

УДК 612.616:612.015

## ФАКТОРЫ РАЗЖИЖЕНИЯ КОАГУЛИРОВАВШЕГО ЭЯКУЛЯТА ЧЕЛОВЕКА

Мирошников В.М., Николаев А.А., Луцкий Д.Л.

*Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань*

Из аспирата семенных пузырьков человека сочетанием катионообменной хроматографии на S-сефарозе и диск-электрофореза выделен белок. Молекулярная масса полученного белка, по данным SDS-PAGE, составила 53,5 kDa. Исходя из электрофоретической подвижности, мы предположили, что полученный белок –семеногелин-I (SPMI/Sp-I). После обработки полученного препарата очищенным простатоспецифическим антигеном (человеческий калликреин-3 (hK3)), электрофоретически были выявлены многочисленные полипептиды с молекулярной массой от 5 до 24 kDa. Проверка биологической активности на образцах нативной спермы подтвердила наличие у полипептидных фрагментов способности ингибировать двигательную активность сперматозоидов и они были отнесены к SPMI. Электрофоретическая подвижность фракции SPMI с молекулярной массой 18-20 kDa, которую мы назвали «тяжелой» (SPMI-h), соответствовала электрофоретической подвижности фракции нативной спермы человека, проявляющей ингибиторную активность. Изучение в казинолитическом тесте (с химотрипсином и папаином в качестве ферментов) возможной ингибиторной активности SPMI-h, показало наличие подобной активности в отношении папаина, влияние на ферментативную активность химотрипсина выявлено не было.

Мужская субфертильность является насущной медицинской и социально-демографической проблемой, поскольку обуславливает бесплодие в браке более чем в 50 % случаев. По данным Республиканского центра репродукции человека Минздрава России идиопатическое мужское бесплодие в России составляет около 25 % [3]. Подобное положение сложилось во многом из-за недостаточной изученности функционирования мужской репродуктивной системы на молекулярном уровне [2, 5, 8] и особенно каскада биохимических процессов, протекающих в эякулированной сперме [6].

**Цель:** Целью настоящей работы стало изучение биохимических факторов разжижения коагулировавшего эякулята и их функциональных характеристик.

**Материалы:** В работе были использованы нативные эякуляты человека и их компоненты (сперматозоиды, спермоплазма), аспиранты семенных пузырьков человека. Аспиранты семенных пузырьков хранили до использования при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Для исследования были использованы 27 эякулятов, полученных у мужчин с подтвержденной фертильностью. Эякуляты, обследованные по описанным ранее методикам [1, 4, 10], соответствовали критериям, рекомендованным экспертной группой ВОЗ для определения нормозоспермии [11].

После полного разжижения эякулят центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин. Полученную спермоплазму хранили до использования при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**Методы:** Катионообменную хроматографию осуществляли на колонке (1,5×20,0 см) с SP-сефарозой в 0,1 М цитратном буфере (pH 6,0). Элюцию проводили в ступенчатом градиенте хлорида натрия от 0 до 0,5 М.

Препаративный диск-электрофорез в 10 % ПААГ проходил в трис-глициновом буфере (pH 8,9), режим 75 В и 5 мА на трубку. Электрофорез осуществлялся в присутствии 0,1 % DS-Na по методу Вебера-Осборна. Перед нанесением на гель препараты обрабатывали 3,0 % DS-Na и 1,0 % 1,4-дигидрокси-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутан) 5 мин при  $100^{\circ}\text{C}$ . Гели фиксировали и отмывали от DS-Na в 50 % растворе трихлоруксусной кислоты. Окраску на белок проводили с помощью кумаси голубого G-250 (0,04 % раствор в 3,5 % хлорной кислоте).

Для определения молекулярной массы использовали белки-стандарты: лизоцим (14300 Да),  $\beta$ -лактоглобулин (18400 Да), трипсиноген (24000 Да), пепсин (34700 Да), яичный альбумин (45000 Да), сывороточный альбумин быка (мономер 66000 Да).

Для ферментативной обработки выделенного белка использовали чистый препарат простатоспецифического антигена (человеческий каллик-

реин-3 (hK3) [8], который брали в весовом соотношении 1 : 30. Инкубировали при температуре 37°C в течении 40 минут.

Исследуемый препарат очищали от простатоспецифического антигена методом аффинной хроматографии на иммобилизованном на BrCN-сефарозе 4В спермоспецифическом ингибиторе трипсина [7], колонка 1,5×10,0 см, трис-HCl-буфер, рН 6,5.

Для оценки биологической активности полученного препарата использовали сперматозоиды человека. Сперматозоиды для эксперимента выделяли после полного разжижения эякулята центрифугированием в градиенте перколла. Все растворы перколла готовили на HBS + BSA буфере с рН 8,0 (0,13 М NaCl, 0,004 М KCl, 0,001 М CaCl<sub>2</sub>, 0,0005 М MgCl<sub>2</sub>, 0,014 М фруктозы, 0,01 М N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновой кислоты и 1 мг/мл бычьего сывроточного альбумина).

Отмытые таким образом сперматозоиды разводили жидкостью Гиние. Жидкость Гиние готовили на основе свежего раствора Тирода с фруктозой, по следующей схеме [4]:

1. Готовили раствор Тирод I (NaCl – 20 %, CaCl – 0,5 %, KCl – 0,5 %, MgCl<sub>2</sub> – 0,25 %).

2. Готовили раствор Тирод II (NaHCO<sub>3</sub> – 0,5 %, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – 0,25 %).

3. Смешивали 4 мл Тирода I в 50 мл дистиллированной воды и 2 мл Тирода II в 50 мл дистиллированной воды.

4. В полученный раствор добавляли 1,5 г фруктозы в 33 мл дистиллированной воды.

Демембранизацию сперматозоидов проводили после выделения в градиенте перколла, для чего их обрабатывали смесью, содержащей 0,1 % тритон X-100, 0,25 М сахарозы, 0,025 М глутамата калия и 0,001 М трео-2,3-дигидрокси-1,4-димеркаптобутана.

Для выделения биологически активных полипептидов полученный препарат наносили на колонку с SP-сефадексом С-25. Элюцию полипептидов проводили в градиенте NaCl (от 0 до 0,6 М). Выход биологически активных фракций определяли по блокированию подвижности демембранизированных сперматозоидов [13].

Измерение двигательных характеристик сперматозоидов (общее количество подвижных сперматозоидов, количество активно подвижных сперматозоидов, скорость сперматозоидов) проводили по ранее описанным методам [4].

Для оценки биологических эффектов полипептидов спермоплазмы смешивали выделенные в градиенте перколла, разведенные жидкостью Гиние сперматозоиды объемом 5 мкл с 5 мкл раствора биологически активных полипептидов в разной концентрации, разведенных в жидкости

Гиние и с 15 мкл жидкости Гиние. Контролем служили образцы, приготовленные из выделенных в градиенте перколла, разведенных жидкостью Гиние сперматозоидов объемом 5 мкл, смешанных с 20 мкл чистой жидкости Гиние, а также с 20 мкл жидкости Гиние с добавлением BSA в возрастающих концентрациях (от 1 до 8 мг/мл). Время инкубации сперматозоидов с биологически активными полипептидами составляло 20 минут для оценки влияния на двигательную активность.

Для определения молекулярной массы полученных фракций полипептидов использовали диск-электрофорез в ПААГ.

Общую протеолитическую активность спермоплазмы определяли казеинолитическим методом с изменениями. За единицу активности (КЕ) принимали такое количество фермента, которое высвобождает 450 мкг эквивалента кислоторастворимого тирозина за 60 мин при 37°C.

Ингибиторную активность полученного препарата определяли в казеинолитическом тесте, а в качестве фермента использовали 0,01% химотрипсин и 0,01% папаин. Ингибиторную активность выражали в ингибиторных единицах (ИЕ). 1 ИЕ соответствовала 1 КЕ папаина или 1 КЕ химотрипсина.

**Результаты и их обсуждение.** Выделение белка семенных пузырьков начинали с ионообменной хроматографии на SP-сефарозе, при этом выход белка происходил при 0,2 М хлорида натрия.

Далее проводили препаративный диск-электрофорез в ПААГ, фракции с молекулярной массой 50-60 кДа отделяли, накапливали и хранили при температуре 18°C. По нашим данным, белок семенных пузырьков имел молекулярную массу 53,5 кДа.

Затем добавляли чистый препарат простатоспецифического антигена и инкубировали в течение 40 минут при 37°C. От простатоспецифического антигена освобождались с помощью аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным на BrCN-сефарозе спермоспецифическим ингибитором трипсина. Для полной очистки от простатоспецифического антигена, требовалось не менее 3 рециркуляций (степень очистки от простатоспецифического антигена контролировали иммунохимически с использованием стандартной тест-системы на простатоспецифический антиген).

По данным электрофореза в ПААГ, обработка ферментом приводила к образованию многочисленных фракций полипептидов, которые имели молекулярную массу от 5000 до 24000 Да.

Для того, чтобы подтвердить, что выделенный нами белок является предшественником

спермоплазменного ингибитора подвижности сперматозоидов, то есть семеногелином-I (SPMI/Sg-I) [13], и, соответственно, образовавшиеся полипептиды относятся к SPMI, мы проверили биологическую активность полученной смеси на отмытых сперматозоидах и наблюдали небольшое, но достоверное снижение всех дви-

гательных параметров сперматозоидов (таблица 1).

Далее мы выделили биологически активные полипептиды, для чего использовали метод хроматографии на колонке с SP-сефадексом С-25. Элюцию полипептидов проводили в градиенте NaCl (от 0 до 0,6 М).

**Таблица 1.** Биологическая активность полипептидов спермоплазмы

Двигательные характеристики сперматозоидов	До инкубации	Через 20 мин. инкубации	
		Контроль (отмытые сперматозоиды в присутствии жидкости Гиние)	Опыт (отмытые сперматозоиды в присутствии биологически активных полипептидов)
Всего подвижных, %	78,0	79,0	64,3
Активно подвижных, %	58,0	58,0	53,0
Слабо подвижных, %	20,0	21,0	11,3
Скорость, мм/мин	2,6	2,55	2,1

Выход биологически активных фракций имел нелинейный характер и определялся по блокированию подвижности демембранизированных сперматозоидов. Биологически активные фракции полипептидов блокировали подвижность демембранизированных сперматозоидов в течение 3-10 сек. Достоверной зависимости между молекулярной массой полипептидов и их способностью подавлять двигательную активность сперматозоидов выявлено не было, хотя слабая тенденция к увеличению ингибиторной активности с уменьшением молекулярной массы полипептидов наблюдалась.

По ранее полученным данным [8, 11] в нативной спермоплазме присутствует ряд ингибиторов протеиназ, причем, по меньшей мере два из них имеют относительно низкую молекулярную массу (18-25 кДа).

Поэтому представляло интерес оценить возможную ингибиторную активность полученных фракций биологически активных полипептидов. Для этого фракции полипептидов оценивали в казеинолитическом тесте ингибирования химотрипсина и папаина. По полученным нами данным, биологически активные полипептиды, образующиеся при ферментативном расщеплении белка семенных пузырьков SPMI/Sg-I, не обладают ингибиторной активностью по отношению к химотрипсину. В тоже время фракции полипептидов с молекулярной массой 16-24 кДа (мы назвали их «тяжелыми» – SPMI-h) проявляют ингибиторную активность в казеинолитическом тесте ингибирования папаина, причем максимальной ингибиторной активностью обладала фракция с молекулярной массой 18-20 кДа (таблица 2).

**Таблица 2.** Исследование ингибиторной активности фракций полипептидов

Молекулярная масса фракций полипептидов	Ингибиторная активность фракций полипептидов	
	Ингибирование химотрипсина, ИЕ	Ингибирование папаина, ИЕ
5000 – 7500 Да	0	0
7500 – 10000 Да	0	0
10000 – 12000 Да	0	0
12000 – 14000 Да	0	0
14000 – 16000 Да	0	0
16000 – 18000 Да	0	0,1
18000 – 20000 Да	0	4,7
20000 – 22000 Да	0	0,3
22000 – 24000 Да	0	0,1

На основании полученных данных процесс коагуляции-разжижения спермы после эякуляции можно представить следующим образом.

Во время эякуляции продукт семенных пузырьков SPMIP/Sg-I [14] поступает через семявыбрасывающий проток в уретру, где смешивается с продуктами секреции предстательной железы (в том числе с простатоспецифическим антигеном и спермоспецифическим ингибитором трипсина), продуктами секреции других вспомогательных желез мужской репродуктивной системы (бульбоуретральные, парауретральные железы и др.). В результате SPMIP/Sg-I приводит к коагуляции спермы после эякуляции. Затем происходит процесс разжижения, в котором ключевую роль, на наш взгляд, играет взаимодействие простатоспецифического антигена, являющегося типичной сериновой протеиназой (по ферментативной активности классифицируется как человеческий калликреин-3 (hK3) и его естественного ингибитора - спермоспецифического ингибитора трипсина (так же являющегося продуктом секреции предстательной железы). Соотношение между простатоспецифическим антигеном и спермоспецифическим ингибитором трипсина и их биологическая активность обеспечивают оптимальную скорость разжижения эякулята. В процессе разжижения эякулята простатоспецифический антиген расщепляет SPMIP/Sg-I на ряд полипептидов, которые способны блокировать двигательную активность сперматозоидов (SPMI), вероятно, за счет обратимого ингибирования деиновой АТФазы хвоста сперматозоидов [12]. Так как, по нашим наблюдениям, подавляется, прежде всего, активность слабо подвижных сперматозоидов, то биологическая роль образующихся SPMI может сводиться к отбору более активных сперматозоидов и созданию для них, за счет обездвиживания слабо подвижных, дополнительного энергетического резерва в спермоплазме. Таким образом, повышается фоновая фертильность спермоплазмы.

Кроме того, блокирование излишней двигательной активности может способствовать предупреждению преждевременной капацитации. Интересно, что биологическая роль образующихся полипептидов не ограничивается блокированием подвижности сперматозоидов, например, фракции полипептидов, которые мы назвали «тяжелыми». Они способны избирательно ингибировать протеиназы – папаин (тиоловая протеиназа), но не химотрипсин (сериновая протеиназа), что, возможно, может регулировать процесс разжижения по механизму отрицательной обратной связи. Не исключена и другая функциональная роль, поскольку активность фермен-

тов спермоплазмы во многом определяет оплодотворяющую способность сперматозоидов [9].

Вероятно, нарушение описанных процессов обуславливает, по крайней мере, часть случаев мужской субфертильности на фоне астенозооспермии «неясного генеза» и, в частности, субфертильность, связанную с нарушением времени разжижения эякулята.

Таким образом, нами охарактеризованы некоторые звенья процесса разжижения коагулированного эякулята и выявлена ингибиторная активность фракции полипептидов SPMI-h (18-20 кДа) по отношению к папаину. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят выявить другие стороны мужской фертильности и её нарушений.

#### Литература:

1. Бойко О. В., Николаев А. А., Луцкий Д. Л., Полунин А. И. Микробиологическое исследование эякулята: Методическое пособие. – Астрахань: АГМА, 2002. – 27 с.
2. Евдокимов В. В. Системное исследование эякулята при заболеваниях мужских репродуктивных органов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М.: НИИ урологии МЗ РФ, 1999. – 38 с.
3. Корякин М. В., Акопян А. С. // Молекулярные исследования мужской субфертильности / Под ред. проф. А. А. Николаева. – Астрахань: АГМА, 2000. – 170 с.
4. Луцкий Д. Л., Николаев А. А. Морфологическое исследование эякулята: Методическое пособие. – Астрахань: АГМА, 1999. – 47 с.
5. Луцкий Д. Л. Иммунохимическая и биохимическая характеристика спермоплазмы субфертильных мужчин: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Астрахань: АГМА, 2000. – 25 с.
6. Луцкий Д. Л., Николаев А. А. // Цитология. 2001. Т.43. №4. С.361.
7. Николаев А. А., Карасев В. С. // Биохимия. 1990. Т.55. Вып.6. С.1065.
8. Николаев А. А. Биохимическое и иммунохимическое изучение белков семенной плазмы человека: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Астрахань: АГМА, 1994. – 34 с.
9. Николаев А. А., Луцкий Д. Л., Бочановский В. А., Ложкина Л. В. // Урол. и нефрол. 1997. № 5. С.35.
10. Николаев А. А., Луцкий Д. Л. Биологическое и биохимическое исследование эякулята: Методическое пособие. – Астрахань: АГМА, 1999. – 47 с.
11. Полунин А.И., Мирошников В.М., Луцкий Д.Л., Николаев А.А. Хронический неспецифический простатит и уретрит: современные вопросы диагностики и лечения. – Астрахань: АГМА, 2001. – 194 с.

12. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. 4-е издание. – Москва: Медицина, 2001. – 144 с.
13. Belles-Isles M., Chapeau C., White D., Gagnon C. // *Biochem. J.* 1986. Vol.240. P.863.
14. Iwamoto T., Gagnon C. // *J. Urol.* 1988. Vol.140. №5. P.1045.
15. McGee R. S., Herr J. C. // *Biol. Reprod.* 1988. Vol.39. №2. P.499.

### **The factors of liquification of coagulated ejaculate of a human being**

Miroshnikov V. M., Nikolaev A.A., Lutsky D.L.

The protein was extracted from the aspirate of seminal vesicles of human being by the combination of cation-changeable chromatography on S-sepharose and disk-electrophoresis. Molecular mass of extracted protein according to SDS-PAGE data, comprised 53.5 kDa. We suggested that this received protein is semenogelin-I (SPMIP/Sg-I) according to electrophoretic motility. After the processing of the received preparation by purified prostate specific antigen (human kallikrein-3 (hK3)), numerous polypeptides with molecular mass from 5 to 24 kDa were found by electrophoretical analysis. The testing of biological activity of the samples of native sperm proved the existence of inhibition ability in polypeptide fragments to activate sperm motility and they were referred to SPMI. Electrophoretical motility of fraction of SPMI with the molecular mass of 18-20 kDa, which we called «heavy» (SPMI-h) corresponded to electrophoretical motility of fraction of native sperm of a human being with inhibitory activity. The study of possible inhibitory activity SPMI-h in caseinolytical test (with chymotrypsin and papain as enzymes) showed the existence of similar activity of papain, but the impact on enzyme activity of chymotrypsin was not found.