

НИЗКИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ H_2O_2 АКТИВИРУЮТ СИСТЕМУ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ СПЕРМАТОЗОИДОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2015 В.В. Евдокимов¹, К.В. Барина², В.Б. Туровецкий³,
В.И. Муронец², Е.В. Шмальгаузен^{2*}

¹ Институт урологии им. Н.А. Лопаткина, 105425 Москва;
факс: +7(499)165-0911, электронная почта: vveddok@mail.ru

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; факс: +7(495)939-3181,
электронная почта: shmal@belozersky.msu.ru

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва; факс: +7(495)939-1115,
электронная почта: vbturovet@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.02.15

Исследовано влияние низких концентраций перекиси водорода (10–100 мкМ) на подвижность сперматозоидов и активность сперматозоидного фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDS). Показано, что инкубация с 10 и 100 мкМ H_2O_2 приводит к увеличению числа сперматозоидов с активной подвижностью соответственно на 20 и 18% и повышению активности GAPDS на 27 и 20% по сравнению с пробой без добавок. Также обнаружено, что после инкубации с 10 мкМ перекисью водорода содержание восстановленного глутатиона (GSH) в сперматозоидах увеличивается, в среднем, на 50% по сравнению с контролем. Предполагается, что инкубация сперматозоидов с низкими концентрациями перекиси водорода активирует пентозофосфатный путь, что приводит к синтезу NADPH и восстановлению окисленного глутатиона глутатион-редуктазой. Вследствие этих процессов в клетке повышается уровень GSH, который восстанавливает окисленные цистеины активного центра GAPDS, что приводит к росту активности фермента и увеличению числа подвижных сперматозоидов. Таким образом, увеличение числа подвижных сперматозоидов в присутствии низких концентраций перекиси водорода может служить индикатором нормальной работы клеточной системы антиоксидантной защиты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, сперматозоиды, активные формы кислорода, антиоксидантная защита.

Одной из важнейших характеристик сперматозоидов, определяющих способность к оплодотворению, является их подвижность. Основной причиной снижения фертильности спермы является токсичное действие активных форм кислорода (АФК) [1–4]. В нашей предыдущей работе было показано, что снижение подвижности сперматозоидов в присутствии перекиси водорода связано с окислением одного из ферментов гликолиза – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [5]. Гликолиз необходим для синтеза АТФ в клетке, поэтому активность глице-

ральдегид-3-фосфатдегидрогеназы важна для всех энергозависимых процессов, включая разные типы движения. В клетках различных органов и тканей глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа локализована в цитоплазме, где протекают реакции гликолиза. В сперматозоидах присутствует особый изофермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDS), который отличается от изофермента соматических клеток прежде всего тем, что он прочно связан с фиброзной оболочкой основного отдела жгутика сперматозоида [6–8]. Показано, что GAPDS необходима для движения сперматозоидов: нарушение экспрессии гена GAPDS приводит к серьезным нарушениям подвижности сперматозоидов, блокируя их поступательное движение [9].

Обе изоформы фермента легко окисляются АФК, в том числе перекисью водорода, в результате чего теряют ферментативную активность

Принятые сокращения: GAPDS – спермоспецифичная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; dN-GAPDS – рекомбинантный белок GAPDS без N-концевого домена; АФК – активные формы кислорода, G6PD – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; ППФ – пентозофосфатный путь; АТМ – сериновая/треониновая протеинкиназа.

* Адресат для корреспонденции.

[10–12], что приводит к снижению продукции АТФ в ходе гликолиза. Ранее мы показали, что в присутствии умеренных и высоких концентраций перекиси водорода (более 0,5 мМ) подвижность сперматозоидов падает пропорционально снижению активности GAPDS [5]. Влияние низких концентраций перекиси водорода в данной работе не рассматривалось, поскольку казалось естественным, что в низкой концентрации перекись водорода будет немедленно нейтрализована антиоксидантной системой клеток, и все эффекты будут слабо выраженными. Однако в литературе появляется все больше данных о том, что именно малые концентрации АФК (до 50 мкМ) могут активировать в сперматозоидах каскады ферментативных реакций, регулирующих процессы капацитации и оплодотворения [13–15].

Таким образом, АФК в малых дозах могут быть частью регуляторного механизма, который обеспечивает ответ клетки на изменение внешних условий. Этот клеточный ответ может затрагивать основные метаболические пути, а также влиять на подвижность сперматозоидов.

Кроме того, раньше мы показали, что мягкое окисление глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в мышечных экстрактах низкими концентрациями перекиси водорода приводит к разобщению окисления и фосфорилирования в гликолизе, приводя к ускоренному накоплению лактата за счет снижения продукции АТФ [16]. Такие изменения в гликолизе могут приводить к накоплению субстрата для окислительного фосфорилирования (пирувата) и, следовательно, к ускорению окислительного фосфорилирования в клетках. Если предположить, что подобный эффект может наблюдаться в сперматозоидах, то в присутствии низких концентраций H_2O_2 может измениться соотношение гликолиза и окислительного фосфорилирования, а, следовательно, характер подвижности сперматозоидов. В представленной работе для проверки указанных выше предположений мы исследовали влияние низких концентраций перекиси водорода на активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и на характер подвижности сперматозоидов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Реактивы. Использовали следующие реактивы: глицин, NAD («MP Biomedicals», США), диэтилацеталь глицеральдегид-3-фосфата (бариевая соль), восстановленный глутатион, каталаза из печени быка, ЭДТА («Sigma-Aldrich», США), 5,5'-дитио-бис-нитробензойная кислота («Ferak», Германия), трипсин («Спофа», Чехия).

Исследование влияния перекиси водорода на подвижность сперматозоидов. Исследования проводили на сперматозоидах человека. После разжижения эякулята каждый образец микроскопировали в проходящем свете при увеличении $\times 400$ на микроскопе Amplival (Jena, «Karl Zeiss», Германия). Подвижность сперматозоидов определяли с помощью автоматического спермоанализатора СА – 500 («Биола», Россия). Эксперименты проводили при температуре 20–22°. Исследовали образцы спермы, содержавшие не менее 40% подвижных клеток. Из полученного образца эякулята отбирали пробы для опыта и контроля. В экспериментальные пробы вносили H_2O_2 до конечной концентрации 10 и 100 мкМ. Через 1 ч оценивали изменение подвижности сперматозоидов в контрольной и экспериментальных пробах, после чего во все пробы добавляли по 0,2 мкг (1 ед) каталазы и осаждали сперматозоиды центрифугированием (5 мин, 1500 g). Супернатант удаляли, а в осадке клеток определяли активность GAPDS.

Определение активности GAPDS в сперматозоидах. К осажденным клеткам добавляли равный объем фосфатно-солевого буфера (10 мМ фосфат калия, 0,15 М NaCl, pH 7,5) и разрушали клетки ультразвуком. В полученной суспензии определяли активность GAPDS и концентрацию общего белка. Активность GAPDS определяли с помощью спектрофотометра «Shimadzu» UV-1601 (Япония) при 20°, измеряя нарастание поглощения в реакционной смеси в результате образования NADH (340 нм) в ходе окисления 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА). Реакционная смесь (1 мл) содержала 50 мМ глицин, 50 мМ фосфат калия, pH 9,0, 5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ NAD, 1 мМ 3-ФГА и 20 мкл суспензии разрушенных сперматозоидов. Удельную активность фермента выражали в мкмоль NADH/мин на 1 мг белка.

Определение белка. Концентрацию белка в исследуемых образцах определяли по методу Брэдфорд [17]. К 1 мл реактива добавляли 1–2 мкл суспензии сперматозоидов и через 1 мин регистрировали поглощение раствора при 595 нм.

Определение концентрации перекиси водорода. Концентрацию H_2O_2 определяли спектрофотометрически при 230 нм, считая коэффициент экстинкции равным $72,7 M^{-1} cm^{-1}$.

Определение содержания глутатиона в сперматозоидах. После измерения подвижности сперматозоиды осаждали центрифугированием. Супернатант удаляли, а к осадку клеток добавляли 100 мкл буфера (50 мМ фосфат калия, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) и разрушали клетки ультразвуком. В полученной суспензии определяли содержание общего белка по методу Брэдфорд (как описано

выше). Затем суспензию центрифугировали (13 000 g, 10 мин), осадок удаляли, а в экстракте определяли содержание восстановленного глутатиона (GSH). Для определения GSH белки в экстракте осаждали концентрированной хлорной кислотой, добавляя к 100 мкл экстракта 17 мкл HClO_4 (до конечной концентрации 1 мМ), после чего раствор нейтрализовали добавлением 14 мкл насыщенного раствора K_2CO_3 . Выпавший осадок удаляли центрифугированием (13 000 g, 5 мин), а в супернатанте определяли содержание GSH в реакции с 5,5'-дитио-бис-нитробензойной кислотой (ДТНБ). Содержание GSH определяли сразу в нескольких пробах: по 100 мкл пробы вносили в лунки 96-луночного планшета и добавляли 5 мкл 0,01 М раствора ДТНБ. Через 5 мин в лунках определяли поглощение при 400 нм при помощи планшетного фотометра. Калибровочную прямую для определения GSH строили, используя раствор восстановленного глутатиона, концентрацию которого определяли по светопоглощению при 412 нм, считая $\epsilon = 13\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Содержание GSH в экстракте рассчитывали на 1 мг общего белка в суспензии разрушенных клеток.

Выделение GAPDS из сперматозоидов для масс-спектрометрического исследования. Для того, чтобы выделить GAPDS из сперматозоидов в растворимой форме, необходимо отщепить *N*-концевой фрагмент (~70 аминокислотных остатков), с помощью которого белок прикрепляется к цитоскелету жгутика. Для этого исследуемые образцы сперматозоидов сначала разрушали ультразвуком и центрифугировали. Затем к осадку разрушенных клеток (~50 мкл) добавляли 50 мкг трипсина в 50 мкл фосфатно-солевого буфера, pH 7,5, и инкубировали 15 мин при 30°, после чего добавляли ингибитор протеаз фенилметансульфонилфторид до 0,5 мМ и удаляли осадок центрифугированием (10 мин, 14 000 g). В результате описанной процедуры GAPDS, лишенный *N*-концевого фрагмента, переходит в раствор, сохраняя при этом ферментативную активность [18]. Из полученного раствора сразу же готовили пробы для Ds-Na-электрофореза согласно стандартной методике. После проведения DsNa-электрофореза белковые полосы с мол. массой ~40 кДа, соответствующие субъединице GAPDS без *N*-концевого домена [18], вырезали из геля и анализировали методом масс-спектрометрии. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme «BrukerDaltonics» (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование влияния низких концентраций H_2O_2 на подвижность сперматозоидов. Для данного эксперимента отбирали образцы, в которых количество подвижных сперматозоидов составляло не менее 40%. Каждый образец делили на три пробы: в две пробы добавляли H_2O_2 до конечной концентрации 10 и 100 мкМ, а третья служила контролем. Обнаружено статистически достоверное увеличение содержания подвижных сперматозоидов в образцах, содержащих перекись водорода, по сравнению с образцом без добавок. После 1 ч инкубации в присутствии 10 и 100 мкМ H_2O_2 содержание сперматозоидов с активной подвижностью увеличилось соответственно на 20 и 18% по сравнению с контролем, а содержание подвижных сперматозоидов (общая подвижность) – на 11% (рис. 1).

Исследование влияния перекиси водорода на активность GAPDS в сперматозоидах. После исследования подвижности сперматозоидов перекись водорода в пробах удаляли добавлением каталазы, сперматозоиды отделяли центрифугированием, и в полученных осадках измеряли активность GAPDS. Мы ожидали увидеть снижение активности GAPDS в пробах с перекисью водорода по сравнению с пробой без добавок в

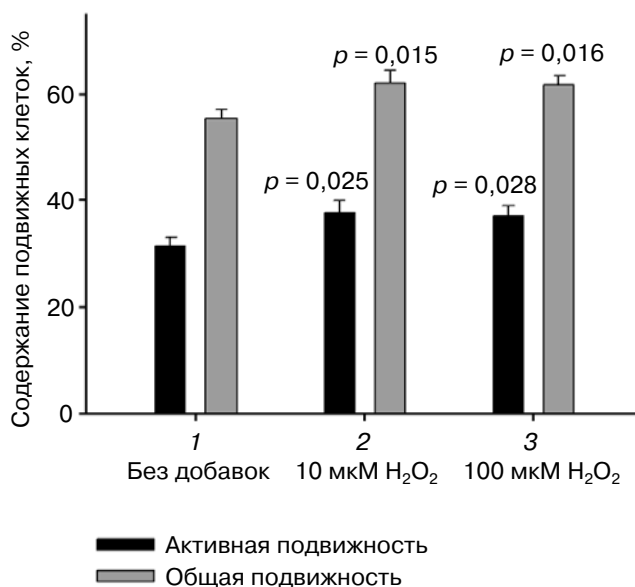


Рис. 1. Влияние H_2O_2 на подвижность сперматозоидов. Образец эякулята разделили на три части: первую пробу инкубировали без добавок (1), вторая и третья пробы содержали соответственно 10 и 100 мкМ H_2O_2 (2 и 3). Все пробы инкубировали при 22° 1 ч. Данные представлены в виде среднего значения \pm std. ошибка ($n = 13$). Для оценки статистической значимости использовали *t*-критерий Стьюдента

результате окисления части активных центров фермента. Однако в большинстве экспериментов активность GAPDS в образцах с перекисью водорода оказалась выше по сравнению с контролем (таблица).

Как видно из таблицы, в контрольных пробах наблюдался довольно сильный разброс значений удельной активности GAPDS (0,094–0,44 мкмоль NADH/мин на мг белка), поскольку свойства сперматозоидных ферментов у разных доноров могут существенно различаться в пределах нормы. Поэтому для проведения статистического анализа в каждом эксперименте удельную активность GAPDS в контроле принимали за 100%.

В пробах, содержащих 10 и 100 мкМ H₂O₂, было обнаружено статистически значимое увеличение активности GAPDS соответственно на 27 и 20% по сравнению с контролем: $p = 0,043$ и $0,017$, согласно тесту Манна–Уитни (таблица, рис. 2). Результат был неожиданный, поскольку известно, что глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа из разных источников легко инактивируется в присутствии перекиси водорода в результате окисления цистеина активного центра [10–12].

Для проверки не является ли рост активности GAPDS в сперматозоидах следствием какой-либо ковалентной модификации фермента в ре-

зультате активации сигнальных путей, регулируемых АФК, из контрольного и экспериментального (после инкубации с H₂O₂) образцов сперматозоидов с удельной активностью GAPDS 0,108 и 0,17 мкмоль NADH/мин на мг белка были выделены препараты GAPDS и исследованы методом масс-спектрометрического анализа (MALDI). Для исследования применяли метод «отпечатков пальцев», который предполагает полное расщепление анализируемого белка трипсином с последующим анализом полученных пептидов масс-спектрометрическим методом. Сравнение наборов пептидов, полученных для двух препаратов GAPDS с разной активностью, не выявило различий, которые могли бы означать ковалентную модификацию белка в экспериментальном образце. Таким образом, было показано, что рост активности GAPDS в результате инкубации сперматозоидов с H₂O₂ не является следствием модификации GAPDS.

Далее было исследовано прямое влияние перекиси водорода на рекомбинантную сперматозоидную глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (dN-GAPDS), а также на полноразмерный белок GAPDS, который связан с цитоскелетом жгутика сперматозоида.

Исследование влияние перекиси водорода на сперматозоидную глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу. Рекомбинантная глицеральдегид-3-

Влияние H₂O₂ на активность GAPDS в сперматозоидах*

№ опыта	Активность GAPDS после 1 ч инкубации					
	без добавок (контроль)		10 мкМ H ₂ O ₂		100 мкМ H ₂ O ₂	
	мкмоль NADH/мин мг	%	мкмоль NADH/мин мг	%	мкмоль NADH/мин мг	%
1	0,108	100	0,146	135	0,17	157
2	0,144	100	0,125	87	0,184	127
3	0,155	100	0,199	128	0,16	103
4	0,094	100	0,21	225	0,10	113
5	0,440	100	0,55	125	0,53	120
6	0,190	100	0,32	168	0,33	173
7	0,120	100	0,125	104	0,135	112
8	0,220	100	0,22	100	0,157	71
9	0,360	100	0,5	138	0,57	158
10	0,200	100	0,13	65	0,147	73
Среднее	0,203	100	0,253	127,5	0,249	120,7
Стд. ошибка	0,035	—	0,049	14,2	0,053	10,8
p	—	—	—	0,043	—	0,017

* Представлено 10 независимых экспериментов.

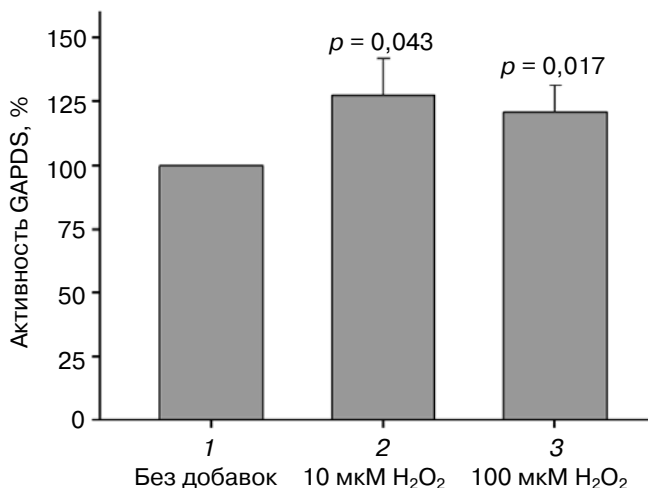


Рис. 2. Влияние H₂O₂ на активность GAPDS в сперматозоидах. Образец эякулята делили на три части: первую пробу инкубировали без добавок (1), во вторую и третью пробы добавляли H₂O₂ до конечной концентрации 10 и 100 мкМ (2, 3). Все пробы инкубировали при 22° 1 ч, затем клетки отделяли центрифугированием и определяли активность GAPDS. За 100% принимали активность в пробе без добавок. Приведены средние значения 10 независимых экспериментов ± std. ошибка. Для оценки статистической значимости использовали тест Манна–Уитни

фосфатдегидрогеназа сперматозоидов человека без *N*-концевого домена (dN-GAPDS) была получена в нашей лаборатории. Благодаря удалению *N*-концевого домена удалось получить этот фермент в растворимой и активной форме [12]. Как показано на рис. 3, при инкубации dN-GAPDS с перекисью водорода наблюдается инактивация фермента, пропорциональная концентрации окислителя.

Сперматозоидная глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDS) отличается от рекомбинантного белка dN-GAPDS наличием дополнительного *N*-концевого фрагмента, который связывает GAPDS с цитоскелетом жгутика сперматозоида, в результате чего после разрушения клеток GAPDS остается в нерастворимой фракции. Чтобы проверить, как влияет перекись водорода на полноразмерный белок GAPDS, исследовали влияние H₂O₂ на активность GAPDS непосредственно в нерастворимом осадке, полученном после обработки сперматозоидов ультразвуком (рис. 4).

Как видно из рис. 4, активность GAPDS в нерастворимой фракции сперматозоидов падает в три раза после инкубации с 100 мкМ H₂O₂ (рис. 4, 2). В контрольном образце без добавок активность GAPDS снижается за время эксперимента приблизительно на 10% в результате окисления фермента кислородом воздуха (рис. 4, 4).

Представленные данные говорят о том, что перекись водорода инактивирует как рекомбинантный фермент dN-GAPDS, так и полноразмерный GAPDS. Таким образом, увеличение активности GAPDS после обработки сперматозоидов перекисью водорода нельзя объяснить прямым воздействием H₂O₂ на GAPDS. Мы предположили, что такой эффект может быть связан с активацией метаболических путей, приводящих к повышению уровня восстановленного глутатиона (GSH). Глутатион является естественным антиоксидантом, который нейтрализует АФК в клетке, а также восстанавливает окисленные цистеины в белках. На рис. 4 показано, что инкубация пробы, предварительно окисленной H₂O₂, с 5 мМ глутатионом приводит к 4-кратному увеличению активности GAPDS (рис. 4, 3). Этот эксперимент демонстрирует, что активность GAPDS в сперматозоидах может эффективно регулироваться путем окисления-восстановления. Перекись водорода окисляет SH-группы фермента, снижая его активность. Глутатион эффективно восстанавливает активность окисленного фермента, превращаясь в окисленную форму GSSG. Мы предположили, что рост активности GAPDS в клетках, обработанных H₂O₂, может быть связан с увеличением продукции GSH в клетке в ответ на действие H₂O₂. Для проверки этого предположения необходимо было выяснить, влияет ли обработка сперматозоидов перекисью водорода на содержание восстановленного глутатиона в клетках. С этой целью было проведено сравнение содержания GSH в

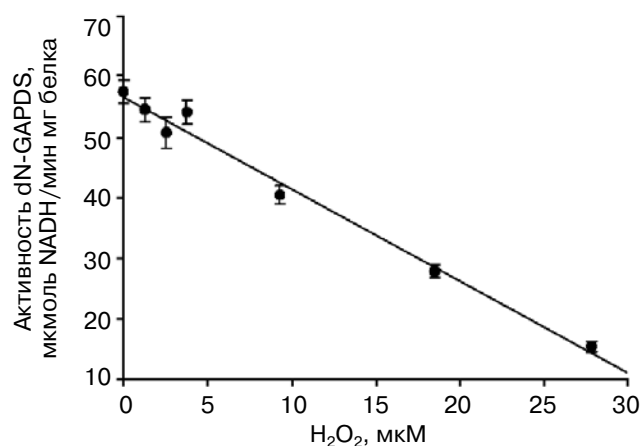


Рис. 3. Окисление рекомбинантного белка dN-GAPDS в присутствии H₂O₂. Пробы с раствором dN-GAPDS (0,23 мг/мл или 1,5 мкМ) в 10 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,5, инкубировали в присутствии указанных концентраций перекиси водорода 1 ч, после чего измеряли активность dN-GAPDS

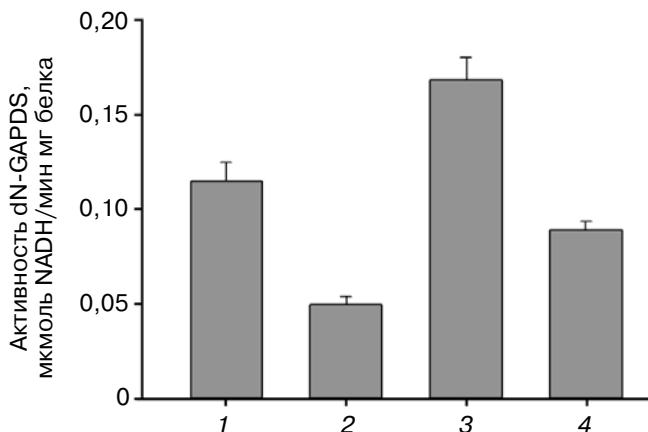


Рис. 4. Окисление и восстановление GAPDS в нерастворимой фракции сперматозоидов. Сперматозоиды разрушили ультразвуком. Осадок разрушенных клеток отделили центрифугированием и дважды промыли калий-фосфатным буфером, pH 7,5, затем суспендировали в том же буфере и разделили на две части. В одной пробе (без добавок) измерили активность в начале (1) и конце эксперимента (4). Вторую пробу сначала инкубировали 30 мин в присутствии 100 мкМ H_2O_2 (2), после чего добавили глутатион (GSH) до 5 мМ и инкубировали еще 30 мин (3)

сперматозоидах после 1 ч инкубации без добавок и в присутствии H_2O_2 .

Как видно из рис. 5, после инкубации сперматозоидов в присутствии 10 мкМ H_2O_2 содержание GSH в клетках увеличивается, в среднем,

на 50% по сравнению с образцом без добавок. При увеличении концентрации H_2O_2 до 100 мкМ содержание GSH в клетках снижается, и различия в содержании GSH по сравнению с контрольной группой становятся статистически недостоверны. Вероятно, это связано с тем, что в этой группе значительная часть GSH расходуется на нейтрализацию избытка H_2O_2 .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что инкубация сперматозоидов в присутствии низких концентраций H_2O_2 приводит к повышению концентрации глутатиона в клетке. Увеличение содержания GSH приводит к восстановлению окисленных SH-групп фермента GAPDS, что сопровождается ростом его ферментативной активности. Следствием этих событий, возможно, является небольшое увеличение числа подвижных сперматозоидов.

В данном разделе мы рассмотрим возможные механизмы, которые могут приводить к повышению продукции GSH в ответ на повышение концентрации H_2O_2 до 100 мкМ.

Для поддержания уровня восстановленного глутатиона в клетке необходим фермент глутатион-редуктаза, который восстанавливает окисленный глутатион (GSSG) до GSH. Показано, что глутатион-редуктаза необходима для сохра-

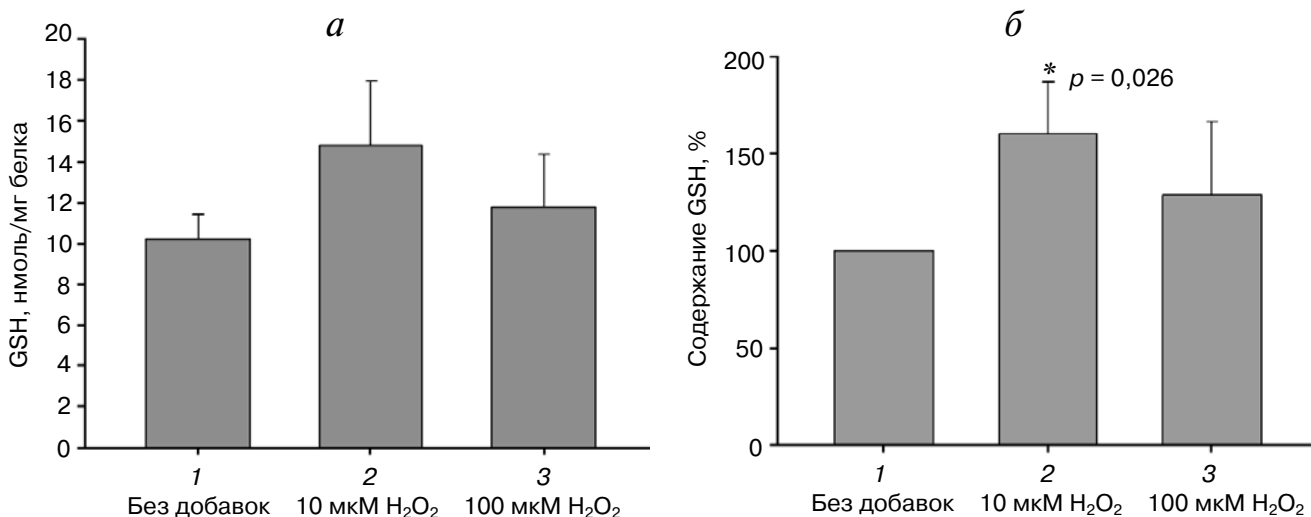


Рис. 5. Влияние H_2O_2 на содержание GSH в сперматозоидах. Образец эякулята делили на три части: первая проба (1) служила контролем, в две оставшиеся пробы (2, 3) добавляли H_2O_2 до конечной концентрации 10 и 100 мкМ. Все пробы инкубировали при 22° в течение 1 ч, затем сперматозоиды осаждали центрифугированием и определяли содержание GSH в клетках. а — Результаты шести независимых экспериментов представлены в виде средних значений \pm std. ошибка (нмоль/мг общего белка в пробе); б — для каждого эксперимента содержание GSH в пробе без добавок принято за 100%. * Статистически значимые различия (согласно тесту Манна–Уитни)

нения подвижности сперматозоидов: в присутствии ингибитора глутатион-редуктазы кармустина (производного нитрозомочевины) сперматозоиды быстро теряют подвижность, и наблюдается рост продуктов перекисного окисления липидов, что свидетельствует о накоплении АФК в клетках [19].

Для восстановления GSSG глутатион-редуктазой необходим кофактор NADPH, который образуется в ходе пентозофосфатного пути (ПФП). Таким образом, ПФП является частью антиоксидантной системы сперматозоидов, поскольку производит NADPH для работы глутатион-редуктазы и глутатион-пероксидазы. Есть данные, что умеренный окислительный стресс приводит к активации пентозофосфатного пути в сперматозоидах. Так, инкубация сперматозоидов в присутствии 50–100 мкМ H_2O_2 в среде, содержащей меченую глюкозу, приводит к высвобождению меченого CO_2 , что указывает на активацию ПФП [19]. Таким образом, активация пентозофосфатного пути в ответ на присутствие H_2O_2 — это включение системы антиоксидантной защиты.

В связи с вышеизложенными фактами можно предположить, что в нашем случае инкубация сперматозоидов с низкими концентрациями перекиси водорода активирует пентозофосфатный путь, что приводит к синтезу NADPH и восстановлению GSSG глутатион-редуктазой. Вследствие этих процессов в клетке повышается уровень GSH, который восстанавливает окисленные цистеины активного центра GAPDS, что приводит к увеличению активности фермента и подвижности сперматозоидов.

Механизм активации ПФП в сперматозоидах перекисью водорода не установлен. Однако известно, что ключевым ферментом ПФП является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (G6PD). В настоящее время известно, что G6PD соматических клеток регулируется множеством сигнальных молекул [20]. Среди регуляторов этого фермента есть те, которые активируются в ответ на повышение концентрации АФК. Один из таких регуляторов — сериновая/треониновая протеинкиназа АТМ (ataxia telangiectasia mutated), названная так по названию редкого наследственного заболевания (ataxia telangiectasia, АТ), которое вызывается мутацией данной протеинкиназы. Среди многочисленных симптомов этого заболевания — повышенная чувствительность к радиации, предрасположенность к раковым заболеваниям, стерильность, иммунодефицит и неврологические нарушения (атаксия и гибель клеток Пуркинью) [21]. Изначально считалось, что АТМ и связанные с ней сигнальные пути активируются двойными разрывами ДНК,

которые появляются в ответ на ионизирующее излучение. В то же время, многообразие нарушений, наблюдаемых при АТ, позволяло предполагать, что киназа АТМ является сенсорным белком клетки, который активируется в ответ на появление АФК и активирует систему антиоксидантной защиты [21–23]. Дефект данного белка приводит к накоплению АФК и повреждению разнообразных макромолекул, чувствительных к окислению, вызывая широкий спектр нарушений клеточных функций. Действительно, у пациентов с АТ обнаруживаются значительные повреждения липидов и ДНК, вызываемые окислением [24]. Позже был установлен механизм активации белка АТМ: было показано, что окисление молекулы АТМ, а именно образование димера, сшитого дисульфидной связью, вызывает активацию этой киназы. Мутация цистеинового остатка, вовлеченного в образование дисульфидной связи, блокирует регуляцию киназы АТМ путем окисления [25].

Еще один регулятор активности G6PD — малые белки теплового шока (sHsps). Сначала было замечено, что sHsps защищают клетки мышечных фибробластов L929 от повреждений, вызываемых окислительным стрессом, путем активации G6PD и накопления восстановленного глутатиона [26]. Позже появилась работа, которая связала имеющиеся данные об АТМ и Hsps: было показано, что АТМ фосфорилирует шаперон Hsp27, что приводит к его связыванию с G6PD и активации фермента [27].

Необходимо заметить, что АТМ-зависимая активация G6PD наблюдалась как в экстрактах яиц шпорцевой лягушки (*Xenopus*), так и в фибробластах человека, что позволяет предполагать его универсальность [27]. Вероятно, похожий каскад взаимодействий приводит к активации G6PD в сперматозоидах человека при инкубации с низкими концентрациями H_2O_2 .

Механизм активации G6PD неясен. Было высказано предположение, что Hsp27 стабилизирует активную конформацию фермента [27]. В работах другой группы авторов было показано, что активация G6PD в клетках коркового слоя почек крысы факторами роста сопровождается переходом неактивной формы фермента, ассоциированной с клеточными структурами, в цитоплазму. При этом предполагалось, что переход в цитоплазму вызывается модификацией фермента или компонента, с которым связан фермент [28]. Похожий механизм активации G6PD наблюдался после оплодотворения яиц морского ежа [29].

Учитывая, что основные регуляторные механизмы универсальны, можно предполагать, что в сперматозоидах присутствует протеинкиназа,

активируемая окислением, которая запускает каскад реакций фосфорилирования, приводящих в итоге к активации G6PD. Тогда гипотетическая цепь событий, приводящих к накоплению GSH в ответ на повышение концентрации H_2O_2 в сперматозоидах, будет выглядеть следующим образом: $H_2O_2 \rightarrow$ активация протеинкиназы, чувствительной к АФК \rightarrow фосфорилирование регуляторных белков (малых белков теплового шока) \rightarrow активация G6PD \rightarrow накопление NADPH \rightarrow активация глутатионредуктазы \rightarrow накопление GSH.

Таким образом, мы показали, что инкубация сперматозоидов в присутствии 10 и 100 мкМ H_2O_2 приводит к увеличению числа сперматозоидов с активной подвижностью соответственно на 20 и 18% и повышению активности фермента

гликолиза GAPDS на 27 и 20%, что, вероятно, является следствием повышения уровня GSH в клетках под действием H_2O_2 . Эти результаты подтверждают ранее полученные данные относительно активации пентозофосфатного пути в сперматозоидах низкими концентрациями H_2O_2 [19], поскольку продукт пентозофосфатного пути NADPH является кофактором глутатионредуктазы, и его накопление способствует восстановлению окисленного глутатиона (GSSG) с образованием GSH. Следовательно, увеличение подвижности сперматозоидов в присутствии низких концентраций перекиси водорода может служить индикатором нормальной работы клеточной системы антиоксидантной защиты.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-04-00823).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mazzilli, F., Rossi, T., Marchesini, M., Ronconi, C., and Dondero, F. (1994) Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects, *Fertil. Steril.*, **62**, 862–868.
- Sharma, R.K., and Agarwal, A. (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility, *Urology*, **48**, 835–850.
- Aitken, R.J., and Sawyer, D. (2003) The human spermatozoon – not waving but drowning, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **518**, 85–98.
- Agarwal, A., Saleh, R.A., and Bedaiwy, M.A. (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction, *Fertil. Steril.*, **79**, 829–843.
- Элькина Ю.Л., Атрошенко М.М., Брагина Е.Е., Муронец В.И., Шмальгаузен Е.В. (2011) Окисление глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы приводит к снижению подвижности сперматозоидов, *Биохимия*, **76**, 338–344.
- Westhoff, W., and Kamp, G. (1997) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa, *J. Cell Sci.*, **110**, 1821–1829.
- Welch, J.E., Brown, P.L., O'Brien, D.A., Magyar, P.L., Bunch, D.O., Mori, C., and Eddy, E.M. (2000) Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-2 gene is expressed specifically in spermatogenic cells, *J. Androl.*, **21**, 328–338.
- Tanii, I., Yagura, T., Inagaki, N., and Yoshinaga, K. (2007) Preferential localization of rat GAPDS on the ribs of fibrous sheath of sperm flagellum and its expression during flagellar formation, *Acta Histochem. Cytochem.*, **40**, 19–26.
- Miki, K., Ou, W., Goulding, E., Willis, W.D., Bunch, D.O., Stadler, L.F., Perreault, S.D., Eddy, E.M., and O'Brien, D.A. (2004) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16501–16506.
- Little, C., and O'Brien, P.J. (1969) Mechanism of peroxide-inactivation of the sulfhydryl enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.*, **10**, 533–538.
- Schmalhausen, E.V., Nagradova, N.K., Boschi-Muller, S., Branlant, G., and Muronetz, V.I. (1999) Mildly oxidized GAPDH: the coupling of the dehydrogenase and acyl phosphatase activities, *FEBS Lett.*, **452**, 219–222.
- Elkina, Yu.L., Kuravsky, M.L., El'darov, M.A., Stogov, S.V., Muronetz, V.I., and Schmalhausen, E.V. (2010) Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Structural basis for enhanced stability, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 2207–2212.
- Aitken, R.J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D.W., and van Duin, M. (1995) Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function, *J. Cell Sci.*, **108**, 2017–2025.
- Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., and Breitbart, H. (2004) Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction, *Biol. Reprod.*, **70**, 518–522.
- Shahar, S., Wiser, A., Ickowicz, D., Lubart, R., Shulman, A., and Breitbart, H. (2011) Light-mediated activation reveals a key role for protein kinase A and sarcoma protein kinase in the development of sperm hyper-activated motility, *Hum. Reprod.*, **26**, 2274–2282.
- Dan'shina, P.V., Schmalhausen, E.V., Avetisyan, A.V., and Muronetz, V.I. (2001) Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis, *IUBMB Life*, **51**, 309–314.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method of quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analyt. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Щуцкая Ю.Ю., Элькина Ю.Л., Куравский М.Л., Брагина Е.Е., Шмальгаузен Е.В. (2008) Исследование глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из сперматозоидов человека, *Биохимия*, **73**, 228–236.
- Williams, A.C., and Ford, W.C.L. (2004) Functional Significance of the Pentose Phosphate Pathway and Glutathione Reductase in the Antioxidant Defenses of Human Sperm, *Biol. Reprod.*, **71**, 1309–1316.
- Stanton, R.S. (2012) Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival, *IUBMB Life*, **64**, 362–369.
- Rotman, G., and Shiloh, Y. (1997) The ATM gene and protein: possible roles in genome surveillance, checkpoint

- controls and cellular defence against oxidative stress, *Cancer Surv.*, **29**, 285–304.
22. Rotman, G., and Shiloh, Y. (1997) Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? *Bioessays*, **19**, 911–917.
 23. Shiloh, Y. (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape, *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 402–410.
 24. Reichenbach, J., Schubert, R., Schindler, D., Muller, K., Bohles, H., and Zielen, S. (2002) Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia, *Antioxid. Redox. Signal.*, **4**, 465–469.
 25. Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., and Paull, T.T. (2010) ATM activation by oxidative stress, *Science*, **330**, 517–521.
 26. Preville, X., Salvemini, F., Giraud, S., Chaufour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M.V., and Arrigo, A.P. (1999) Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery, *Exp Cell Res.*, **247**, 61–78.
 27. Cosentino, C., Grieco, D., and Costanzo, V. (2011) ATM activates the pentose phosphate pathway promoting antioxidant defence and DNA repair, *EMBO J.*, **30**, 546–555.
 28. Stanton, R.C., Seifter, J.L., Boxer, D.C., Zimmerman, E., and Cantley, L.C. (1991) Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors. Correlation with increased enzymatic activity, *J. Biol. Chem.*, **266**, 12442–12448.
 29. Swezey, R.R., and Epel, D. (1986) Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in sea urchin eggs by reversible association with cell structural elements, *J. Cell Biol.*, **103**, 1509–1515.

LOW CONCENTRATIONS OF HYDROGEN PEROXIDE ACTIVATE ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM IN HUMAN SPERMATOZOA

V. V. Evdokimov¹, K. V. Barinova², V. B. Turovetskii³,
V. I. Muronetz², E. V. Schmalhausen^{2*}

¹ N. A. Lopatkin Institute of Urology, ul. 3-ya Parkovaya 51,
Moscow 105425, Russia; fax: +7(499)165-0911,
E-mail: vvevdok@mail.ru

² M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991,
Russia; fax: +7(495)939-3181, E-mail: shmal@belozersky.msu.ru

³ M. V. Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-1115,
E-mail: vbturovet@rambler.ru

Received February 17, 2015

The effects of low concentrations of hydrogen peroxide (10–100 μM) on sperm motility and on the activity of the sperm enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDS) were investigated. Incubation with 10 and 100 μM hydrogen peroxide was shown to increase the number of spermatozoa with progressive motility by 20 and 18%, respectively, and to enhance the activity of GAPDS in sperm cells by 27 and 20% compared to a semen sample incubated without additions. It was also found that incubation with 10 μM hydrogen peroxide increased the content of reduced glutathione (GSH) in sperm cells by 50% on average compared to that in the control samples. It is supposed that low concentrations of hydrogen peroxide activate the pentose phosphate pathway, resulting in NADPH synthesis and the reduction of oxidized glutathione by glutathione reductase yielding GSH. The formed GSH reduces the oxidized cysteine residues of the GAPDS active site, increasing the activity of the enzyme, which in turn enhances the content of sperm cells with progressive motility. Thus, increase in motile spermatozoa in the presence of low concentrations of hydrogen peroxide may serve as an indicator of normal functioning of the antioxidant defense system in sperm cells.

Key words: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spermatozoa, reactive oxygen species, antioxidant defense