
	Исходное значение Baseline value	Время инкубации, мин Incubation time, minutes			
		30	60	180	
БПК, 10 ⁻⁸ мг/мл PPC, 10 ⁻⁸ mg/ml					
Активная подвижность, % Active motility, %	21,3 ± 3,1 100 %	27,9 ± 5,9* 131 %	24,7 ± 2,3 115 %	22,6 ± 2,5 106 %	20,2 ± 2,3 95 %
Общая подвижность, % Total motility, %	41,2 ± 4,5 100 %	51,9 ± 5,1 123 %	46,5 ± 6,7 113 %	48,2 ± 2,6 117 %	38,8 ± 3,1 94 %
БПК, 10 ⁻⁹ мг/мл PPC, 10 ⁻⁹ mg/ml					
Активная подвижность, % Active motility, %	20,8 ± 3,2 100 %	21,2 ± 5,3 102 %	22,7 ± 3,6 109 %	24,6 ± 3,8 118 %	19,4 ± 2,5 93 %
Общая подвижность, % Total motility, %	42,3 ± 5,0 100 %	43,5 ± 4,7 103 %	44,6 ± 4,2 105 %	48,5 ± 4,0 114 %	41,2 ± 2,0 97 %
БПК, 10 ⁻¹² мг/мл PPC, 10 ⁻¹² mg/ml					
Активная подвижность, % Active motility, %	20,1 ± 2,2 100 %	32,2 ± 4,8* 160 %	34,0 ± 3,5* 169 %	34,4 ± 3,8* 171 %	18,3 ± 2,9 91 %
Общая подвижность, % Total motility, %	41,8 ± 5,4 100 %	68,2 ± 4,7* 163 %	71,1 ± 4,0* 170 %	63,5 ± 2,5* 152 %	37,2 ± 2,7 89 %
БПК, 10 ⁻¹⁵ мг/мл PPC, 10 ⁻¹⁵ mg/ml					
Активная подвижность, % Active motility, %	20,3 ± 3,6 100 %	31,1 ± 3,8* 153 %	33,1 ± 2,8* 163 %	21,9 ± 4,7 108 %	18,3 ± 2,3 90 %
Общая подвижность, % Total motility, %	44,7 ± 4,8 100 %	62,1 ± 5,3 139 %	58,2 ± 2,3 130 %	49,6 ± 4,9 111 %	41,7 ± 3,0 93 %

*Различия статистически значимы, $p < 0,05$.

*Differences are significant, $p < 0.05$.

сперматозоидов при исходной астенозооспермии для использования их в программах ВРТ (экстракорпорального оплодотворения и интрацитоплазматических инъекций сперматозоидов) для супружеской инсеминации. Эти же вещества могут быть использованы при криоконсервации эякулята после процедуры размораживания. В связи с этим было предпринято определение жизнеспособности сперматозоидов после криоконсервации спермы человека. В качестве криоконсервантов применяли стерильную среду для замораживания (Sperm Freez, Бельгия), которую используют в практике процедур ВРТ. Флуоресцентный метод выявлял после криоконсервации большее количество нежизнеспособных сперматозоидов, чем при подсчете с ЭО.

Проведенный анализ литературы указал на возможность использования МС в качестве агента, влияющего на функциональную активность клетки. В ряде работ отмечен позитивный эффект воздействия МС, где раз-

витие клеточного повреждения связано с нарушением митохондриальных функций [16].

Мы провели ряд экспериментов с препаратом МС. В одной серии опытов использовали эякулят с исходной низкой общей подвижностью сперматозоидов — астенозооспермия (<40 %) (табл. 2). В другой серии были использованы образцы эякулята с исходной нормальной подвижностью (>40 %) сперматозоидов (табл. 3).

При исходной астенозооспермии активная подвижность значительно выросла в первые 30 мин опыта — на 72 %, затем снизилась до исходного уровня. Общая подвижность также после некоторого повышения на 35 % упала до исходного уровня.

При нормозооспермии активная подвижность существенно возростала — на 89 и 35 % с первых 30 мин и на протяжении 2 ч наблюдения. Общая подвижность значительно возростала в первые 30 мин — на 41 %,

Таблица 2. Влияние метиленовой сини на подвижность сперматозоидов при исходной астенозооспермии (общая подвижность — менее 40 %)

Table 2. Effect of methylene blue on sperm motility in case of baseline asthenospermia (total motility is below 40 %)

Параметры эякулята Ejaculate parameter	Исходные данные Baseline data	Время инкубации, мин Incubation time, minutes			Контроль, через 2 ч Control, after 2 h
		30	60	120	
Активная подвижность, % Active motility, %	14,7 ± 2,6 (100 %)	25,3 ± 4,2 (172 %)*	12,8 ± 3,1 (87 %)	14,6 ± 2,7 (100 %)	14,8 ± 1,8 (100 %)
Малая подвижность, % Low motility, %	22,0 ± 2,2 (100 %)	24,6 ± 3,1 (111 %)	17,6 ± 4,2 (80 %)	15,3 ± 4,5 (69 %)	24,0 ± 2,5 (109 %)
Общая подвижность, % Total motility, %	36,7 ± 3,4 (100 %)	49,9 ± 5,7 (135 %)*	30,4 ± 4,2 (82 %)	29,9 ± 3,7 (81 %)	38,8 ± 3,8 (105 %)

*Различия величин подвижности по сравнению с исходным уровнем достоверны, $p < 0,05$.

*Differences in motility compared to the baseline level are significant, $p < 0.05$.

Таблица 3. Влияние метиленовой сини на подвижность сперматозоидов при исходной нормозооспермии (общая подвижность — более 40 %)

Table 3. Effect of methylene blue on sperm motility in case of baseline normozoospermia (total motility is more than 40 %)

Параметры эякулята Ejaculate parameter	Исходные данные Baseline data	Время инкубации, мин Incubation time, minutes			Контроль, через 2 ч Control, after 2 h
		30	60	120	
Активная подвижность, % Active motility, %	28,1 ± 4,8 (100 %)	53,2 ± 5,1 (189 %)*	38,0 ± 4,6 (135 %)*	31,0 ± 3,8 (110 %)	24,6 ± 4,3 (87 %)
Малая подвижность, % Low motility, %	29,2 ± 4,7 (100 %)	28,0 ± 3,9 (95 %)	22,5 ± 3,6 (77 %)	28,0 ± 4,2 (95 %)	28,0 ± 3,8 (96 %)
Общая подвижность, % Total motility, %	57,3 ± 5,6 (100 %)	81,2 ± 5,1 (141 %)*	60,5 ± 3,8 (105 %)	59,0 ± 4,0 (102 %)	52,6 ± 3,3 (91 %)

*Различия величин подвижности по сравнению с исходным уровнем достоверны, $p < 0,05$.

*Differences in motility compared to the baseline level are significant, $p < 0.05$.



затем снижалась до исходного уровня. В контрольных образцах подвижность через 2 ч наблюдения во всех случаях сохранялась на исходном уровне. Число живых форм сперматозоидов на протяжении времени проведения эксперимента в обеих группах сохранилось на исходном уровне: 60–64 %. Таким образом, добавление МС в эякулят в пределах 30–60 мин и 2 ч инкубации изменяло все формы подвижности сперматозоидов. При увеличении времени инкубации эффект возрастания подвижности сперматозоидов не наблюдался.

Полученные результаты исследования воздействия МС на сперматозоиды с ведущей формой патоспермии — астенозооспермией — показывают существенное изменение основных функциональных параметров эякулята. Ответ сперматозоидов на воздействие МС в разных группах различен и по времени, и по эффекту. Наиболее выражен рост подвижности во фракции активноподвижных сперматозоидов в первые 30–60 мин опыта. Через 2 ч во всех образцах эякулята, включая контроль, подвижность возвращалась к исходному уровню. Через 24 ч наблюдения все виды подвижности снижались до 20–50 % по отношению к исходному уровню, в контроле — до 2–60 %.

Механизм наблюдаемого эффекта остается пока неясным, но полученные данные показывают перспективность проведения дальнейших работ по изучению возможности использования препаратов в андрологической и репродуктивной практике, в клиниках ВРТ, а также в качестве стимуляции подвижности сперматозоидов в дальнейших экспериментальных исследованиях.

Обсуждение

Вопрос о механизме действия пептидов еще не решен до конца и находится на стадии изучения, однако есть данные, указывающие на то, что свойства пептидов в определенной степени связаны с их влиянием на кальциевый гомеостаз и функционирование митохондрий. Кроме того, известно, что подвижность сперматозоидов обеспечивается за счет энергии гликолиза, одним из ферментов которого является спермо-специфическая форма глицеральдегид-3-фосфатдегидрогенезы (ГАФДс), которая прочно связана с фиброз-

ным слоем жгутика сперматозоида. Предполагают, что подвижность сперматозоидов существенно зависит от активности этого фермента, который высокочувствителен к повреждающему действию клеточных АФК. Это обстоятельство объясняет интерес к поиску агентов, снижающих повышенную продукцию АФК, которая приводит, в частности, к снижению подвижности сперматозоидов.

Действие низких концентраций перекиси водорода приводит к повышению подвижности сперматозоидов в разной степени в зависимости от концентрации перекиси. При этом одновременно было обнаружено незначительное увеличение активности фермента ГАФДс. Такой эффект, исходя из исследований, проведенных ранее, нельзя объяснить прямым взаимодействием перекиси водорода и ГАФДс. Можно предположить, что выявленный эффект, по всей вероятности, связан с активацией метаболических путей, приводящих к увеличению содержания восстановленного глутатиона, т.е. с активацией системы антиоксидантной защиты сперматозоидов. Глутатион является естественным восстановителем окисленных цистеиновых остатков, поэтому его накопление может приводить к восстановлению окисленных активных центров ГАФДс и тем самым к повышению активности фермента. В этом случае положительный эффект, связанный с активацией фермента в сперматозоидах в присутствии низких концентраций перекиси водорода, может служить индикатором нормальной работы клеточной антиоксидантной системы.

Заключение

1. Применение БПК в эксперименте оказывает положительный эффект на подвижность сперматозоидов. Степень подвижности сперматозоидов связана с концентрацией препарата.
2. Белково-пептидный комплекс можно использовать после криоконсервации эякулята.
3. Препарат МС обладает положительным эффектом на подвижность сперматозоидов и имеет перспективу использования в программах ВРТ.
4. Перекись водорода в низких концентрациях повышает подвижность сперматозоидов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Андрология. Клинические рекомендации. Под ред. П.А. Щеплёва. М.: Мед-практика, 2012. 155 с. [Andrology. Clinical guidelines. Ed. by P.A. Shcheplev. Moscow: Medpraktika, 2012. 155 p. (In Russ.)].

2. Андрология. Мужское здоровье и дис-функция репродуктивной системы. Под ред. Э. Нишлага, Г.М. Бере. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. 554 с. [Andrology. Male health and reproductive dysfunction. Ed. by: E. Nishlag, G.M. Bere. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2005. 554 p. (In Russ.)].

3. Пашкова Е.Ю., Калинин С.Ю. Мужское бесплодие в XXI веке — реалии и перспективы. Новые возможности

- использования комбинированной стимулирующей терапии гонадотропинами. Эффективная фармакотерапия 2013;1:26–31. [Pashkova E.Yu., Kalinchenko S.Yu. Male infertility in the 21st century – realities and prospects. New possibilities for using gonadotropin combination stimulatory therapy. *Effektivnaya farmakoterapiya* = *Effective pharmacotherapy* 2013;1:26–31. (In Russ.)].
4. Быков В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века (обзор литературы). Проблемы репродукции 2000;6(1):6–13. [Bykov V.L. Spermatogenesis in men in the late twentieth century (literature review). *Problemy reproduktcii* = *Russian Journal of Human Reproduction* 2000;6(1):6–13. (In Russ.)].
 5. Рождаемость и планирование семьи в России: История и перспективы. Под ред. И.А. Троицкой, А.А. Авдеева. Сб. ст. Сер. Демографические исследования. Вып. 18. М.: ТЕИС, 2011. С. 177. [Fertility and family planning in Russia: History and perspectives. Ed. by I.A. Troitskaya, A.A. Avdeev. *Coll. Articles. Ser. Demographic research. Issue 18. Moscow: TEIS, 2011. p. 177. (In Russ.)].*
 6. Кулаков В.И. Вспомогательные репродуктивные технологии – настоящее и будущее. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. С. 11–14. [Kulakov V.I. Assisted reproductive technologies – present and future. Moscow: Medical Media Agency, 2005. Pp. 11–14. (In Russ.)].
 7. Келлэт Е.П., Корнеева И.Е., Шуршаллина А.В. Бесплодие неясного генеза: фокус современных научных исследований. Проблемы репродукции 2010;16(1):32–5. [Kellet E.P., Korneeva I.E., Shurshalina A.V. Unexplained infertility: the focus of current scientific research (a review). *Problemy reproduktcii* = *Russian Journal of Human Reproduction* 2010;16(1):32–5. (In Russ.)].
 8. Корнеев И.А., Зассеев Р.Д. Преодоление бесплодия у мужчин с ретроградной эякуляцией и анэякуляцией. Урологические ведомости 2017;7(2):10–15. [Korneev I.A., Zasseev R.D. The infertility overcoming in men with retrograde ejaculation and anejaculation. *Urologicheskie vedomosti* = *Urology Reports (St. Petersburg)* 2017;7(2):10–15. (In Russ.)]. DOI: 10.17816/uroved7210-15.
 9. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Пер. с англ. Н.П. Макарова. Науч. ред. Л.Ф. Курило. 5-е изд. М.: Капитал Принт, 2012. 291 с. [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Translation from English by N.P. Makarov. Ed. by L.F. Kurilo. 5th edition. Moscow: Kapital Print, 2012. 291 p. (In Russ.)].
 10. Волкова Н.А., Павлович Е.В., Гапон А.А., Николов О.Т. Влияние электромагнитного облучения миллиметрового диапазона на морфофункциональное состояние криоконсервированных спермиев человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2014;157(5):587–90. [Volkova N.A., Pavlovich E.V., Gapon A.A., Nikolov O.T. Effects of millimeter-wave electromagnetic exposure on the morphology and function of human cryopreserved spermatozoa. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2014;157(5):587–90. (In Russ.)].
 11. Шуцкая Ю.Ю., Элькина Ю.Л., Куравский М.Л. и др. Исследование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека. Биохимия 2008;73(2):228–36. [Shutskaya Yu.Yu., Elkina Yu.L., Kuravskiy M.L. et al. Investigation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human spermatozoa. *Biokhimiya* = *Biochemistry (Moscow)* 2008;73(2):228–36. (In Russ.)].
 12. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008;14(3):243–58. DOI: 10.1093/humupd/dmn004.
 13. Ершова О.А., Баирова Т.А., Колесников С.И. и др. Окислительный стресс и ген каталазы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2016;161(3):378–81. [Ershova O.A., Bairova T.A., Kolesnikov S.I. et al. Oxidative stress and catalase gene. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2016;161(3):378–81. (In Russ.)].
 14. Altunoluk B., Efe E., Kurutas E.B. et al. Elevation of both reactive oxygen species and antioxidant enzymes in vein tissue of infertile men with varicocele. *Urol Int* 2012;88(1):102–6. DOI: 10.1159/000332156.
 15. Hamada A., Esteves S.C., Agarwal A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: Part 2. *Nat Rev Urol* 2013;10(1):26–37. DOI: 10.1038/nrurol.2012.198.
 16. Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Мухалева Е.В. и др. Нейропротективное действие метиленовой сини *in vivo* и *in vitro*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2019;167(4):438–42. [Stelmashuk E.V., Genrikhs E.E., Mukhaleva E.V. et al. Neuroprotective effects of methylene blue *in vivo* and *in vitro*. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2019;167(4):438–42. (In Russ.)].

Вклад авторов

В.В. Евдокимов: разработка дизайна исследований, проведение экспериментов, написание текста статьи;

Н.К. Исаев: разработка дизайна исследований, определение научно-практических аспектов;

В.Б. Туровецкий: обзор публикаций по теме статьи, статистический анализ данных.

Authors' contributions

V.V. Evdokimov: development of research design, conducting experiments, writing the text of the article;

N.K. Isaev: development of research design, definition of scientific and practical aspects;

V.B. Turovetsky: review of publications on the topic of the article, statistical analysis of data.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.В. Евдокимов / V.V. Evdokimov: <https://orcid.org/0000-0001-5673-4810>

Н.К. Исаев / N.K. Isaev: <https://orcid.org/0000-0001-8427-1163>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Опыты проведены в соответствии с правилами биоэтики.

Compliance with the rights of patients and the rules of bioethics. The experiments were conducted in accordance with the rules of bioethics.

Статья поступила: 29.04.2021. **Принята к публикации:** 23.12.2021.

Article submitted: 29.04.2021. **Accepted for publication:** 23.12.2021.