

© ВАВИЛОВ Н.В., ГОДОВАЛОВ А.П., 2023

Вавилов Н.В., Годовалов А.П.

ОПЫТ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ОКИСЛЕННО МОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ В СПЕРМАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, г. Пермь, Россия

Среди причин мужского бесплодия достаточно внимания уделяется окислительному стрессу, который, в свою очередь, является патогенетическим звеном воспалительного процесса. Однако подходы к определению окисленно модифицированных белков (ОМБ) не адаптированы при использовании биологических материалов, кроме сыворотки периферической крови. Цель исследования – изучить уровень окисленно модифицированных белков в спермальной жидкости практически здоровых мужчин. В исследовании использовали 54 образца эякулята от практически здоровых мужчин, у которых отсутствовал рост микроорганизмов на питательных средах. У всех добровольцев получали пробы сыворотки периферической крови. В исследовании использовали два варианта методики определения ОМБ. В первом случае образцы предварительно обрабатывали 10% раствором сульфата стрептомицина для осаждения нуклеиновых кислот и свободных аминокислот. Во втором случае не проводили инкубацию образцов с раствором сульфата стрептомицина, а сразу переходили к исследованию нативного эякулята. Определение уровня ОМБ проводили с помощью 0,1 М раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Образовавшиеся 2,4-динитрофенилгидразоны (ДНФ) регистрировали при 365 нм для оценки кетон-ДНФ нейтрального характера, при 432 нм – кетон-ДНФ основного характера и при 530 нм – альдегид-ДНФ нейтрального характера. При определении содержания карбониллов использовали молярный коэффициент поглощения, равный $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка исследуемой биологической жидкости. Для определения концентрации белка использовали биуретовый метод (Вектор-Бест, Новосибирск). Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и *t*-критерия Стьюдента для парных данных. Суммарная концентрация ОМБ в нативной спермальной жидкости, не обработанной сульфатом стрептомицина, составила $3,6 \pm 0,4$ нмоль/мг белка, после её обработки сульфатом стрептомицина – $0,6 \pm 0,1$ нмоль/мг общего белка ($p < 0,05$). При этом в спермальной жидкости практически здоровых добровольцев преобладают кетоновые производные, что может быть обусловлено длительно действующими факторами. Предложен удобный в использовании в большинстве лабораторий способ для нивелирования неспецифического окрашивания при определении окисленно модифицированных белков в спермальной жидкости.

Ключевые слова: окисленно модифицированные белки; спермальная жидкость; динитрофенилгидразин; альдегидные производные; кетоновые производные.

Для цитирования: Вавилов Н.В., Годовалов А.П. Опыт определения уровня окисленно модифицированных белков в спермальной жидкости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (8): 460-463.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-8-460-463>.

Для корреспонденции: Годовалов Анатолий Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ЦНИЛ; e-mail: AGodovalov@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 09.04.2023

Принята к печати 21.04.2023

Опубликовано 01.08.2023

Vavilov N.V., Godovalov A.P.

EXPERIENCE OF DETERMINING THE LEVEL OF OXIDIZED MODIFIED PROTEINS IN SEMENAL FLUID

E.A. Vagner Perm State Medical University, Russia

Among the causes of male infertility, enough attention is paid to oxidative stress, which in turn is a pathogenetic link in the inflammatory process. However, approaches to the determination of oxidized modified proteins are not adapted for use when using biological materials other than peripheral blood serum. The aim of investigation was to study the level of oxidized modified proteins in the sperm fluid of healthy men. 54 ejaculate samples from apparently healthy men who did not grow microorganisms on nutrient media were observed. All volunteers received peripheral blood serum samples. Two variants of the method for determining the oxidized modified proteins were used. In the first case, the samples were pre-treated with a 10% streptomycin sulfate solution to precipitate nucleic acids and free amino acids. In the second case, the samples were not incubated with a solution of streptomycin sulfate, but immediately proceeded to the study of native ejaculate. Determination of the level of oxidized modified proteins was carried out using a 0.1M solution of dinitrophenylhydrazine. The resulting 2,4-dinitrophenylhydrazones (DNP) were recorded at 365 nm to assess neutral ketone-DNP, at 432 nm – basic ketone-DNP, and at 530 nm – neutral aldehyde-DNP. When determining the carbonyl content, a molar absorption coefficient of $22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ was used. The concentration of oxidized proteins was expressed in nmol/mg of the total protein of the studied biological fluid. The protein concentration was determined using the biuret method (Vector-Best, Russia). Statistical analysis of the results was performed using descriptive statistics and Student's *t*-test for paired data. The total concentration of oxidized modified proteins in native spermal fluid not treated with streptomycin sulfate was 3.6 ± 0.4 nmol/mg of protein, after treatment with streptomycin sulfate it was 0.6 ± 0.1 nmol/mg of total protein ($p < 0.05$). At the same time, ketone derivatives predominate in the semen of practically healthy volunteers, which may be due to long-acting factors. A method convenient for use in most laboratories for leveling non-specific staining in the determination of oxidized proteins in

semen has been proposed.

Key words: oxidized proteins; semen; dinitrophenylhydrazine; aldehyde derivatives; ketone derivatives.

For citation: Vavilov N.V., Godovalov A.P. Experience of determining the level of oxidized modified proteins in seminal fluid. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (8): 460-463 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-8-460-463>.

For correspondence: *Godovalov A.P.*; e-mail: AGodovalov@gmail.com

Information about authors:

Vavilov N.V., <https://orcid.org/0000-0003-4765-9702>;

Godovalov A.P., <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>.

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 09.04.2023

Accepted 21.04.2023

Published 01.08.2023

Введение. В последнее время в многочисленных исследованиях сообщается о снижении качества эякулята и других показателей мужского репродуктивного здоровья [1, 2]. Существует глобальный кризис мужского репродуктивного здоровья [3], что подтверждается как снижением количества сперматозоидов, так и увеличением встречаемости аномалий мужской репродуктивной системы, таких как крипторхизм, опухоли уrogenитального тракта [4]. Мужской фактор регистрируется примерно у 40% супружеских пар, страдающих бесплодием [5, 6]. Продемонстрирована связь между мужским бесплодием и общим состоянием здоровья. Ассоциированные клинические состояния включают сахарный диабет, нарушения обмена веществ и сердечно-сосудистые заболевания [4].

Воспалительный процесс является одним из ключевых патологических феноменов в реализации мужского бесплодия. При этом значительный вклад отводится механизмам аутоповреждения, в частности, путём гиперпродукции активированных форм кислорода и азота, которые запускают карбонильный стресс, что в конечном итоге приводит к накоплению окисленно модифицированных белков (ОМБ). Показано, что в результате этого белки могут утрачивать свою функцию [7]. Определение ОМБ эякулята может являться чувствительным интегральным маркером снижения мужской фертильности, а также развития уrogenитальной патологии как инфекционного, так и неинфекционного характера.

Для определения ОМБ предложен способ [8], который претерпел несколько изменений [9, 10]. Однако в основном все исследования проведены с использованием сыворотки или плазмы крови, что несколько ограничивает информацию о патогенезе заболеваний.

Цель исследования – изучить уровень окисленно модифицированных белков в спермальной жидкости практически здоровых мужчин.

Материал и методы. Для проведения исследований использовали 54 образца эякулята от практически здоровых мужчин в возрасте от 24 до 55 лет (средний возраст $39,2 \pm 0,9$ лет), у которых отсутствовал рост микроорганизмов на питательных средах. Взятие материала и его исследование проводили согласно стандартизованным методикам, предложенным экспертами ВОЗ в 2010 году [11]. Кроме этого, у

всех добровольцев получали пробы сыворотки периферической крови.

Для измерения оптической плотности использовали планшетный спектрофотометр (PowerWave Био-ТЕК Instruments, Inc.) и кварцевые 96-луночные планшеты.

В исследовании использовали два варианта методики определения ОМБ. В первом случае образцы предварительно обрабатывали 10% раствором сульфата стрептомицина для осаждения нуклеиновых кислот и свободных аминокислот. Для этого к 300 мкл эякулята добавляли 30 мкл 10% раствора сульфата стрептомицина и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. После 10-минутного центрифугирования при 5000 об/мин оценивали спектр поглощения надосадочной жидкости при длине волны 280 и 260 нм. Если соотношение оптической плотности 280 нм / 260 нм было более 1, то продолжали исследование, если меньше, то заново повторяли инкубацию с 10% раствором сульфата стрептомицина.

Во втором случае не проводили инкубацию образцов с раствором сульфата стрептомицина, а сразу переходили к исследованию нативного эякулята.

Для определения уровня ОМБ в две микропробирки типа эппендорф вносили по 100 мкл полученной надосадочной жидкости в первом случае или нативного эякулята во втором случае. Далее, в пробирку с опытной пробой добавляли 200 мкл 0,1 М раствора 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ), растворенного в 1 М растворе соляной кислоты, а в контрольную пробирку - 200 мкл растворителя ДНФГ, который представляет собой 1 М раствор HCl. Пробирки оставляли на 1 ч при комнатной температуре в темном месте, перемешивая каждые 15 минут. Затем в каждую пробирку добавляли 300 мкл 20% раствора ТХУ (трихлоруксусная кислота), доводя тем самым до 10% (конечной) концентрации ТХУ. Пробы инкубировали в течение 10 мин на льду и центрифугировали в течение 10 мин для осаждения белковых преципитатов. Надосадочную жидкость удаляли. После этого осадок трижды промывали 200 мкл раствора этанол/ацетон (1:1) для удаления несвязавшегося ДНФГ и примеси липидов. Осадок высушивали в течение 12-18 часов. Далее сухой осадок растворяли в 200 мкл 8 М раствора мочевины при периодическом перемешивании до

полного растворения.

Образовавшиеся 2,4–динитрофенилгидразоны (ДНФ) регистрировали при следующих длинах волн: при 365 нм для оценки кетон-ДНФ нейтрального характера (кДНФн), при 432 нм – кетон-ДНФ основного характера (кДНФо) и при 530 нм – альдегид-ДНФ нейтрального характера (аДНФн). При определении содержания карбониллов использовали молярный коэффициент поглощения (ϵ), равный 22,000 М⁻¹см⁻¹. Коэффициент молярной экстинкции ДНФ использовали для расчета концентрации карбонильных производных ОМБ, где: С – это концентрация ДНФ в нмоль/мл, А – показатель абсорбции.

$$\epsilon = 22,000/\text{М} = 22,000/10^6 \text{ нмоль/мл};$$

$$C = A/\epsilon = A_{(365,432,530)} / 2,2 * 10^4/10^6;$$

$$C = A_{(365,432,530)} \times 45,45 \text{ нмоль/мл.}$$

Концентрацию окисленных белков выражали в нмоль/мг общего белка исследуемой биологической жидкости. Для определения концентрации белка использовали биуретовый метод (АО «Вектор-Бест», Новосибирск). Концентрацию белка измеряли в каждой пробе после полного растворения осадка белка в растворе мочевины. Суммарную концентрацию окисленных белков рассчитывали путем суммирования всех окисленных производных.

Протокол исследования был одобрен Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ (№1 от 25.01.2023 г.). У всех участников исследования было получено письменное информированное согласие до включения в исследование.

Статистический анализ результатов проводили с использованием методов описательной статистики и *t*-критерия Стьюдента для парных данных.

Результаты и обсуждение. Установлено, что суммарная концентрация ОМБ в нативной спермальной жидкости, не обработанной сульфатом стрептомицина, составила 3,6±0,4 нмоль/мг белка. При этом соотношение кДНФн, кДНФо и аДНФн было 1:1,6:2,3 (см. таблицу).

На основании расчетов, предложенных в ряде работ [12, 13] уровень кДНФн не должен существенно превышать величину 1 нмоль/мг белка. В настоящем исследовании концентрация кДНФн была 1,7±0,1 нмоль/мг белка, что может быть связано с неспецифическим окрашиванием свободных аминокислот и нуклеиновых кислот [13]. Кроме этого, молекулы ацетона также могут быть связаны с ДНФГ и вносить свой вклад в завышение значений [14]. Такую проблему можно нивелировать предварительной инкубацией проб с раствором стрептомицина сульфата [8]. После обработки образцов эякулята раствором сульфата стрептомицина, уровень кДНФн снизился до 0,3±0,1 нмоль/мг белка ($p < 0,05$, к тем же пробам до обработки стрептомицином).

В целом, сумма ОМБ в спермальной жидкости, после её обработки сульфатом стрептомицина, составила 0,6±0,1 нмоль/мг общего белка ($p < 0,05$). Соотношение аДНФн : кДНФо : кДНФн существенно не изменилось – 1:1,4:2,2 (см. таблицу).

Концентрация производных ДНФ, нмоль/мг белка

| Образцы | кДНФн | кДНФо | аДНФн |
|--|-----------|-----------|-----------|
| Спермальная жидкость нативная | 1,7±0,1 | 1,2±0,1 | 0,7±0,1 |
| Спермальная жидкость после обработки сульфатом стрептомицина | 0,3±0,1** | 0,2±0,1** | 0,1±0,1** |
| Сыворотка крови | 1,2±0,1 | 0,7±0,1 | 0,4±0,1 |

Примечание. * - $p < 0,05$ к аналогичному показателю в сыворотке крови; ** - $p < 0,05$ к аналогичному показателю в нативной спермальной жидкости.

В сыворотке крови этих же добровольцев соотношение окисленных белков аДНФн:кДНФо:кДНФн выжалось, как: 1:2:3,3. Суммарная концентрация окисленных белков сыворотки периферической крови 2,4±0,1 нмоль/мг белка.

Известно, что образование кетоновых производных при окислении белковых молекул указывает на необратимый характер их модификации. С другой стороны, при регистрации альдегидных производных существует потенциал к ренатурации структуры и восстановлению функции белков [15]. В настоящем исследовании показано, что в спермальной жидкости практически здоровых добровольцев преобладают кетоновые производные, что может быть обусловлено длительно действующими факторами, такими как клетки иммунной системы, которые способны к продукции свободных радикалов даже в отсутствии стимуляции [16].

Сравнительно более высокая концентрация ОМБ в сыворотке крови, чем в эякуляте, может быть связана с высокой скоростью обновления спермальной жидкости, а также более выраженной антиоксидантной защитой органов репродукции [17].

Заключение. Таким образом, для выявления реального уровня окисленно модифицированных белков в спермальной жидкости требуется предобработка образцов для нивелирования неспецифического окрашивания. Установленные соотношения форм окисленных белков могут быть использованы для оценки степени ОМБ при патологических состояниях, а метод их регистрации удобен в использовании и может быть реализован в большинстве лабораторий.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 1, 3-8, 11, 14, 16, 17 с м. REFERENCES)

2. Вавилов Н.В., Мальцев Н.А., Годовалов А.П. Содержание иммуноглобулинов разных классов в спермоплазме при бессимптомной бактериоспермии. *Медицинская иммунология*. 2017; 19(S): 255.
9. Вавилов Н.В., Шилов Ю.И., Годовалов А.П. Методические аспекты определения окислительной модификации белка. *Медицинский альманах*. 2018; 53(2): 19-22.
10. Дубинина Е.Е., Гавровская С.В., Кузьмич Е.В., Леонова Н.В., Морозова М.Г., Ковругина С.В., Смирнова Т.А. Окислительная

модификация белков: окисление триптофана и образование би-тирозина в очищенных белках с использованием системы Фентона. *Биохимия*. 2002; 67(3): 413-21.

12. Рябов Г.А., Азизов Ю.М., Дорохов С.И., Кулабухов В.В., Титова И.А., Пасечник И.Н. и др. Окислительная модификация белков плазмы крови у больных в критических состояниях. *Анестезиология и реаниматология*. 2000; 2: 72-5.
13. Боев К.В., Василенко Д.В., Маслов А.И. Свободно-радикальное окисление белков: методологические аспекты количественной оценки окислительной модификации по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. *Universum: Химия и биология*. 2014; 1(2): 3-8.
15. Копытова Т.В., Пантелеева Г.А., Дмитриева О.Н., Коткова Е.В. Оценка окислительной модификации белков у больных хроническими распространёнными дерматозами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 2: 41-4.
7. Hawkins C.L., Davies M.J. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J. Biol. Chem.* 2019; 294(51): 19683-708.
8. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. *Methods in enzymology*. 1994; 233: 357-63.
9. Vavilov N.V., Shilov Yu.I., Godovalov A.P. Methodological aspects of determining the oxidative modification of a protein. *Meditsinskiy al'manakh*. 2018; 53(2): 19-22. (in Russian)
10. Dubinina E.E., Gavrovskaya S.V., Kuz'mich E.V., Leonova N.V., Morozova M.G., Kovrugina S.V., Smirnova T.A. Oxidative modification of proteins: tryptophan oxidation and bityrosine formation in purified proteins using the Fenton system. *Biokhimiya*. 2002; 67(3): 413-21. (in Russian)
11. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. WHO, Geneva; 2010.
12. Ryabov G.A., Azizov Yu.M., Dorokhov S.I., Kulabukhov V.V., Titova I.A., Pasechnik I.N. et al. Oxidative modification of blood plasma proteins in critically ill patients. *Anesteziologiya i reanimatologiya*. 2000; 2: 72-5. (in Russian)
13. Boev K.V., Vasilenko D.V., Maslov A.I. Free-radical oxidation of proteins: methodological aspects of the quantitative assessment of oxidative modification by the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Universum: Khimiya i biologiya*. 2014; 1(2): 3-8. (in Russian)
14. Hill G.E., Ruggeroli A., Pohorecki R., Alonso A., Robbins R.A. Cigarette smoking reduces endogenous airway nitric oxide production during cardiopulmonary bypass in humans. *Anesth. Analg.* 1995; 81(1): 170-2.
15. Kopytova T.V., Panteleeva G.A., Dmitrieva O.N., Kotkova E.V. Evaluation of oxidative modification of proteins in patients with chronic widespread dermatoses. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2014; 2: 41-4. (in Russian)
16. Liang S., Ji L., Kang L., Hu X. Metabolic regulation of innate immunity. *Adv. Immunol.* 2020; 145: 129-57.
17. Kolesnikova L.I., Kurashova N.A., Osadchuk L.V., Osadchuk A.V., Dolgikh M.I., Dashiev B.G. Parameters of Pro- and Antioxidant Status in Ejaculate of Men of Fertile Age. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 159(6): 726-8.

REFERENCES

1. Levine H., Jørgensen N., Martino-Andrade A., Mendiola J., Weksler-Derri D., Jolles M. et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis of samples collected globally in the 20th and 21st centuries. *Hum. Reprod. Update*. 2023; 29(2): 157-76.
2. Vavilov N.V., Mal'tsev N.A., Godovalov A.P. The content of immunoglobulins of different classes in sperm plasma in asymptomatic bacteriospermia. *Meditsinskaya immunologiya*. 2017; 19(S): 255. (in Russian)
3. Esteves S.C. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int. Braz. J. Urol.* 2014; 40(4): 443-53.
4. De Jonge C., Barratt C.L.R. The present crisis in male reproductive health: an urgent need for a political, social, and research roadmap. *Andrology*. 2019; 7(6): 762-8.
5. Bieniek J.M., Drabovich A.P., Lo K.C. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian J. Androl.* 2016; 18(3): 426-33.
6. Kovac J.R., Pastuszak A.W., Lamb D.J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil. Steril.* 2013; 99(4): 998-1007.