

ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ»

ОНУФРОВИЧ ОЛЕНА КОСТЯНТИНІВНА

УДК 616.697–092:612.616.2.015.111/.113

**ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНІ ПРОЦЕСИ ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ АРГІНАЗА/НО-
СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ РІЗНИХ ФОРМАХ
НЕПЛІДНОСТІ ЧОЛОВІКІВ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Тернопіль – 2017

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор

Воробець Зіновій Дмитрович,

Львівський національний медичний університет

імені Данила Галицького МОЗ України,

завідувач кафедри медичної біології, паразитології

та генетики

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, доцент **Заїчко Наталія Валентинівна**, Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова МОЗ України, завідувач кафедри біологічної та загальної хімії

доктор медичних наук, професор **Мисула Ігор Романович**, ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», завідувач кафедри медичної реабілітації

Захист відбудеться «29» червня 2017 року об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 58.601.04 Державного вищого навчального закладу «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» зал засідань спеціалізованих вчених рад за адресою: 46001, м. Тернопіль, майдан Волі, 1.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Державного вищого навчального закладу «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України» за адресою: 46001, м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8.

Автореферат розісланий « 27 » травня 2017 року.

Учений секретар

спеціалізованої вченої ради К 58.601.04

кандидат біологічних наук, доцент

Т.Я. Ярошенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Питання репродуктивного здоров'я населення сьогодні особливо актуальне. Однією з причин непліддя є порушення статевої функції чоловіків (Воробець Д.З., Кочешкова Н.С., 2008; Горпинченко та ін., 2016; Aitken R.J. et al., 2016). Патологічні процеси, які відбуваються у сім'яниках і придаткових залозах, змінюють структуру і форму сперматозоїдів, що знижує їх рухливість і запліднювальну здатність (Горпинченко І.І. та ін., 2016; Aitken R.J., 2016; Michel T. et al., 2016). Загальноприйняті методи діагностики неплідності не завжди вказують на причину зниження життєздатності та біологічної повноцінності сперматозоїдів, не розкривають механізму структурно-функціональних змін (Воробець Д.З., Кочешкова Н.С., 2008).

Як відомо, розвиток багатьох захворювань супроводжується оксидативним стресом унаслідок інтенсивного утворення в клітинах активних форм кисню (Владимиров Ю.А. и др., 2012; Mehrotra A. et al., 2013; Aitken R.J. et al., 2016). Пероксидне окиснення ліпідів – універсальний механізм ушкодження клітинних мембран за різних патологій (Mehrotra A. et al., 2013). Зміна ліпідного оточення мембран і посилення процесів пероксидації призводять до структурних порушень у клітинах та активності мембранозв'язаних ензимів (Tang et al., 2012; Aitken R.J., 2016). У знешкодженні вторинних продуктів пероксидації та інших окиснених речовин головну роль відіграє глутатіонова антипероксидна система (Lakpour N. et al., 2013; Maiorino M. et al., 2016).

Унаслідок недостатнього функціонування систем антиоксидантного захисту змінюється активність аргіназа/NO-синтазної та Ca^{2+} -транспортувальних систем і відповідно концентрація оксиду азоту та Ca^{2+} в клітині, які є внутрішньоклітинними месенджерами й прямо чи опосередковано регулюють більшість клітинних функцій (Wu G. et al., 2009; Воробець З.Д. та ін., 2012;). У цьому аспекті роль Нітроген (II) оксиду, як універсального клітинного й тканинного метаболіту в регуляції клітинних функцій і паракринного регулятора міжклітинних взаємодій, не викликає сумніву (Реутов В.П. та ін., 2008; Fukumura D., 2016). Синтез оксиду азоту здійснюється за участю NO-синтази (EC 1.14.13.39) з *L*-аргініну шляхом окисного перетворення (Alkaitis M.S., Crabtree M.J., 2012). *L*-аргінін також метаболізується за участю аргінази. Баланс між регуляторними фізіологічними та цитотоксичними властивостями значною мірою зумовлений локальною концентрацією оксиду азоту, а також метаболічним статусом тканин, у яких синтезується та реалізує ефект оксиду азоту (Бондарь Т.Н., 2009).

Із огляду на важливу роль структурно-функціональної повноцінності сперматозоїдів у репродукції людини, проведені нами дослідження спрямовані на вивчення активності глутатіонової антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем за різних форм патоспермії чоловіків і мають як теоретичне, так і практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планових науково-дослідних тем Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Дослідження функціонально-метаболічних резервів стрес-лімітуючих систем організму за екстремальних умов з

метою виявлення ефективних способів їх корекції» (державний реєстраційний номер 011101U000121), «Дослідження системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостатування функціонально-метаболических параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи» (державний реєстраційний номер 0116U004510) і теми «Молекулярно-біологічні регуляторні механізми порушення запліднювальної здатності сперматозоїдів і розробка нових імуно-біохімічних методів діагностики фертильності у чоловіків» (грант Президента України № 97/2016-рп від 13.04.2016 р.). Автор є співвиконавцем наведених тем, особисто провела лабораторні дослідження, представлені у дисертаційній роботі. Тема дисертації затверджена Вченою радою медичного факультету № 2 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 6 від 18.03.2014 р.).

Мета роботи. З'ясування особливостей функціонування глутатіонової антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем сперматозоїдів за різних форм патоспермії чоловіків.

Для досягнення поставленої мети в роботі заплановано розв'язати такі завдання:

1. Проаналізувати етіологічні чинники, що провокують патоспермію і розвиток неплідності та з'ясувати морфофункціональні особливості еякуляту і сперматозоїдів чоловіків за різних форм патоспермії.

2. Дослідити зміни концентрації ТБК-активних продуктів, концентрації відновленого глутатіону й активності ензимів глутатіонової антиоксидантної системи (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази) сперматозоїдів за різних форм патоспермії.

3. Вивчити зміни активності аргінази сперматозоїдів за різних форм патоспермії.

4. Визначити зміни активності окремих ізоформ NO-синтази сперматозоїдів за різних формах патоспермії.

5. З'ясувати кореляційні та причинно-наслідкові взаємозв'язки між активністю глутатіонової антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем сперматозоїдів за різних форм патоспермії.

Об'єкт дослідження: регуляторні системи антиоксидантного захисту та системи аргіназа/NO-синтаза сперматозоїдів за різних форм патоспермії.

Предмет дослідження: активність ензимів глутатіонової антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем сперматозоїдів за різних форм патоспермії у чоловіків.

Методи дослідження: біохімічні (препаративна біохімія, ензимологія, спектрофотометрія, біохімічна кінетика), лабораторної діагностики та статистичного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше проведено комплексне дослідження активності ензимів глутатіонової антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної регуляторних систем сперматозоїдів за різних форм патоспермії у чоловіків.

Показано, що при всіх формах патоспермії у сперматозоїдах відбувається активація процесів перекисного окиснення ліпідів, однак найбільшою мірою – в разі лейкоцитоспермії. При цьому знижується активність ензимів антиоксидантного захисту (глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази).

З'ясовано, що активність аргінази у сперматозоїдах неплідних чоловіків із олігозооспермією, астенозооспермією, олігоастенозооспермією та лейкоцитоспермією у 2,2–3,3 раза нижча щодо нормозоспермії. У сперматозоїдах неплідних чоловіків із усіма формами патоспермії виявлено зниження активності eNOS у 1,4–3,2 раза щодо чоловіків із нормозоспермією. Одночасно констатовано, що в сперматозоїдах неплідних чоловіків із різними формами патоспермії у 22,8–58,4 раза зростанням активності індукцибельної NO-синтази.

Виявлено взаємозв'язок між активністю ензимів глутатіонової антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем і морфо-функціональними характеристиками сперматозоїдів. Показано, що за всіх форм патоспермії зниження концентрації та кількості рухливих форм і зростання кількості патологічних форм сперматозоїдів відповідно корелює зі зростанням перекисного окиснення ліпідів, зниженням активності ензимів антиоксидантного захисту, зниженням активності ендотеліальної NO-синтази і зростанням активності індукцибельної NO-синтази.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані обґрунтують розробку нових додаткових методів діагностики функціонального стану сперматозоїдів за співвідношенням активності глутатіонової антиоксидантної системи й активності процесів перекисного окиснення ліпідів, а також за активністю ензимів аргіназа/NO-синтазної системи у чоловіків із патоспермією. Матеріали досліджень впроваджені в навчальний і науковий процес на кафедрах медичної біохімії та клініко-лабораторної діагностики ДВНЗ «Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України», кафедрі біологічної хімії Харківського національного медичного університету, кафедрі медичної біології та генетики Вищого державного навчального закладу України «Буковинського державного медичного університету».

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Аспірантка особисто здійснила патентно-інформаційний пошук, аналіз науково-медичної інформації за темою дисертаційної роботи, самостійно виконала лабораторні дослідження, статистичну обробку даних і аналіз отриманих результатів, сформулювала висновки дисертації. Разом із науковим керівником, доктором біол. наук, проф. З.Д. Воробцем розробила програму, визначила мету і завдання дослідження, методичні підходи до проведення досліджень. У працях, опублікованих у співавторстві, дисертантці належать фактичний матеріал і основний творчий доробок: результати власних досліджень, участь у аналізі та узагальненні отриманих даних, підготовка праці до друку.

Апробація результатів дисертації. Дисертаційну роботу апробовано на спільному засіданні кафедр біохімії, медичної біології та біофізики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Результати досліджень та основні положення дисертації були представлені на наукових семінарах кафедри медичної біології (Львів, 2013-2016), Міжнародній

науковій конференції «Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання» (Дніпропетровськ, 2014), Міжнародній науковій конференції «Механізми функціонування фізіологічних систем» (Львів, 2014), XII Біохімічному конгресі (Київ, 2014), 40th FEBS Congress (Berlin, Germany, 2015), XIV International Congress of Medical Sciences (Sofia, Bulgaria, 2015), 10th Annual Scientific Conference Wroclaw (Poland, 2015), Міжнародній науковій конференції «Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика» (Одеса, 2015), VIII і IX науково-практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 2015, 2016), XVI Конгресі світової федерації українських лікарських товариств (Берлін-Київ 2016), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Медична наука в практику охорони здоров'я» (Полтава, 2016).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 праць, із яких 6 статей у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України, (із них 1 цитована у Scopus) та 11 тез доповідей у матеріалах наукових з'їздів, міжнародних і вітчизняних конференцій і конгресів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 164 сторінках (основний обсяг становить 122 сторінки) друкованого тексту і включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів та методів досліджень, власні дослідження, аналіз і узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних джерел, який містить 289 найменувань (67 кирилицею і 222 латиницею). Дисертація ілюстрована 9 таблицями та 25 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У розділі «**Огляд літератури**» описано морфофункціональні властивості сперматозоїдів чоловіків, подано загальну характеристику метаболічних порушень при різних формах патоспермії, охарактеризовано та узагальнено сучасні уявлення стосовно функціонування аргінази, NO-синтази, про- та антиоксидантної системи. Особливу увагу приділено змінам функціональної активності аргінази, NO-синтази, ензимам системи глутатіону за патоспермії.

Матеріали та методи досліджень. У дослідженнях використовували сперматозоїди чоловіків з віком 20–44 роки. Серед обстежених були як умовно здорові, без розладів репродуктивної функції, так і неплідні чоловіки. Контрольна група складалась із 20 соматично здорових чоловіків зі збереженою фертильністю й нормозооспермією та підтвердженим батьківством (перебувають у шлюбі протягом 3-10 років і мають 1-3 здорових дітей). Перед включенням до дослідження всі чоловіки були ознайомлені з інформаційним листком пацієнта та давали інформовану згоду на участь в дослідженні.

Основна група – пацієнти з неплідністю. Усім чоловікам проведено аналіз спермограми та виконано біохімічні дослідження, що характеризують про- та антиоксидантний статус та активність аргінази/NO-синтазної системи сперматозоїдів. Аналіз сперми включав наступні параметри: рухливість, концентрацію та морфологічні характеристики сперматозоїдів. Дослідження морфологічних особливостей сперми ґрунтувалось на використанні методу (Haidl G., 2002). Матеріалом для дослідження були зразки сім'яної рідини, яку отримували

в центральній лабораторії Львівської обласної клінічної лікарні. Показники спермограм (концентрація сперматозоїдів, їх рухливість, морфологія та відсоток живих форм) оцінювались за допомогою світлооптичної мікроскопії згідно директив щодо проведення спермограм (ВООЗ, 2010).

Проаналізовано дані 72 чоловіків, що проходили первинне обстеження у зв'язку з непліддям у консультативній поліклініці Львівської обласної клінічної лікарні в період 2013–2017 роки. Середній вік пацієнтів становив $26,2 \pm 4,2$ років. Критерії включення: вік 20-44 роки, неплідність у шлюбі 1-10 років, чоловічий фактор неплідності за умов олігозооспермії або астенозооспермії. Критерії виключення: неплідність у шлюбі понад 10 років, азооспермія, надмірне вживання алкоголю і вплив будь-яких шкідливих фізико-хімічних чинників під час діагностично-лікувальних заходів.

Усіх хворих пацієнтів було розділено на 4 групи. За показниками спермограм олігозооспермія була виявлена у 12 пацієнтів (16,7 %), які увійшли в 1-шу групу, астенозооспермія у 17 пацієнтів (23,6 %), що склали 2-гу групу, олігоастенозооспермія у 10 пацієнтів (13,9 %), які увійшли в 3-тю групу. У 39 (54,2 %) обстежуваних неплідних чоловіків вміст лейкоцитів у спермі складав $< 1,0 \cdot 10^6$ /мл, лише у 33 (45,8 %) пацієнтів відзначалася лейкоцитоспермія, тобто вміст лейкоцитів коливався від $1,0 \cdot 10^6$ /мл до $3,0 \cdot 10^6$ /мл, що свідчило про наявність запального процесу у цього відсотка чоловіків. Вони склали 4-ту групу.

Члени комісії з питань біоетики Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (протокол № 2 від 16 лютого 2015 р.) порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявили. Були передбачені заходи із забезпечення безпеки здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм у відповідності до принципів Гельсінської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних Законів України.

Отримання сперми у пацієнтів з неплідністю проводили після попереднього завершення їхнього клінічного обстеження перед призначенням їм курсу лікування. Сперматозоїди чоловіків відмивали від плазми еякуляту 3-разовим центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хв у середовищі відмивання, яке містило (мМ): 120 NaCl, 30 KCl, 30 Hepes (pH 7,4). Для пермеабілізації мембран сперматозоїдів і розкриття латентної активності ензимів до їх суспензії додавали 0,5 % детергент сапонін (Воробець Д.З., Кочешкова Н.С., 2008).

Визначення активності аргінази сперматозоїдів, пермеабілізованих сапоніном, проводили за утворенням сечовини, вміст якої оцінювали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (Сімко, Україна). Визначення NO-синтазної ензиматичної активності сапонін-перфорованих сперматозоїдів проводили у відповідності з методом, описаним Раваєвою М.Ю., Чуян О.М., 2011). Активність Ca^{2+} -незалежної ізоформи (iNOS) оцінювали додаючи в інкубаційне середовище селективний інгібітор індукбельної ізоформи аміногуанідин замість $CaCl_2$. Активність Ca^{2+} -залежної ізоформи, що відповідає конститутивній ізоформі NOS (cNOS), розраховували як різницю між загальною активністю NOS і

активністю Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS. Активність NO-синтази виражали в нмолях окисненого NADPH(H^+)/хв·мг протеїну.

Глутатіонпероксидазну активність лімфоцитів визначали за зменшенням вмісту GSH (Моин В.М., 1986), глутатіонредуктазну активність - за зменшенням вмісту NADPH (Власова С.Н., 1990), а глутатіонтрансферазну активність – за зменшенням вмісту GSH (Карпищенко А.И., 2002).

Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах оцінювали за накопиченням ТБК-активних продуктів, основним із яких є МДА (Тимирбулатов С.А., 1981). Вміст відновленого глутатіону визначали за методом Андерсона М.Е. (Anderson M.E., 1985.). Вміст протеїну у лімфоцитарній суміші визначали за методом Лоурі (Lowry O.H. et al, 1951).

Уявні кінетичні параметри аргінази (КФ. 3.5.3.1), ізоформ NO-синтази (КФ 1.14.13.39), ензимів системи глутатіону - глутатіонпероксидази (КФ 1.11.1.9), глутатіонредуктази (КФ 1.8.1.7), глутатіонтрансферази (КФ 2.5.1.18) визначали в координатах Лайнуівера-Берка (Келеті Т., 1990) шляхом лінеаризації кривих і розрахунку констант (Костерін С.О., 1987).

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M) і стандартну похибку (m). Достовірність змін встановлювали за t -критерієм Ст'юдента. Для оцінки зв'язків між показниками проводили кореляційний аналіз за критерієм Пірсона.

Результати експериментальних досліджень. Характеристика етіологічних чинників, що спричиняють патоспермію та аналіз спермограм. При аналізі пацієнтів щодо етіологічного фактора, що спричиняє патоспермію, виявлено, що найбільший відсоток захворювання спричиняє хламідійна інфекція (22,1 %). Уреаплазмоз спричиняв 11,0 % захворювань. Такі комбіновані інфекції як хламідіоз з уреаплазмозом викликали 17,9 %, а трихомоніаз із хламідіозом – 13,6 % захворювань.

Показники, що характеризують функціональний стан сперматозоїдів і сперми, значно відрізнялись в контрольній і дослідних групах (відповідно нормозооспермія та різні форми патоспермії) ймовірно внаслідок запальних уражень сечостатевої системи. При цьому показники рН сперми не відрізнялись значною варіабельністю і знаходились в межах норми (7,2-8,0).

Концентрація сперматозоїдів при нормозооспермії становила $50,0 \pm 6,4$ млн/мл, а загальна їх кількість в еякуляті – $138,0 \pm 7,4$ млн. При патоспермії концентрація сперматозоїдів у групі 1 (олігозооспермія) складала $11,95 \pm 2,35$ млн/мл ($p < 0,001$), у групі 2 (астенозооспермія) – $44,30 \pm 5,35$ млн/мл ($p < 0,05$), у групі 3 (олігоастенозооспермія) – $9,95 \pm 1,65$ млн/мл ($p < 0,001$), а у групі 4 (лейкоцитоспермія) – $46,40 \pm 6,20$ млн/мл, що достовірно не відрізнялось від нормозооспермії.

Хоча концентрація сперматозоїдів є важливою характеристикою сперми, однак її запліднююча здатність залежить в більшій мірі від концентрації та загальної кількості рухливих сперматозоїдів з нормальною будовою, тобто тих, які здатні приймати участь в спермоцитарній реакції.

У нормі рухливість сперматозоїдів складала $52,86 \pm 3,22$ %, а кількість патологічних форм була $32,8 \pm 2,8$ %. При патоспермії в групі 1 відносна кількість рухливих сперматозоїдів складала $42,33 \pm 4,95$ %, а кількість патологічних форм – $39,72 \pm 3,2$ %. У групі 2 відносна кількість рухливих сперматозоїдів була $24,05 \pm 5,35$ %, а кількість патологічних форм – $45,5 \pm 5,2$ %. У групі 3 відносна кількість рухливих сперматозоїдів складала $26,05 \pm 4,25$ %, а кількість патологічних – $42,7 \pm 3,2$ %. При лейкоцитоспермії (група 4) відносна кількість рухливих сперматозоїдів складала $42,34 \pm 3,24$ %, а кількість патологічних – $42,4 \pm 3,6$ %. Концентрація лейкоцитів в еякуляті в нормі складала $0,28 \pm 0,06$ млн/мл. При всіх видах патоспермій вона була значно вищою: при олігозооспермії – $0,46 \pm 0,08$ ($p < 0,001$), астенозооспермії – $0,34 \pm 0,08$ ($p < 0,05$), олігоастенозооспермії – $0,44 \pm 0,09$ ($p < 0,001$), а при лейкоцитоспермії – $1,56 \pm 0,25$ млн/мл ($p < 0,001$),

Отже, при хронічних запальних процесах у сечостатевих органах спостерігається зниження практично всіх показників функціональної активності сперматозоїдів і зростання концентрації лейкоцитів у спермі.

Властивості про- та антиоксидантної системи сперматозоїдів чоловіків при різних формах патоспермії. За умов фізіологічної норми зберігається постійна рівновага між інтенсивністю вільнорадикальних процесів та активністю антиоксидантної системи. Зниження активності антиоксидантної системи сперматозоїдів може бути пов'язано з порушенням функції сперматозоїдів та їх здатності до запліднення. ТБК-позитивні продукти є маркером окисидативного стресу (Oral O. et al., 2006). У результаті проведених досліджень виявлено статистично достовірне збільшення вмісту ТБК-активних продуктів в сперматозоїдах неплодних чоловіків порівняно з аналогічним показником контрольної групи чоловіків зі збереженою фертильністю (рис. 1).

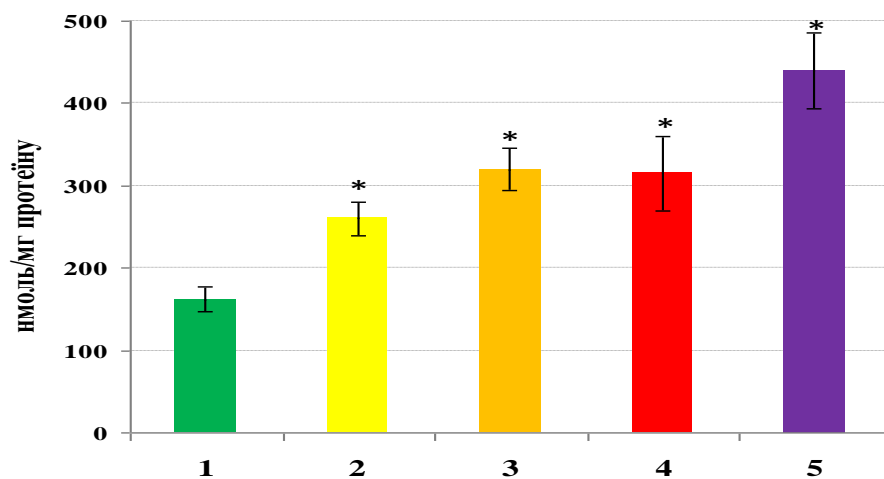


Рис. 1. Зміни концентрації ТБК-активних продуктів сперматозоїдів з: 1 - нормоспермією (n=20), 2 - олігоспермією (n=12), 3 - астенозооспермією (n=17), 4 - олігоастенозооспермією (n=10), 5 - лейкоцитоспермією (n=33) стосовно величини в осіб групи контролю, ($M \pm m$)

Примітка: * $p < 0,05$, зміни вірогідні щодо значень у осіб групи контролю (нормозооспермія).

Так, їх рівень у групі чоловіків з олігозооспермією зростає в 1,6 раза, з $162,2 \pm 15,6$ нмоль/мг протеїну до $260,4 \pm 20,10$ нмоль/мг протеїну ($p < 0,05$). У чоловіків з астенозооспермією та олігоастенозооспермією вміст цього показника в сперматозоїдах перевищує контрольний показник вдвічі і становить $320,2 \pm 25,2$ та $315,4 \pm 45,6$ нмоль/мг протеїну відповідно ($p < 0,05$). У чоловіків із лейкоцитоспермією вміст ТБК-позитивних продуктів досягає максимального значення $440,8 \pm 45,6$ нмоль/мг протеїну, що в 2,7 раза ($p < 0,05$) перевищує цей показник у чоловіків із збереженою фертильністю.

Таким чином, виявлено статистично достовірне збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у сперматозоїдах неплідних чоловіків порівняно з аналогічним показником при нормозооспермії.

Глутатіонпероксидаза (GP), глутатіонредуктаза (GR) та глутатіонтрансфераза (GsT) формують ефективний захист від пероксидного окиснення ліпідів мембран сперматозоїдів і є ключовими антиоксидантними ензимами, що регулюють рівень АФК.

Результати досліджень із вивчення активності глутатіонпероксидази сперматозоїдів пацієнтів із неплідністю показали статистично достовірне зниження ензиматичної активності ензиму (рис. 2). Так, у сперматозоїдах практично здорових осіб активність GP становить $6,51 \pm 0,87$ мкмоль GSH/хв·мг протеїну ($n=20$).

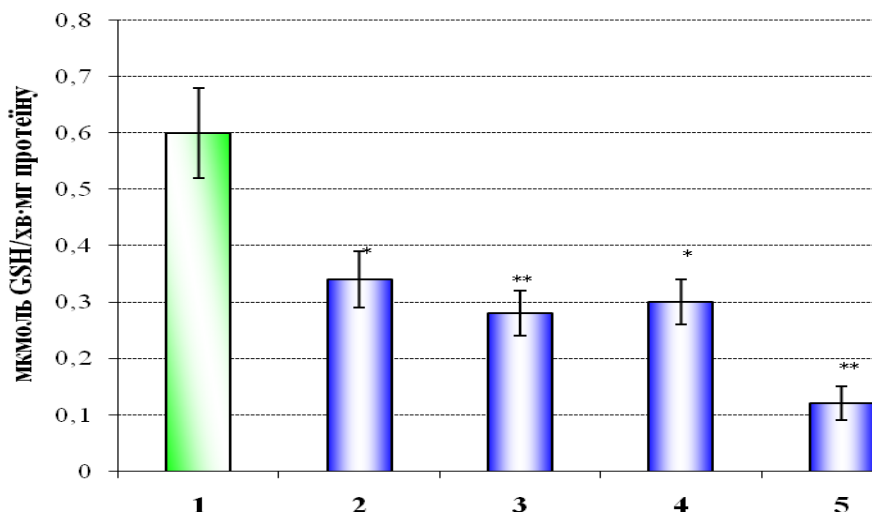


Рис. 2. Активність глутатіонпероксидази сперматозоїдів інфертильних чоловіків із 1 - нормоспермією ($n=20$), 2 - олігоспермією ($n=12$), 3 - астенозооспермією ($n=17$), 4 - олігоастенозооспермією ($n=10$), 5 - лейкоцитоспермією ($n=33$), ($M \pm m$)

Примітка: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, зміни вірогідні щодо значень у осіб контрольної групи (нормозооспермія)

У пацієнтів із олігозооспермією активність GP сперматозоїдів відрізняється від контрольної групи осіб і становить $2,92 \pm 0,29$ мкмоль GSH/хв·мг протеїну, що нижче норми в 2,2 раза ($n=12$), ($p < 0,001$). У пацієнтів з астенозооспермією

ензиматична активність GP знижується порівняно з контрольною групою осіб до $2,32 \pm 0,36$ мкмоль GSH/хв·мг протеїну, що нижче норми в 2,8 раза ($n=17$) ($p<0,01$). У пацієнтів з олігоастенозооспермією ензиматична активність GP знижується порівняно з контрольною групою осіб до $2,32 \pm 0,47$ мкмоль GSH/хв·мг протеїну ($n=10$). Це нижче норми в 2,8 раза ($p<0,001$). У пацієнтів з лейкоцитоспермією ензиматична активність GP ще більш знижується порівняно з контрольною групою осіб, до $1,71 \pm 0,36$ мкмоль GSH/хв·мг протеїну, що нижче норми в 3,8 раза ($n=33$) ($p<0,001$).

У результаті досліджень із вивчення активності глутатіонредуктази сперматозоїдів пацієнтів із неплідністю встановлено статистично достовірне зниження активності ензиму (рис. 3).

Так, у сперматозоїдах практично здорових осіб активність GR становить $0,52 \pm 0,77$ нмоль NADPH/хв·мг протеїну ($n=20$). У пацієнтів із олігозооспермією активність GR сперматозоїдів істотно знижується щодо контрольної групи осіб і становить $0,23 \pm 0,05$ нмоль NADPH/хв·мг протеїну ($n=12$), тобто знижується в 2,3 раза ($p<0,05$). У пацієнтів із астенозооспермією ензиматична активність GR також знижується порівняно з контрольною групою осіб, до $0,32 \pm 0,04$ нмоль NADPH/хв·мг протеїну ($n=17$), що нижче контрольних значень в 1,6 раза ($p<0,005$). У пацієнтів із олігоастенозооспермією ензиматична активність GR також знижується порівняно з контрольною групою осіб – $0,32 \pm 0,03$ нмоль NADPH/хв·мг протеїну ($n=10$), що нижче від контрольних значень в 1,7 раза ($p<0,05$).

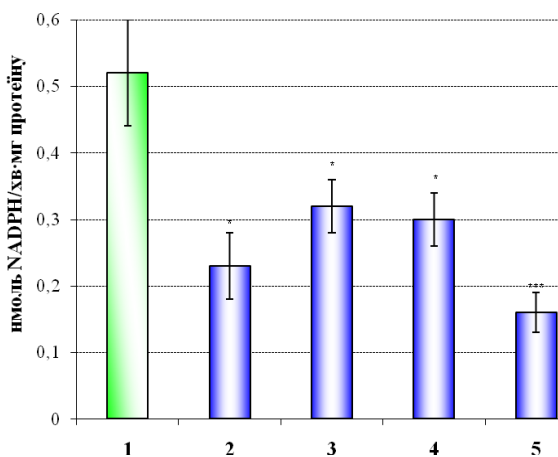


Рис. 3. Активність глутатіонредуктази сперматозоїдів інфертильних чоловіків
1 - нормоспермією ($n=20$), 2 - олігоспермією ($n=12$), 3 - астенозооспермією ($n=17$), 4 - олігоастенозооспермією ($n=10$), 5 - лейкоцитоспермією ($n=33$), ($M \pm m$)
Примітка: * $p<0,05$, *** $p<0,001$, зміни вірогідні щодо значень у осіб групи контролю (нормозооспермія)

У пацієнтів із лейкоцитоспермією ензиматична активність GR знижується більш суттєво порівняно з контрольною групою осіб – $0,16 \pm 0,03$ нмоль NADPH/хв·мг протеїну ($n=33$), що нижче норми в 3,2 раза ($p<0,001$).

Зниження активності глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази безпосередньо зв'язане зі збільшенням рівня продуктів пероксидації ліпідів і погіршенням стану окиснювально-відновної рівноваги в досліджуваних групах неплідних чоловіків. Нижча активність GR у сперматозоїдах чоловіків з порушенням фертильності ймовірно зумовлена недостатньою кількістю внутрішньоклітинних запасів NADPH, які забезпечуються активністю NADPH-генерувальних ензимів.

Результати досліджень із вивчення активності глутатіонтрансферази сперматозоїдів пацієнтів із неплідністю показали статистично достовірне зниження ензиматичної активності ензиму.

Так, в сперматозоїдах практично здорових осіб активність GsT становить $0,6 \pm 0,08$ мкмоль GSH/хв·мг протеїну ($n=20$). У пацієнтів із олігозооспермією активність GsT сперматозоїдів істотно не відрізняється від контрольної групи осіб і становить $0,34 \pm 0,06$ мкмоль GSH/хв мг протеїну ($n=12$), що в 1,8 раза нижче контрольних значень ($p < 0,05$). У пацієнтів з астенозооспермією ензиматична активність GsT також знижується порівняно з контрольною групою осіб, до $0,28 \pm 0,08$ мкмоль GSH/хв мг протеїну ($n=17$). Ця величина нижча контрольної в 2,1 раза ($p < 0,05$). У пацієнтів з олігоастенозооспермією ензиматична активність GsT також знижується порівняно з контрольною групою осіб до $0,3 \pm 0,05$ мкмоль GSH/хв на 1 мг протеїну ($n=10$), тобто в 2 рази ($p < 0,05$). У пацієнтів з лейкоцитоспермією ензиматична активність GsT знижується більш суттєво порівняно з контрольною групою осіб, до $0,1 \pm 0,03$ мкмоль GSH/хв мг протеїну ($n=33$), що в 6 разів нижче контрольних значень.

Глутатіон є одним з найбільш важливих антиоксидантів, що діють в якості кофактора для GP і реагують безпосередньо з АФК, його сульфгідрильними групами. GSH і GP функціонують як антиоксиданти, зокрема в сім'яниках. GSH знешкоджує надлишок АФК і окиснюється до GSSG (окиснений глутатіон), який потім перетвориться назад у відновлений GSH через GR.

Вміст відновленого глутатіону в сперматозоїдах в умовах норми складає $34,0 \pm 3,99$ пмоль/10⁶ клітин.

При олігозооспермії вміст GSH знижується до $16,8 \pm 1,9$ пмоль GSH/10⁶ клітин, тобто в 2 рази ($p < 0,05$), а при астенозооспермії він знижується до $17,5 \pm 1,83$ пмоль GSH/10⁶ клітин, тобто в 1,9 раза ($p < 0,05$). Щодо олігоастенозооспермії, то вміст GSH в сперматозоїдах при цій патології складає $18,3 \pm 2,64$ пмоль GSH/10⁶ клітин, тобто був в 1,8 раза нижчим норми ($p < 0,05$), а при лейкоцитоспермії він складає $27,1$ пмоль GSH/10⁶ клітин, тобто був в 1,2 раза нижчим значень при нормозооспермії ($p < 0,05$).

Важливим показником про- та антиоксидантного гомеостазу вважається співвідношення відновленої форми глутатіону до окисненої.

Дослідження, проведені нами показали, що при нормозооспермії співвідношення GSH/GSSH становить $15,2 \pm 1,9$. При різних формах патоспермії воно є значно нижчим. Вважається, що зниження GSH в спермі може бути важливим непрямим біомаркером ідіопатичного чоловічого непліддя (Atig F. et al. 2012).

Властивості аргінази та NO-синтаз сперматозоїдів чоловіків при патоспермії. Вивчення змін ензиматичної активності аргінази при патологічних станах викликає значний інтерес у дослідників в медико-біологічній практиці. Це, в певній мірі, зв'язано з тим, що аргіназа залучена до метаболізму NO шляхом конкуренції з NO-синтазою за L-аргінін. Аргіназа відіграє важливу роль у регуляції клітинного синтезу NO і модулює його біологічні ефекти (Mori M., 2007).

У результаті проведених досліджень з вивчення активності аргінази встановлено, що у сперматозоїдах практично здорових осіб активність аргінази

становить $68,6 \pm 7,2$ нмоль сечовини/хв·мг протеїну ($n=20$) (рис. 4). У пацієнтів із олігозооспермією (перша група) активність аргінази сперматозоїдів істотно відрізняється від контрольної групи і становить $31,2 \pm 2,2$ нмоль сечовини/хв·мг протеїну ($n=12$), що в 2,2 раза нижче групи контролю ($p < 0,001$). У пацієнтів із астенозооспермією (друга досліджувана група) активність ензиму становить $30,2 \pm 5,8$ нмоль/хв·мг протеїну ($n=17$), що в 2,3 раза нижче групи контролю ($p < 0,001$). У пацієнтів із олігоастенозооспермією (третья досліджувана група) активність становить $28,4 \pm 4,6$ нмоль/хв·мг протеїну ($n=10$), що в 2,4 раза нижче контрольних значень ($p < 0,001$). У пацієнтів із лейкоцитоспермією (четверта досліджувана група) ензиматична активність аргінази знижується ще стрімкіше і складає $20,8 \pm 5,1$ нмоль сечовини/хв·мг протеїну ($n=33$), що нижче контролю в 3,3 раза ($p < 0,001$).

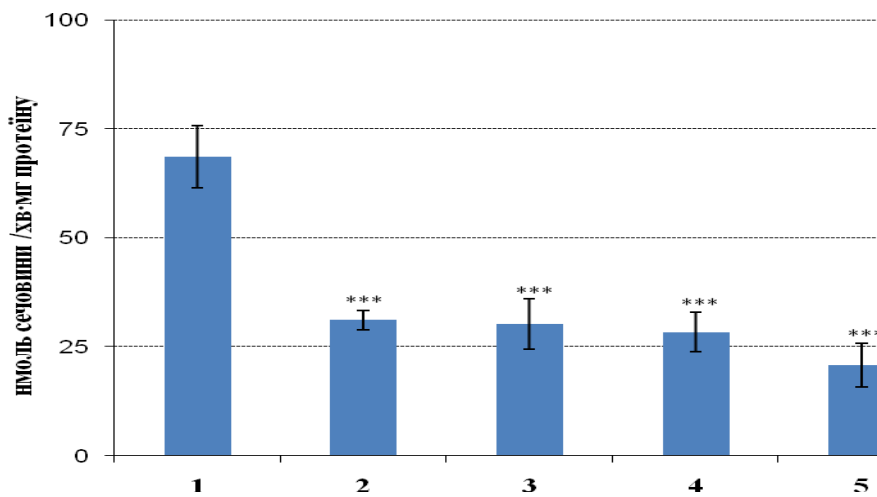


Рис. 4. Активність аргінази сперматозоїдів у пацієнтів з 2 - олігозооспермією ($n=12$) та 3 - астенозооспермією ($n=17$), 4 - олігоастенозооспермією ($n=10$), 5 - лейкоцитоспермією ($n=33$) та осіб групи 1 - контролю ($n=20$), ($M \pm m$)

Примітка: *** $p < 0,001$, зміни вірогідні щодо значень у осіб групи контролю (нормозооспермія).

Загальновідомо, що лейкоцити є маркерами запалення та/або наявності інфекції. Вони негативно впливають на сперматозоїди, стимулюють утворення реактивних форм кисню, індукцію та розвиток оксидативного стресу, у такий спосіб пригнічуючи рухливість і функціональну активність сперматозоїдів (Lakner J.E. et al., 2008). Активні форми кисню, які продукуються лейкоцитами, можуть викликати пошкодження ДНК сперматозоїдів (Gavriluk D., Aitken R.J., 2015).

У чоловіків із порушенням сперматогенезу за типом олігозооспермії пригнічення активності аргінази сперматозоїдів позитивно корелює зі зниженням їх концентрації в еякуляті ($r=0,68$, $p < 0,05$).

Кінетичний аналіз ензиматичної реакції показав, що за умов патоспермії у спермі активність аргінази знижується за рахунок зменшення числа обертів ферменту (значення V_{\max} зменшується).

За останнє десятиліття з'явилась численна кількість досліджень, присвячених вивченню ролі оксиду азоту та NO-синтаз у регулюванні фізіологічних функцій і розвитку патологічних процесів.

У результаті вивчення активності NOS сперматозоїдів пацієнтів із неплідністю виявлено статистично достовірне зниження ензиматичної активності ендотеліальної ізоформи ензиму, що супроводжується різким зростанням індукбельної ізоформи NOS (табл. 1).

Таблиця 1

Зміни активності ендотеліальної та індукбельної ізоформ NO-синтази в осіб групи контролю ($n=20$) та в пацієнтів з олігозооспермією ($n=12$), астенозооспермією ($n=17$), олігоастенозооспермією ($n=10$), лейкоцитозооспермією ($n=33$)

| Активність ензимів Групи пацієнтів | Активність eNOS (пмоль цитруліну/хв·мг протеїну) | Активність iNOS (пмоль цитруліну/хв·мг протеїну) |
|---------------------------------------|--|--|
| Група контролю (нормозооспермія) | $4,8 \pm 0,5$ | $0,28 \pm 0,09$ |
| Пацієнти з олігозооспермією | $3,2 \pm 0,5^*$ | $6,4 \pm 0,4^{***}$ |
| Пацієнти з астенозооспермією | $3,4 \pm 0,5^*$ | $8,2 \pm 1,2^{***}$ |
| Пацієнти з олігоастенозооспермією | $3,2 \pm 0,6^*$ | $8,6 \pm 1,5^{***}$ |
| Пацієнти з лейкоцитозооспермією | $1,5 \pm 0,5^{***}$ | $15,8 \pm 2^{***}$ |

Примітка: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, зміни вірогідні щодо значень в осіб групи контролю

Так, у сперматозоїдах практично здорових осіб активність eNOS становить $4,8 \pm 0,5$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну ($n=20$), а активність iNOS – $0,28 \pm 0,09$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну.

У пацієнтів із олігозооспермією активність eNOS сперматозоїдів була в 1,5 раза нижчою щодо контрольної групи осіб і становила $3,2 \pm 0,5$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну ($n=12$) ($p < 0,05$). В той же час активується iNOS в 22,8 раза і в даній групі осіб сягає $6,4 \pm 0,4$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну ($p < 0,001$). У

пацієнтів із астенозооспермією ензиматична активність eNOS також знижується порівняно з контрольною групою осіб – $3,4 \pm 0,5$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну ($n=17$), тобто в 1,4 раза ($p < 0,05$). Одночасно iNOS зростає до $8,2 \pm 1,2$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну, що вище від контрольних значень у 29,3 раза ($p < 0,001$). У пацієнтів із олігоастенозооспермією ензиматична активність eNOS знижується в 1,5 раза порівняно з контрольною групою осіб, до $3,2 \pm 0,6$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну ($n=10$) ($p < 0,05$). Одночасно зростає активність iNOS, до $8,6 \pm 1,5$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну, що вище контрольних значень у 30,7 раза ($p < 0,001$). У пацієнтів із лейкоцитоспермією ензиматична активність eNOS більш суттєво знижується порівняно з контрольною групою осіб, до $1,5 \pm 0,5$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну ($n=33$) (в 3,2 раза, $p < 0,001$). Одночасно iNOS істотно зростає до $15,8 \pm 2$ пмоль цитруліну/хв·мг протеїну, що перевищує значення при нормозооспермії в 58,4 раза ($p < 0,001$).

Кінетичний аналіз показав, що за умов розвитку патології в сперматозоїдах інгібування активності eNOS відбувається за рахунок зниження числа обертів ензиму (значення V_{\max} знижується).

На основі отриманих даних у дисертаційній роботі запропонована гіпотетична модель, що ілюструє причинно-наслідкові зв'язки між функціонуванням прооксидантно-антиоксидантною та аргіназа/NO-синтазної систем при патоспермії. Виявлено, що зниження показників якості сперми корелює зі зростанням ПОЛ і зниженням активності ензимів антиоксидантного захисту, а також зі зниженням активності ендотеліальної та зростанням активності індукцибельної ізоформ NO-синтази.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове розв'язання актуального наукового завдання щодо з'ясування особливостей функціонування про- та антиоксидантною та аргіназа/NO-синтазної систем сперматозоїдів чоловіків при різних формах патоспермії. Запропоновано модель, що описує причинно-наслідкові зв'язки між гомеостазом оксиду азоту та системою глутатіону.

1. Показано, що найпоширенішим етіологічним чинником, який спричиняє інфекційне захворювання та розвиток патоспермії є хламідійна інфекція (22,1 %). За різних форм патоспермії знижується функціональна активність сперматозоїдів, що зумовлено зменшенням концентрації (у 4,2 раза за олігозооспермії, $p < 0,001$ та у 5,0 разів за олігоастенозооспермії, $p < 0,001$) та кількості рухливих форм (у 2,2 раза при олігозооспермії, $p < 0,001$ та 2,0 рази за астенозооспермії, $p < 0,001$) і підвищенням кількості патологічних форм сперматозоїдів, а також збільшенням кількості лейкоцитів у еякуляті в 1,6-5,6 раза, $p < 0,01$ - $p < 0,001$.

2. Виявлено достовірну активацію процесів перекисного окиснення ліпідів у сперматозоїдах при всіх формах патоспермії. При олігозооспермії інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів зростала в 1,6 раза ($p < 0,001$), астенозооспермії - в 2,0 рази ($p < 0,001$), олігоастенозооспермії - в 1,9 раза ($p < 0,001$), а при лейкоцитоспермії - в 2,7 раза ($p < 0,001$) щодо нормозооспермії.

3. Констатовано зниження активності глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази сперматозоїдів чоловіків з олігозооспермією (у 2,2, 2,3, 1,8 рази, $p < 0,001$), з астенозооспермією та олігоастенозооспермією (у 2,8, 1,6, 1,8 рази, $p < 0,001$), з лейкоцитоспермією (у 3,8, 3,3, 6,0 рази, $p < 0,001$) відповідно, порівняно з показниками чоловіків зі збереженою фертильністю. Концентрація відновленого глутатіону при цьому найбільшою мірою знижувалась при олігозооспермії та астенозооспермії (у 1,9-2,0 рази, $p < 0,01$).

4. Встановлено зниження активності аргінази у сперматозоїдах неплідних чоловіків з олігозооспермією (у 2,2 рази, $p < 0,001$), астенозооспермією (у 2,3 рази, $p < 0,001$), олігоастенозооспермією (у 2,4 рази, $p < 0,001$), з лейкоцитоспермією (у 3,3 рази, $p < 0,001$) щодо нормозооспермії.

5. З'ясовано, що у сперматозоїдах неплідних чоловіків з усіма формами патоспермії активність ендотеліальної NO-синтази нижча, ніж у чоловіків із нормозооспермією. Зокрема, з олігозооспермією - у 1,5 рази ($p < 0,05$), астенозооспермією - у 1,4 рази ($p < 0,05$), олігоастенозооспермією - у 1,5 рази ($p < 0,05$), лейкоцитоспермією - у 3,2 рази ($p < 0,001$). Виявлено високовірогідне підвищення активності індукцибельної ізоформи NO-синтази у сперматозоїдах неплідних чоловіків. Зокрема, у сперматозоїдах чоловіків із олігозооспермією індукцибельна NO-синтаза підвищена у 22,8 рази ($p < 0,001$), астенозооспермією - у 29,3 рази ($p < 0,001$), олігоастенозооспермією - у 30,7 рази ($p < 0,001$), з лейкоцитоспермією - у 58,4 рази ($p < 0,001$) порівняно зі нормозооспермією.

6. На основі отриманих даних запропонована гіпотетична модель, що ілюструє причинно-наслідкові зв'язки між функціонуванням прооксидантно-антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем при патоспермії. Встановлено, що зниження показників якості сперми корелює зі збільшенням пероксидного окиснення ліпідів ($r = -0,75$) і зниженням активності ензимів антиоксидантного захисту ($r = 0,68$), а також зі зменшенням активності ендотеліальної ($r = 0,65$) та підвищенням активності індукцибельної ізоформи NO-синтази ($r = -0,67$).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Фафула Р.В. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах чоловіків із порушенням фертильності / Р.В. Фафула, О.К. Онуфрович, У.П. Єфремова, Й.А. Наконечний, З.Д. Воробець // Вісник проблем біології медицини. – 2017. – Вип. 1 (135). – С. 199–204. *(Дисертантом особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

2. Онуфрович О.К. Активність глутатіонзалежних ензимів сперматозоїдів за умов патоспермій / О.К. Онуфрович, Р.В. Фафула, У.П. Єфремова, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець // Медична та клінічна хімія. – 2016. – Т. 18, № 4. – С. 5–10. *(Дисертантом особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

3. Фафула Р.В. Особливості аргіназного шляху метаболізму L-аргініну в сперматозоїдах чоловіків при різних формах патоспермії / Р.В. Фафула, О.К. Онуфрович, У.П. Єфремова, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець // Фізіологічний журнал. – 2016. – Т 62. – № 5. – С. 83-90. *(Дисертантом особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

4. Vorobets D.Z. NO-synthase pathway of L-arginine transformation in spermatozoa of infertile men with different forms of patospermia / D.Z. Vorobets., О.К. Onufrovych, R.V. Fafula, U.P. Iefremova, Z.D. Vorobets // Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry. – 2016. – № 3 (75). – P. 47-53. *(Дисертантом особисто проведено аналіз літературних джерел, виконання лабораторних досліджень, статистичний аналіз отриманих результатів; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

5. Онуфрович О.К. Вплив препаратів з антиоксидантними властивостями на активність ферментів глутатіонової антиоксидантної системи сперматозоїдів при екскреторно-токсичній формі неплідності чоловіків / О.К. Онуфрович, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець // Вісник Дніпропетровського національного університету (Серія біологія, медицина). – 2013. – Т. 4, № 2. – С. 52–56. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку).*

6. Онуфрович О.К. Стан глутатіонової антиоксидантної системи сперматозоїдів при екскреторно-токсичній формі неплідності чоловіків / О.К. Онуфрович, Р.В. Фафула, Д.З. Воробець // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2013. – № 2. – С. 148–151. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку).*

7. Онуфрович О.К. Функціональний зв'язок між порушеннями гормональної регуляції сперматогенезу та аргіназного шляху метаболізму L-аргініну в сперматозоїдах чоловіків при різних формах патоспермії / О.К. Онуфрович, Р.В.Фафула, У.П.Єфремова, Д.З.Воробець, З.Д. Воробець // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторівна організм: ІХ науково-практична конференція, 29-30 вересня 2016 р.: матеріали конф. – Тернопіль: ТДМУ, 2015. – С. 59–60. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

8. Онуфрович О.К. Аргіназна активність сперматозоїдів чоловіків при різних формах патоспермії / О.К. Онуфрович, Р.В. Фафула, У.П. Єфремова, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець // Медична наука в практику охорони здоров'я: Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених, 09 грудня 2016 р.: матеріали конф. – Полтава, 2016. – С. 48. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, матеріали до друку підготовлено у співавторстві).*

9. Онуфрович О.К. Різні форми патоспермії чоловіків: особливості метаболізму L-аргініну / О.К. Онуфрович, Р.В. Фафула, У.П. Єфремова, Д.З. Воробець, З.Д. Воробець // XVI Конгрес світової федерації українських лікарських товариств. 8–23 серпня 2016 р.: матеріали конгр. – Берлін-Київ, 2016. – С. 86. *(Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку).*

10. Onufrovych O. The glutathione antioxidant system of spermatozoa in patients

with excretory toxic form of infertility/ O. Onufrovych , R. Fafula, Z. Vorobets // XIV International Congress of Medical Sciences, Medical University Sofia, May 7-10, 2015.: conf. materials. – Bulgaria. – 2015. – P. 90 (*Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку*).

11. Fafula R.V. Disturbance of regulatory mechanisms of spermatozoa in patients with infertility / R.V Fafula, O.K. Onufrovych, N.G. Makar, Z.D. Vorobets // Bridges in Life Sciences:10th Annual Scientific Conference Wroclaw, April 16-19, 2015.: conf. materials. – Poland. – 2015. – P. 107. (*Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку*).

12. Fafula R. Role of nitric oxide and CD2BP3 adapter protein on human sperm motility // R. Fafula, O. Onufrovych, D. Vorobets, Z. Vorobets // The Biochemical Basis of Life: 40th FEBS Congress Berlin, July 4-9, 2015.: congress materials. – Germany. – 2015. – P. 191. (*Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку*).

13. Онуфрович О.К. Регуляція антипероксидної системи сперматозоїдів за участі іонів кальцію / О.К. Онуфрович, Р.В. Фафула, З.Д. Воробець // Пріоритети сучасної медицини: теорія і практика: матеріали міжнародної наукової конференції 6-7 лютого 2015 р.: матеріали конф. – Одеса, 2015. – С. 201-202. (*Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку*).

14. Воробець З.Д. Особливості функціонування АТФ-гідолазних і глутатіонзалежної антиоксидантної систем сперматозоїдів чоловіків при олігозооспермії З.Д. Воробець, О.К. Онуфрович, Р.В. Фафула, Д.З. Воробець Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм: матеріали VIII науково-практичної конференції, 01-02 жовтня 2015 р.: матеріали конф. – Тернопіль: ТДМУ, 2015. – С. 19. (*Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку*).

15. Онуфрович О.К. Регуляція глутатіонової антипероксидної системи сперматозоїдів чоловіків при екскреторно-токсичній формі неплідності / О.К. Онуфрович, Н.Г. Макар, Р.В.Фафула, З.Д. Воробець // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2014. – Vol. 86, № 5 (2). – С. 116-117. (*Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку*).

16. Онуфрович О.К. Іони кальцію в регуляції глутатіонової антипероксидної системи сперматозоїдів чоловіків / О.К. Онуфрович Н.Г. Макар, Р.В.Фафула, З.Д. Воробець // Механізми функціонування фізіологічних систем: матеріали міжнародної наукової конференції, 15-17 жовтня 2014 р.: матеріали конф. – Львів, 2014. – С. 67. (*Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку*).

17. Онуфрович О.К. Роль іонів кальцію в регуляції глутатіонової антипероксидної системи сперматозоїдів чоловіків при екскреторно-токсичній формі неплідності / О.К. Онуфрович, Р.В. Фафула, Н.Г. Макар, З.Д. Воробець // Фармацевтичні та медичні науки: актуальні питання: матеріали міжнародної наукової конференції, 16-17 травня 2014 р.: матеріали конф. – Дніпропетровськ. – С. 73–74. (*Дисертантом особисто проведено лабораторні дослідження, підготовлено матеріали до друку*)

АНОТАЦІЯ

Онуфрович О.К. Вільнорадикальні процеси та функціонування аргіназа/NO-синтазної системи сперматозоїдів при різних формах неплідності чоловіків. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Державний вищий навчальний заклад “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України”. Тернопіль, 2017.

У дисертаційній роботі досліджено особливості про- та антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем сперматозоїдів чоловіків із різними формами патоспермії.

Показано, що при патоспермії знижується функціональна активність сперматозоїдів. Виявлено достовірну активацію процесів пероксидації ліпідів та встановлено зниження активності глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази і глутатіонтрансферази у сперматозоїдах чоловіків за всіх форм патоспермії щодо показників у осіб групи контролю.

Встановлено знижену активність аргінази у сперматозоїдах неплідних чоловіків щодо чоловіків з нормозооспермією. З'ясовано, що у сперматозоїдах неплідних чоловіків зі всіма формами патоспермії активність ендотеліальної синтази оксиду азоту нижча, ніж у чоловіків зі нормозооспермією, тоді як активність індукційної синтази оксиду азоту зростає у багато разів.

Показано, що зниження показників якості сперми корелює зі збільшенням ПОЛ і зниженням активності ензимів антиоксидантного захисту, а також зі зменшенням активності ендотеліальної та підвищенням активності індукційної ізоформ синтази оксиду азоту. Запропонована гіпотетична модель, що ілюструє причинно-наслідкові зв'язки між функціонуванням прооксидантно-антиоксидантної та аргіназа/NO-синтазної систем при патоспермії.

Ключові слова: ТБК-активні продукти, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, глутатіонтрансфераза, аргіназа, NO-синтаза, сперматозоїди, патоспермія.

АННОТАЦИЯ

Онуфрович Е.К. Свободнорадикальные процессы и функционирование аргиназа/NO-синтазной системы сперматозоидов при различных формах бесплодия у мужчин. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.04 - биохимия. - Государственное высшее учебное заведение "Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МОЗ Украины". Тернополь, 2017.

В диссертационной работе исследованы особенности про- и антиоксидантной и аргиназа/NO-синтазной систем сперматозоидов мужчин с различными формами патоспермии.

Показано, что при патоспермии происходит снижение функциональной

активности сперматозоидов. Выявлено достоверная активация процессов пероксидации липидов и показано снижение активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы сперматозоидов у мужчин со всеми формами патоспермии относительно величин у лиц группы контроля.

Показано пониженную активность аргиназы в сперматозоидах бесплодных мужчин по сравнению с мужчинами с нормозооспермией. Выявлено, что в сперматозоидах бесплодных мужчин со всеми формами патоспермии активность eNOS ниже по сравнению с мужчинами с нормозооспермией, в то же время как активность iNOS многократно увеличивается.

Определено, что снижение показателей качества спермы коррелирует с увеличением пероксидации липидов и снижением активности энзимов антиоксидантной защиты, а также с уменьшением активности эндотелиальной и повышением активности индуцибельной изоформы синтазы оксида азота.

Предложена гипотетическая модель, иллюстрирующая причинно-следственные связи между функционированием прооксидантно-антиоксидантной и аргиназа/NO-синтазной систем при патоспермии.

Ключевые слова: ТБК-активные продукты, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансферазы, аргиназа, NO-синтаза, сперматозоиды, патоспермия.

SUMMARY

Onufrovych O.L. Free radical processes and functioning of arginase/ NO-synthase system in various forms of sperm infertility men. - Manuscript.

Dissertation for the scientific degree of PhD in Medicine (specialty 03.00.04 – Biochemistry). – Ternopil State Medical University, Ternopil, 2017.

The dissertation is devoted to the research of antioxidant system features and arginase /NO-synthase system in sperm cells of patients with various pathospermia forms.

According to semen analysis, oligozoospermia was found in 12 patients (16.7 %), astenozoospermia was detected in 17 patients (23.6 %), oligoastenozoospermia was observed in 10 patients (13.9 %). Thirty-nine (54.2 %) infertile men had leukocytes content in the semen lower than $1.0 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$, only in 33 patients (45.8 %) leukocytospermia was noted (the leukocytes content ranged from $1.0 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ to $3.0 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$) which indicates inflammation in this group of men.

It was shown that mean levels of TBARS in sperm cells of infertile men with oligozoo-, astenozoo-, oligoastenozoo- and leucocytospermia were 1.6-, 2.0-, 2.0- and 2.7-fold higher respectively compared with fertile men. The glutathione peroxidase activity was decreased in 2.2-fold in patients with oligozoospermia, in 2.8-fold in patients with astenozoo- and oligoastenozoospermia and in 3.8-fold in patients with leucocytospermia.

It was found that glutathione reductase activity in patients with oligozoo-, astenozoo-, oligoastenozoo- and leucocytospermia were 2.3-, 1.6-, 1.7- and 3.3-fold lower than that in normozoospermic men, respectively. In addition, the glutathione transferase activity was decreased in 1.8–2.1-fold in patients with oligozoo-, astenozoo- and oligoastenozoospermia and in 5.0-fold in patients with leucocytospermia in comparison with healthy donors. The most significant changes have been observed in infertile men

with leucocytospermia.

It has been found that arginase activity in the sperm cells of men with oligozoospermia, asthenozoospermia, oligoasthenozoospermia and leucocytospermia is decreased in 2.1, 2.3, 2.4 and 3.3 times respectively. The most significant changes have been observed in infertile men with leucocytospermia since white blood cells stimulate the formation of reactive oxygen species, induction and development of oxidative and nitrative stress in spermatozoa. Inhibition of arginase pathway of L-arginine metabolism has adaptive role, which is to limit bioavailability of L-arginine and to prevent excessive formation of NO in cytotoxic concentrations to sperm cells. It has been found that arginase inhibition of spermatozoa positively correlated with a decrease in their concentration in the ejaculate of infertile men with oligozoospermia ($r=0.68$).

It has been found that that activity of Ca^{2+} -independent inducible NO-synthase was in 22.9-56 times greater in sperm cell of infertile men than reference values of healthy men, while the activity of Ca^{2+} -dependent NO-synthase (endothelial NO-synthase) was in 1.5-3.2 times lower than in healthy donors. Sperm of infertile men, as compared to fertile men, was characterized by decreased endothelial NO-synthase activity. According to obtained results, the endothelial NO-synthase activity of spermatozoa in patients with impaired fertility of all groups was significantly lower. The endothelial NO-synthase activity in spermatozoa of men with oligozoospermia was 1.5 times ($p<0.05$), in men with asthenozoospermia – 1.4 times ($p<0.05$), in men with oligoasthenozoospermia – 1.5 times ($p<0.05$) and in men with leukocytospermia – 3.2 times ($p<0.001$) lower than in healthy men. The maximum change in endothelial NO-synthase activity was observed in patients with leukocytospermia in comparison with healthy donors.

Besides, increased inducible NO-synthase activity was observed in spermatozoa of infertile men. Men with leukocytospermia were distinguished to have the most expressed increased inducible NO-synthase activity in sperm cell which exceeded the reference values in healthy donors more than half an order (in 56 times ($p<0.001$)). Meanwhile, in spermatozoa of other studied groups of patients the activation of inducible NO-synthase was of weaker intensity. The inducible NO-synthase activity was 22.9 times ($p<0.001$) greater in sperm cell of men with oligozoospermia, in almost 30 times ($p<0.001$) greater in men with asthenozoospermia and in 30.7 times ($p<0.001$) greater in patients with combined pathology.

It has been shown that pathospermia is accompanied by an imbalance in the system of NO synthesis in the sperm cells. This imbalance includes the activation of the inducible isoform of NO-synthase and significant inhibition of its constitutive isoform. Thus, according to obtained data in men with violations of reproductive function of various forms of pathospermia the redistribution of NO-synthase system towards Ca^{2+} -independent inducible isoform of the enzyme was detected. This indicates uncoupling of NO-synthase in spermatozoa and its dysfunction. As a result of this uncoupling the NOS can switch from NO production to superoxide anion generation.

The obtained data indicate violations of NO-homeostasis, hyperproduction of «harmful» NO by inducible NO-synthase and activation of nitric stress in the spermatozoa of men with various forms of pathospermia, which will result in disruption of their functions, in particular the ability of fertilization.

Therefore, determination of the dynamics of the activity of inducible NO-synthase isoforms may be an additional prognostic criterion used for confirmation of infertility and for the evaluation of effectiveness of treatment.

Key words: thiobarbituric acid reactive substances, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione, male infertility, arginase, NO-synthase, spermatozoa, pathospermia.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів

cNOS – конститутивна NO-синтаза

iNOS – індуцибельна NO-синтаза

NO – оксид азоту (Нітрогену II оксид)

GSH – глутатіон відновлений

GP – глутатіонпероксидаза

GR – глутатіонредуктаза

GsT – глутатіонтрансфераза

МДА – малоновий діальдегід