

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ ВЕЩЕСТВ В СПЕРМАТОЗОИДАХ И СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ НА АМИНОКИСЛОТНОМ АНАЛИЗАТОРЕ

Ион МЕРЕУЦА, Галина ПОСТОЛАТИ

Институт физиологии и санокреатологии АН Молдовы

Центр метрологии и аналитических методов исследования АН Молдовы

Reproducția populației este o problemă importantă și actuală în Europa, fiind determinată de fertilitatea spermei bărbatului. Spermograma este o metodă de laborator pe larg răspândită, care poate fi suplimentată cu indicii metabolismului azotat.

Au fost selecționate condițiile recoltării probelor de spermă a bărbaților tineri, de asemenea parametrii tehnici de divizare a amestecurilor de aminoacizi în probele de plasmă seminală și spermatozoizi, în coloana cromatografică. Pentru prima dată este demonstrat un spectru complet al poolului de aminoacizi liberi în spermatozoizii și plasma seminală de om.

The reproduction of population is an important problem for the states of Europe. This problem in particular is conditioned by men fertility. The spermogramme is widespread laboratory research, which may be completed with nitrogen metabolism indexes.

In the paper there are selected the technical conditions for young men probes preparation and parameters technical of amino acids mixtures in probe of sperm plasma and spermatozooids division at chromatography column. There are revealed free amino acids pool in the in the seminal plasma and spermatozoon of young healthy men.

В современных условиях при снижении рождаемости возможность каждой семьи иметь ребенка является важной как для общества в целом, так и для благополучия отдельного человека. Известно, что около 15% супружеских пар страдают бесплодием, причем треть случаев обусловлена мужским бесплодием. Нарушения функции гонад достигают 21% причин бесплодия у мужчин [4]. По наблюдениям ряда авторов, качество спермы за последние десятилетия меняется, что заключается в уменьшении концентрации и подвижности сперматозоидов [7].

Спермограмма является распространенным лабораторным исследованием состояния репродуктивной системы мужчин [8], однако большой межлабораторный разброс в получаемых результатах снижает диагностическую ценность исследования [6, 7].

Сперма, или эякулят, является смесью выделяемых во время эякуляции продуктов секреции мужских половых органов (яичек и их придатков, предстательной железы, семенных пузырьков, куперовых желез, уретры) и состоит из жидкости семенных пузырьков (65%), жидкости простаты (30%), сперматозоидов (5%) [9].

Сперма взрослого мужчины представляет собой липко-вязкую слизеподобную неоднородную и непрозрачную жидкость с характерным запахом сырого каштана (очень легкий запах хлора). Вкус спермы определяется характером питания и обычно слегка сладкосолёный с кислым или горьким привкусом. Отмечено, что при частых эякуляциях сперма становится менее сладкой и усиливается привкус горечи. В течение 20-30 секунд сперма разжижается, становится гомогенной, вязкой и имеет непрозрачный беловато-серый цвет. Количество её индивидуально и может колебаться от 1-2 до 10 мл и более. Средний объем спермы, при условии, что эякуляция происходит с 3-дневными перерывами, составляет от 3 до 5 мл. Количество спермы может колебаться в зависимости от возраста, состояния здоровья, количества выпитой жидкости и так далее. Как показывает практика, большой объём спермы ещё не означает её более высокой оплодотворяющей способности, а иногда взаимосвязан с частыми выкидышами у женщины. Количество эякулята зависит также от частоты семяизвержений. В целом оплодотворяющую способность спермы характеризует не её объём, а количество сперматозоидов в 1 мл спермы, которое в норме составляет 60-120 млн. При этом подвижные сперматозоиды должны составлять не менее 70% от их общего количества. Нижней границей нормы (по данным ВОЗ) принято считать не менее 20 млн. сперматозоидов в 1 мл [7].

Сперма состоит из двух отдельных частей: семенной плазмы, образующейся в основном из секреции предстательной железы и незначительных выделений яичек, их придатков и протоков семенной железы, и из форменных элементов (сперматозоидов, или первичных половых клеток яичек).

Семенная плазма отличается особенностью состава, заключающейся в наличии большого количества специфических химических веществ и составляющих, присутствие которых обнаруживается и в других жидкостях и тканях организма, но в значительно меньшем объеме, чем в семенной жидкости. Состав семенной плазмы комплексный: она содержит значительное количество белков, жиров и углеводов, а также ряд ферментов, гормонов и прочих веществ.

Иммунологические исследования выявили в семенной жидкости наличие специфических белковых соединений из предстательной железы и семенных пузырьков. После семяизвержения протеины быстро разрушаются в аминокислоты под воздействием протеолитических ферментов, весьма активных в семенной плазме [7, 8]. В семенной жидкости, в количественно нисходящем порядке, содержатся следующие выделяемые белками основные аминокислоты: глутаминовая кислота, лизин, серин, гистидин, аспарагиновая кислота, лейцин, изолейцин, глицин и тирозин [2]. Помимо белков и аминокислот в сперме содержатся свободные амины – спермин и спермидин, причем последний присутствует в большом количестве (30 – 366 мкг/мл). Доля альбумина в спермальной плазме не превышает 10% от уровня общего белка. В спермальной плазме концентрация общего белка $35,0 \pm 5,2$ г/л, мочевины $21,0 \pm 3,5$ ммоль/л, креатинина $583,0 \pm 87,0$ ммоль/л. Наличие свободного креатина отмечено в большой концентрации и составляет характерную составную часть семенной жидкости [6].

Для оценки состояния мужской репродуктивной системы недостаточны сведения о количественном и качественном составе сперматозоидов [5]. Целесообразно изучение показателей метаболизма в спермальной плазме и сперматозоидах. К числу перспективных направлений диагностики мужской фертильности относятся дополнительные исследования состояния сперматозоидов и компонентов семенной плазмы, отражающих состояние спермато- и спермиогенеза, в том числе азотсодержащих веществ, включающих такие показатели азотистого обмена, как аминокислоты, мочевина и аммиак. В доступной литературе удалось найти значения только некоторых таких показателей [6]. Так, в сперматозоидах уровень общего белка составил $82,7 \pm 7,4$ г/л, альбумина – $27,0 \pm 4,3$ г/л, что составляет 33% от уровня общего белка. В спермальной плазме концентрация общего белка $35,0 \pm 5,2$ г/л, мочевины – $21,0 \pm 3,5$ ммоль/л, креатинина – $583,0 \pm 87,0$ ммоль/л.

Продукты катаболизма белков – мочевина и креатинин – присутствуют в сперматозоидах в концентрациях на порядок меньших, чем в спермальной плазме. Концентрация мочевины в сперматозоидах составляет $1,7 \pm 0,07$ ммоль/л, креатинина – $29,7 \pm 1,8$ ммоль/л.

Показано [2] относительное постоянство спектра свободных аминокислот в семенной жидкости. Установлена также [3] возрастная динамика содержания свободных аминокислот в сперме. Показаны корреляционные связи содержания аминокислот и качества спермопродукции [1]. Потребление пищи, бедной аргинином, может вести к нарушению сперматогенеза [10].

Все изложенное подтверждает необходимость наличия в арсенале современной медицины биохимического анализа, выявляющего особенности содержания продуктов азотистого обмена в сперме.

В лаборатории жидкостной хроматографии ЦМАМИ в содружестве с Институтом физиологии и санокреатологии были подобраны технические условия для анализа свободных аминокислот в плазме спермы и сперматозоидах.

Отбор пробы для анализа

Для сдачи спермы на анализ необходимо соблюдать следующие требования. Следует воздерживаться от половой жизни и мастурбации 4-5 суток, важно также, чтобы в этот период не было поллюций. В дни воздержания нельзя употреблять алкоголь (даже пиво), лекарственные препараты, париться, принимать ванну (мыться желательно под душем). Сперму лучше получать в лаборатории путем мастурбации или прерванного полового акта. Нельзя получать сперму в презерватив, так как от соприкосновения с резиной и веществами, которыми обработан презерватив, сперматозоиды теряют свою подвижность и умирают. Следует избегать переохлаждения спермы или попадания на нее прямых солнечных лучей. Очень важно, чтобы вся выброшенная при эякуляции сперма в полном объеме попала в лабораторную посуду. Потеря хотя бы одной порции (особенно первой) может значительно исказить результат исследования. Выполнение всех этих требований поможет избежать ошибок в показателях спермограммы.

Нормальный эякулят (нормоспермия), обладающий оплодотворяющей способностью, должен удовлетворять следующим требованиям:

- объем 3-4 мл,
- количество сперматозоидов в 1 мл – 60-120 млн.

Анализ литературы показывает, что у фертильных мужчин отмечается незначительная олигоспермия – 3,3%, или гипокиноспермия – 7,7 %; у обследованных по поводу бесплодия объем эякулята как снижен (менее 1,5 мл в 7,2% случаев), так и увеличен (свыше 5 мл – 12% случаев) [7].

Подготовка образца

Хранение нативной спермы в течение 3 месяцев при -20°C приводит к повышению концентрации свободных аминокислот в плазме более чем в 2 раза, тогда как продолжительное хранение безбелковых экстрактов при этой же температуре не вызывает изменений в содержании аминокислот.

Отобранную сперму переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют при 10000 об/мин в течение 20 мин.

Семенную плазму (супернатант) количественно (1 мл) переносят в другую центрифужную пробирку и депротеинизируют равным по объему 6% раствором сульфосалициловой кислоты. Перемешивают, оставляют на 1 час в холодильнике и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. До анализа хранят при низкой температуре. Кислоту испаряют в вакуумном роторном испарителе при 40°C, промывают супернатант дистиллированной водой до pH 2,2. Возможно непосредственное нанесение неотогнанного супернатанта на хроматографическую колонку.

Сперматозоиды. Находящиеся в осадке сперматозоиды количественно (3-30 мг) растирают с 1 мл 6% сульфосалициловой кислоты и центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 мин. Кислоту испаряют в вакуумном роторном испарителе при 40°C, промывают супернатант дистиллированной водой до pH 2,2. Сухой осадок перерастворяют в стартовом литиевом буфере pH 2,2 (1,0 мл). Проба хранится в холодильнике.

Анализ проводится в стандартном режиме определения свободных аминокислот с использованием литиевых буферов pH 2,90, 2,95, 3,20, 3,80 и 5,00, проточность 12,0 мл/час.

В данной работе исследовались показатели спермограммы 10 здоровых мужчин в возрасте 20-30 лет с нормальной спермопродукцией.

Показатели спермограммы обследованных мужчин на 90% соответствовали критериям нормы, сформулированным экспертами ВОЗ: объем эякулята – от 2 до 5,5 мл, концентрация сперматозоидов от 15 до 190 млн/мл (у половины мужчин свыше 90 млн/мл), среди них подвижных сперматозоидов – от 36 до 68%, в среднем 52,2±9,9 %.

Нами выявлено среднее содержание свободных аминокислот в семенной жидкости и сперматозоидах человека. Полученные результаты отражены в таблице.

Таблица

Содержание продуктов азотистого обмена (мкмоль/100 мл) в сперме человека

Названия аминокислот	Семенная плазма	Сперматозоиды
цистеиновая кислота	30,80±1,77	0,20±0,02
таурин	265,90±22,32	1,20±0,10
аспарагиновая кислота	146,60±5,35	0,50±0,03
треонин	182,10±6,98	0,40±0,02
серин	527,00±26,79	1,20±0,08
аспарагин	253,30±7,51	0,30±0,02
глутаминовая кислота	415,70±14,61	1,00±0,05
глутамин	312,10±13,35	0,50±0,02
пролин	106,30±4,23	1,10±0,09
глицин	195,10±5,38	1,10±0,08
аланин	106,00±3,90	0,50±0,03
цитруллин	14,70±0,91	0,10±0,03
α-аминомасляная кислота	24,60±1,40	0,10±0,02
валин	149,10±4,20	0,60±0,04
цистин	51,60±2,96	0,40±0,03
метионин	17,60±1,27	0,02±0,01
цистатионин	0,30±0,02	0,04±0,04

Названия аминокислот	Семенная плазма	Сперматозоиды
изолейцин	139,70±4,78	0,30±0,01
лейцин	194,70±6,91	0,30±0,02
тирозин	198,40±7,11	0,40±0,02
фенилаланин	76,00±2,71	0,30±0,01
γ-аминомасляная кислота	51,40±3,63	0,10±0,003
этаноламин	56,00±2,98	0,70±0,04
орнитин	8,30±0,50	0,20±0,01
лизин	228,30±7,55	0,70±0,05
гистидин	180,60±8,09	0,50±0,03
аргинин	182,80±6,72	0,90±0,05
мочевина	635,30±34,64	2,10±0,03
аммиак	147,30±9,06	4,10±0,37
Σ свободных АК	4203,20±135,32	13,60±0,95
Σ показателей азотистого обмена	4985,70±170,90	19,70±1,29
Σ протеиногенных АК	2501,00±65,10	9,90±0,79
Σ незаменимых АК	1492,00±38,24	6,50±0,51
Σ заменимых АК	1837,60±65,52	4,20±0,26
Σ гликогенных АК	1394,10±44,04	4,30±0,32
Σ кетогенных АК	837,20±28,58	2,00±0,13
Σ серосодержащих АК	3414,40±142,53	4,10±0,08
Σ иммуноактивных АК	595,20±24,43	4,00±0,37

Таким образом, в семенной плазме основную часть свободных аминокислот (81,2%) составляют серосодержащие и заменимые (35,5%) аминокислоты. В то же время в сперматозоидах доля этих групп аминокислот среди показателей азотистого обмена составляет 30,1% и 47,8% соответственно.

Прослеживается корреляционная связь между показателями обмена в сперматозоидах и их концентрацией. Анализ литературы показывает, что у фертильных мужчин отмечается незначительная олигоспермия – 3,3%, или гипокиноспермия – 7,7%; у обследованных по поводу бесплодия объем эякулята как снижен (менее 1,5 мл - в 7,2% случаев), так и увеличен (свыше 5 мл - в 12% случаев) [7].

Анализ литературных данных показывает плодотворность и возможную диагностическую ценность анализа содержания свободных аминокислот спермы для определения качества спермопродукции.

Следует отметить, что не всегда отклонение данных характеристик в ту или иную сторону является признаком заболевания. Только комплексная оценка полученных данных и их взаимосвязей позволяет установить оплодотворяющую способность мужчины. При этом спермограмма может быть использована не только для выявления бесплодия, но и дает возможность оценить и другие патологические отклонения в состоянии здоровья мужчины [6].

Выводы:

1. Применение подобранных технических условий позволяет осуществлять анализ свободных аминокислот спермальной плазмы и сперматозоидов на анализаторе аминокислот ААА-339М.
2. Спермальная плазма и сперматозоиды имеют характерный профиль свободных аминокислот.
3. Спермограмма, дополненная показателями азотистого обмена в сперме, может быть использована для выявления фертильности мужчин, что повысит ее диагностическую ценность.

Литература:

1. Джарбусынов Б.У., Шамкенов Б.И. Значение свободных аминокислот спермы при мужском бесплодии // Ж.урол. и нефрол. - 1981. - №4. - С.44-47.
2. Зайцев В.В. О постоянстве спектра свободных аминокислот и неорганических элементов семенной жидкости человека: Тр. 2-го Моск.мед. ин-та. - Москва, 1978. - 109. - №2. - С.90-93.
3. Кадишь В.О. Формирование воспроизведенной способности у бугаев-плодников абердин-ангуськой породы // Автореф. дисс.канд.с.-х. наук. - Киев: УААН, 2001.

4. Казаков В.Ф., Серебряков В.Г., Козляткин В.А.Ю. и др. Нарушения белкового обмена у жителей экологически неблагоприятного региона // Материалы VI Междунар. Конгресса «Экология и здоровье человека». - Самара, 1999, с.100-101.
5. Козляткин А.Ю., Комарова Н.В. Оценка семенной жидкости в диагностике мужского бесплодия // Самарскому гос. мед. университету 80 лет. - Самара, 1999, с.121.
6. Комарова М.В., Торопова Н.Е. Определение спермограммы при бесплодном браке // Современная диагностика в практике здравоохранения. - Самара, 1995, с.104-106.
7. Комарова М.В. Характеристика эякулята в оценке репродуктивных возможностей человека: Дисс.канд.биол.н. - Уфа, 2000.
8. Фанченко Н.Д. Лабораторная диагностика нарушений центральной регуляции репродуктивной системы // Пробл. репродукции. - 1995. - №1. - С.100-103.
9. Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии: В 3-х томах. - Москва: Мир. - 1978 с.
10. Van der Host C.J., Elgersma A., De Boer M.J. a.oth., Some biochemical parameters for qualification of bull semen // Tijdschr. Diergeneesk. - 1979. - 104. - №8. - P.97-108.

Prezentat la 10.12.2007