

УДК 577.1:611.013.11/57.042

## ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЯКОСТІ СПЕРМИ ТА ВМІСТУ L-КАРНІТИНУ, ФРУКТОЗИ, ЦИНКУ І АСКОРБАТУ В СІМ'ЯНІЙ РІДИНІ ЧОЛОВІКІВ З РІЗНИХ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ

Кондратова Ю.А., Клепко А.В., Андрейченко С.В.

ДУ "Науковий центр радіаційної медицини АМН України", Київ, Україна

Надійшла до редакції 09.03.2010

Проведені когортні дослідження якості сперми та хімічного складу сім'яної рідини спермодонорів з трьох різних регіонів України, що значно відрізнялись за рівнем радіоактивного забруднення територій. Виявлено існування міжрегіональних кількісних відмінностей в антиоксидантних, енергозабезпечуючих і хроматин-стабілізуючих властивостях сперми. Це проявилось в зниженні вмісту аскорбату, вільного карнітину і цинку в спермальній рідині чоловіків і мало пряму залежність від накопиченої дози радіації. Одночасно в сім'яній плазмі спостерігалось збільшення середніх значень концентрації фруктози, а в спермі – підвищення скорегованого фруктозного рівня. В регіонах із більшою радіоактивною забрудненістю територій було встановлено посилення тенденцій до олігозооспермії і астенозооспермії, а також накопичення морфологічних аномалій і втрати рухливості сперматозоїдами.

**Ключові слова:** сперматозоїди, рухливість, сім'яна рідина, фруктоза, аскорбінова кислота, карнітин, цинк

### ВСТУП

Сім'яна рідина являє собою поживне середовище, в котрому містяться сперматозоїди, а також в деяких випадках лейкоцити та незрілі клітини сперматогенного епітелію. Молекулярні компоненти сім'яної рідини та спермальні клітини продукуються різними компартментами чоловічого репродуктивного тракту. Так, сама рідина виробляється сім'яними пухирцями, а вже потім до неї з ячок транзитом через епідидиміси приєднуються сперматозоїди. Крім того, сім'яні пухирці є головним джерелом постачання до сім'яної рідини фруктози, пролактину та простагландинів. Слід додати, що в невеликих кількостях фруктоза також виробляється і ампулою *ductus deferens*. В той же час, цинк та цитрат походять з простати, хоча самі сперматозоїди також містять цинк. Карнітин, гліцеролфосфохолін та аскорбат, як правило, мають епідидимальне походження [1-3].

Одночасно сім'яна рідина багата на ферменти, серед яких слід відзначити нейтральну  $\alpha$ -глікозидазу з епідидимісів та кислу фосфатазу – з простати. Поява в сім'яній рідині еластази з поліморфоядерних гранулоцитів може вказувати на наявність інфекції в спермальних каналцях ячок [4].

Всі вище перелічені компоненти сім'яної рідини мають не тільки фізіологічне, але й важливе діагностичне значення, оскільки на підставі їх кількісного визначення можна судити про функціонування різних компартментів чоловічого репродуктивного тракту та допоміжних статевих залоз. Так, відомо, що фруктоза є джерелом енергії для рухливості сперматозоїдів. Тому її нестача головним чином пов'язана з появою астенозооспермії

і може опосередковано вказувати на дисфункцію або гіпоплазію сім'яних пухирців, а також закупорку спермального протоку [5, 6].

Цитрат підтримує рН сперми в кислотному діапазоні, а простагландини впливають на скорочення цитоскелету сперматозоїдів та гіперактивацію [7]. Карнітин, або  $\gamma$ -триметиламіно-бета-гідроксибутират, відповідає за транспорт жирних кислот до мітохондрій та, відповідно, за енергопостачання. Доведено, що карнітин проявляє терапевтичний ефект при лікуванні астенозооспермії, олігозооспермії та порушеннях ерекції [8, 9]. В свою чергу, цинк відіграє важливу роль в стабілізації мембран та хроматину сперматозоїдів, а також проявляє суттєву антибактеріальну активність. Нестача цинку в багатьох випадках зумовлює імпотенцію. Аскорбат, або вітамін С, приймає участь у знешкодженні вільних радикалів та запобігає розвитку окиснювального стресу в сперматозоїдах. Вітамін С значно впливає на якість сперми та її запліднюючий потенціал [10, 11].

Встановлено, що низький рівень  $\alpha$ -глікозидази в спермі пов'язаний з дефектами процесу дозрівання сперматозоїдів в епідидимісах. Крім того,  $\alpha$ -глікозидаза та кисла фосфатаза відіграють суттєву роль при заплідненні на етапі просування сперматозоїдів крізь захисні оболонки яйцеклітини [12].

Метою проведеного дослідження було кількісне визначення в спермі фруктози, L-карнітину, аскорбату та цинку, а також встановлення кореляційних зв'язків між вмістом цих речовин в спермі та регіональною приналежністю спермодонорів.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження були проведені на 3 групах добровольців з різних регіонів України, а саме: Івано-Франківської області – 32 чоловіки, Києва та Київської області – 35 чоловік, Житомирської області – 29. Згідно з даними Чорнобильського реєстру середня накопичена доза від радіоактивного опромінення на населення цих регіонів становить 1сЗв, 5 та 10 сЗв, відповідно [13].

Збір сперми проводився шляхом мастурбацій у стерильні пластикові контейнери. Перед цим всі донори мали утримуватися від будь-яких статевих контактів щонайменше 3 дні. Після проведення розрідження зібраної сперми протягом 30 хв при кімнатній температурі, кожний зразок поділяли на 2 частини. Першу частину використовували для мікроскопічного аналізу, визначення концентрації та загальної рухливості сперматозоїдів, а другу – для кількісних біохімічних вимірювань. Всі пацієнти дали письмову згоду на участь у епідеміологічних дослідженнях.

*Мікроскопічний аналіз.* Параметри сперми оцінювали за допомогою світлової мікроскопії на збільшенні  $\times 500$  під мікроскопом “МБИ-6” (Росія) відповідно до протоколу, запропонованого Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) [14]. До уваги брали наступні показники: об'єм еякуляту, розрідженість, колір, запах, рН, концентрацію, присутність округлих клітин, концентрацію сперматозоїдів, прямолінійну рухливість, типовість морфологічних ознак, появу супутніх клітин (лейкоцитів та епітеліальних клітин). Сперматозоїди вважали нормальними, якщо їх структура відповідала визнаним стандартам і не було помічено ніяких дефектів у головці, хвості, шийці та центральній частині. Крім того, головка мала мати овальну форму з чітко окресленою акросомою. При цьому її довжина становить 4,0-5,5 мкм, а товщина – 2,5-3,3 мкм, а їх співвідношення дорівнює 1,5-1,75. За кінетичними характеристиками сперматозоїди поділяли на 4 категорії. До категорії 1 відносили нерухомі клітини; до категорії 2 – мобільні, що не пересувались в просторі, до категорії 3 – клітини, що повільно пересувались у просторі як прямолінійно, так і за допомогою обертання, до категорії 4 – прямолінійно рухомі швидкі сперматозоїди.

Астенозооспермія характеризувала стан пацієнта, коли в його зразку сперми було помічено менше 50% поступально рухливих сперматозоїдів, причому чисельність категорії 4 становила менше 25% загальної кількості сперматозоїдів. Олігозооспермія визначалась як стан, коли концентрація сперматозоїдів в 1 мл еякуляту була не більше  $20 \times 10^6$  клітин. Визначення концентрації клітин у зразках сперми проводили за допомогою камери Горяєва та забарвленням нігрозин-еозином [14]. Про появу лейкоцитів судили на підставі їх здатності реагувати з пероксидазними барвниками. Кількість пероксидазопозитивних клітин визначали загально прийнятою

методикою із застосуванням орто-толуїдину блакитного. В результаті у жодного з донорів не було помічено інфекції статевих шляхів.

*Біохімічний аналіз.* Зразки сперми центрифугували 5 хв при 1000g. Сім'яну плазму після цього відокремлювали від осаду та зберігали при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведення загального аналізу зібраних зразків. Концентрацію фруктози визначали спектрофотометрично за допомогою резорцину на спектрофотометрі “Specol -211” (Німеччина) при довжині хвилі 490 нм.

Концентрацію цинку в сім'яній рідині визначали за допомогою атомно-абсорбційної спектроскопії на приладі Analytik Jena Contr AA300 (Германія). Визначення L-карнітину проводилось за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії на приладі Agilent 1200 (США), що був оснащений ультрафіолетовим детектором. Перед початком хроматографії вільний карнітин перетворювали у реакції з пара-бромфенобромидом (пбб) у ефір, що мав максимум поглинання при 260 нм. Хроматографічне виділення та ідентифікацію пбб-карнітинового ефіру проводили на колонці Lichrospher  $\text{SiO}_2$  (200 $\times$ 4,6 мм) відповідно до протоколу [15].

Аскорбат також визначали методом вискоєфективної рідинної хроматографії. Для цього зразки сім'яної рідини, що були попередньо очищені від клітин, розводили 100%-ним метанолом у співвідношенні 1:9 і розмішували на “Vortex”. Після центрифугування при 10000g протягом 3 хв охолоджену до  $-20^{\circ}\text{C}$  аліквоту супернатанту вводили у хроматографічну систему. Використовували колонку Spherisorb 18 (150 $\times$ 4,6 мм) та мобільну фазу, що складалася з 2,5% оцтової кислоти та 80% метанолу у бідистильованій воді [16].

*Статистичний аналіз.* Порівняння даних для різних груп донорів проводили із застосуванням дисперсійного аналізу “ANOVA” та непарного тесту Стьюдента з поправкою Бонфероні. Довірчі інтервали для середніх значень визначали за допомогою t-критерію при  $p=0,95$  на підставі підрахунку стандартної похибки. Основу статистичної обробки складали двобічні криві розподілу випадкових даних. Відмінності вважали статистично значущими при  $p<0,05$  [17].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В табл.1 представлені результати визначення кількісного вмісту фруктози, вільного карнітину, аскорбату і цинку в сім'яній плазмі чоловіків з 3-ох різних за рівнем радіоактивного забруднення регіонів України. Як виявилось, концентрація цинку мала найменше значення у чоловіків з Житомирської області, а найбільше – з Івано-Франківської. В Києві та Київській області вміст цинку в зразках був вищий ніж в Житомирській області, але порівняно зі зразками з Івано-Франківської області статистично достовірних відмінностей знайти не вдалося.

Концентрація аскорбату в спермальній рідині суттєво відрізнялась для зразків з Житомирської області порівняно з Київською та Івано-Франківською, де цей показник більш ніж на 30% був менший. Вміст вільного L-карнітину в сім'яній плазмі виявився найбільшим для зразків з Івано-Франківської області, тоді як в Київському та Житомирському регіонах цей показник був відповідно на 27% та 37% нижчим. Для двох останніх регіонів статистично достовірних відмінностей знайдено не біло. Концентрація фруктози в сім'яній плазмі за середніми значеннями була найбільшою в Житомирській області, а найменшою – в Івано-Франківській. Однак на статистичному рівні відмінностей тут встановлено не було.

Оцінка рівня фруктози в спермі проводилася за різними показниками, що враховували: 1) загальну концентрацію рухливих сперматозоїдів, 2) наявність лише поступально рухливих сперматозоїдів, 3) концентрацію швидко прямолінійно рухливих сперматозоїдів, 4) загальну концентрацію

сперматозоїдів. Результати дослідження показали (табл.2), що сперма чоловіків з Житомирської області мала найбільше значення всіх чотирьох показників, тоді як для Івано-Франківської області ці показники були найменшими. В Київському регіоні рівень фруктози в спермі показав проміжні значення.

Зростання рівня фруктози в спермі за даними літератури [18, 19] може вказувати на тенденцію до появи астенозооспермії, олігозооспермії та олігоастенозооспермії. Дійсно, найбільшого прояву ці явища мали у чоловіків з Житомирської області, а найменшого – з Івано-Франківської (табл.3), що свідчить про існування зворотної залежності між якістю сперми та накопиченою дозою радіації. В цьому зв'язку, важливо відзначити, що рухливість та морфологічна повноцінність сперматозоїдів поступово знижувались при переході від Івано-Франківського регіону до Київського, а потім до Житомирського. Одночасно, зменшувався об'єм еякуляту та концентрація сперматозоїдів в спермі чоловіків-донорів (див. табл.3).

Таблиця 1.

**Кількісні особливості хімічного складу сім'яної рідини сперми чоловіків в залежності від місця їх проживання**

Назва речовини	Назва регіону та кількість донорів (n)		
	Київ та Київська обл. n = 35	Житомирська обл. n = 29	Івано-Франківська обл. n = 27
Фруктоза, мг/мл	2,05 ± 0,37	2,40 ± 0,32	1,90 ± 0,38
L-Карнітин, мкмоль/л	270,84 ± 28,05*	230,42 ± 24,25*	368,33 ± 37,12
Аскорбінова кислота, мкмоль/л	420,68 ± 31,77	300,78 ± 35,43*	439,84 ± 39,33
Цинк, мг/л	138,74 ± 12,28**	98,37 ± 8,94*	159,64 ± 11,55

\* - вірогідні відмінності з Івано-Франківською обл.; \*\* - вірогідні відмінності з Житомирською обл.

Таблиця 2.

**Оцінка рівня фруктози в спермі чоловіків в залежності від регіону їх проживання**

№	Показник	Івано-Франківська обл.	Київ та Київська обл.	Житомирська обл.
1	[Ф] × lg[кат. 4+3+2]	14,86	15,74	17,64
2	[Ф] × lg[кат. 4+3]	14,52	15,33	17,33
3	[Ф] × lg[кат. 4]	13,93	14,72	16,34
4	[Ф] × lg[кат. 4+3+2+1]	15,07	16,05	18,02

[Ф] – концентрація фруктози в спермальній рідині (мг/мл); [кат.] – кількість сперматозоїдів відповідної категорії

Таблиця 3.

**Міжрегіональні кількісні відмінності в показниках спермограми**

Ознака	Київ та Київська обл.	Житомирська обл.	Івано-Франківська обл.
Об'єм еякуляту	2,20 ± 0,40* **	1,70 ± 0,34	3,05 ± 0,45*
Концентрація сперматозоїдів (×10 <sup>6</sup> /мл)	68,10 ± 7,30* **	35,80 ± 4,25	85,20 ± 5,45*
Рухливі сперматозоїди (кат. 4)	22 ± 2	18 ± 3	25 ± 2*
Рухливі сперматозоїди (кат. 3+4)	44 ± 3*	37 ± 1	51 ± 4*
Нерухливі сперматозоїди (кат. 1)	30 ± 3*	38 ± 2	23 ± 4*
Морфологічно-аномальні сперматозоїди (%)	34 ± 2*	42 ± 4	27 ± 3*
Астенозооспермія (%)	14	24	7
Олігозооспермія (%)	9	14	4
Олігоастенозооспермія (%)	6	3	0

\* - вірогідні відмінності з Івано-Франківською обл.; \*\* - вірогідні відмінності з Житомирською обл.

**ВИСНОВКИ**

1. В регіонах з підвищеним рівнем радіоактивного забруднення, зокрема Житомирській області було встановлено пригнічення антиоксидантних, енергозабезпечуючих та хроматин-стабілізуючих властивостей сперми, що

корелювало зі зменшенням вмісту аскорбату, вільного карнітину та цинку, відповідно, у сім'яній плазмі спермодонорів порівняно з регіонами з малою та помірною радіоактивною забрудненістю, а саме Івано-Франківським та Київським.

2. Збільшення середньої накопиченої дози на населення регіону проживання спермодонорів прямим чином корелювало зі зростанням тенденцій до прояву астенозооспермії, олігозооспермії та збільшенням скорегованого фруктозного рівня в спермі.
3. Проведені когортні дослідження показали, що зростання рівня радіоактивності в регіоні прямо позначається на якості сперми, оскільки призводить до накопичення морфологічних аномалій в сперматозоїдах, кількісних змінах в чисельності нерухомих та рухливих субпопуляцій сперматозоїдів, а також зменшенні об'єму еякуляту та загальної кількості сперматозоїдів.
8. *Cavallini G., Modenini F., Vitali G., Koverech A.* Acetyl-L-carnitine plus propionyl-L-carnitine improve efficacy of sildenafil in treatment of erectile dysfunction after bilateral nerve-sparing radical retropubic prostatectomy // *Urology.* – 2005. – Vol.66, No 5. – P. 1080-1085.
9. *Vicari F., La Vignera S., Calogero A.E.* Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculopidymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol.78, No6. – P. 1203-1208.
10. *Thiele J.J., Freisleben H.J., Fuchs J., Ochsendorf F.R.* Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: detection and interrelationship with chemiluminescence's in washed semen // *Hum. Reprod.* – 1995. – Vol.10. – P. 110-115.
11. *Smith R., Vantman D., Ponce J., Escobar J., Lissi E.* Total antioxidant capacity of human seminal plasma // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol.11. – P. 1655-1660.
12. *Hardy D.M.* Fertilization. – N.Y.: Academic Press 2002. – 430 p.
13. *Ліхтарьов І.А., Бебеуко В.Г.* Дозиметрія та радіаційна гігієна // Бюлетень Наукового центру радіаційної медицини АМН України. – 2005. – Вип.5. – С. 5-10.
14. *World Health Organization.* WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5<sup>th</sup> editor. – Geneva: WHO Press, 2010. – 286p.
15. *Li K., Li W., Huang Y.* Determination of free L-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility // *Clinica Chimica Acta.* – 2007. – Vol.378. – P. 159-163.
16. *Colagar A.H., Marzony E.T.* Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2009. – Vol.45. – P. 144-149.
17. *Bland M.* An introduction to medical statistics. 3<sup>rd</sup> editor. – Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. – 405p.
18. *Zopfgen A., Priem F., Sudhoff F. et al.* Relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population // *Human Reproduction.* – 2000. – Vol.15, No 4. – P.840-845.
19. *Gonzales G.F., Villena A.* Influence of low corrected seminal fructose levels on sperm chromatin stability in semen from men attending an infertility service // *Fertil. Steril.* – 1997. – Vol.67, No 4. – P. 763-768.

### Література

1. *Aumuller G, Riva A.* Morphology and function of the human seminal vesicle // *Andrologia.* – 1992. – Vol.24. – P.183-196.
2. *Copper T.G., Yeung C-H., Nashan D., Neischlag E.* Epididymal markers in human infertility // *J. Androl.* – 1988. – Vol.9. – P.91-101.
3. *Jeyendran R.S., van der Ven H.H., Rosecrans R. et al.* Chemical constituents of human seminal plasma: relationship to fertility // *Andrologia.* – 1989. – Vol.24. – P.181-194.
4. *Reinhardt A., Haidl G., Schill W.-B.* Granulocyte elastase indicates male genital tract inflammation and appropriate anti-inflammatory treatment // *Andrologia.* – 1997. – Vol.24. – P.187-192.
5. *Lewis-Jones D. L., Aird I. A., Biljan M. M., Kingsland C. R.* Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma // *Human Reproduction.* – 1996. – Vol. 11, No 11. – P. 2465-2467.
6. *Gonzales G. F., Villena A.* True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men // *Int. J Androl.* – 2001. – Vol. 24. – P. 255-260.
7. *Gottlieb C., Svanborg K., Eneroth P., Bygdeman M.* Effect of prostaglandins on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphosphate content // *Fertil. Steril.* – 1988. – Vol. 49. – P. 322-327.

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАЧЕСТВА СПЕРМЫ И СОДЕРЖАНИЯ L-КАРНИТИНА, ФРУКТОЗЫ, ЦИНКА И АСКОРБАТА В СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЕ МУЖЧИН С РАЗНЫХ РЕГИОНОВ УКРАИНЫ

Кондратова Ю.А., Клепко А.В., Андрейченко С.В.

Проведенные когортные исследования качества спермы и химического состава семенной плазмы сперматозоидов в трех разных регионах Украины, которые значительно отличались по уровню радиоактивного загрязнения территорий. Обнаружено существование межрегиональных количественных отличий в антиоксидантных, энергообеспечивающих и хроматин-стабилизирующих свойствах спермы. Это проявилось в уменьшении содержания аскорбата, свободного карнитина и цинка в семенной плазме мужчин в прямой зависимости от накопленной дозы радиации. Одновременно в семенной плазме наблюдалось уменьшение средних значений концентрации фруктозы, а в сперме – возрастание скорректированного фруктозного уровня. В регионах с большей радиоактивной загрязненностью территорий было установлено усиление тенденций к проявлению олигозооспермии и астенозооспермии, что сопровождалось накоплением морфологических аномалий и потерей двигательных свойств сперматозоидами.

**Ключевые слова:** сперматозоиды, подвижность, семенная жидкость, фруктоза, аскорбиновая кислота, карнитин, цинк

**COMPARATIVE ANALYSIS OF SEMEN QUALITY ALONG WITH L-CARNITINE, FRUCTOSE, ZINC AND ASCORBATE CONTENTS IN SEMINAL PLASMA OF MEN FROM DIFFERENT REGIONS OF UKRAINE****Kondratova Yu.A., Klepko A.V., Andreychenko S.V.**

The comparative studies of semen quality and chemical contents of seminal plasma have been carried out on 3 cohorts of sperm donors – volunteers from 3 regions of Ukraine, which showed up different levels of radiation pollution for their territories. The research has established the existence of variabilities in antioxidative, energy supplying and chromatin stabilizing properties of sperm that manifested in the abatement of ascorbate, free carnitine and zinc contents in seminal plasma of men in direct dependence on the accumulated radiation dose. Yet, seminal fructose means along with the corrected fructose level in sperm increased. On the territories with high radiation pollution the tendency for oligozoospermia and astenoospermia were shown to enhance that was accompanied by the accumulation of morphologic anomalies and loss of motility by spermatozoa.

**Key words:** sperm, motility, semen plasma, fructose, ascorbic acid, carnitine, zinc

---