

Л.И. Колесникова, О.А. Вантеева, Н.А. Курашова, Б.Я. Власов

Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Российская Федерация

Глутатион как важнейший компонент тиолдисульфидной системы в патогенезе бесплодия мужчин с избыточной массой тела

Цель исследования: изучить состояние глутатионового звена тиолдисульфидной системы у мужчин с бесплодием с различными индексами массы тела на фоне окислительного стресса. **Пациенты и методы:** обследовано 60 мужчин с бесплодием с нормальной и избыточной массой тела и 40 практически здоровых мужчин с доказанной фертильностью. Активность компонентов системы антиоксидантной защиты организма оценивалась по уровню восстановленного и окисленного глутатиона по методу P.Y. Hissin, определение содержания ТБК-активных продуктов осуществляли по методу В.Б. Гаврилова. При анализе межгрупповых различий для независимых выборок использовали параметрический критерий Стьюдента. **Результаты:** у мужчин с бесплодием и избыточной массой тела окислительный стресс характеризовался статистически значимым повышением концентрации окисленной формы глутатиона (GSSG) по сравнению с ее восстановленной формой. Полученные результаты обсуждаются в связи с «поливалентностью» GSSG по отношению ко многим клеточным процессам, которая проявляется специфическим образом на фоне серьезной дисрегуляции метаболизма у бесплодных мужчин с высокой массой тела. **Выводы:** глутатион является важнейшим звеном при изучении окислительного стресса у мужчин с бесплодием. Повышение уровня окисленного глутатиона связано с наличием у него дополнительных функций, которые реализуются при повышении величины индекса массы тела, особенно в ассоциации с бесплодием.

Ключевые слова: система глутатиона, мужское бесплодие, индекс массы тела, перекисное окисление липидов.

9

Введение

Несмотря на значительные успехи и внедрение в клиническую практику современных репродуктивных технологий в Российской Федерации, проблема лечения бесплодия, в т.ч. мужской инфертильности, далека от окончательного разрешения [1, 2]. Наряду с проблемой бесплодия в последние годы отмечается неуклонный рост распространенности ожирения. По предварительным данным, в России не менее 30% трудоспособного населения имеют избыточную массу тела и 25% — ожирение [3].

Мужчины с высоким индексом массы тела (ИМТ) с большей вероятностью страдают от бесплодия по сравне-

нию с мужчинами с нормальным весом. Как показало исследование Национального института наук о гигиене окружающей среды (National Institute of Environmental Health Sciences, США), превышение веса на 20 фунтов (около 9 кг) увеличивает шансы развития бесплодия на 10% [4].

Среди разнообразных причин, вызывающих увеличение ИМТ и ожирение, в последнее время значительное место уделяют феномену развития оксидативного стресса (ОС) [5], который ранее был описан при многих других заболеваниях [6–11]. В результате исследований А. Voulomie и соавт., в 1999 г. было показано, что повышение концентрации лептина у субъектов с ожирением вызывает состояние выраженного ОС [12].

L.I. Kolesnikova, O.A. Vanteeva, N.A. Kurashova, B.Ya. Vlasov

Scientific Center of the Problems of Family Health and Human Reproduction, Irkutsk, Russian Federation

Glutathion as an Important Component of Thiosulfid System of Infertility Pathogenesis in Overweight Men

Aim: to study the glutathionic part of thiosulfid system and oxidative stress in infertile men with different body mass index. **Patients and methods:** examined 60 infertile men with normal and overweight, and 40 healthy men with proven fertility. Active components of the antioxidant defense system of the body was assessed by the level of reduced and oxidized glutathione by the method of PY Hissin, determination of TBA-active products was carried out by the method VB Gavrilova. In the analysis of inter-group differences for independent samples was used parametric Student criterion.

Results: the oxidative stress in obese men was characterized by significant elevation of oxidized form of glutathione (GSSG) in comparison with its reduced form. We discussed our results in the context of GSSG «quantivalence» to numerous of cellular processes in the setting of metabolic disorders in infertile and obese men. The ratio of reduced glutathione to oxidized infertile men decreased by 1,5 times in patients with obesity and 1,2 times in those with normal body mass index. **Conclusions:** Glutathione is the most important link in the study of oxidative stress in men with infertility. Raising the level of oxidized glutathione is due to the presence of his additional functions that are implemented at higher values of body mass index, especially in association with infertility.

Key words: glutathione system, men infertility, body mass index, lipid peroxidation.

На первых рубежах защиты от ОС в клетках всех организмов стоят многочисленные низкомолекулярные компоненты т.н. тиолдисульфидной системы (цистеин и гомоцистеин, эрготионеин, липоевая кислота, кофермент А и другие), общей особенностью которых является присутствие в них сульфгидрильных SH-групп, которые при мягком окислении образуют биотиолы, содержащие дисульфидные -S-S- связи [13]. Важным химическим свойством биотиолов, с которым непосредственно связана их специфическая биологическая активность, является высокая реакционная способность сульфгидрильных групп, обусловленная уникальными особенностями атома серы: легкой поляризуемостью электронов и подвижностью незанятых d-орбиталей, допускающей d-орбитальное замещение. Вследствие этого биотиолы в физиологических условиях легко вступают в разнообразные химические реакции (окисления, алкилирования, меркаптидообразования). Исключительное значение в биологическом плане имеют окислительно-восстановительные превращения тиолов. Необходимо отметить, что уникальные возможности тиолдисульфидной редокс-системы, отражающей наиболее фундаментальные проявления жизнедеятельности, в последние 10–15 лет эффективно используют для развития персонализированной медицины, цель которой состоит в назначении конкретного лекарственного средства больному на основании фармакокинетических и фармакогенных сведений [14].

10

Среди многочисленных компонентов тиолдисульфидной системы наибольший интерес представляет редокс-пара «восстановленный – окисленный глутатион» (GSH – GSSG), содержащаяся во всех компартментах клетки в очень значительных (миллимолярных) концентрациях. Глутатион, наряду с участием в самых разнообразных катаболических и анаболических, транспортных и детоксикационных процессах, выделяется среди других соединений как антиоксидантный буфер чрезвычайно высокой емкости, выполняющий эту функцию при многочисленных заболеваниях у человека [15].

Таким образом, избыточный вес и ожирение, являющиеся фактором риска развития мужской фертильности, ассоциируются с дисбалансом редокс-статуса организма, одним из центральных компонентов которых, а также их своеобразным маркером является состояние глутатионовой системы.

Цель исследования: изучить концентрацию восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитарном цитозате у бесплодных мужчин с разной величиной ИМТ.

Пациенты и методы

Участники исследования

По результатам клинико-лабораторного обследования 60 мужчин с бесплодием были разделены на 2 группы: 1-я группа — с ИМТ 18–25 кг/м² в возрасте 29±0,63 лет (*n* =30); 2-я группа — с ИМТ 25–30 кг/м² в возрасте 27±0,63 лет (*n* =30). Контрольную группу составили практически здоровые мужчины с ИМТ 18–25 кг/м² в возрасте 30±0,69 лет (*n* =40) с доказанной фертильностью на момент исследования.

Методы исследования

Основопологающим методом диагностики мужского бесплодия было исследование эякулята, которое проводилось согласно документу «Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью» (2001), двукрат-

но, с минимальным интервалом 2 нед. В ходе клинического обследования пациентов, состоявших в бесплодном браке, были установлены причины бесплодия согласно рекомендациям экспертов ВОЗ (1993). Чаще других были диагностированы воспаление репродуктивного тракта (67–69% случаев), варикоцеле (10–11%), изолированная патология семенной плазмы (8,32%), необъяснимое бесплодие (6–8%) и эндокринное бесплодие (4–6%).

В качестве материала для исследований использовался гемолизат, приготовленный из эритроцитов. Забор крови проводился из локтевой вены в соответствии с общепринятыми требованиями. Получение информированного согласия на участие в исследовании являлось обязательной процедурой при включении мужчин в одну из групп. В работе с больными были соблюдены этические принципы, предъявляемые Хельсинкской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki; 1964, 2000 ред.).

Активность компонентов антиоксидантной системы защиты организма оценивали по уровню восстановленного и окисленного глутатиона, а также по соотношению GSH/GSSG в эритроцитах. Концентрацию глутатиона определяли по методу P.Y. Hissin (1976), концентрацию выражали в ммоль/л.

Для того чтобы получить информацию об интенсивности одного из важнейших свободнорадикальных процессов — перекисного окисления липидов (ПОЛ), контролируемого системой глутатиона, в сыворотке крови обследуемых определяли содержание ТБК (2-тиобарбитуровая кислота)-реактантов по методу В.Б. Гаврилова (1987), концентрацию которых выражали в мкмоль/л.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ результатов выполняли с применением программы «Statistica 6.1» (Statsoft Inc., США). Данные представлены в виде среднегрупповых значений показателей и среднеквадратичной ошибки ($M \pm m$, где *M* — среднее арифметическое, *m* — ошибка среднего). Для оценки статистически значимых различий полученных данных использовали критерии Стьюдента и Фишера. Различия считали статистически значимыми при *p* ≤ 0,05.

Результаты и обсуждение

Рассматривая представленные в табл. статистические результаты по определению содержания компонентов глутатиона и ТБК-реактантов у бесплодных мужчин с различной величиной ИМТ, следует отметить, что их сочетание соответствует общепринятым представлениям о дисбалансе про- и антиоксидантных факторов, который лежит в основе ОС. Действительно, в группе мужчин с бесплодием отмечается статистически значимое по сравнению с контрольной группой снижение концентрации GSH (антиоксидантный фактор) и повышение содержания ТБК-реактантов (прооксидантный компонент). Более наглядную информацию дает отношение GSH/GSSG, которое при сдвиге редокс-статуса в окислительном направлении в большей или меньшей степени снижается (см. табл.).

Однако если подвергнуть более детальному анализу полученные данные, то оказывается, что у бесплодных мужчин с высоким ИМТ содержание GSH практически не отличается от аналогичного параметра фертильных мужчин с нормальным ИМТ. Важно отметить, что этот феномен наблюдается на фоне повышения содержания

Таблица. Содержание компонентов глутатионовой системы и ТБК-реактантов у бесплодных мужчин в зависимости от величины индекса массы тела, М±m

Показатель	Контрольная группа, М±m (1)	Группа с бесплодием, М±m		p ≤ 0,05
		ИМТ = 18–25 (2)	ИМТ = 25–30 (3)	
GSH, ммоль/л	2,15±0,07	1,82±0,06*	1,72±0,04*	1–2; 1–3
GSSG, ммоль/л	2,11±0,05	2,15±0,08	2,54±0,05*	1–3; 2–3
ТБК-реактанты, мкмоль/л	1,90±0,06	2,36±0,08	2,65±0,05*	1–2; 1–3; 2–3
GSH/GSSG	1,00±0,05	0,85±0,04	0,68±0,04	1–2; 1–3; 2–3

Примечание. * — разница статистически значима (p<0,05).

ТБК-реактантов. Другими словами, восстановленный глутатион не играет существенной роли в возникновении бесплодия у мужчин при повышении ИМТ на фоне активации проокислительных процессов.

Результаты исследования позволяют отметить еще один факт, касающийся концентрации GSSG, измеренной у бесплодных мужчин с разными показателями ИМТ: содержание окисленного компонента статистически значимо превышает соответствующие величины GSH в этих обследованных группах. Повышение концентрации GSSG, которое ранее рассматривалось с точки зрения потенциальной метаболической агрессии [16] и обычно не наблюдалось при других нозологических формах, вероятно, неслучайно и может быть объяснено наличием у окисленного глутатиона дополнительных функций, которые реализуются при повышении ИМТ, особенно в ассоциации с бесплодием.

О такой возможности свидетельствуют результаты исследований, полученные в России и за рубежом. Так, установлено, что GSSG (фармакологический аналог — глутамил-цистеинил-глицин) в концентрациях, близких или превышающих те, что определяются вне клеток, продемонстрировал способность оказывать рецептор-опосредованное Ca²⁺-зависимое влияние на клеточные процессы при ряде заболеваний [17]. Обнаружено модулирующее влияние окисленного глутатиона на регуляцию функций цитокинов и воспалительные процессы [18]. Весьма примечательно, что в ряде случаев проявление иммуномодулирующего и гемопоэтического действия GSSG обусловлено его опосредованным антиоксидантным эффектом [19].

Среди других метаболических эффектов GSSG, которые так или иначе могут иметь отношение к повышению массы тела у мужчин в ассоциации с бесплодием, можно указать на участие трипептида в процессах клеточного сигналинга [20], механизмах формирования лекарственной устойчивости [21], контроле пролиферативной активности [22].

Представленные выше литературные данные со всей очевидностью свидетельствуют о том, что повышение содержания GSSG как одного из компонентов тиолдисульфидной системы не может абсолютно достоверно интерпретироваться с точки зрения развития ОС, который, в свою очередь, включается в патогенез повышения массы тела и развития мужского бесплодия. Вместе с тем такое положение не является исключительным и может быть подтверждено многими классическими примерами. Так, хорошо известно, что аскорбиновая кислота является признанным водорастворимым антиоксидантом, но, с другой стороны, она необходима для синтеза коллагена, транспорта железа и выполнения других функций, т.е. выполняет роль прооксиданта [23]. Таким образом, по важности реализации ее метаболических потенциалов 2 данные ипостаси как минимум равнозначны, а конкретный путь использования аскорбиновой кислоты будет определяться приоритетными метаболическими потребностями в каждый момент времени.

Заключение

Приведенный пример, касающийся и окисленного глутатиона, является прекрасной иллюстрацией отмеченного еще А. Ленинджером факта того, что за счет выполнения молекулами различных функций, число и разнообразие молекул в организме относительно невелико. Все вышеперечисленное заложено в фундаменте молекулярной «рентабельности» живых систем, их пластичности и поразительной способности при адаптации к действию самых разнообразных факторов внутренней и внешней среды.

Исследования выполнены при поддержке гранта Президента РФ НШ-494. 2012.7.

REFERENCES

- Kulakov V.I. *Bесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению*. [Infertile couple. Current approaches to diagnosis and treatment] Moscow: GEOTAR-Media. 2005. 616 p.
- Sukhikh G.T., Bozhedomov V.A. *Muzhskoe бесплодие* [Male Infertility]. Moscow: Eksmo. 2009. 240 p.
- Mel'nichenko G.A., Romantsova T.I. *Ozhirenie* [Obesity]. Pod red. I.I. Dedova, G.A. Mel'nichenko [I.I. Dedov, G.A. Mel'nichenko (editors)]. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agenstvo. 2004. 16–43 p.
- Sallmen M., Sandler D., Hoppin J.A., Blair A., Baird D.D. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology*. 2006; 17 (5): 520–523.
- Fisher-Wellman K.H., Bloomer R.J. Exacerbated postprandial oxidative stress induced by the acute intake of a lipid meal compared to isoenergetically administered carbohydrate, protein, and mixed meals in young, healthy men. *J. Am. Coll. Nutr.* 2010; 29: 373–381.
- Bardymova T.P., Ukhova A.Yu., Darenskaya M.A. Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients with diabetes mellitus. *Sibirskii med. zhurn. (Irkutsk)- The Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2010; 6: 106–108.
- Kolesnikova L.I., Darenskaya M.A., Grebenkina L.A., Osipova E.V., Dolgikh M.I., Bolotova Ts.Ts. Process of lipid peroxidation in women of different ethnic groups with threatened miscarriage. *Byull. VSNTs SO RAMN - Bulletin of Eastern-Siberian Scientific Center of Siberian Department of Russian Academy of Medical Sciences*. 2010; 6 (76 ч. 2): 31–33.
- Kulikov V.Yu., Semenyuk A.V., Kolesnikova L.I. *Perekisnoe okislennie lipidov i kholodovoi faktor* [Lipid peroxidation and cold shock]. Novosibirsk: Nauka. 1988. 192 p.

9. Protopopova N.V., Kolesnikova L.I., Il'in V.P. *Metabolizm i gemodinamika u beremennykh s arterial'noi gipertenziei* [Metabolism and hemodynamics in pregnant women with arterial hypertension]. Novosibirsk: Nauka. 2000. 260 p.
10. Sutura L.V., Kolesnikova L.I. *Osnovnye patogeneticheskie mekhanizmy i metody korrektsii reproduktivnykh narushenii u bol'nykh s gipotalamicheskimi sindromami* [The main pathogenetic mechanisms and methods of reproductive disorders correction in patients with hypothalamic syndromes]. Novosibirsk: Nauka. 2001. 134 p.
11. Kolesnikova L.I., Osipova E.V., Grebenkina L.A. *Okislitel'nyi stress pri reproduktivnykh narusheniyakh endokrinnogo geneza u zhenshchin* [Oxidative stress in women with reproductive endocrine disorders]. Novosibirsk: Nauka. 2011. 116 p.
12. Bouloumie A., Marumo T., Lafontan M., Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.* 1999; 13: 1231–1238.
13. Ghezzi P., Bonetto V., Fratelli M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxidants Redox Signaling.* 2005; 7 (8): 964–972.
14. Volchek I.V., Petrov A.S. The possibility of personalized man therapy: 12-Year Experience. *Terra Medica.* 2010; 3: 3–10.
15. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 2003; 57: 145–157.
16. Kulinskii V.I., Kolesnichenko L.S. The biological role of glutathione. *Uspekhi sovremennoi biologii - Achievements of Modern Biology.* 1990; 110: 20–32.
17. Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G. effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue, glutoxim, on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages. *Tsitologiya - Cytology.* 2008; 50: 452–461.
18. Antonov V.G., Antushevich A.E., Burova E.B. i dr. Possible mechanism of modulating effect of Glutoxim on regulatory effect of cytokines. *Tsitokiny i vospalenie - Cytokines and Inflammation.* 2005; 2: 72–73.
19. Diaz-Montero C.M., Wang Y., Shao L., Feng W. et al. The glutathione disulfide mimetic NOV-002 inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by reducing oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 52: 1560–1568.
20. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I. i dr. The possible involvement of phosphoinositidekinases in action of oxidized glutathione and glutoxim on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages. *Doklady Akademii nauk - Proceedings of the Russian Academy of Sciences.* 2008; 422: 562–563.
21. Bogush T.A., Dudko E.A., Bogush E.A., Kirsanov V.Yu., Antonov V.G. Glutoxim as an inhibitor of multiple drug resistance phenotype associated with Rgr expression. *Antibiotiki i khimioterapiya - Antibiotics and Chemotherapy.* 2010; 55: 5–6.
22. Makhinas G.M., Zhukova G.M. Use of glutoxim in gastric cancer patients receiving platinum-containing chemotherapy. *Onkologiya - Oncology.* 2012; 1: 44–46.
23. Chistyakov V.A. Non-specific defense mechanisms against destructive action of reactive oxygen species. *Uspekhi sovremennoi biologii - Achievements of Modern Biology.* 2008; 3: 300–306.

FOR CORRESPONDENCE

Kolesnikova Lyubov' Il'ichna, PhD, Professor, RAMS academician, Director of the Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences

Address: 664003, Irkutsk, Timiryazeva Street, 16; **tel.:** (3952) 20-76-36, 20-73-67, **e-mail:** iphr@sbamsr.irk.ru

Vanteeva Ol'ga Andreevna, PhD student, Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences

Address: 664003, Irkutsk, Timiryazeva Street, 16; **tel.:** (3952) 20-76-36, **e-mail:** olga_tolpygina@mail.ru

Kurashova Nadezhda Aleksandrovna, PhD, Research Worker, Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences

Address: 664003, Irkutsk, Timiryazeva Street, 16; **tel.:** (3952) 20-76-36, **e-mail:** nakurashova@yandex.ru

Vlasov Boris Yakovlevich, PhD, Professor, Senior Research Worker, Laboratory of Physiology and Pathology of endocrine system, Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences

Address: 664003, Irkutsk, Timiryazeva Street, 16; **tel.:** (3952) 20-76-36, 20-73-67, **e-mail:** iphr@sbamsr.irk.ru