

Міністерство охорони здоров'я України
Тернопільський національний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України

Тернопільський національний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Мескало Ольга Іванівна

УДК 616.69-008.8: [615.355:542.97] 616.697-008.8-092:612.616.2.014.6

ДИСЕРТАЦІЯ
ФУНКЦІОНУВАННЯ Ca^{2+} , Mg^{2+} - ТА Na^{+} , K^{+} -АТФаз В
СПЕРМАТОЗОЇДАХ ЧОЛОВІКІВ ІЗ ПАТОСПЕРМІЄЮ

091 «Біологія»

09 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.І. Мескало

Наукові керівники:

Лихацький Петро Григорович, доктор біологічних наук, професор,

Воробець Зіновій Дмитрович, доктор біологічних наук, професор

Тернопіль – 2021

АНОТАЦІЯ

Мескало О.І. Функціонування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ - та Na^+, K^+ -АТРаз в сперматозоїдах чоловіків із патоспермією. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія» (09 «Біологія»). – Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, Тернопіль, 2021.

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2022.

Дисертацію присвячено актуальній проблемі – вивчення властивостей основних йон-транспортувальних систем у сперматозоїдах чоловіків при різних формах патоспермії з метою встановлення функціонального значення та діагностичної цінності, що має суттєве медико-біологічне значення.

З'ясовані зміни активностей транспортувальних АТРаз (Na^+, K^+ -АТРази і тапсигаргін-нечутливої та тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази), а також інгібувальний вплив пероксиду та каліксаренів на гідроліз аденозинтрифосфату (АТФ) у сперматозоїдах чоловіків із патоспермією. Виявлено пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази у сперматозоїдах неплідних чоловіків порівняно з фертильними чоловіками. Активність Na^+, K^+ -АТРази у сперматозоїдах пацієнтів з оліго-, астено- та олігоастенозооспермією була вдвічі нижчою порівняно з контрольною групою. У чоловіків із лейкоцитоспермією також спостерігалось зниження активності Na^+, K^+ -АТРази стосовно цього показника у сперматозоїдах чоловіків із нормозооспермією.

Встановлено, що активність тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у пацієнтів з астено-, олігоастено- і лейкоцитоспермією є вірогідно нижчою порівняно із цією величиною у сперматозоїдах фертильних чоловіків. Однак, у пацієнтів з

олігозооспермією тапсигаргін-резистентна і тапсигаргін-чутлива компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази мали тенденцію до зростання, проте ці зміни не були статистично достовірними. У чоловіків із астено-, олігоастено- та лейкоцитоспермією пригнічення тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази має більш виражений характер стосовно контрольних величин, ніж інгібування активності тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

Досліджено ефекти калікс[4]арену С-107 на кінетичні характеристики Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів у нормозооспермічних і патоспермічних чоловіків. Виявлено пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази калікс[4]ареном С-107 внаслідок зниження максимальної швидкості АТР-гідролазної реакції сперматозоїдів нормозооспермічних чоловіків. Спостерігається зниження коефіцієнта Хілла n_H , що вказує на інгібування калікс[4]ареном С-107 АТРазної реакції для оліго- і астенозооспермічних зразків. Значення коефіцієнта Хілла ($n_H > 1$) свідчать про позитивну кооперативність Na^+, K^+ -АТРази з АТР у патоспермічних зразках, отриманих від неплідних чоловіків. Зміни в значеннях коефіцієнта Хілла можуть вказувати на субодиничні зміни структури ензиму при зростаючій концентрації калікс[4]арену С-107 в інкубаційному середовищі.

При високих концентраціях калікс[4]арену С-107 коефіцієнт (напів-) активації MgCl_2 Na^+, K^+ -АТРази в сперматозоїдах нормоспермічних чоловіків знижується, а для олігозооспермічних чоловіків K_{MgCl_2} зростає. При збільшенні концентрації калікс[4]арену С-107 відбувається зростання K_{MgCl_2} для Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів астенозооспермічних чоловіків. При цьому величина коефіцієнта кооперативності Хілла n_H активуючої дії MgCl_2 знижується у присутності калікс[4]арену С-107. Це може свідчити про зміни в субодиничному складі ензиму як результат дії калікс[4]арену С-107 на нього. Висока ефективність інгібуючої дії калікс[4]арену С-107 на Na^+, K^+ -АТразу у нормозооспермічних зразках має неконкурентний характер та

пов'язаний зі зменшення максимальної швидкості реакції в 5 разів. В олігота астенozoоспермічних чоловіків інгібуючий ефект калікс[4]арену С-107 спричинює збільшення K_{MgCl_2} для $MgCl_2$.

Відомо, що H_2O_2 є одним із найтоксичніших активних форм кисню, який має здатність дозозалежно пригнічувати активність Na^+,K^+ -АТРази. Отримані дані вказують на те, що пригнічення активності Na^+,K^+ -АТРази відбувалося під впливом H_2O_2 (50-500 мкМ) у сперматозоїдах інфертильних чоловіків із різними формами патоспермії. Різке зменшення активності ензиму протягом перших 5 хв інкубації з 100 мкМ H_2O_2 , спостерігалось як для нормозооспермічних, так і для патозооспермічних чоловіків. Повністю пригнічена ензиматична активність Na^+,K^+ -АТРази в сперматозоїдах була через 20 хв інкубації з H_2O_2 для астенozoоспермічних чоловіків і через 30 хв для нормозооспермічних чоловіків.

Встановлено, що значення константи напівінгібування (IC_{50}) для пацієнтів з астенozoоспермією було у два рази менше ніж для фертильних чоловіків ($p < 0,05$). Коефіцієнт Хілла був значно вищий лише для пацієнтів з астенozoоспермією, що вказує на зростання позитивно кооперативного зв'язування між Na^+,K^+ -АТРазою та H_2O_2 .

Для з'ясування інгібуючого ефекту H_2O_2 було досліджено вплив на основні кінетичні параметри гідролізу АТР за участю Na^+,K^+ -АТРази. Активність Na^+,K^+ -АТРази знижена за присутності H_2O_2 в середовищі інкубації у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР сперматозоїдів плідних та неплодних чоловіків. Визначено основні кінетичні параметри Na^+,K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків, шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуївера-Берка. За впливу H_2O_2 в сперматозоїдах чоловіків із нормозооспермією спостерігається зростання K_{ATP} і зниження V_{max} , що вказує на змішаний тип інгібування. Проте,

конкурентний тип інгібування спостерігається у сперматозоїдах інфертильних чоловіків, K_{ATP} зростає, а V_{max} достовірно не змінюється.

Встановлено, що в сперматозоїдах чоловіків із патоспермією тапсигаргін-резистентна Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРазна активність більш сприйнятлива до H_2O_2 -індукованого пошкодження, ніж у чоловіків із нормозооспермією. Пригнічення тапсигаргін-чутливої Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази в сперматозоїдах фертильних чоловіків за дії H_2O_2 відбувається за неконкурентним типом (V_{max} знижується, K_{ATP} не змінюється). Проте, у тапсигаргін-резистентної Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази K_{ATP} зростає, що характерно для конкурентного типу інгібування. У сперматозоїдах чоловіків із астенозооспермією для обох Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази компонент спостерігається зростання K_{ATP} , а величина V_{max} достовірно не змінюється.

Оскільки Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРаза є однією з мішеней для активних форм кисню (АФК) і бере безпосередню участь при окисидативному стресі, сперматозоїди отримані від нормо- та патозооспермічних зразків піддавали оксидативному стресу у вигляді екзогенного H_2O_2 в діапазоні різних концентрацій (25, 50, 100 і 200 мкМ). У діапазоні концентрацій Ca^{2+} від 10 до 50 мкМ в інкубаційному середовищі спостерігалось зростання активності тапсигаргін-чутливої і тапсигаргін-резистентної Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів з постійною концентрацією АТР. Зниження ензиматичної активності спостерігалось для обох Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази компонент у присутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі. Схожі результати були отримано для тапсигаргін-чутливої і тапсигаргін-резистентної Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків. Максимальна швидкість гідролізу АТР у інфертильних чоловіків різко знизилася. Зниження величини V_{max} у пацієнтів з астенозооспермією було поступовим.

Як у нормо-, так і в патозооспермічних зразках H_2O_2 реалізує свою інгібуючу дію через механізм неконкурентного гальмування активності тапсигаргін-чутливої Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази (V_{max} зменшується без зміни

спорідненості до Ca^{2+}). При H_2O_2 -індукованому оксидативному стресі уявна константа активації йонами Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}$) не змінювалася для тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у сперматозоїдах чоловіків із доведеною фертильністю, тоді як в астенозооспермічних зразків $K_{\text{Ca}^{2+}}$ зменшується майже вдвічі.

Знижена активність тапсигаргін-резистентної і тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази призводить до порушення Ca^{2+} -гомеостазу і є характерною для аномальних сперматозоїдів (патозооспермія). З метою вивчення особливостей та механізму роботи $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази визначали початкову швидкість реакції, максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції та характеристичний час реакції. Для встановлення цих кінетичних параметрів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР, який каталізується $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою, досліджували динаміку накопичення продукту АТР-гідролазної реакції. За оцінкою змін гідролазної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази досліджено кінетику первинно-активного транспортування йонів Ca^{2+} крізь плазматичну мембрану і мембрани внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо у сапонін-пермеабілізованих сперматозоїдах інфертильних чоловіків із астено- та олігоастенозооспермією. З'ясовано, що у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків транспортування йонів Ca^{2+} крізь плазматичну мембрану характеризується вищою ємністю, ніж крізь мембрани внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо, однак відбувається з однаковою початковою швидкістю і характеристичним часом реакції. Встановлено, що у сперматозоїдах патоспермічних чоловіків транспортування йонів Ca^{2+} за участю обох компонентів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відбувається менш інтенсивно і характеризується нижчою ємністю порівняно із сперматозоїдами чоловіків зі збереженою фертильністю. Вказані зміни кінетичних параметрів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР призводять до пригнічення активності тапсигаргін-резистентної і тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та зумовлюють зниження фертилізаційного потенціалу сперматозоїдів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження АТРаза Р-типу (Na^+, K^+ -АТРази, тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза) у сперматозоїдах інфертильних чоловіків із різними формами патоспермій.

Встановлено пригнічення ензиматичних активностей Na^+, K^+ -АТРази, тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза у сперматозоїдах чоловіків з астено-, олігоастенозооспермією і лейкоцитоспермією стосовно показників у нормозооспермічних зразках. Вивчено кінетичні властивості Na^+, K^+ -АТРази і тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза сперматозоїдів чоловіків із патоспермією.

Виявлено, що за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу відбувається дозозалежне пригнічення активності убаїнчутливої Na^+, K^+ - та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів. Тапсигаргін-резистентна компонента $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів патоспермічних зразків більш сприйнятлива до H_2O_2 -індукованого пошкодження, порівняно з нормозооспермічними зразками.

Встановлено, що калікс[4]арен С-107, пригнічуючи Na^+, K^+ -АТРаза, не змінює кінетичні параметри залежності швидкості реакції ($K_{\text{АТР}}$, n_H) від концентрації субстрату в сперматозоїдах здорових чоловіків. Проте, відмічається зниження коефіцієнта кооперативності n_H інгібування АТРазної реакції калікс[4]ареном С-107 майже вдвічі в оліго- та астенозооспермічних зразках.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані сприяють розробці нових додаткових діагностичних критеріїв для підтвердження неплідності та для розробки нових, вдосконалення існуючих лікувальних тактик при корекції патологічних станів.

Результати дисертаційної роботи впроваджені у навчальний та науковий процес кафедр медичної біології та біофізики Львівського

національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри біофізики та біоінформатики Львівського національного університету імені Івана Франка; кафедри медичної біології та генетики Буковинського державного медичного університету; кафедри біомедицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; в наукову роботу ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України».

Ключові слова: неплідність чоловіків, патоспермія, сперматозоїди, Na^+ , K^+ -АТРаза, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, калікс[4]арени, оксидативний стрес.

SUMMARY

Meskalov O.I. Functioning of Ca^{2+} , Mg^{2+} - and Na^+ , K^+ -ATPases in the spermatozoa of men with pathospermia. – Qualifying scientific work on the right of manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in specialty 091 «Biology» (09 «Biology»). – Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2021.

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2022.

The dissertation is devoted to actual problems – studying of properties of the basic ion-transporting systems in spermatozoa of men at various forms of pathospermia for the purpose of establishment of functional value and diagnostic value that has essential medico-biological value.

Activity changes found of transport ATPases (Na^+ , K^+ -ATPases and thapsigargin-insensitive and thapsigargin-resistant components of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases), as well as the inhibitory effect of peroxide and calixarenes of ATP hydrolysis in sperm of men with pathospermia. Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men compared to fertile men was revealed. The

activity of Na^+, K^+ -ATPase in the spermatozoa of patients with oligo-, astheno- and oligoasthenozoospermia was twice lower compared to the control group. In men with leukocytospermia, a decrease in Na^+, K^+ -ATPase activity relative to this value was also observed in the spermatozoa of men with normozoospermia.

It was found that the activity of tapsigargin-sensitive and tapsigargin-resistant components of $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase in patients with astheno-, oligoastheno- and leukocytospermia is significantly lower compared to this value in fertile sperm. However, in patients with oligozoospermia, the tapsigargin-resistant and tapsigargin-sensitive components of $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase tended to increase, but these changes were not statistically significant. In men with astheno-, oligoastheno- and leukocytospermia, inhibition of the tapsigargin-resistant component $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase is more expressed in relation to control values than inhibition of the activity of tapsigargin-sensitive component $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase.

The effects of calix[4]arene C-107 on the kinetic characteristics of Na^+, K^+ -ATPase of spermatozoa in normozoospermic and pathospermic men were studied. Inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity, calix[4]arene C-107, due to a decrease in the maximum rate of ATP-hydrolase reaction, spermatozoa of normozoospermic men. There is a decrease in the Hill coefficient n_H , which indicates the inhibition of calix[4]arene C-107 ATPase reaction for oligo- and asthenozoospermic samples. The values of the Hill coefficient ($n_H > 1$) indicate a positive cooperation of Na^+, K^+ -ATPase with ATP in pathospermic samples obtained from infertile men. Changes in the values of the Hill coefficient may indicate subunit changes in the structure of the enzyme with increasing concentrations of calix[4]arene C-107 in the incubation medium.

At high concentrations of calix[4]arene C-107, the coefficient of (half-) activation of MgCl_2 Na^+, K^+ -ATPase in the spermatozoa of normospermic men decreases, and for oligozoospermic men K_{MgCl_2} increases. With increasing concentration of calix[4]arene C-107, there is an increase in K_{MgCl_2} for Na^+, K^+ -ATPase of spermatozoa of asthenozoospermic men. The value of the Hill

coefficient n_H under activating action of $MgCl_2$ is reduced in the presence of calix[4]arene C-107. This may indicate changes in the subunit composition of the enzyme as a result of the effect of calix[4]arene C-107 on it. The high efficiency of the inhibitory effect of calix[4]arene C-107 on Na^+,K^+ -ATPase in normozoosperm samples is non-competitive and is associated with a reduction of the maximum reaction rate by 5 times. In oligo- and asthenozoospermic males, the inhibitory effect of calix[4]arene C-107 causes an increase in K_{MgCl_2} for $MgCl_2$.

It is known that H_2O_2 is one of the most toxic reactive oxygen species which has the ability to inhibit of Na^+,K^+ -ATPase activity in a dose-dependent manner. The obtained data indicate that the inhibition of Na^+,K^+ -ATPase activity occurred under the influence of H_2O_2 (50-500 μM) in the spermatozoa of infertile men with various forms of pathospermia. A sharp decrease in enzyme activity during the first 5 min of incubation with 100 μM H_2O_2 was observed for both normozoospermic and pathozoospermic men.

Completely inhibited enzymatic activity of Na^+,K^+ -ATPase in sperm was after 20 min of incubation with H_2O_2 for asthenozoospermic men and after 30 min for normozoospermic men. It was found that the value of half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for patients with asthenozoospermia was twice less than for fertile men ($p < 0,05$). The Hill Hill coefficient was significantly higher only for patients with asthenozoospermia, indicating an increase in positive cooperative binding between Na^+,K^+ -ATPase and H_2O_2 .

To elucidate the inhibitory effect of H_2O_2 , its effect on the main kinetic parameters of ATP hydrolysis with Na^+,K^+ -ATPase was investigated. The activity of Na^+,K^+ -ATPases is reduced in the presence of H_2O_2 in the incubation medium in the entire range of the studied concentrations of ATP in sperm of fertile and infertile men. The main kinetic parameters of Na^+,K^+ -activated, Mg^{2+} -dependent hydrolysis of ATP in spermatozoa of fertile and infertile men were determined by linearization of concentration curves in Lineweaver-Burk plot. There is an increase in K_{ATP} and a decrease in V_{max} , which is characteristic of a mixed type of inhibition

under the influence of H_2O_2 in the sperm of men with normozoospermia. However, a competitive type of inhibition is observed in the sperm of infertile men (K_{ATP} increases and V_{max} does not change significantly).

It was found that in the spermatozoa of men with pathospermia tapsigargin-resistant $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity is more susceptible to H_2O_2 -induced damage than in men with normozoospermia. Inhibition of tapsigargin-sensitive $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase in spermatozoa of fertile men by the effect of H_2O_2 occurs by non-competitive type (V_{max} decreases, K_{ATP} does not change). However, in tapsigargin-resistant $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase, K_{ATP} increases, which is characteristic of the competitive type of inhibition. In the spermatozoa of men with asthenozoospermia for both $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATP different components, an increase in K_{ATP} is observed, and the value of V_{max} does not change significantly.

Because $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase is one of the targets for reactive oxygen species and is directly involved in oxidative stress, sperm obtained from normo- and pathozoospermic samples were subjected to oxidative stress in the form of exogenous H_2O_2 in the range of different concentrations (25, 50, 100 and 200 μM). In the range of Ca^{2+} concentrations from 10 to 50 μM in the incubation medium, an increase in the activity of tapsigargin-sensitive and tapsigargin-resistant $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of spermatozoa with a constant concentration of ATP was observed. A decrease in enzymatic activity was observed for both $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase different components in the presence of H_2O_2 in the incubation medium. Similar results were obtained for tapsigargin-sensitive and tapsigargin-resistant $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of spermatozoa of infertile men. The maximum rate of ATP hydrolysis in infertile men decreased sharply. The decrease V_{max} in patients with asthenozoospermia was gradual.

In both normo- and pathozoospermic samples H_2O_2 realizes its inhibitory effect through the mechanism of non-competitive inhibition of the activity of tapsigargin-sensitive $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase (V_{max} decreases without changing the affinity for Ca^{2+}). Under H_2O_2 -induced oxidative stress, the apparent constant of

activation by Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}$) ions does not change for tapsigargin-resistant $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase in spermatozoa of men with proven fertility, whereas in asthenozoospermic samples there are almost changes.

Reduced activity of tapsigargin-resistant and tapsigargin-sensitive $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase leads to disruption of Ca^{2+} -homeostasis and is characteristic for abnormal spermatozoa (pathospermia). In order to study the peculiarities of the functioning of $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, we determined the initial reaction rate, the maximum (plateau) amount of the reaction product and the characteristic reaction time. To determine these kinetic parameters of $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -dependent hydrolysis of ATP catalyzed by $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, the dynamics of product accumulation of the ATP-hydrolases reaction was studied. The obtained curves were linearized in the coordinates $\{P/t; P\}$. Analyzing the changes in the activity of $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase, the kinetics of primary-active transport of calcium ions through the plasma membrane and membranes of intracellular Ca^{2+} -stores in saponin-permeabilized spermatozoa of infertile men was studied. It was shown that in normozoospermic samples, the transport of Ca^{2+} ions through the plasma membrane is characterized by a higher capacity than through the membranes of intracellular Ca^{2+} -stores, but it occurs with practically the same initial velocity and characteristic reaction time. It was found that in pathospermic samples, transport of Ca^{2+} ions with the participation of both components of $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase occurs less intensively and is characterized by a lower capacity compared to spermatozoa of men with preserved fertility. Specific changes in the kinetic parameters of $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -dependent hydrolysis of ATP lead to inhibition of tapsigargin-resistant and tapsigargin-sensitive $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity and cause a decrease in fertilizing potential of spermatozoa.

Scientific novelty of the obtained results. For the first time, a comprehensive study of P-type ATPases (Na^+,K^+ -ATPases, tapsigargin-resistant and tapsigargin-sensitive $\text{Ca}^{2+},\text{Mg}^{2+}$ -ATPases) in spermatozoa of infertile men with various forms of pathospermia was performed.

Inhibition of enzymatic activities of Na^+, K^+ -ATPase, tapsigargin-resistant and tapsigargin-sensitive $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase was found in spermatozoa of men with astheno-, oligoastenozoospermia and leukocytospermia with respect to leukocytospermia. The kinetic properties of Na^+, K^+ -ATPase and tapsigargin-resistant and tapsigargin-sensitive components $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of male sperm with pathospermia were studied.

It was found that under conditions of H_2O_2 -induced oxidative stress there is a dose-dependent inhibition of the activity of ubain-sensitive Na^+, K^+ – and $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of sperm. Tapsigargin-resistant component $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of sperm of pathospermian samples is more susceptible to H_2O_2 -induced damage compared to normozoospermic samples.

It was found that the calix[4]arenes of C-107, by inhibiting Na^+, K^+ -ATPase, does not change the kinetic parameters of the dependence of the reaction rate ($K_{\text{ATP}}, n_{\text{H}}$) on the substrate concentration in the sperm of healthy men. However, there is a decrease in the coefficient of cooperation n_{H} inhibition of ATPase reaction of calix[4]arene by C-107 almost twice, in oligo- and asthenozoospermic samples.

The practical significance of the results obtained. The obtained data contribute to the development of new additional diagnostic criteria for the confirmation of infertility and for the development of new, improvement of existing treatment tactics in the correction of pathological conditions.

The results of the dissertation are introduced into the educational and scientific process of the departments of medical biology and biophysics of Danylo Halytsky Lviv National Medical University; department of biophysics and bioinformatics, Ivan Franko National University of Lviv; department of medical biology and genetics, Bukovina State Medical University; department of biomedicine, NSC "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv; in the scientific work of the State Institution "Institute

of Hereditary Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine".

Key words: male infertility, pathozoospermia, sperm, Na^+, K^+ -ATPase $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase, calix[4]arene, oxidative stress.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Meskalo OI**, Fafula RV, Lychkovskyj EI, Vorobets ZD. Na^+, K^+ -ATPase and $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. Біологічні Студії / Studia Biologica. 2017;11(2):5-12. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
2. Fafula RV, **Meskalo OI**, Lychkovskyu EI, Iefremova UP, Onufrovych OK, Maksymyuk HV, Melnyk OV, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Effect of hydrogen peroxide on Na^+, K^+ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men. Regulatory Mechanisms in Biosystems. 2017;8(4):521-526. **(Web of Science)** *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
3. Фафула РВ, **Мескало ОІ**, Личковський ЕІ, Воробець ЗД. Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТР убаїнчутливою Na^+, K^+ -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків. Біофізичний вісник. 2017;38(2):45-53. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження,*

проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

4. Фафула РВ, **Мескало ОІ**, Личковський ЕІ, Воробець ЗД. Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТР Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2017;4(80):46-51. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
5. Fafula RV, **Meskalo OI**, Lychkovskyy EI, Vorobets ZD. Kinetics of inhibitory effect of hydrogen peroxide on activity of plasma membrane transporting Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of sperm cells. Біологічні Студії / Studia Biologica. 2018;12(1):17-24. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
6. Fafula RV, **Meskalo OI**, Lychkovskyy EI, Vorobets ZD. Hydrogen peroxide effect on the thapsigargin-sensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of sperm cells. Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry. 2018;1(81):33-38. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
7. Fafula RV, **Meskalo OI**, Lychkovskyy EI, Vorobets ZD. The ATP-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in spermatozoa of infertile men with oligo- and asthenozoospermia. Біологічні Студії / Studia Biologica. 2018;12(3-4):47-54. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані*

результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).

8. Fafula RV, **Meskalo OI**, Besedina AS, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Kinetic properties of Na⁺,K⁺-ATPase of spermatozoa from fertile and infertile men under effect of calix[4]arene C-107. Ukrainian Biochemical Journal. 2019;91(3):56-64. (**Scopus**) *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
9. Fafula RV, **Meskalo OI**, Vorobets ZD. Role of mitochondria in progesterone-evoked intracellular calcium signals in ejaculated spermatozoa from infertile men. Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry. 2019;1(85):5-9. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*
10. **Meskalo OI**, Fafula RV, Vorobets ZD. Characteristics of Ca²⁺,Mg²⁺-dependent ATP hydrolysis in sperm cells of infertile men. Studia Biologica. 2020;14(1):33-40. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел, виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написання та оформлення статті виконано у співавторстві).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

11. **Meskalo OI**, Fafula RV, Iefremova UP, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ. Na, K-ATPase activity in sperm cells of infertile men. XVI International Congress of Medical Sciences; 2017 May 11-14; Sofia, Bulgaria; Abstract Book; 2017, p.110. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*

12. Fafula R, **Meskalo O**, Vorobets Z. Disturbance of activities of Ca^{2+} - and Na^{+} -ATP-dependent transport systems in spermatozoa of infertile men with different forms of patospermia. 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry; 2017 Sep 18-20; Lublin, Poland; 2017, p.32. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*
13. **Мескало ОІ**, Фафула РВ, Личковський ЕІ, Мельник ОВ, Воробець ЗД. Дисфункція Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз сперматозоїдів неплідних чоловіків з різними формами патоспермій. Матеріали Х Науково-практичної конференції (з міжнародною участю) “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм”; 2017 жовт. 5-6; Тернопіль; 2017, с.30-31. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*
14. Fafula RV, **Meskalo OI**, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity in spermatozoa of infertile men. XVII International Congress of Medical Sciences; 2018 May 10-13; Sofia, Bulgaria; 2018, p.77-78. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*
15. Фафула РВ, **Мескало ОІ**, Воробець ЗД. Особливості гідролізу АТФ та псигаргін-чутливою компонентою Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази сперматозоїдів неплідних чоловіків за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу. Матеріали XI Науково-практичної конференції (з міжнародною участю) “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм”; 2018 жовт. 4-5; Тернопіль; 2018, с.38-39. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*
16. Fafula RV, **Meskalo OI**, Vorobets ZD. Alterations in Ca^{2+} signals and Ca^{2+} -ATPases activities in spermatozoa in human subjects with different fertility

- potential. Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю; 2019 трав. 27-30; Київ. Фізіологічний журнал; 2019; 65(3 (додаток)):14. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*
17. **Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets ZD.** Ca²⁺-signals in response to ATP in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia. 6th Ukrainian congress for cell biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine; Proceedings; 2019, p.22. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*
18. **Meskalo OI, Fafula RV, Vorobets ZD.** Calix[4]arene C-107 effect on kinetic properties of Na⁺,K⁺-ATPase of spermatozoa of men with different form of pathospermia. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу; 2019 вер. 30-жовт. 4; Тернопіль; Медична та клінічна хімія. 2019; 21(3 (80)) (додаток):36-37. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*
19. **Meskalo OI, Fafula RV, Vorobets ZD.** Kinetics of Ca²⁺-transport by ATPases in spermatozoa of infertile men. Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів присвяченої 75 річниці створення біологічного факультету ЛНУ ім. І. Франка та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача; 2020 квіт. 27-29; Львів; Молодь і поступ біології; 2020, с.20-21. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проаналізовано й узагальнено отримані результати; написано тези).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	22
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО РОЛЬ ЙОН- ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ ПАТОСПЕРМІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	30
1.1 Характеристика чоловічого непліддя.....	30
1.2 Na^+ , K^+ -АТРаза: молекулярна організація, механізм роботи та регуляція її функціональної активності.....	36
1.3 Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза: молекулярна організація, механізм роботи та регуляція її функціональної активності.....	42
1.4 Оксидативний стрес у сперматозоїдах інфертильних чоловіків	47
1.5 Характеристика каліксаренів.....	51
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	54
2.1 Загальна характеристика досліджуваних груп інфертильних чоловіків.....	54
2.2 Виділення сперматозоїдів.....	56
2.3 Оцінка життєздатності та рухливості сперматозоїдів.....	57
2.4 Визначення Ca^{2+} -активованої, Mg^{2+} -залежної АТРазної активності сперматозоїдів.....	58
2.5 Визначення Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТРазної активності сперматозоїдів.....	59
2.6 Визначення кількості неорганічного фосфату у сперматозоїдах	60
2.7 Визначення концентрації протеїну.....	61
2.8 Кінетичний аналіз ензимних систем сперматозоїдів.....	61
2.9 Статистична обробка даних.....	63
2.10 Реактиви.....	64

РОЗДІЛ 3 ХАРАКТЕРИСТИКА Na^+, K^+ -АТРази СПЕРМАТОЗОЇДІВ ФЕРТИЛЬНИХ ТА ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ.....	65
3.1 Зміни Na^+, K^+ -АТРазної активності сперматозоїдів інфертильних чоловіків	65
3.2 Кінетичні властивості Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків за дії калікс[4]арену С-107.....	67
3.3 Функціонування Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів чоловіків за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу.....	76
3.4 Ефекти H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР у баїнчутливою Na^+, K^+ -АТРазою сперматозоїдів інфертильних чоловіків.....	80
РОЗДІЛ 4 ХАРАКТЕРИСТИКА $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз СПЕРМАТОЗОЇДІВ ФЕРТИЛЬНИХ ТА ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ.....	85
4.1 Зміни $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності сперматозоїдів інфертильних чоловіків.....	85
4.2 Кінетика вивільнення P_i під час Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах інфертильних чоловіків.....	88
4.3 Залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у сперматозоїдах інфертильних чоловіків від концентрації АТР.....	93
4.4 Залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у сперматозоїдах інфертильних чоловіків від концентрації йонів Mg^{2+}	98
РОЗДІЛ 5 ЕФЕКТИ H_2O_2 НА ОСНОВНІ КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз СПЕРМАТОЗОЇДІВ ФЕРТИЛЬНИХ ТА ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ.....	103
5.1 Ефекти H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків.....	103

5.2 Ефекти H_2O_2 на основні кінетичні параметри транспортування Ca^{2+} за участю Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків.....	107
РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	115
ВИСНОВКИ.....	131
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	134
ДОДАТКИ.....	158

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АТР	–	аденозинтрифосфат
АТР _e	–	зовнішньоклітинний АТР
АФК	–	активні форми кисню
Ca ²⁺ _i	–	внутрішньоклітинний йонізований кальцій
[Ca ²⁺] _i	–	внутрішньоклітинна концентрація йонів кальцію
NO	–	Нітроген (II) оксид
NOS	–	NO-синтаза
O ₂ ^{•-}	–	супероксид аніон радикал
PMCA	–	Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРаза плазматичної мембрани
P _i	–	неорганічний фосфор
ЕПР	–	ендоплазматичний ретикулум
ПМ	–	плазматична мембрана
ПОЛ	–	перикисне окиснення ліпідів
EGTA	–	етилен діамін тетраоцтова кислота
PMCA	–	Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРаза плазматичної мембрани
SERCA	–	Ca ²⁺ ,Mg ²⁺ -АТРаза мембрани ендоплазматичного ретикулуму
pH	–	від'ємний десятковий логарифм концентрації йонів Гідрогену

Досліджувані групи

N	–	нормозооспермія
OI	–	олігозооспермія
Ast	–	астенозооспермія
OIAst	–	олігоастенозооспермія
Leu	–	лейкоцитоспермія

ВСТУП

Актуальність теми. Непліддя відноситься до важливих показників стану репродуктивного здоров'я. Не зважаючи на суттєві успіхи репродуктивної медицини та біології проблема діагностики та лікування непліддя залишається актуальною. Серед причин цієї патології вагоме місце займають порушення сперматогенезу [27, 129]. Недостатність функції сперматозоїдів є найбільш визначеною причиною непліддя у чоловіків та одна з головних причин зростання інтракорпорального запліднення у розвинених країнах світу [37]. Основними причинами чоловічої неплідності, за даними різних авторів, є: інфекція геніталій, ендокринна патологія, варикоцеле, генетичний фактор, обструктивна та необструктивна азооспермія, ідіопатична оліго-, астено-, тератозооспермія [18, 108, 171, 181]

З позиції сучасної біомембранології багато захворювань пов'язані зі змінами структури та функції біомембран. Мембранозв'язуючі протеїни, включаючи інтегральні АТР-залежні транспортні ензими, відіграють важливу роль у функціонуванні біомембран. Na^+, K^+ -АТРаза була детально вивчена і підтверджена у різних типах клітин, включаючи сперматозоїди [181]. Відомо, що Na^+, K^+ -АТРаза відіграє вирішальну роль у клітинній сигналізації. Na^+, K^+ -АТРаза регулює рухливість клітин, проліферацію клітин, синтез глікогену, внутрішньоклітинний кальцій та гомеостаз натрію, кальцієву сигналізацію, апоптоз та ін [43, 118, 152]. Пригнічення активності цього ензиму призводить до астенозооспермії, олігозооспермії і навіть азоспермії [16].

Зміни активності транспортувальних ензимів призводять, зокрема, до перерозподілу катіонів натрію, калію, кальцію між клітиною та зовнішньоклітинним середовищем, змін величини мембранного потенціалу. Регуляція йонного гомеостазу є вкрай важливим для рухливості і запліднювальної здатності сперматозоїдів [16, 40, 77, 108, 160, 171, 178, 181].

Оксидативний стрес може активізувати сигналізацію Na^+, K^+ -АТРази. Гіперпродукція активних форм кисню (АФК) може пошкодити клітини сперматозоїдів і вважається одним із механізмів непліддя [137]. АФК постійно виробляються в більшості клітин, а їхні рівні регулюються рядом ензиматичних і неензиматичних антиоксидантів. АФК може змінювати різні біомолекули, включаючи поліненасичені жирні кислоти мембран сперматозоїдів, в результаті чого відбувається перекисне окислення ліпідів та порушення мембранних білків.

Ca^{2+} керують не тільки практично усіма клітинними функціями, а й її життєвим циклом в цілому, починаючи від зародження, росту, диференціації і закінчуючи смертю. Численні клітинні функції прямо чи опосередковано регулюються за участю змін концентрації внутрішньоклітинного кальцію ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [11, 71, 72, 75, 90, 108, 128, 158, 181]. Порушення внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу може спричинити патологічні процеси в організмі, а довготривале збільшення концентрації Ca^{2+} в цитозолі призвести до ушкодження й загибелі клітини.

Пошук нових інгібіторів та активаторів, що здатні селективно впливати на активність Na^+, K^+ -АТФази сперматозоїдів при різних формах патоспермії – є важливим як з теоретичної, так із практичної точки зору. Каліксарени – макроциклічні олігомери фенолів, чашоподібної будови з ліпофільними порожнинами. Ці сполуки здатні змінювати ензиматичну активність, а також активність йон-транспортуючих систем [10, 25]. Деякі калікс[4]арени виявляють бактерицидну, антивірусну, антикоагуляційну, антитромботичну і протипухлинну активність, подібно до природних рецепторів, вони мають властивість розпізнавати та утворювати міцні комплекси з біомолекулами та іонами [3, 25]. Таким чином каліксарени можуть впливати на перебіг біохімічних процесів. Доведено, що каліксарени С-97, С-107 здатні ефективно пригнічувати убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТРазну активність у

плазматичній мембрані міоцитів матки та сперматозоїдів, не впливаючи при цьому на активність базальної Mg^{2+} -АТРази [9].

Не зважаючи на значну кількість накопичених даних щодо йон-транспортувальних процесів у сперматозоїдах, зокрема АТР-гідролазних систем, на сьогодні відсутня комплексна оцінка їх ролі при розвитку чоловічої неплідності. Відтак, актуальним є вивчення активності транспортувальних систем в сперматозоїдах інфертильних чоловіків, виявлення можливих механізмів які ведуть до розвитку чоловічого непліддя.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом планових науково-дослідних тем Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського “Експериментальне дослідження метаболічних порушень в організмі за дії екзогенних токсикантів та при різних патологічних станах” (державний реєстраційний номер 0120U104148), та Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького “Дослідження системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостазування функціонально-метаболічних параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи” (державний реєстраційний номер 0116U004510). Дисертант є співвиконавцем вище наведених тем, нею особисто проведені лабораторні дослідження, представлені у дисертаційній роботі.

Мета дослідження – дослідити активність йон-транспортувальних АТР-гідролазних систем у сперматозоїдах чоловіків із патоспермією та за умов впливу оксидативного стресу і каліксаренів.

Завдання дослідження:

1. Вивчити зміни ензиматичної активності оубаїн-чутливої Na^+,K^+ -АТРази в сперматозоїдах неплідних чоловіків із патоспермією.

2. Вивчити зміни ензиматичної активності тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в сперматозоїдах неплідних чоловіків із патоспермією.

3. З'ясувати кінетичні характеристики оубаїн-чутливої Na^+, K^+ -АТРази, тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в сперматозоїдах неплідних чоловіків із патоспермією.

4. Вивчити інтенсивність вільнорадикальних процесів у сперматозоїдах інфертильних чоловіків.

5. Дослідити кінетичні закономірності інгібувального впливу каліксаренів на гідроліз АТР в сперматозоїдах чоловіків із патоспермією.

Об'єкт дослідження: йон-транспортувальні процеси в сперматозоїдах інфертильних чоловіків.

Предмет дослідження: активність Na^+, K^+ -АТРази і $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз у сперматозоїдах чоловіків із патоспермією; кінетичний аналіз властивостей досліджуваних ензиматичних систем.

Методи дослідження: препаративної біохімії (для виділення сперматозоїдів та оцінки життєздатності і рухливості сперматозоїдів), ензимології (для визначення Na^+, K^+ - та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазних активностей сперматозоїдів), спектрофотометрії (для визначення концентрації протеїну та кількості неорганічного фосфату у сперматозоїдах), біохімічної кінетики (для кінетичного аналізу ензимних систем сперматозоїдів) та статистичного аналізу (для обробки одержаних результатів).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне дослідження АТРаз Р-типу (Na^+, K^+ -АТРази, тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз) у сперматозоїдах інфертильних чоловіків із різними формами патоспермій.

Встановлено пригнічення ензиматичних активностей Na^+, K^+ -АТРази, тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз в сперматозоїдах чоловіків з астено-, олігоастенозооспермією і

лейкоцитоспермією стосовно показників у нормозооспермічних зразках. Вивчено кінетичні властивості Na^+, K^+ -АТРази і тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаз сперматозоїдів чоловіків із патоспермією.

Виявлено, що за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу відбувається дозозалежне пригнічення активності убаїнчутливої Na^+, K^+ - та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів. Тапсигаргін-резистентна компонента $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів патоспермічних зразків більш сприйнятлива до H_2O_2 -індукованого пошкодження, порівняно з нормозооспермічними зразками.

Встановлено, що калікс[4]арен С-107, пригнічуючи Na^+, K^+ -АТРази, не змінює кінетичні параметри залежності швидкості реакції ($K_{\text{АТР}}$, n_H) від концентрації субстрату в сперматозоїдах здорових чоловіків. Проте, відмічається зниження коефіцієнта кооперативності n_H інгібування АТРази реакції калікс[4]ареном С-107 майже вдвічі в оліго- та астенозооспермічних зразках.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані дані сприяють розробці нових додаткових діагностичних критеріїв для підтвердження неплідності та для розробки нових, вдосконалення існуючих лікувальних тактик при корекції патологічних станів.

Результати дисертаційної роботи впроваджені у навчальний та науковий процес кафедр медичної біології та біофізики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри біофізики та біоінформатики Львівського національного університету імені Івана Франка; кафедри медичної біології та генетики Буковинського державного медичного університету; кафедри біомедицини ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; в наукову роботу ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України».

Особистий внесок здобувача. Дисертантом особисто виконані патентні дослідження та аналіз науково-медичної інформації за темою дисертаційної роботи. Автором самостійно виконано лабораторні дослідження, проведено кінетичний аналіз і статистичну обробку даних. Дисертант, разом зі співавторами, проводив оцінку та узагальнення отриманих даних, написання та підготовку праць до друку. Планування досліджень, аналіз даних, їх інтерпретація та зіставлення з літературними даними, формулювання висновків здійснено за участю наукових керівників. Дисертантом особисто розроблено дизайн рукопису дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень та основні положення дисертації оприлюднено на наукових семінарах кафедри медичної біології (Львів, 2018-2021), XVI, XVII International Congress of Medical Sciences (Sofia, 2017, 2018); 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Lublin, 2017); X, XI науково-практичній конференції “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм” (Тернопіль, 2017, 2018, 2019); ювілейному XX з’їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (Київ, 2019); 6th Ukrainian congress for cell biology with international representation (Яремче, 2019); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019); XVI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів, присвяченій 75 річниці створення біологічного факультету ЛНУ ім. І. Франка та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача (Львів, 2020), XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 19 робіт, з яких 10 статей – у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, і 9 робіт у матеріалах наукових міжнародних і вітчизняних з’їздів, конгресів, конференцій. Серед опублікованих праць 2 статті у виданнях, включених до наукометричних баз Scopus та Web of Science.

Структура дисертації. Дисертація викладена на 167 сторінках друкованого тексту та включає вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, три розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки, список використаних джерел літератури, який містить 200 бібліографічних описів (27 – кирилицею і 173 – латиницею), додатки. Дисертація ілюстрована 6 таблицями та 45 рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 34 сторінках.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО РОЛЬ ЙОН-ТРАНСПОРТУВАЛЬНИХ СИСТЕМ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ ПАТОСПЕРМІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Характеристика чоловічого непліддя

Однією з найсерйозніших соціальних проблем, з якими стикаються розвинені країни сьогодні, є зниження рівня народжуваності [182]. Непліддя вражає більше 80 мільйонів молодих чоловіків та жінок у всьому світі. За даними ВООЗ, непліддя стає проблемою громадського здоров'я, коли його частота перевищує 15 %. Оцінка непліддя починається, як правило, через 1 рік неможливості завагітніти. (ВООЗ, 2010). Частка пар, які звертаються за медичним лікуванням від безпліддя, оцінюється у 4–17 % [45, 119]. У 40 % випадків проблема полягає виключно у чоловіках, у 40 % – виключно у жінок, а в 20% – обох [111].

За останні кілька десятиліть накопичено все більше доказів про глобальне зниження якості сперми чоловіків. Найпоширенішими причинами чоловічого непліддя є:

- патологія з боку органів сечостатевої системи;
- інфекційно-запальні захворювання органів репродуктивної системи;
- хронічний простатит (56,1 %);
- варикоцеле (діагностовано у 23,5 % чоловіків, ця патологія є найчастішою анатомічною причиною чоловічого непліддя);
- патологія одного або обох яєчок різної етіології (12,7 %) [21].

Сперматозоїди чоловіків дуже сприйнятливі до оксидативного стресу. Цей процес викликає пероксидне пошкодження плазматичної мембрани сперматозоїдів та фрагментацію ДНК як в ядерному, так і в мітохондріальному геномах [35, 197]. Більшість клітин захищені або

ензимними антиоксидантними системами (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза і каталаза), або неензимними антиоксидантними системами (відновлений глутатіон, сечова кислота, вітамін С, вітамін Е), і в разі пригнічення цих механізмів порушується функція сперматозоїдів [31]. АФК негативно впливають на параметри сперми [116]. Плазматична мембрана сперматозоїдів дуже чутлива до впливу АФК, оскільки вона містить багато поліненасичених жирних кислот. Високий рівень АФК у спермі означає дисбаланс між генерацією АФК та активність антиоксидантної системи. Підвищений рівень АФК може призвести до пошкодження і подальшої дисфункції сперматозоїдів або загибелі клітин [155].

Чоловіче непліддя – це складний багатofакторний патологічний стан, в якому генетичні фактори відіграють важливу роль. Чоловіки з азооспермією мають найбільший ризик бути носіями генетичних аномалій (25 %) [123]. В процес сперматогенезу залучено близько 10 % генів. Генетичні аномалії складають 15-30 % в структурі етіології чоловічого непліддя. Наслідком молекулярних дефектів і генетичних змін є порушення фізіологічних процесів – синтезу гормонів, сперматогенезу і порушення якості сперматозоїдів. Хромосомні аномалії включають в себе як кількісні, так і структурні хромосомні аберації, які є досить значними, щоб розрізнити під мікроскопом. На їх частку припадає близько 5-10% випадків олігозооспермії і до 15-25 % випадків необструктивної азооспермії. Проте аутосомні структурні хромосомні аномалії є головною передумовою олігозооспермії [1].

Приблизно у 15 % чоловіків та 10 % жінок можуть бути присутні генетичні відхилення, в тому числі аберації хромосом і мутації окремих генів. Чоловіче непліддя часто пов'язане з аномалією хромосом [159]. Аномалії статевих хромосом відіграють головну роль у важких сперматогенних порушеннях. Мутації генів, пов'язаних з аутосомами, в

основному беруть участь у центральному гіпогонадізмі, мономорфній тератозооспермії або астенозооспермії, вродженій обструктивній азооспермії [123]. Синдром Клайнфельтера (XXY) та специфічна транслокація є встановленими причинами для чоловічого непліддя [159].

Генетичні причини непліддя є важливим етіологічним фактором, що призводить до незворотної часткової або повної сперматогенетичної зупинки. Гени, які мають вирішальне значення для сперматогенезу та сперміогенезу, локалізовані на довгому плечі 5 та 6 інтервалі делеції Y-хромосом [68]. Одним з найбільш значущих патогенетичних дефектів, пов'язаних з чоловічим непліддям, є мікроделеції довгого плеча Y-хромосоми (Yq). У 13 % азооспермічних чоловіків, 1% -7% чоловіків із сильною олігозооспермією, 5 % чоловіків з важкою первинною недостатністю функції яєчок і концентрацією сперматозоїдів менше 5 млн /мл виявлено мікроделецію Y-хромосоми. Делеції довгого плеча Y-хромосоми (Yq) є одними з найбільш поширених хромосомних аномалій у чоловіків і, як правило, виникають внаслідок рекомбінації між довгими відрізками повторюваних послідовностей ДНК під час мейозу або раннього розвитку перед імплантацією [159].

ДНК сперматозоїлів може мати вищий рівень делецій та пошкоджень ДНК в результаті оксидативного стресу. Wang H. та ін. [192] встановили, що рівень активних форм кисню вищий у сперматозоїдах неплідних чоловіків. Тому сперматозоїди чутливі до оксидативного стресу, особливо завдяки унікальному структурному складу. Також під час сперміогенезу, коли від сперматидів відокремлюється цитоплазма, що призводить до дефіциту антиоксидантних ензимів. Пошкодження ДНК у хромосомі Y може спричинити делецію генів у хромосомі Y [68]. У зв'язку з цим широко розвинені і впроваджені допоміжні репродуктивні технології, які дозволяють, на сьогоднішній день, не тільки зрозуміти причину непліддя, але і прогнозувати результат лікування неплідних пар.

Оскільки на фертильність чоловіків можуть впливати різні фактори, одним із можливих пояснень тенденції до зниження може бути те, що поряд із способами життя існують екологічні та професійні фактори, що сприяють погіршенню якості сперми. Чоловіки, які страждають ожирінням, мають вищий відсоток сперматозоїдів з фрагментацією ДНК та патологічною морфологією [163]. Bieniek JM. та ін. продемонстрував зворотну залежність між індексом маси тіла та тестостероном, співвідношенням тестостерону до естрадіолу, об'ємом еякуляту, концентрацією сперми та морфологією [93]. Чоловіки з ожирінням частіше страждають олігозооспермією або азооспермією порівняно з чоловіками в межах нормальної ваги [74, 79, 176].

Тепловий стрес може зашкодити репродуктивному здоров'ю чоловіків. Коли нормальна терморегуляція яєчка порушена, може виникнути тепловий стрес, що негативно впливає на якість та концентрацію сперматозоїдів, їх рухливість та морфологію. Також, підвищена температура калитки призводять до апоптозу статевих клітин та пошкодження ДНК сперматозоїдів, що згодом пригнічує сперматогенез [78, 79, 116].

Чоловіче непліддя може бути ранньою ознакою поганого загального стану здоров'я. Непліддя може бути не тільки ознакою основного захворювання, у чоловіків зі зміненими показниками сперми може збільшуватися ризик злоякісних утворень. Ризик раку яєчок зростає до 20 разів у чоловіків з порушеними показниками сперми. Також припускають, що чоловіче непліддя може бути пов'язане з підвищеним ризиком раку простати [93].

Існують дані, що вказують на зв'язок між чоловічим непліддям та гіпертонічною хворобою. У чоловіків, які страждають на гіпертонічну хворобу, виявлено зниження рівня тестостерону, об'єму еякуляту, кількості та рухливості сперматозоїдів в порівнянні з здоровими чоловіками [61].

Фертильність чоловіків може бути знижена в результаті [197]:

- вроджені або набуті патології сечостатевої системи;

- злоякісні новоутворення;
- інфекції сечостатевих шляхів;
- підвищена температура калитки (наприклад, як наслідок варикоцеле);
- ендокринні порушення;
- генетичні відхилення;
- імунологічні фактори

У 30-40 % випадків не виявлено жодного фактора, пов'язаного з чоловічим неплоддям (ідіопатичне чоловіче безпліддя). Ці чоловіки не мають попереднього анамнезу захворювань, що впливають на фертильність, і мають нормальні дані при фізичному огляді та ендокринні, генетичні та біохімічні лабораторні дослідження [112]. Однак аналіз сперми може виявити патологію в спермограмі.

Аналіз спермограми – найбільш інформативний показник, відхилення в якому, дозволяє правильно вибрати діагностику і тактику лікування пацієнтів з неплоддям.

Звичайний аналіз сперми повинен включати:

- a) фізичні характеристики сперми, включаючи розрідження, в'язкість, рН, колір і запах;
- b) об'єм зразка;
- c) кількість сперматозоїдів;
- d) рухливість і прогресування сперматозоїдів;
- e) морфологія сперматозоїдів;
- f) кількісна оцінка лейкоцитів;
- g) виявлення фруктози у випадках, коли сперматозоїдів не виявлено, особливо якщо загальний обсяг проби менше 1 мл.

Спермограма є недорога, проста у виконанні та надає цінну інформацію [80].

Параметри сперми в межах референтного інтервалу 95 % не гарантують фертильності, а також значення поза цими межами (окремо від

інших клінічних даних) не обов'язково вказують на чоловіче неплоддя або патологію [65].

Критерії Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), що використовуються для оцінки спермограми, показано у таблиці 1.1. Приблизно 2000 чоловіків з восьми країн, партнери яких мали термін вагітності ≤ 12 місяців, були обрані для надання еталонного розподілу параметрів сперми.

Таблиця 1.1 – Референтні значення деяких показників еякулятів відповідно до рекомендацій ВООЗ (2010)

№ п/п	Показники	Значення
1.	pH	$\geq 7,2$
2.	В'язкість	до 2 см
3.	Час розрідження	до 60 хв
4.	Концентрація сперматозоїдів	не менше 15 млн/мл
5.	Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті	не менше 40 млн
6.	Загальна рухливість сперматозоїдів	40 % і більше
7.	Життєзданість сперматозоїдів	58 % і більше
8.	Аглотинація	відсутня
9.	Лейкоцити	не більше 1 млн/мл
10.	Еритроцити	відсутні

Аномальні показники лейкоцитів є частою причиною чоловічого неплоддя. Частота лейкоцитоспермії (> 1 млн. лейкоцитів / мл сперми) у неплодних чоловіків коливається від 3 до 23 % і корелювала з клінічними та субклінічними інфекціями статевих органів, підвищеним рівнем активних

форм кисню, підвищеним рівнем антиспермальних антитіл та недостатньою функцією сперматозоїдів [81].

Аналіз патології здійснювали відповідно до критеріїв ВООЗ (табл. 1.2.).

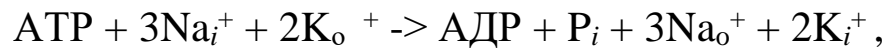
Таблиця 1.2 – Класифікація показників еякуляту, ВООЗ, 2010

Аспермія	об'єм сперми – 0,0 мл
Астенозооспермія	рухливість сперматозоїдів категорії А < 32% або категорій А + В < 40% за нормальних показників кількості та морфологічних форм
Азооспермія	сперматозоїдів у спермі немає
Акіноспермія (Акінезія)	повна відсутність рухливості живих сперматозоїдів у спермі та нездатність їх до запліднення;
Нормозооспермія	показники сперми у нормі;
Олігоастенотератозооспермія	поєднання трьох варіантів патозооспермії
Олігозооспермія	концентрація сперматозоїдів < 15 млн/мл;
Тератозооспермія	відсоток морфологічно нормальних сперматозоїдів нижче нормативних значень

1.2 Na^+, K^+ -АТРаза: молекулярна організація, механізм роботи та регуляція її функціональної активності

Na^+, K^+ -АТРаза (натрій-калієва помпа) – це ензим, вбудований в плазматичну мембрану, що спряжено з гідролізом АТР, каталізує обмін

цитоплазматичного Na^+ для позаклітинного K^+ через мембрану проти електрохімічного градієнта відповідно до наступного рівняння:



де Na_i^+ і K_i^+ – це внутрішньоклітинні іони,

Na_o^+ і K_o^+ – зовнішньоклітинні іони [115,134].

Na^+ , K^+ -АТРаза є представником класу Р-типу АТРаза, сімейства первинних транспортерів, які характеризуються утворенням перехідного фосфорильованого проміжного продукту з АТР під час їх функціонального циклу [179]. АТРази Р-типу зустрічаються як в прокаріотичних, так і в еукаріотичних клітинах і беруть участь у транспортуванні H^+ , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} і Cd^{2+} . Всі ці ензими використовують гідроліз АТР, щоб здійснювати транспорт катіонів проти електрохімічних градієнтів. АТРази Р-типу супроводжують процес фосфорилування-дефосфорилування, зв'язують, закривають і транспортують іони шляхом перемикання між ними двох різних катіон-залежних конформацій, так звані Е1 і Е2 стани. Точні молекулярні механізми, які з'єднують гідроліз АТР, конформаційні зміни і транслокацію іонів залишаються до кінця не з'ясованими [49].

У соматичних клітинах іонні градієнти генеровані Na^+ , K^+ -АТРазою відіграють ключову роль у підтриманні об'єму і рН клітин, в підтримці мембранного потенціалу спокою, а також у забезпеченні хімічної енергії, необхідної для вторинного транспорту інших іонів, розчинених речовин і води на поверхні клітини [4, 70, 73, 108].

Структурно, Na^+ , K^+ -АТРаза складається з двох субодиниць (α і β), та третьої – регуляторної (FXD або γ). α і β субодиниці є інтегральними мембранними білками і пов'язані один з одним нековалентними зв'язками: в очищених препаратах Na^+ , K^+ -АТРази, вони присутні в молярному співвідношенні 1:1 [179].

Поліпептид α , який вважається каталітичною субодиноцею ферменту, містить сайти зв'язування АТР, Na^+, K^+ та інгібітора Na^+, K^+ -АТРазу убаїну. [179, 181]. Це протеїн 110–112 кДа з 10 трансмембранно охоплюючими доменами, з цитоплазматичними N- та С-кінцями, великою внутрішньоклітинною областю та п'ятьма невеликими позаклітинними петлями [179].

Більшість амінокислотних залишків також розташовані всередині клітини, утворюючи великий цитоплазматичний домен. Трансмембранні сегменти, вбудовані в мембрану, знаходяться в безпосередній близькості, є дані, які вказують, що трансмембранні сегменти M1-M2 і M7-M8, які розташовані в поліпептидному ланцюзі дуже далеко один від одного, можуть взаємодіяти один з одним. Трансмембранні сегменти беруть участь у формуванні каналу, через який катіони проходять крізь мембрану [134].

Поліпептид β являє собою одиночний білок, що охоплює мембрану, молекулярною масою 40–60 кДа, більша частина його маси направлена до позаклітинного середовища, де він сильно глікозилюваний. Поліпептид β безпосередньо не бере участі в транспорті іонів та ензиматичній активності ферменту; однак він відіграє важливу роль у згортанні, стабільності та націлюванні α -субодиноці на плазматичну мембрану [179].

N-кінцевий сегмент ланцюга β -субодиноці розташований в цитоплазмі, тоді як основна частина розташована поза клітиною, де є три ділянки N-глікозилювання, до яких приєднані розгалужені вуглеводні ланцюги. На екстрацелюлярній частині β -субодиноці утворюються три дисульфідні зв'язки (рис. 1.1).

α -субодиноця є каталітичною субодиноцею ферменту, що містить сайти зв'язування катіонів, ділянка зв'язування серцевого глікозиду і АТР-зв'язуючий сайт, тоді як для субодиноці β необхідна для дозрівання ферменту, впливає на активацію Na^+, K^+ -АТРази позаклітинним K^+ . β -субодиноця тісно пов'язана з α -субодиноцею і необхідна для введення

каталітичної субодиниці в мембрану і доставки обох субодиниць до плазматичної мембрани [134, 196].

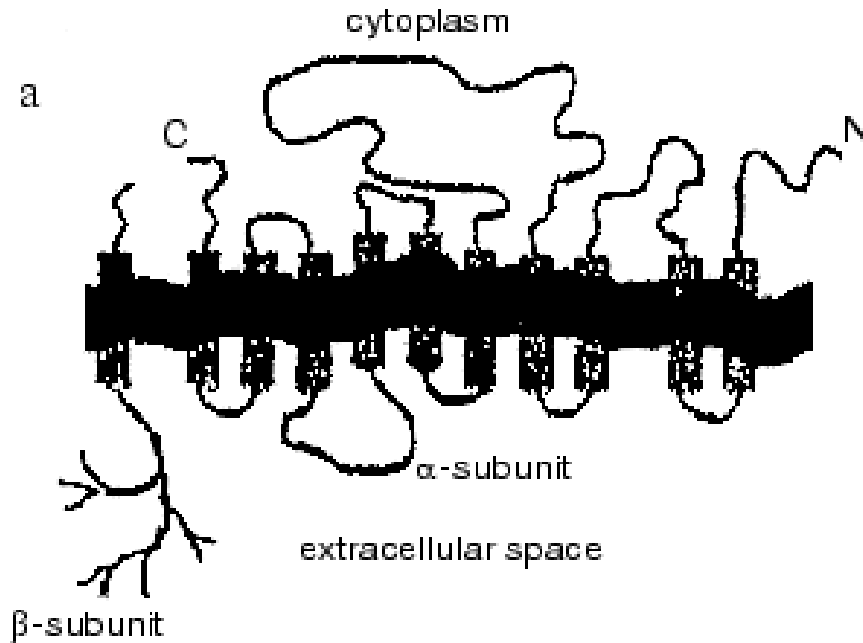


Рисунок 1.1 – Розташування поліпептидних ланцюгів Na⁺, K⁺-АТФази α- і β-субодиниць в мембрані

У ссавців ідентифіковані чотири різні ізоформи α-субодиниці Na⁺, K⁺-АТФази, а саме α1, α2, α3 та α4. Кожна з цих ізоформ характеризується специфічною експресією та особливими ферментативними властивостями. β-субодиниці були виявлені в трьох різних формах, відомих як β1, β2 і β3. [50, 51, 63].

Найменш охарактеризовані ізоензими Na⁺, K⁺-АТФази α4-субодиниці. Ізоформа α4 натрієвої помпи була ідентифікована в 1987 у геномі ДНК з людських лейкоцитів з використанням зондів, отриманих з овець α1 і щурів α2 натрієвої помпи. Визначено нуклеотидну послідовність Na⁺, K⁺-АТФази α4 людини і показано, що кодований поліпептид експресується в яєчках чоловіків [103-105, 107, 117].

Na^+, K^+ -АТРаза в клітинах яєчок складається виключно з ізоформ $\alpha 1$ і $\alpha 4$. У тканинах статевих залоз, Na^+, K^+ -АТРаза може функціонувати як каталітична субодиниця Na^+, K^+ -АТРази. У епітеліальних клітинах ензим допомагає створити відповідне середовище всередині просвіту каналців для нормального розвитку сперматозоїдів. Зокрема, $\alpha 4$ ізоформа експресується в чоловічих статевих клітинах після мейозу, і її активність відповідає приблизно дві третини з всього Na^+ і K^+ активного транспорту клітин [108].

Ізоформа $\alpha 4$ людини виявляє унікальні кінетичні властивості щодо транспорту іонів. Ізоформа $\alpha 4$ має вищу спорідненість до Na^+ і меншу спорідненість до K^+ , ніж ізоформа $\alpha 1$. Низька спорідненість $\alpha 4$ до позаклітинного K^+ ($\alpha 4 < \alpha 1$) може корелювати з високим вмістом K^+ у середовищі, з яким контактують чоловічі статеві клітини. Таким чином, висока концентрація K^+ в каналцях та в придатках яєчка не впливає на активність ізоформи $\alpha 1$, але може регулювати функцію ізоформи $\alpha 4$, впливаючи на електрохімічний баланс клітин [171].

Отже, одним із механізмів, за допомогою якого ізоформа Na^+, K^+ -АТРази $\alpha 4$ впливає на рухливість сперматозоїдів, є її ключова роль у підтримці нерівномірного трансмембранного розподілу Na^+ та K^+ та електричного потенціалу через плазматичну мембрану. Окрім своєї прямої ролі в транспортуванні Na^+ та K^+ , ізоформа Na^+, K^+ -АТРази $\alpha 4$ має високу спорідненість до Na^+ , що сприяє підтримці низького внутрішньоклітинного рівня Na^+ у спермі [179].

Більш того, $\alpha 4$ має дуже високу чутливість до оубаїну, що найбільш помітно відрізняє її від $\alpha 1$ ізоформи. Отже, можна припустити, що $\alpha 4$ відіграє важливу роль у фізіології сперматозоїдів людини. Імуноцитохімічні дослідження на сперматозоїдах щурів, мишей та людини показали, що $\alpha 4$ ізоформа Na^+, K^+ -АТРази експресується в джгутику, більш локалізована у

середній частині джгутика. У голівці сперматозоїдів мало або майже відсутня ізоформа Na^+, K^+ -АТРази $\alpha 4$ [107, 161].

Jimenez T. та ін. повідомили, що інгібування убаїном ізоформи Na^+, K^+ -АТРази $\alpha 4$ призводить до значного зниження рухливості сперматозоїдів. Інші дослідження показали, що між Na^+, K^+ -АТРазною активністю та рухливістю сперматозоїдів спостерігається суттєва кореляційна залежність [49, 108, 171, 196].

Ізоформа Na^+, K^+ -АТРази $\alpha 4$ міститься в сперматозоїдах, але не в клітинах Сертолі, Лейдіга або недиференційованих статевих клітинах. На відміну від $\alpha 4$ ізоформи Na^+, K^+ -АТРази, ізоформа $\alpha 1$ експресується у всіх клітинах яєчка [179].

Косак-Токер N. та ін. показали, що убаїн впливає на рухливість сперматозоїдів чоловіків. Це свідчило про важливу роль Na^+, K^+ -АТРази у підтримці електрохімічного градієнта іонів та мембранного потенціалу чоловічих статевих клітин. Селективного інактивування $\alpha 4$ за допомогою убаїну було достатньо для зменшення рухливості сперматозоїдів людини. Використання убаїну в концентраціях, які максимально пригнічували ізоформи $\alpha 1$ та $\alpha 4$, додатково не впливали на рухливість сперматозоїдів. Це вказує, що градієнти іонів, що генеруються ізоформою $\alpha 4$, є критичними для функцій сперматозоїдів.

Хоча інгібування ізоформи $\alpha 4$ убаїном, призводить до порушення рухливості сперматозоїдів, проте не впливає на інші параметри моторики в рухливих клітинах. Це свідчить про те, що активність $\alpha 4$ важлива для запуску джгутикового руху та загальної рухливості клітин, але вона не бере участі в модулюванні лінійності, амплітуди бічного зміщення головки, частоти перехресних ударів та швидкості сперматозоїдів. Роль $\alpha 4$ у рухливості джгутиків відповідає локалізації ізоформи в проксимальній ділянці джгутика. Про важливість ізоформи $\alpha 4$ у функціонуванні сперматозоїдів свідчить той факт, що майже половина гідролізу АТР, каталізованого Na^+, K^+ -АТРазою

чоловічої статевої клітини людини, залежить від активності $\alpha 4$ [121, 138, 139, 171].

1.3 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза: молекулярна організація, механізм роботи та регуляція її функціональної активності

Йони Ca^{2+} - це універсальний внутрішньоклітинний месенджер, який діє в широкому часовому діапазоні для регулювання багатьох різних клітинних процесів [44]. Він контролює як короточасні біологічні процеси, що відбуваються в мілісекундах, такі як скорочення м'язів, так і тривалі процеси, які вимагають більших періодів, такі як проліферація клітин та розвиток органів. Специфічність клітинних сигналів Ca^{2+} контролюється за допомогою численних іонних каналів, насосів та обмінників, які переносять потоки іонів Ca^{2+} через плазматичну мембрану та через мембрани внутрішньоклітинних органел [55].

На сьогоднішній день відомі три типи Ca^{2+} помп, що використовують АТР [131]:

- Ca^{2+} -АТРаза плазматичної мембрани (PMCA);
- саркоплазматична (ендоплазматична) Ca^{2+} -АТРаза (SERCA);
- Ca^{2+} -АТРаза секреторного шляху (SPCA).

Ці три типи Ca^{2+} -АТРаз демонструють приблизно 30% подібності послідовностей один з одним і, як вважають, мають подібні структури і подібні механізми дії [109].

Ca^{2+} - помпа плазматичної мембрани (PMCA)

PMCA належить до сімейства АТРаз типу P, які характеризуються тимчасовим збереженням енергії АТР у вигляді фосфорильованого проміжного ферменту (отже, P-типу).

Помпа працює зі стехіометрією $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ 1:1. Має високу афінність до Ca^{2+} і безліч агентів, які його модулюють. Кислотні фосфоліпіди також збільшують спорідненість Ca^{2+} помпи.

Молекулярний механізм активації фосфоліпідами до кінця нез'ясований, однак може бути фізіологічно значущим: було підраховано, що в мембранному середовищі помпа, ймовірно, постійно активується кислими фосфоліпідами до приблизно 50% його максимальної активності [55].

Структурно передбачається, що помпа складається з 10 трансмембранних доменів, двох великих внутрішньоклітинних петель і аміно- і карбокси-кінцевих цитоплазматичних хвостів (рис. 1.2). 90-залишковий амінокінцевий хвіст містить сайт зв'язування для 14-3-3 протеїну, який відіграє інгібуючу роль на активності помпи [165].

Перша цитозольна петля між двома і трьома трансмембранними доменами вважається «доменним перетворювачем». Містить одне з двох ділянок для аутоінгібувальної взаємодії з кальмодуліновим зв'язуючим доменом. Цей цикл також містить сайт А, який є одним з двох основних вузлів альтернативного сплайсингу, який генерує варіанти помпи [55, 60].

PMCA була виявлена в еритроцитах, потім була описана і охарактеризована в багатьох інших типах клітин. Вона була очищена в 1979 році за допомогою кальмодуліну і клонована приблизно через 10 років. PMCA є найбільшими з трьох типів Ca^{2+} -АТРази, які знаходяться між 130 і 140 кДа. Більший розмір пояснюється додатковою ділянкою кальмодулін-зв'язування, розташованою на С-кінці білка, який бере участь у регуляції активності АТРази [55].

Існують чотири ізоформи PMCA (позначені PMCA 1–4) і приблизно десять варіантів сплайсингу. PMCA1 і PMCA4 знаходяться в більшості тканин ссавців, а також, можливо, більш спеціалізовані функції в деяких типах клітин [55, 109]. Показано, що PMCA4 є головною ізоформою,

ідентифікованою в яєчках і сперматозоїдах. Більше 90% білка РМСА у сперматозоїдах припадає на РМСА4 [97].

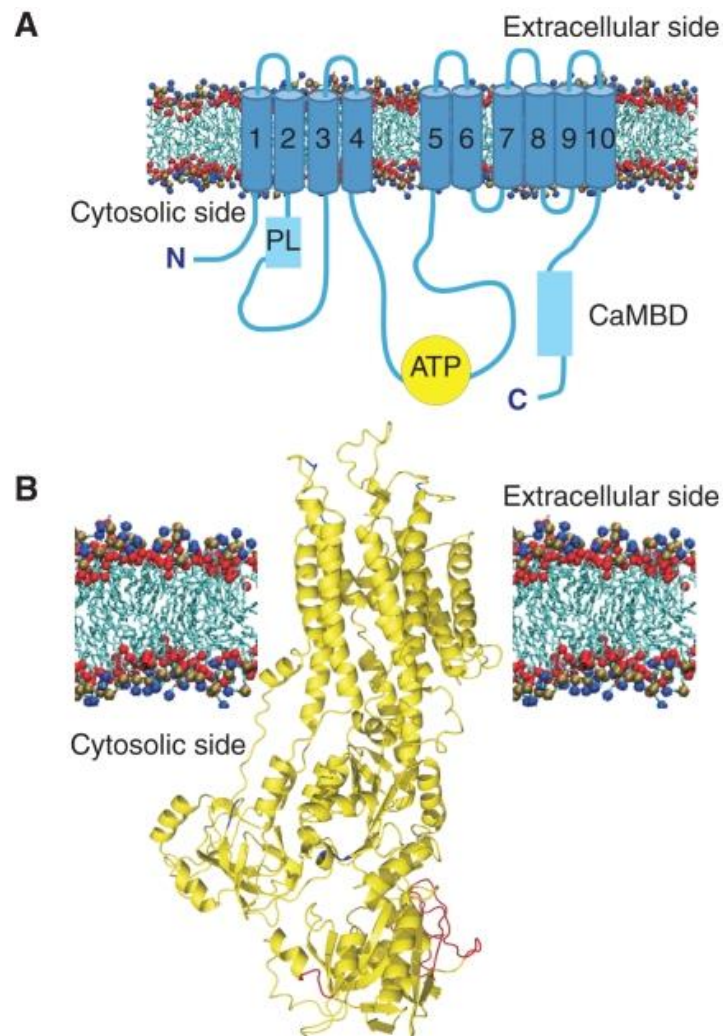


Рисунок 1.2 – (А) Топологічна модель РМСА. Організована в мембрані з 10 трансмембранними доменами, з'єднаними на зовнішній стороні короткими петлями. Цитозольна частина помпи містить каталітичний центр та інші функціонально важливі домени. Сайт зв'язування АТФ позначений жовтим кольором. Домен зв'язування фосфоліпідів (PL) і зв'язуючий домен кальмодуліну (CaVBD) представлені голубим кольором. (В) Виведена 3-D структура РМСА [55]

Гомеостаз кальцію має важливе значення для рухливості сперматозоїдів. PMCA4 знаходиться в головному фрагменті джгутика і бере участь у рухливості сперматозоїдів і гіперактивності. Цікаво, що PMCA4 також має важливе значення для модуляції активності кальцію / кальмодулінозалежної синтази оксиду азоту (nNOS) і, таким чином, контролює утворення оксиду азоту [55, 173]. Дефекти PMCA були описані у великій кількості захворювань, серед яких ті, що пов'язані з оксидативним стресом у декількох типах тканин, зокрема мозку, при ішемії мозку, діабеті, атеросклерозі, старінні, нейродегенеративних захворюваннях та різних порушеннях Ca^{2+} обміну. Дефекти PMCA також були зареєстровані в різних типах раку, відповідно до доказів залучення дисфункції Ca^{2+} гомеостазу в процесі злоякісної трансформації [55, 94, 148, 175].

Саркоплазматична(ендоплазматична) Ca^{2+} -АТРаза (SERCA) – являє собою мембранно-зв'язаний протеїн ссавців, що підтримує транспортування Ca^{2+} і бере участь у клітинній сигналізації та гомеостазі Ca^{2+} .

Він складається з одного поліпептидного ланцюга з 994 амінокислотних залишків, розподілених у 10 трансмембранних сегментах (M1 – M10) і цитозольної головки, що включає три різні домени (A, N і P), які безпосередньо беруть участь у каталітичній активності (рис. 1.3).

Домен N містить залишки (такі як Phe-487), що взаємодіють з аденозиною групою АТР, завдяки чому субстрат АТР є поперечно зшитим з Р-доменом. Домен Р містить залишок (Asp-351), що піддається фосфорилуванню з одержанням фосфоферментного проміжного з'єднання, залишку (Asp-703), що координує Mg^{2+} , та інших ознак, характерних для АТРаза Р-типу. Домен А включає в себе підписану послідовність TGES, яка забезпечує каталітичну допомогу для кінцевого гідролітичного розщеплення фосфоензима. Кооперативне і послідовне зв'язування двох Ca^{2+} що беруть участь в каталітичній активації і транспортуванні відбуваються на ділянках (I

і II), розташованих в межах трансмембранної області досить близько до цитоплазматичної поверхні ліпідного бішару [130].

Ca²⁺-ATPаза (SERCA)

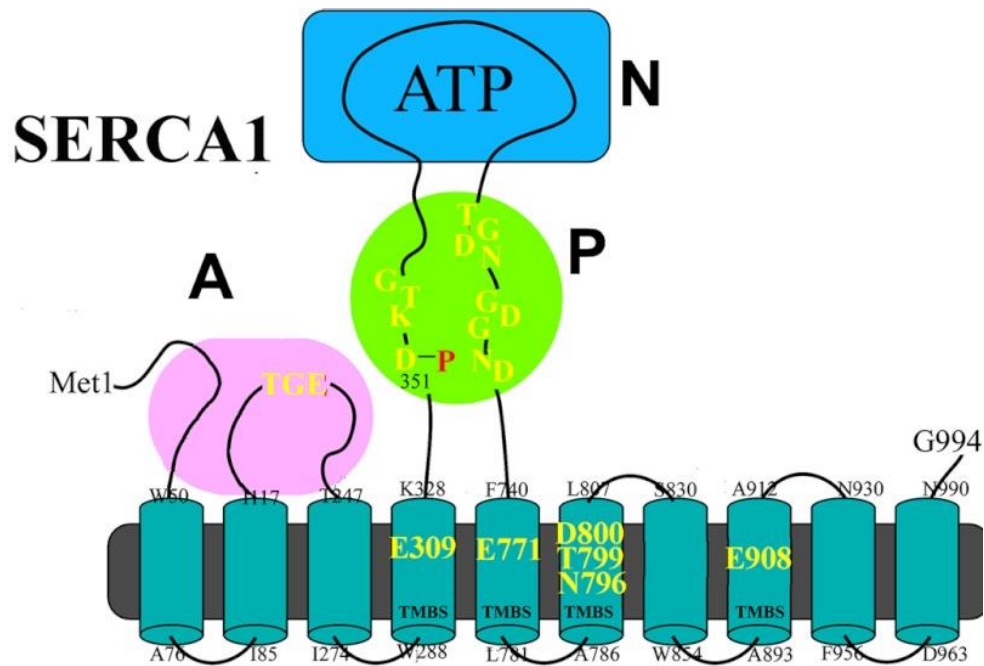


Рисунок 1.3 – Двовимірна модель послідовності SERCA [130]

На відміну від переконливих доказів важливості PMCA у функціях сперматозоїдів, підстави для віднесення до основної ролі діяльність SERCA у зрілих сперматозоїдах видаються більш суперечливими. Докази ролі SERCA у сперматозоїдах були представлені Rossato M. та ін. (2001), де показано, що і Ca²⁺ мобілізація і акросомна реакція в сперматозоїдах можуть бути викликані потужним SERCA специфічним інгібітором тапсигаргіном в діапазоні концентрацій 10–100 нМ.

Присутність і роль SERCA у зрілих сперматозоїдах все ще є предметом для суперечок. Припускають, що всередині сперматозоїда SERCA

відігравати важливу роль тільки під час сперматогенезу, але потім стає надлишковою у зрілих сперматозоїдах [109, 149].

1.4 Оксидативний стрес у сперматозоїдах інфертильних чоловіків

Поряд із загальноприйнятими причинами чоловічого безпліддя, такими як варикоцеле, крипторхізм, інфекції, обструктивні ураження, муковісцидоз, травми та пухлини, дослідженнями виявлено нову, але важливу причину: оксидативний стрес. Оксидативний стрес (ОС) є наслідком дисбалансу між активними формами кисню (АФК) та антиоксидантами в організмі, що може призвести до пошкодження сперматозоїдів, зрештою, чоловічого непліддя [28, 30]. Дані свідчать, що пошкодження сперматозоїдів, спричинене активними видами кисню (АФК), є значним фактором, що сприяє патології в 30–80 % випадків [34, 46, 80, 183].

Сперматозоїди ссавців зазвичай генерують активні форми кисню (АФК) як частину нормального метаболізму, включаючи супероксидний аніон, пероксид водню та оксид азоту [36]. Кисень необхідний для підтримки життя, оскільки фізіологічні рівні активних форм кисню (АФК) необхідні для підтримки нормальної функції клітин. Існують суттєві докази того, що сперматозоїди мають невелику кількість АФК необхідну для гіперактивації, рухливості та акросомної реакції. АФК утворюються в невеликих кількостях, є функціонально необхідними для керування каскадами фосфорилування тирозину, пов'язаними з емністю сперми [30, 172].

І навпаки, продукти їх розпаду, можуть виявитись шкідливими для функціонування клітин та виживання. Окислювальний стрес може бути наслідком дисбалансу між утворенням вільних радикалів (головним чином АФК) та здатністю антиоксидантів їх розщеплювати [30, 34, 172].

Оксидативний стрес виникає у сперматозоїдів, коли загальний рівень АФК (як поза-, так і внутрішньоклітинний) перевищує наявну загальну

антиоксидантну здатність [33, 96, 100, 137, 168, 172]. Активні форми кисню представляють широкий спектр молекул, включаючи радикальні (гідроксильні іони, супероксид, NO, пероксил тощо) та нерадикальні (озон, синглетний кисень, пероксид ліпідів, пероксид водню) та похідні кисню. Активні форми азоту (оксид азоту, пероксинітрит, іони нітроксилу тощо) є вільними радикалами азоту і вважаються підкласом АФК. Показано, що NO шкідливо впливає на нормальну функцію сперматозоїдів, пригнічуючи їх рухливість [30].

Значні окиснювальні пошкодження виникають у багатьох клітинних органелах, пошкоджуючи ліпіди, білки, ДНК та вуглеводи, що призводить до загибелі клітин. Сперма людини – це складна суміш клітин, що містяться в сім'яні плазмі, секрет, що складається з поєднання різноманітних продуктів, що синтезуються по всій чоловічій статевій системі, включаючи сім'яні каналці та додаткові залози. Незрілі сперматозоїди та лейкоцити є основними джерелами АФК [98]. Сперматозоїди особливо схильні до окиснювального ураження через відсутність цитоплазми, яка також є джерелом антиоксидантів [137].

Активні форми кисню можуть утворюватися як ендогенними, так і екзогенними. Ендогенні вільні радикали можуть утворюватися як побічний продукт клітинного метаболізму або ферментативною активністю. Метаболізм сперматозоїдів є основним джерелом АФК. Діяльність мітохондрій, є разом з гліколізом необхідною для рухливості сперматозоїдів. Мітохондрії генерують АТФ за допомогою дихального ланцюга та окисного фосфорилування, в основі яких лежить перенесення електронів із внутрішніх мітохондріальних мембранних комплексів до кисню та перекачування протонів у міжмембранний простір. Ці протони в кінцевому підсумку використовуються для синтезу АТФ за допомогою комплексу АТФ-синтази. У цьому сценарії АФК є побічними продуктами активності електронного ланцюга і особливо генеруються в комплексах, які в основному вивільняють

супероксидні та гідроксильні радикали в матрикс та міжмембранний простір. Потім ці вільні радикали перетворюються в перекис водню за допомогою супероксиддисмутази [164].

Цитоплазматичні краплі (надлишок залишкової цитоплазми) пояснює відсутність зв'язку між низькою якістю сперми та збільшенням генерування АФК. Ці структури є основним джерелом АФК. Дослідження показують, що утримання залишкової цитоплазми призводить до нефункціональних та незрілих сперматозоїдів, які зберігають надлишок цитоплазматичних ферментів, та беруть участь у метаболізмі глюкози, таких як глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, система NADPH-оксидази та NADH-залежна оксидоредуктаза [30, 98, 164].

Імунна відповідь проти інфекцій викликає запалення тканин, що сприяє проникненню лейкоцитів. Лейкоцити присутні в репродуктивних шляхах чоловіків і містяться майже в кожному еякуляті людини [170].

Лейкоцити є важливим джерелом окисного стресу, і було описано, що лейкоцити утворюють в рази більше АФК, ніж сперматозоїди. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначає лейкоцитоспермію (підвищену інфільтрацію лейкоцитів у спермі) як наявність пероксидазно-позитивних лейкоцитів у концентраціях $> 1 \times 10^6$ на мілілітр сперми. Хоча кожен еякулят містить певну кількість лейкоцитів, лейкоцитоспермія складається із збільшення цієї кількості і, як правило, є наслідком інфекцій. Вони ініціюють свою захисну роль безпосередньо шляхом синтезу АФК [98, 164]. Лейкоцити продукують H_2O_2 , який є найбільш токсичною формою АФК для сперматозоїдів, оскільки він швидко проходить крізь їх мембрани [172].

Плазматична мембрана сперматозоїдів має особливу сприйнятливість до окислювальних пошкоджень, оскільки вона містить велику кількість поліненасичених жирних кислот, а їх цитоплазма містить низькі концентрації поглинаючих ферментів [164]. АФК атакує поліненасичені жирні кислоти в клітинній мембрані, що призводить до каскаду хімічних реакцій, що

називається перекисним окисленням ліпідів. Одним з побічних продуктів перекисного окислення ліпідів є малоновий диальдегід (MDA), який застосовувався в різних біохімічних дослідженнях для контролю ступеня перекисного пошкодження сперматозоїдів [30, 38, 64, 169].

Перекисне окислення ліпідів змінює плинність і проникність мембран, що призводить до втрати рухливості сперматозоїдів та зниження здатності сперматозоїдів взаємодіяти з ооцитом. Перекисне окислення ліпідів спричиняє порушення функціонування мембрани, зниження плинності, інактивацію мембранно-зв'язаних рецепторів та ферментів та підвищену неспецифічну проникність для іонів, пошкодження молекул ДНК [64, 114, 172, 194].

Однією з функцій, на яку впливає окислювальний стрес та перекисне окислення ліпідів, є рухливість сперматозоїдів. Однак, точний механізм, за допомогою якого це відбувається, не зрозумілий. Одна гіпотеза передбачає, що H_2O_2 дифундує через мембрани в клітини і пригнічує активність деяких життєво важливих ферментів, таких як глюкоза-6-фосфатдегідрогеназа (G6PD), через пентозофосфатний шлях контролює внутрішньоклітинну доступність NADPH, який потім використовується як джерело електронів сперматозоїдів для генерації АФК за допомогою ферментної системи, відомої як NADPH-оксидаза [30].

Кореляційні зв'язки між утворенням пероксиду ліпідів і рухливістю неодноразово підтверджувались у різних дослідженнях. Механізми, за допомогою яких втрачається рухливість, коли сперматозоїди перебувають під окислювальним стресом, достеменно невідомі, проте, задіяні як окислювальні пошкодження аксонем, так і виснаження внутрішньоклітинного аденозинтрифосфату (АТФ) [39].

Апоптоз – це незапальна реакція на пошкодження тканин, що характеризується низкою морфологічних та біохімічних змін [30]. Апоптоз сперматозоїдів пов'язаний із внутрішньоклітинними рівнями H_2O_2 , на які, в свою чергу, впливає внутрішньоклітинний рівень O^- . Показано, що рухливі

сперматозоїди активуються надмірним утворенням АФК і зазнають апоптозоподібних змін. Апоптотичні зміни сперми в основному пов'язані з рівнем внутрішньоклітинного H_2O_2 , тоді як мертві сперматозоїди пов'язані з внутрішньоклітинними рівнями O_2^- . Рухливість сперматозоїдів знижується в умовах патологічно високого рівня АФК, при яких спостерігається збільшення відсотка загиблих сперматозоїдів [137].

Мітохондрії є потужними генераторами АФК у сперматозоїдах, і ця активність посилюється, як тільки сперматозоїди переходять в апоптотичний стан. Генерація АФК в мітохондріях є одним з перших ознак того, що ці клітини задіяли внутрішній апоптотичний каскад. Саме з цієї причини більшість пошкоджень ДНК, що спостерігаються у сперматозоїдів, мають окиснювальну природу [39].

1.5 Характеристика каліксаренів

Калікс[*n*]арени – це макроциклічні ароматичні молекули, які походять від синтезу фенолів та альдегідів, тоді як [*n*] відноситься до кількості ароматичних циклів фенолу в молекулі. У каліксаренах фенольні субдиниці з'єднуються через метильні групи в метаположенні. Це забезпечує характерну чашоподібну форму молекули каліксарену. Завдяки наявності гідрофобної порожнини, утвореної фенольними одиницями, каліксарени використовуються для виявлення широкого спектру сполук, таких як іони металів, біомакромолекули тощо [126]. Більш того, модифікація бічних груп дозволяє підготувати каліксарени з високою спорідненістю до конкретних молекул-мішеней. Отже, ці розпізнавальні особливості каліксаренів можуть бути використані як основа для розробки біосенсорів [53, 188].

Таким чином, дослідження взаємодії між функціоналізованими каліксаренами та різними сполуками представляє фундаментальний інтерес, щоб дати нові уявлення про молекулярне розпізнавання, що протікають у

біологічних системах. Окрім ефективних рецепторів та утворення цікавих комплексів за рахунок специфічної взаємодії з великою кількістю хімічних та біологічних сполук (наприклад, іонами амонію, амінами, амінокислотами та пептидами), важливою особливістю функціоналізованих каліксаренів є їх здатність виступати в ролі носіїв через мембрани або бути вбудованими в каналні системи з аналітичним та терапевтичним застосуванням [153, 186].

Каліксарени, що містять переорганізовані групи біоафінів, здатні розпізнавати різні біологічні речовини, такі як ароматичні кислоти, дипептиди, білки, холін та ацетилхолін, вуглеводи, нуклеотиди, нуклеозиди та інші органічні речовини.

Похідні каліксарену також можуть прикріплюватися до поверхні білків. Каліксарени також моделюють взаємодію субстрат-рецептор у біохімічних процесах. Раніше це було показано, що калікс[4]арени, функціоналізовані відповідними групами є ефективними рецепторами для ароматичних сполук. Рецепторна активність по суті залежала від кількості функціональних груп, геометричних параметрів і стереохімічної конфігурації макроциклічних платформ [113].

Ці сполуки виявляють противірусні, антибактеріальні, протипухлинні та антитромботичні властивості і можуть служити ефективними інгібіторами або активаторами ферментативної, рецепторної та транспортної мембрани білків [5, 6, 185]. Деякі каліксарени здатні зв'язуватись з мембраною, формуючи в ній селективні до окремих іонів (а саме Na^+ і K^+) канали. Показано, що калікс[4]арен C-107 є високоафінний супрамолекулярний інгібітор Na^+, K^+ -АТРази плазматичної мембрани [3,7].

Відомо, що окремі каліксарени специфічно модифікують іон-транспортувальні системи ПМ і внутрішньоклітинних органел [25]. Тому калікс[4]арени розглядаються як перспективні молекулярні платформи для створення фізіологічно активних сполук [7, 14, 26, 69].

Висновок:

Порушенням фертилізаційної здатності сперматозоїдів тісно асоційовані з розвитком оксидативного стресу та дисфункцією йон-транспортувальних АТРаз.

Сперматозоїди людини виявляють здатність генерувати АФК та ініціювати пероксидацію ненасичених жирних кислот у плазматичній мембрані сперматозоїдів, що відіграє ключову роль в етіології чоловічого безпліддя.

Негативний вплив оксидативного стресу може реалізовуватися через порушення функціонування мембранозв'язаних ензимів. Однак, детальні біохімічні механізми цих змін є не до кінця з'ясованими.

На сьогодні відсутня комплексна оцінка їх ролі при розвитку чоловічої неплідності. Відтак, актуальним є вивчення йон-транспортувальних, вільнорадикальних процесів в сперматозоїдах інфертильних чоловіків, виявлення можливих механізмів які ведуть до розвитку чоловічого непліддя.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Загальна характеристика досліджуваних груп інфертильних чоловіків

Матеріалом для дослідження були зразки сперми, яку отримували у центральній клінічній лабораторії КНП ЛОР “Львівської обласної клінічної лікарні” (згідно з угодою про співпрацю між Львівським національним медичним університетом імені Данила Галицького та КНП ЛОР “Львівською обласною клінічною лікарнею”). Зразки сперми отримували мастурбацією після статевої абстиненції тривалістю 3-5 днів. Перед здачею біологічного матеріалу чоловіків інформували про уникнення вживання лікарських засобів, алкоголю, приймання теплових процедур.

У дослідженнях використовували сперматозоїди чоловіків віком 20–44 років, що відповідає періоду високої статевої активності. Серед обстежених були як умовно здорові без розладів репродуктивної функції, так і неплідні чоловіки. Контрольна група складалась із 30 соматично здорових чоловіків зі збереженою фертильністю, нормозооспермією та підтвердженим батьківством (перебувають у шлюбі впродовж 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 у дослідженнях.

Основна група – пацієнти з первинним непліддям. Усім чоловікам проведено аналіз спермограм. Показники спермограм (концентрація сперматозоїдів, їх рухливість, морфологія та відсоток живих форм) оцінювали за допомогою світлооптичної мікроскопії згідно директив щодо проведення спермограм. Референтні значення деяких показників еякулятів відповідно до рекомендацій ВООЗ (2010).

Проаналізовано дані 86 чоловіків, що проходили обстеження у зв'язку з непліддям у консультативній поліклініці Львівської обласної клінічної лікарні в період 2018-2021 років.

Критерії включення: вік 20-44 роки, непліддя у шлюбі 1-10 років, чоловічий фактор непліддя за умов олігозооспермії, астенозооспермії, олігоастенозооспермії або лейкоцитоспермії.

Критерії виключення: непліддя у шлюбі понад 10 років, азооспермія, надмірне вживання алкоголю і вплив будь-яких шкідливих фізико-хімічних чинників під час діагностично-лікувальних заходів.

За показниками спермограм усіх інфертильних чоловіків було розділено на 4 групи:

- олігозооспермія (Ol, концентрація сперматозоїдів в еякуляті $< 20 \cdot 10^6$ клітин/мл, $n = 21$);
- астенозооспермія (Ast, рухливість сперматозоїдів $< 40 \%$, $n = 24$),
- олігоастенозооспермія (OlAst, поєднана форма патоспермії, $n = 16$);
- лейкоцитоспермія (Leu, вміст лейкоцитів коливався від $1,0 \cdot 10^6$ /мл до $3,0 \cdot 10^6$ /мл, що свідчило про наявність запального процесу у цих чоловіків, $n = 25$).

Дослідження проводили у лабораторії кафедри медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Комісією з біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України (протокол засідання № 65 від 01 вересня 2021 р.) та комісією з питань біоетики Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького (протокол засідання № 8 від 18 жовтня 2021 р.) порушень морально-етичних норм при виконанні дисертаційної роботи не виявлено. Надані для експертизи матеріали визнали науково обґрунтованими, а також у листі інформування для пацієнтів усі положення чітко викладеними, з якими були ознайомлені пацієнти. Були

передбачені заходи із забезпечення безпеки здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм відповідно до принципів Гельсінської декларації, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину, ICH GCP та чинних нормативно-правових актів України.

2.2 Виділення сперматозоїдів

Отримання зразків сперми у пацієнтів із непліддям проводили після попереднього завершення їхнього клінічного обстеження перед призначенням їм курсу лікування.

Сперматозоїди чоловіків відмивали від плазми еякуляту у середовищі відмивання 3-разовим центрифугуванням при 3000 g впродовж 10 хв, 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 детергент сапонін. Дана методика ґрунтується на роботах, виконаних на сперматозоїдах при вивченні антиоксидантних і йон-транспортувальних систем клітини [11].

Сперматозоїди інкубували впродовж 10 хв при помірному струшуванні у розчині, який містив сапонін у концентрації 0,5 %. Саме така концентрація детергенту вважалася найоптимальнішою для практичного використання у дослідженнях при вивченні властивостей ензимів [15].

Дослідниками показано, що додавання детергенту сапоніну призводить до перфорації спермальних мембран, а інтактні та пермеабілізовані сперматозоїди є зручною моделлю для вивчення ензиматичних активностей АТР-гідролазних йон-транспортувальних систем.

2.3 Оцінка життєздатності та рухливості сперматозоїдів

Якість сперматозоїдів (їх життєздатність, рухливість і морфологія) є важливими факторами для їх функцій. Рухливість сперматозоїдів визначають як процент сперматозоїдів, які рухаються до загальної кількості сперматозоїдів. Рухливість та морфологічні показники сперматозоїдів оцінювали за допомогою світлової мікроскопії. На предметне скло скляною паличкою наносили краплю сперми. До сперми додавали 2...3 краплі 3 % розчину натрій цитрату. Ретельно їх змішували і накривали покривним скельцем. У полі зору мікроскопа вели підрахунок відсотка сперматозоїдів різних категорій рухливості (прогресивно-рухливі, непрогресивно-рухливі, нерухливі) ($n = 3$). Загальну рухливість визначали як суму прогресивно-рухливих і непрогресивно-рухливих сперматозоїдів. Визначали середню арифметичну величину рухливості сперматозоїдів.

Оцінку життєздатності сперматозоїдів проводили під світловим мікроскопом еозин-нігрозиною сумішшю. На ретельно вимите, обезжирене впродовж 3 год у рівних об'ємах етилового спирту з ефіром, висушене і підігріте до 35...37 °С предметне скло наносили краплю сперми. До сперми додавали 2-3 краплі еозин-нігрозинової суміші, 2-3 с змішували з барвником і робили тонкі мазки ($n = 3$).

Виготовлені мазки висушували за 18...20 °С. Після висушування приступали до мікроскопії. Визначення кількості живих і мертвих сперматозоїдів проводили під імерсією з голубим або зеленим світлофільтром. Окремо рахували кількість сперматозоїдів із зафарбованими (мертві) та незафарбованими (живі) головками. Сперматозоїди, головка яких була зафарбована частково, відносили до категорії мертвих. Процентний вміст мертвих сперматозоїдів розраховували за формулою:

$$C_{\text{мертвих}} = C_{\text{зафарбованих}} / C_{\text{загальних}} \times 100\%.$$

У кожній пробі рахували 100 клітин та розраховували середнє значення.

Еозин-нігрозинову суміш готували завчасно. У мірній колбі на 100 см³ наливали 50...60 см³ 3 % розчину натрій цитрату. В його об'ємі розчиняли 1,5 г еозину та 10 г нігрозину. Після повного розчинення барвників, об'єм рідини у колбі доводили розчином натрій цитратом до мітки 100 см³.

2.4 Визначення Ca²⁺-активованої, Mg²⁺-залежної АТРазної активності сперматозоїдів

Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазну активність сперматозоїдів визначали реєструючи процес гідролізу АТР за накопиченням P_i. Визначення сумарної Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазної активності сперматозоїдів проводили при 37° С в інкубаційному середовищі (об'єм – 1 мл) наступного складу (мМ): 150 КСl, 0,05 СаСl₂, 5 MgСl₂, 5 АТР, 1 NaN₃ (інгібітор мітохондріальної АТРази), 1 убаїн (інгібітор Na⁺,K⁺-АТРази) [86], 20 Нерес-Трис-буфер (рН = 7,4).

Для розділення сумарної Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазної активності на компоненти: тапсигаргін-резистентну Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазу плазматичної мембрани (PMCA) та тапсигаргін-чутливу Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазу мембран ендоплазматичного ретикулуму та інших Ca²⁺-депо (SERCA) до стандартного Ca²⁺- та Mg²⁺-вмісного середовища інкубації додавали інгібітор Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази внутрішніх Ca²⁺-депо – тапсигаргін (0,1 мкМ).

Активність “базальної” Ca²⁺-незалежної, Mg²⁺-залежної АТРази сперматозоїдів визначали за тих же умов, але за відсутності СаСl₂, і з додаванням 1 мМ EGTA та 0,1 мкМ тапсигаргіну.

Активність Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази плазматичної мембрани розраховували як різницю між Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазною активністю в присутності тапсигаргіну та “базальною” Ca²⁺-незалежною, Mg²⁺-залежною АТРазною активністю.

Активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази мембран ендоплазматичного ретикулуму та інших Ca^{2+} -депо оцінювали як різницю між загальною $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазною активністю і $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазною активністю в присутності тапсигаргін (селективний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ЕПР) [95].

АТР-гідролазну активність обох компонент $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази виражали в нмолях P_i у перерахунку за хв на 1 мг протеїну.

2.5 Визначення Na^+, K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТРазної активності сперматозоїдів

Na^+, K^+ -АТРазну активність сперматозоїдів визначали також реєструючи процес гідролізу АТР за накопиченням P_i . Визначення загальної АТРазної ензиматичної активності сперматозоїдів проводили при 37°C у середовищі інкубації (об'ємом 1 мл) наступного складу (мМ): 120 NaCl, 30 KCl, 5 MgCl_2 , 1,5 АТР, 1 ЕГТА, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТРази), 20 Нерес-Tris-буфер (pH = 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін. Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування в ньому ендогенних йонів Ca^{2+} .

АТР-гідролазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти суспензії сперматозоїдів (100 мкл); кількість протеїну в пробі не перевищувала 50 – 100 мкг. Тривалість інкубації – 5 хв.

Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого “стоп-розчину” наступного складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО (pH = 4,3).

“Базальну” Mg^{2+} -АТРазну активність сперматозоїдів тестували в аналогічному середовищі інкубації, але у присутності 1 мМ убаїну – селективного інгібітора Na^+, K^+ -АТРази [192].

Убаїнчутливу Na^+, K^+ -АТРазну активність сперматозоїдів обчислювали за різницею між величиною загальної АТРазної і “базальної”

Mg²⁺-АТРазної активності і виражали у нмолях P_i у перерахунку за хв на 1 мг протеїну.

Контролем на неензиматичний гідроліз АТР та вміст ендogenous P_i були проби, що за своїм складом відповідали стандартному середовищу інкубації, але містили сперматозоїди з попередньо інактивованою АТРазою, шляхом їх оброблення “стоп-розчином”. Як контроль на кількість ендogenous P_i в суспензії сперматозоїдів використовували суспензію сперматозоїдів у фізіологічному розчині.

2.6 Визначення кількості неорганічного фосфату у сперматозоїдах

Після зупинки ензиматичної реакції “стоп-розчином” суспензію центрифугували (10 хв, 1500 g) і в отриманому супернатанті, який не містив протеїну, визначали вміст неорганічного фосфору P_i за методом Fiske-Subbarow з використанням набору для аналізу фірми-виробника «Simko Ltd» (Україна).

Метод базується на колориметричному визначенні кількості P_i , який утворюється в результаті ензиматичної реакції гідролізу АТР. Фосфорна кислота здатна утворювати з молібденовою кислотою комплексну сполуку, яка легко відновлюється аскорбіною кислотою з утворенням забарвленої в синій колір сполуки.

Для розвитку забарвлення проби інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Вимірювання абсорбції проводили на однопроменевому спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі $\lambda = 650$ нм.

Визначення вмісту P_i проводили за калібрувальним графіком, для побудови якого використовували розчини однозаміщеного ортофосфату калію різної концентрації.

2.7 Визначення концентрації протеїну

Вміст протеїну у суспензії сперматозоїдів визначали за модифікованим методом Lowry ОН. та ін. [135], який базується на вимірюванні інтенсивності забарвлення розчину внаслідок проходження двох біохімічних реакцій: біуретової та реакції реактиву Фоліна.

Реактив А: 0,1 н. NaOH; 2%- Na₂CO₃ в 0,1 н. NaOH.

Реактив В: 0,5 % CuSO₄·5H₂O в 1 %-му виннокислому натрію або калію.

Реактив С: перед початком аналізу 1 мл реактиву В змішують з 49 мл реактиву А.

У пробірки вносили досліджуваний розчин, який містив 10–100 мкг білка, доводили дистильованою водою до 0,4 мл, додавали 2 мл реактиву С, перемішували та інкубували при кімнатній температурі 20 хв.

Потім додавали 0,2 мл реактиву Фоліна, змішували та інкубували упродовж 30 – 40 хв за кімнатної температури.

Вимірювання абсорбції проводили на однопроменевому спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі $\lambda = 750$ нм. Значення концентрації протеїну знаходили по калібрувальному графіку [20]. В якості етанолу використовували бичачий сироватковий альбумін (Sigma, США).

2.8 Кінетичний аналіз ензимних систем сперматозоїдів

Дослідження кінетичних властивостей ензимів проводили в стандартному середовищі інкубації, що було модифіковане за фізико-хімічними характеристиками чи складом відповідних компонентів (час інкубації, концентрація субстратів, ефекторів, інгібіторів). Усі досліди з вивчення кінетичних властивостей ензимів проводили в режимі початкової швидкості V_0 (лінійність накопичення продукту в часі).

Уявні кінетичні параметри, які характеризують реакцію накопичення продукту реакції – максимальну миттєву швидкість реакції V_{\max} , максимальну (платову) кількість утворення продукту реакції P_{\max} та характеристичний час реакції (період напівнасичення) τ визначали як описано у координатах $\{[P]/[P]/t\}$ [13].

Уявні кінетичні параметри, які характеризують ензиматичну реакцію – константу активації йонами, константу спорідненості (афінності) та початкову максимальну швидкість реакції, розраховували за методом Лайнуївера-Берка [12]. Одержані концентраційні залежності від досліджуваних реагентів реакції будували у координатах: $\{1/V$ від $1/S\}$, де S – задана концентрація реагенту, а V – швидкість реакції при заданій концентрації реагенту.

При визначенні ефективності впливу інгібіторів уявну константу напівінгібування ($I_{0,5}$) та коефіцієнта Хілла (n_H) розраховували у координатах Хілла $\{\lg[(A_0-A)/A]; \lg[I]\}$ відповідно до емпіричного рівняння Хілла:

$$\lg[(A_0-A)/A] = -n_H \lg I_{0,5} + n_H \lg [I],$$

де A_0 та A – питома активність ензиму за відсутності та у присутності в середовищі інкубації інгібітора в концентрації I [8].

Для з'ясування можливих механізмів зміни Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності за H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу та оцінки впливу калікс[4]арену С-107 на кінетичні характеристики Na^+ , K^+ -АТРази, криві концентраційних залежностей були лінеаризовані методом Хайнса-Вульфа (у координатах $\{[S]/V; [S]\}$).

Кінетичні розрахунки здійснювали з використанням програмного забезпечення MS Excel.

2.9 Статистична обробка даних

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M) та стандартну похибку (m). Результати представлені як середнє арифметичне (M) \pm стандартна похибка середнього (m).

Кількість дослідів (n) відповідає кількості чоловіків, досліджених у кожному випадку (кожен раз використовували сперматозоїди, отримані від одного пацієнта або практично здорового донора).

Достовірність змін між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних встановлювали за t -критерієм Ст'юдента. Достовірною вважали різницю за значень вірогідності $p < 0,05$.

Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує еспериментальні дані, розраховували із використанням методу найменших квадратів. Для лінеаризованих графіків абсолютне значення коефіцієнта кореляції r становило 0,90-0,95. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F -критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію за якої $p \leq 0,05$ [12].

Для з'ясування ступеня спорідненості між досліджуваними групами пацієнтів проводили кластерний аналіз за допомогою методу повного зв'язку (complete linkage), який ґрунтується на певному рівні схожості об'єкта з будь-яким іншим для утворення кластеру. Метод кластерного аналізу дає змогу об'єднати у групи досліджувані об'єкти за низкою біохімічних показників та виділити компактні чи віддалені один від одного групи.

Для виявлення взаємних залежностей змінних та виокремлення найвагоміших з них одержані результати піддавали багатofакторному аналізу, а саме методу головних компонент (детермінант), суть якого полягає у перетворенні певної послідовності досліджуваних змінних в іншу

послідовність змінних, які є лінійними комбінаціями початкових змінних. Аналіз параметрів здійснювали, використовуючи комп'ютерну програму Statistica v 10.0.

2.10 Реактиви

У досліджах використовували реактиви Нерес, Tris, Thapsigargin, АТР (Sigma, USA; Acros organics), Ouabain (Fluka), EGTA, Saponin (from *Quillaja Saponaria Molina pract.*; Acros organics).

Каліксарен С-107 (5,17-ди(фосфоно-2-піридилметил)аміно-11,23-дигідроксидипропоксикалікс[4]арен) (рис. 2.1) був синтезований та охарактеризований з використанням методів ЯМР та інфрачервоної спектроскопії в Інституті органічної хімії НАН України.

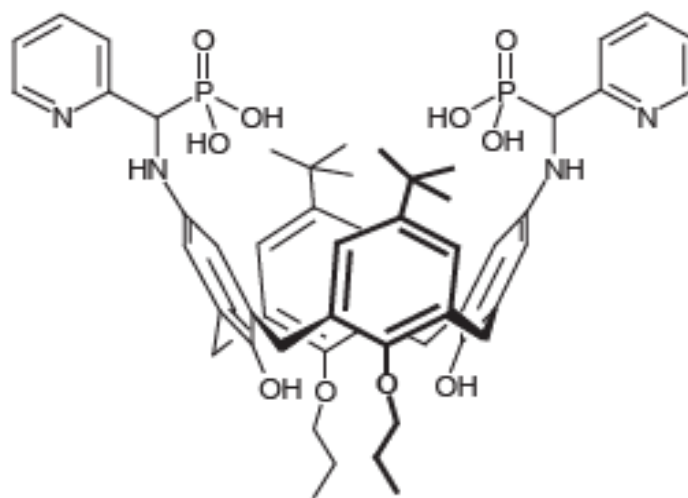


Рисунок 2.1 – Структурна формула каліксарену С-107

Інші використані у досліджах реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації чда та хч.

РОЗДІЛ 3

ХАРАКТЕРИСТИКА Na^+ , K^+ -АТРази СПЕРМАТОЗОЇДІВ ФЕРТИЛЬНИХ ТА ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ

3.1 Зміни Na^+ , K^+ -АТРазної активності сперматозоїдів інфертильних чоловіків.

Після еяколяції, сперматозоїди проходять велику відстань, в середовищі яке постійно змінюється. Ось чому вони повинні мати спеціальний механізм підтримки іонного гомеостазу. У сперматозоїдах є різноманітні іонні канали, обмінники та насоси. Na^+ , K^+ -АТРаза (чутлива до убаїну Ca^{2+} - незалежна, Na^+ , K^+ - активована Mg^{2+} , АТР-залежна гідролаза, ЕС 3.6.1.37) – це мембранозв'язаний ензим, який каталізує активний транспорт Na^+ і K^+ через клітинну мембрану, використовуючи енергію гідролізу АТР.

Відомо, що багато захворювань пов'язані зі зміною структури та функції біомембран. Мембранозв'язані протеїни, включаючи інтегральний АТР-залежні транспортні ензими, відіграє важливу роль у функціонуванні мембрани. Плазматичні мембрани сперматозоїдів містять Na^+ , K^+ -АТРази, яка підтримує фізіологічний трансмембранний іонний градієнти та мембранний потенціал спокою. Можна використовувати зміни в роботі АТРази як показник порушень у структурі біологічних мембран при патологічних умовах.

Для оцінки функціонування Na^+ , K^+ -АТРази в сперматозоїдах визначали активність АТР-гідролази. У здорових чоловіків активність Na^+ , K^+ -АТРази становила $(46,3 \pm 4,2)$ нмоль P_i / хв. мг протеїну (значення активності прийнято за 100 %) (рис. 3.1).

У пацієнтів з олігозооспермією, активність Na^+ , K^+ -АТРази становить

($48,38 \pm 7,6$) % активності в нормозооспермічних чоловіків, що складає ($22,4 \pm 3,5$) нмоль P_i / хв. мг протеїну.

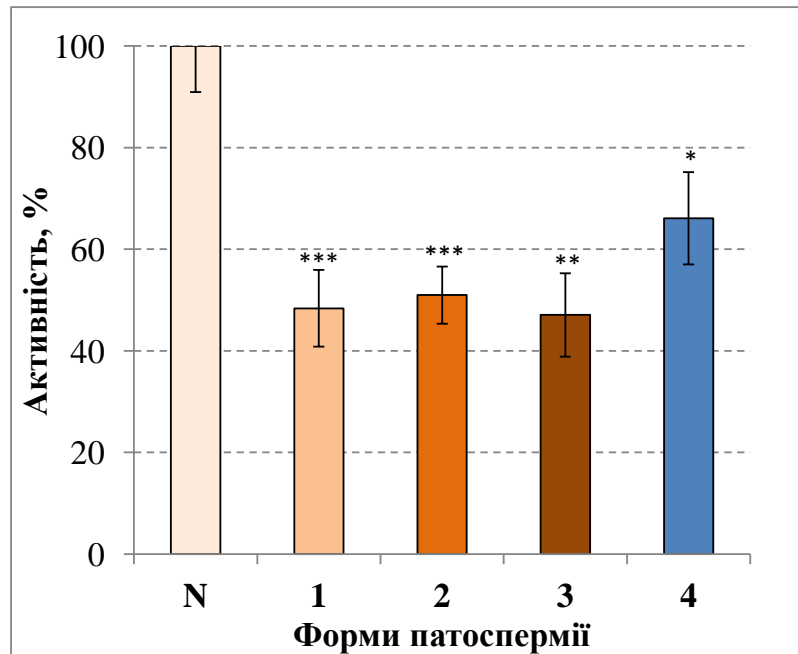


Рисунок 3.1 – Уабайнчутлива Na^+,K^+ -АТРаза активність сперматозоїдів інфертильних чоловіків із різними формами патоспермії ($M \pm m, n = 20-42$). За 100 % прийнято активність Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів нормозооспермічних чоловіків

Примітка 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

Примітка 2. N – контроль; 1 – олігозооспермія; 2 – астенозооспермія; 3 – олігоастенозооспермія; 4 – лейкоцитоспермія.

Активність Na^+,K^+ -АТРази в сперматозоїдах астенозооспермічних чоловіків є нижчою і становить ($23,6 \pm 2,6$) нмоль P_i / хв. мг протеїну, що складає ($50,9 \pm 5,6$) % активності в нормозооспермічних чоловіків.

У пацієнтів з олігоастенозооспермією, активність Na^+, K^+ -АТРази становить ($47,08 \pm 8,2$) % активності в нормозооспермічних чоловіків, що складає ($21,8 \pm 3,8$) нмоль P_i / хв. мг протеїну. У хворих на лейкоцитоспермію активність Na^+,K^+ -АТРаза була ($30,6 \pm 4,2$) нмоль P_i / хв. мг протеїну. Це

складає ($66,9 \pm 9,1$) % активності Na^+, K^+ -АТРази у нормозооспермічних чоловіків [82, 145, 146].

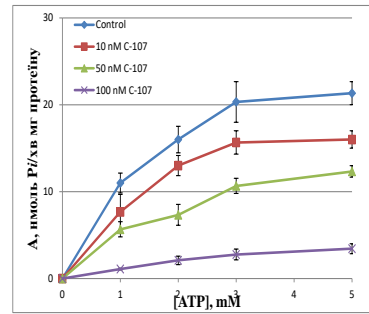
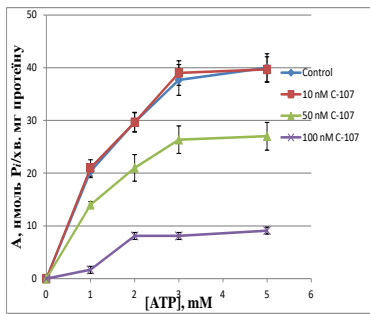
3.2 Кінетичні властивості Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків за дії калікс[4]арену С-107

Калікс[4]арени є низькомолекулярними, малотоксичними супрмолекулярними сполуками, які здатні змінювати активність йон-транспортувальних систем [2, 25]. Завдяки їх здатності утворювати надмолекулярні комплекси з біологічно важливими молекулами та іонами, вони впливають на біохімічні процеси. Тому калікс[4]арени розглядаються як перспективні молекулярні платформи для створення фізіологічно активних сполуки [69].

Досліджували вплив різних концентрацій калікс[4]аренів на залежність АТРадної активності від концентрації АТР.

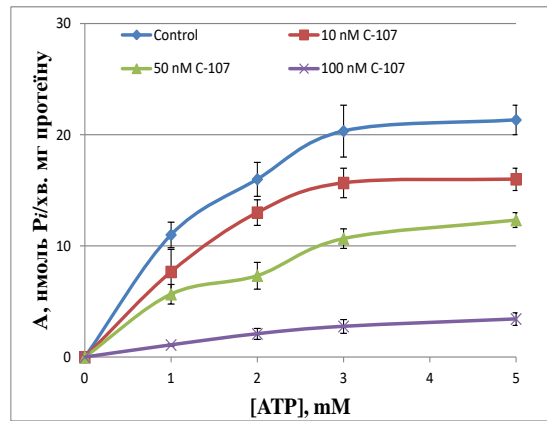
Активність Na^+, K^+ -АТРази зростає у сперматозоїдах чоловіків із нормозооспермією (рис. 3.2, а) та патоспермією (рис. 3.2, б, в) при зростанні в інкубаційному середовищі концентрації субстрату (за постійної концентрації кофактора). Аналогічні концентраційні залежності були отримані також для олігоастенозооспермічних зразків.

Найвища активність екзимів спостерігалася при наявності в інкубаційному середовищі 3мМ АТР. Наявність калікс[4]арену С-107 у діапазоні концентрацій від 10-100 нМ в інкубаційному середовищі призводить до інгібування активності Na^+, K^+ -АТРази у сперматозоїдах чоловіків при нормозооспермії та патозооспермії. При підвищенні концентрації каліксарену спостерігається максимальне інгібування активності Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів.



а

б



в

Рисунок 3.2 – Ефекти калікс[4]арену С-107 на залежність Na^+, K^+ -АТРазної активності сперматозоїдів нормо- (а), оліго- (б) і астенозооспермічних (в) чоловіків від концентрації АТР в середовищі інкубації ($M \pm m$; $n = 4-5$), $[\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$

Коефіцієнт (напів-) активації АТР (K_{ATP}) та коефіцієнт Хілла (n_H) розраховували, використовуючи рівняння Хілла для всіх досліджуваних груп (рис. 3.3). Як видно з рис. 3.3. а, калікс[4]арен С-107 не впливав на K_{ATP} АТР та коефіцієнт Хілла n_H для Na^+, K^+ -АТРаза в сперматозоїдах чоловіків із нормозооспермією.

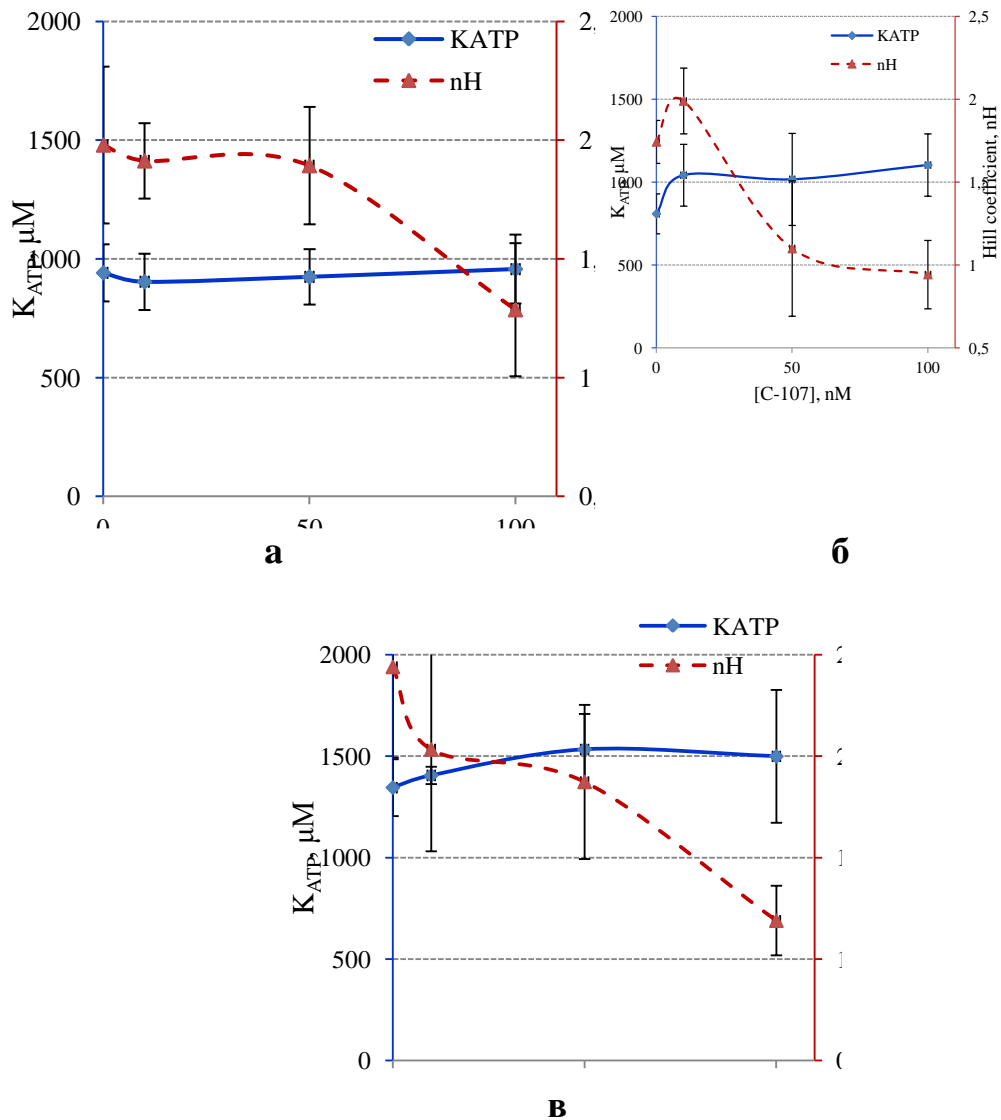


Рисунок 3.3 – Вплив калікс[4]арену С-107 на кінетичні параметри (коефіцієнт (напів)активації АТР (K_{ATP}) та коефіцієнта Хілла (n_H)) Na^+ , K^+ -АТРази в сперматозоїдах нормозооспермічних (а), олігозооспермічних (б) та астенозооспермічних (в) чоловіків ($M \pm m$; $n = 4-5$);

$[\text{MgCl}_2] = 5 \text{ mM}$; контроль – $[\text{C-107}] = 0 \text{ nM}$

Значення коефіцієнта Хілла n_H були вищими ніж 1 в присутності калікс[4]арену С-107 в середовищі інкубації та за його відсутності, що вказує на позитивну кооперацію між ензимом і АТР.

Оскільки калікс[4]арен С-107 інгібував активність Na^+ , K^+ -АТРази сперматозоїдів щодо контролю [6] і не змінив коефіцієнт (напів-) активації

АТР та взаємодії ензиму з АТР (значення K_{ATP} та n_H залишилися незмінними) можна припустити, що активність ензиму може бути знижена через зменшення максимальної швидкості реакції (V_{max}).

Величину V_{max} розраховали у координатах Хейнса-Вульфа. Як видно з рис. 3.4, калікс[4]арен С-107 впливає на максимальну швидкість реакції V_{max} в залежності від дози. Так, при зростанні концентрації калікс[4]арену С-107 V_{max} знижується в 5 разів. Подібні залежності V_{max} від Na^+, K^+ -АТРази були отримані в сперматозоїдах чоловіків із олігозооспермією і астенозооспермією.

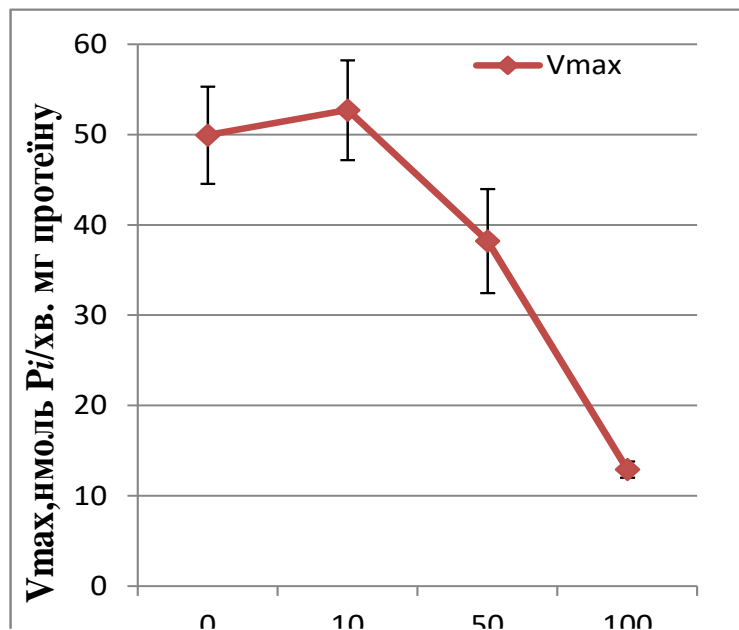


Рисунок 3.4 – Вплив калікс[4]арену С-107 на максимальну швидкість реакції Na^+, K^+ -АТРази, визначену за АТР у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків ($M \pm m$; $n = 5$); $[MgCl_2] = 5$ мМ

Коефіцієнт Хілла n_H був майже вдвічі нижчим у присутності 100 нМ калікс[4]арену С-107 в інкубаційному середовищі для чоловіків із олігозооспермією та астенозооспермією порівняно з контролем. Ці значення коефіцієнта Хілла ($n_H > 1$) свідчать про позитивну кооперативність Na^+, K^+ -АТРази з АТР у патоспермічних зразках, отримані від неплодних чоловіків.

Зміни в значеннях коефіцієнта Хілла можуть вказувати на субодиничні зміни структури ензиму при зростаючій концентрації калікс[4]арену С-107 в інкубаційному середовищі. Максимальна швидкість реакції (V_{max}) Na^+, K^+ -АТРази суттєво зменшується у міру збільшення концентрації калікс[4]арену С-107.

Відомо, що крім АТФ, магній також необхідний для функціонування Na^+, K^+ -АТРази. Іони Mg^{2+} , які діють як кофактор, утворюють хелатуючий комплекс $\text{Mg} \cdot \text{АТР}$, який є субстратом ензимної реакції. Крім того, іони Mg^{2+} зв'язуються з регуляторним центром Na^+, K^+ -АТРази [46].

Na^+, K^+ -АТРазна активність сперматозоїдів зростає із збільшенням концентрації MgCl_2 , в діапазоні від 0,1 до 10 мМ при сталій концентрації АТР (3 мМ) в інкубаційному середовищі (рис. 3.5, контроль). Залежність активності ензиму від концентрації MgCl_2 була схожою до залежності без калікс[4]арену С-107, однак, рівень плато Na^+, K^+ -АТРадної активності зменшується в міру збільшення концентрації калікс[4]арену.

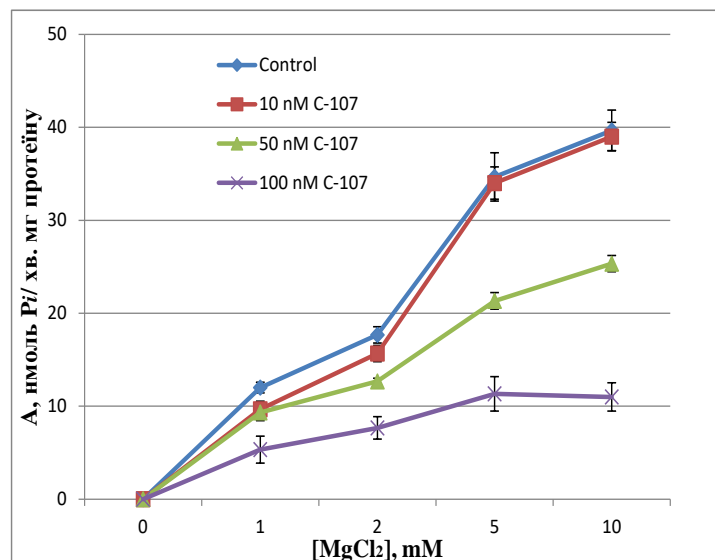
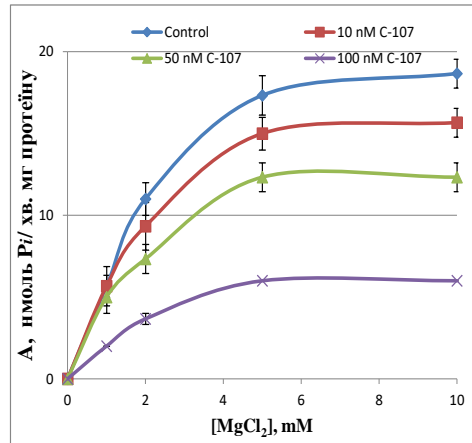
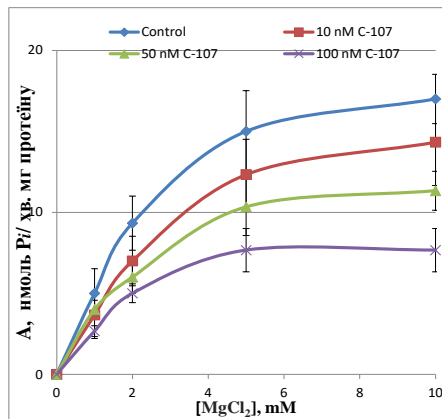


Рисунок 3.5 – Вплив калікс[4]арену С-107 на залежність Na^+, K^+ -АТРадної активності сперматозоїдів нормозооспермічних чоловіків від концентрації MgCl_2 в інкубаційному середовищі ($M \pm m$; $n = 4-5$), $[\text{АТР}] = 3 \text{ мМ}$

Схожі концентраційні залежності були отримані для олігозооспермічних (рис.3.6.а), астенозооспермічних (рис. 3.6.б) та олігоастенозооспермічних зразків (результати в роботі не представлені).



а



б

Рисунок 3.6 – Вплив калікс[4]арену C-107 на залежність Na^+, K^+ -АТРазної активності сперматозоїдів олігозооспермічних (а) і астенозооспермічних (б) чоловіків від концентрації MgCl_2 в інкубаційному середовищі

($M \pm m$; $n = 4-5$), $[\text{ATP}] = 3 \text{ mM}$

Представлені концентраційні залежності не відповідають Mg^{2+} , а $MgCl_2$, оскільки ми використовували в експериментах $MgCl_2$. Слід зазначити, що $[Mg^{2+}]$ інкубаційному середовищі нелінійно залежить від $[MgCl_2]$.

Калікс[4]арен С-107 впливає на коефіцієнт (напів-) активація $MgCl_2$ Na^+,K^+ -АТРази, у сперматозоїдах нормо- та патозооспермічних чоловіків він був інший. Зокрема, у нормозооспермічних зразках сперматозоїдів, коефіцієнт (напів) активації $MgCl_2$ (K_{MgCl_2}) зменшується при високих концентраціях калікс[4]арену С-107 (≥ 50 нМ) в інкубаційному середовищі (рис. 3.7).

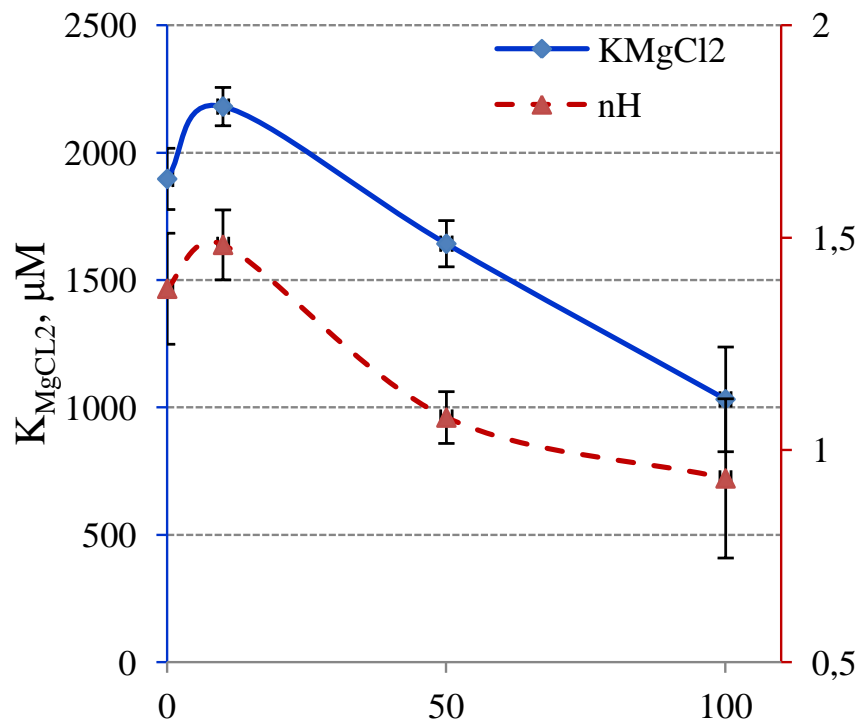
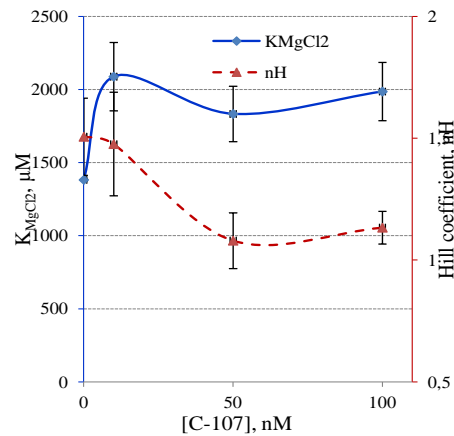
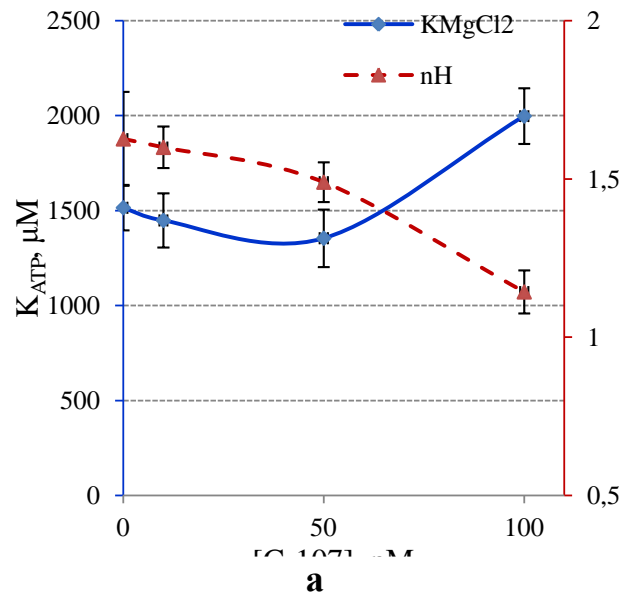


Рисунок 3.7 – Вплив калікс[4]арену С-107 на кінетичні параметри (коефіцієнт (напів-)активації $MgCl_2$ (K_{MgCl_2}) та коефіцієнта Хілла (n_H)) Na^+,K^+ -АТРази в сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків ($M \pm m$; $n = 4-5$);

$[ATP] = 3$ мМ; контроль – $[C-107] = 0$ нМ.

Коефіцієнт (напів-) активації $MgCl_2$ (K_{MgCl_2}) в олігозооспермічних зразках сперматозоїдів збільшується лише при високій концентрації (100 нМ) калікс[4]арену С-107 (рис. 3.8а).



б

Рисунок 3.8 – Вплив калікс[4]арену С-107 на кінетичні параметри (коефіцієнт (напів-)активації $MgCl_2$ (K_{MgCl_2}) та коефіцієнта Хілла (n_H)) Na^+, K^+ -АТРази в сперматозоїдах олігозооспермічних (а) та астенозооспермічних (б) чоловіків ($M \pm m$; $n = 4-5$); $[ATP] = 3$ мМ; контроль – $[C-107] = 0$ нМ.

Збільшення концентрації калікс[4]арену С-107 для Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів астенозооспермічних чоловіків, призводить до збільшення коефіцієнта (напів-) активації MgCl_2 (K_{MgCl_2}) у всьому діапазоні досліджених концентрацій калікс[4]арену (див. рис. 3.8а).

Коефіцієнт кооперативності n_H активації MgCl_2 знижується в присутності каліксу[4]арену С-107. Це може свідчити про зміни в субдиничному складі ензиму як результат дії калікс[4]арену С-107 на нього.

Отримані результати свідчать про високу ефективність інгібуючої дії калікс[4]арену С-107 на Na^+, K^+ -АТРази у нормозооспермних зразках, має неконкурентний характер та пов'язаний зі зменшення максимальної швидкості реакції в 5 разів (рис. 3.9).

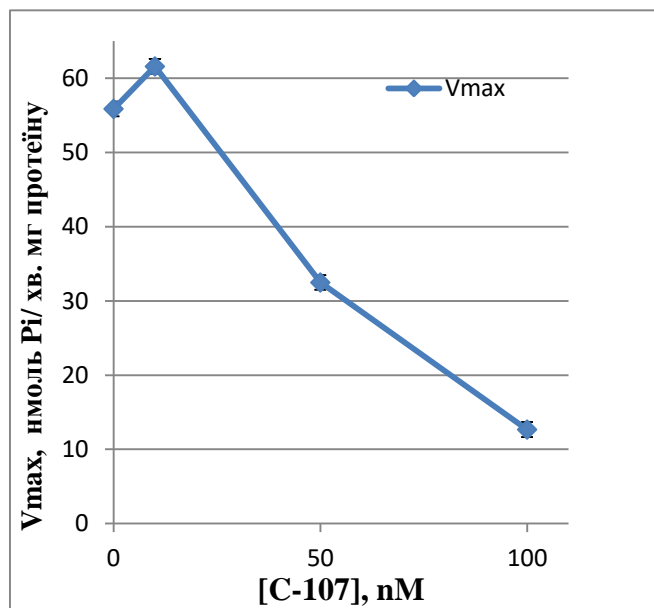


Рисунок 3.9 – Вплив калікс[4]арену С-107 на максимальну швидкість реакції Na^+, K^+ -АТРази, визначену за MgCl_2 у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків ($M \pm m; n = 5$); $[\text{АТР}] = 3 \text{ мМ}$

В оліго- та астенозооспермічних чоловіків інгібуючий ефект калікс[4]арену С-107 спричинює збільшення K_{MgCl_2} для MgCl_2 [84].

3.3 Функціонування Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів чоловіків за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу

Сперматозоїди мають незвичайний ліпідний склад плазматичних мембран, який відрізняється від соматичних клітин ссавців. Вони багаті поліненасиченими жирними кислотами і дуже сприйнятливі до АФК [177]. Оксидативний стрес може активувати Na^+, K^+ -АТРазну-сигналізацію. Встановлено, що екзогенне додавання H_2O_2 , підвищує внутрішньоклітинний рівень АФК у сперматозоїдах [136]. Окрім продукції високореактивних молекул, H_2O_2 може чинити ряд прямих впливів на клітини, їх метаболізм і ензими.

Na^+, K^+ -АТРаза є однією з мішеней для АФК і безпосередньо бере участь в оксидативному стресі. Сперматозоїди піддавали оксидативному стресу, у вигляді H_2O_2 .

Показано, що вплив на сперматозоїди, різними концентраціями H_2O_2 , продемонстрував здатність АФК до дозозалежного пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази. Низькі концентрації H_2O_2 помітно знижували Na^+, K^+ -АТРазну активність. Зокрема, Na^+, K^+ -АТРазна активність спермальних клітин знизилася до $(94,0 \pm 7,4) \%$ та $(37,6 \pm 5,9) \%$ від початкової активності у сперматозоїдах здорових чоловіків (нормозооспермія) оброблених 50 мкМ та 100 мкМ H_2O_2 відповідно (рис. 3.10). Однак залишкова активність ензиму $(10,6 \pm 1,9\%$ від початкової активності) зберігалася.

Коли сперматозоїди пацієнтів із патоспермією, зазнавали впливу різних концентрацій H_2O_2 , також спостерігалася дозозалежне інгібування ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази. Наприклад, в пацієнтів з олігозоо- та астенозооспермією Na^+, K^+ -АТРазна активність спермальних клітин, знизилася до $(33,9 \pm 4,6) \%$ та $(17,3 \pm 5,8) \%$ від початкової активності, при

обробці 100 мкМ H_2O_2 відповідно. Схожі результати були отримані для сперматозоїдів пацієнтів із олігоастенозооспермією.

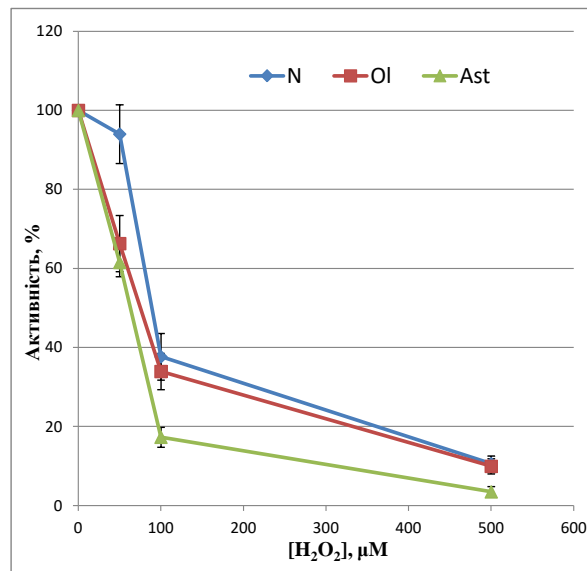


Рисунок 3.10 – Вплив H_2O_2 на активність убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів чоловіків із різними формами патоспермій

Примітка. Дані представлені як ($M \pm m$) стосовно показників за відсутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі, $n = 4-6$.

Також сперматозоїди інкубували зі 100 мкМ H_2O_2 протягом різних проміжків часу, а потім визначали активність Na^+, K^+ -АТРази (рис. 3.11). Збільшення часу інкубації з 100 мкМ H_2O_2 продемонструвало різке зниження активності ензиму впродовж перших 5 хв інкубації як для нормозооспермічних, так і для патозооспермічних чоловіків. Ензиматична активність Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів повністю пригнічувалася через 20 хв для астенозооспермічних чоловіків та при 30 хв для нормозооспермічних чоловіків.

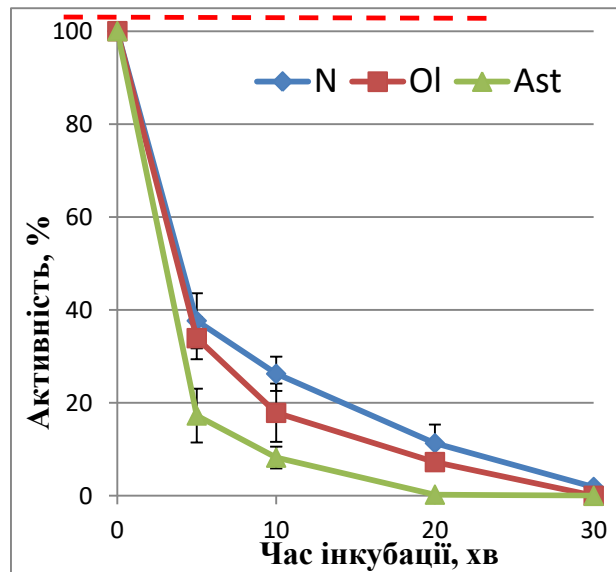


Рисунок 3.11 – Залежність убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності сперматозоїдів чоловіків від тривалості преінкубації з $100 \text{ мкМ H}_2\text{O}_2$

Примітка. Дані представлені як $(M \pm m)$ стосовно показників за відсутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі, $n = 4-6$.

З метою з'ясування механізму інгібуючої дії H_2O_2 , визначали основні кінетичні параметри інгібування. Лінеаризація концентраційних кривих у координатах Хілла представлена на рис. 3.12.

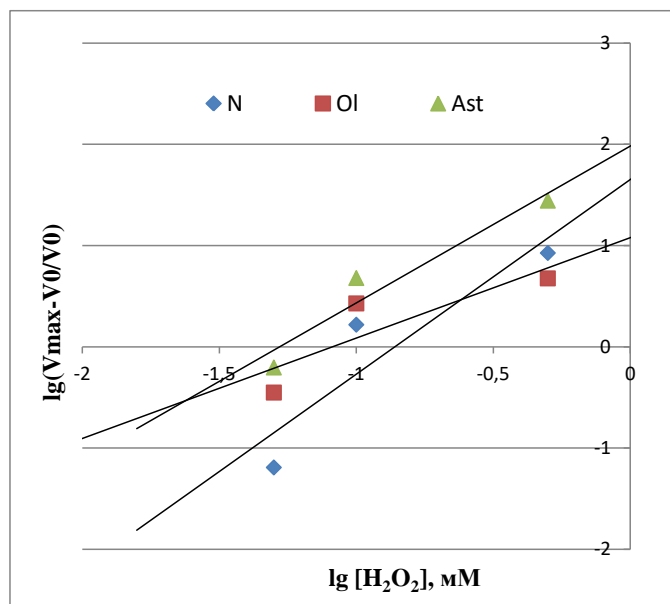


Рисунок 3.12 – Лінеаризація концентраційних залежностей представлених на рис. 3.10. у координатах Хілла

Отримані значення константи напівінгібування (IC_{50}) та коефіцієнта Хілла (n_H) представлені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 – Кінетичні параметри інгібування убаїнчутливої Na^+,K^+ -АТРази сперматозоїдів H_2O_2 ($M \pm m; n = 4-6$).

Кінетичні параметри	Нормозооспермія	Патоспермія		
		олігозооспермія	астенозооспермія	олігоастенозооспермія
$IC_{50}, \mu M$	$106,6 \pm 21,9$	$74,6 \pm 9,8$	$52,8 \pm 3,2 *$	$83,88 \pm 8,0$
n_H	$1,42 \pm 0,18$	$1,45 \pm 0,16$	$2,0 \pm 0,15 *$	$1,52 \pm 0,11$

Примітка. * $p < 0,05$ порівняно з нормозооспермічними чоловіками (чоловіки із збереженою фертильністю).

Сприйнятливість Na^+,K^+ -АТРази до H_2O_2 у здорових чоловіків відрізнялася в значній мірі порівняно з чоловіками з патозооспермією. Про це свідчить той факт, що IC_{50} для Na^+,K^+ -АТРази була більшою у чоловіків із нормозооспермією, ніж у пацієнтів з оліго-, астен- та олігоастенозооспермією.

IC_{50} для пацієнтів з астенозооспермією було в два рази нижчою, ніж у здорових чоловіків із збереженою фертильністю ($p < 0,05$).

Для інших досліджених груп різниця у величині не була статистично достовірною. Ці спостереження дозволяють припустити, що Na^+,K^+ -АТРаза в чоловіків із патозооспермією є більш вразливими до окисного пошкодження, спричинених H_2O_2 , ніж у нормозооспермічних чоловіків.

Коефіцієнт Хілла був суттєво вищий лише для пацієнтів з астенозооспермією, що свідчить про зростання позитивно кооперативного зв'язування [85].

3.4 Ефекти H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР убаїнчутливою Na^+,K^+ -АТРазою сперматозоїдів інфертильних чоловіків

Na^+,K^+ -АТРаза відіграє вирішальну роль у фізіології сперматозоїдів та підтриманні їх фертилізаційної здатності. Na^+,K^+ -АТРаза є однією з мішеней для активних форм кисню. Гіперпродукція активних форм кисню може пошкодити клітини сперматозоїдів і вважається одним із механізмів чоловічого непліддя. Показано, що в сперматозоїдах рівень внутрішньоклітинних АФО збільшується при екзогенному додаванні H_2O_2 [136]. Крім утворення вискоєфективних реактивних молекул, H_2O_2 може викликати ряд прямих впливів на клітини, порушувати їх метаболізм та функціонування ензимів.

У зв'язку з інгібуючим ефектом H_2O_2 було досліджено вплив цього ефектора на основні кінетичні параметри гідролізу АТР убаїнчутливою Na^+,K^+ -АТРазою сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків.

Відбувається монотонне збільшення ензиматичної активності убаїнчутливої Na^+,K^+ -АТРази з виходом на плато в концентраційному діапазоні АТР від 1 до 5 мМ (за сталої концентрації Na^+ , K^+ , Mg^{2+}).

Активність Na^+,K^+ -АТРази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків знижена у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР за присутності H_2O_2 в середовищі інкубації. Проте, у сперматозоїдів чоловіків з нормо- та астенозооспермією оптимальна активність Na^+,K^+ -АТРази спостерігається за наявності 5 мМ АТР в інкубаційному середовищі (рис.3.13, рис.3.14).

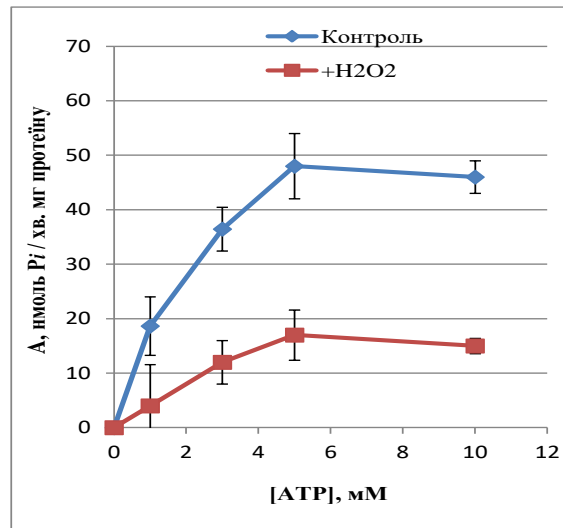


Рисунок 3.13 – Вплив 100 нМ H_2O_2 на активність убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів фертильних чоловіків за зміни концентрації АТР у середовищі інкубації

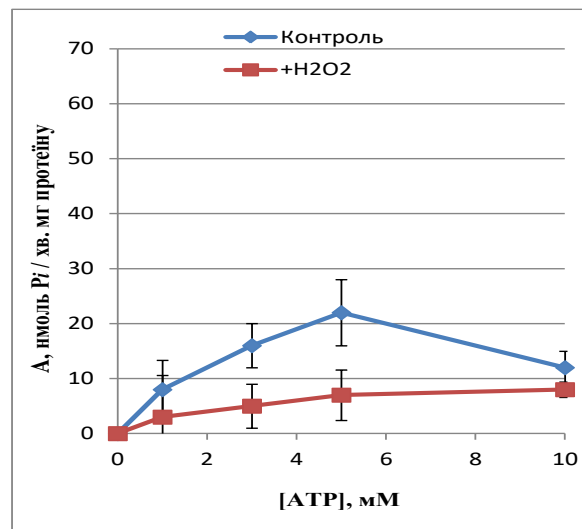


Рисунок 3.14 – Вплив 100 нМ H_2O_2 на активність Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів інфертильних (астенозооспермічних) чоловіків за зміни концентрації АТР у середовищі інкубації

Для інших досліджуваних груп інфертильних чоловіків характер залежності Na^+, K^+ -АТРазної активності від субстрату був схожий. Проведено визначення основних кінетичних параметрів Na^+, K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу для з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТРази в сперматозоїдах чоловіків (рис.3.15, рис.3.16).

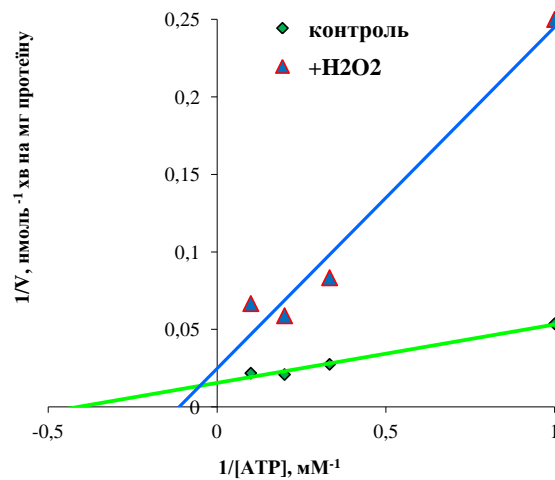


Рисунок 3.15 – Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 3.13, у координатах Лайнуівера-Берка, де V – убаїнчутлива Na^+, K^+ -АТРазна активність в сперматозоїдах фертильних чоловіків

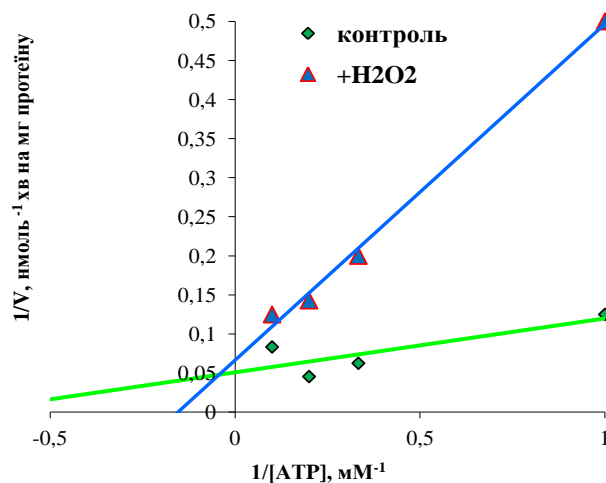


Рисунок 3.16 – Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 3.14, у координатах Лайнуівера-Берка, де V – убаїнчутлива Na^+, K^+ -АТРазна активність в сперматозоїдах інфертильних (астенозооспермія) чоловіків

Як видно з цих рисунків, за наявності інгібітора в середовищі інкубації криві залежностей $\{1/V; 1/[АТР]\}$ відрізняються тангенсом кута нахилу.

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуівера – Берка в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків визначено основні кінетичні параметри Na^+, K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР (рис. 3.17).

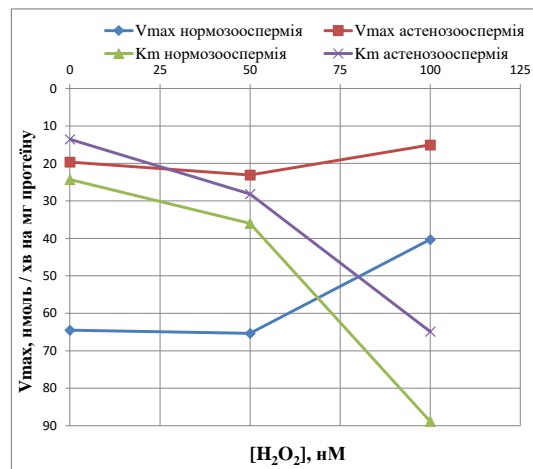


Рисунок 3.17 – Вплив різних концентрацій H_2O_2 на кінетичні параметри убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРази, визначені за АТР (K_m і V_{max}) у сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків

В сперматозоїдах чоловіків з нормо- і астенозоспермією за дії H_2O_2 константа спорідненості Na^+, K^+ -АТРази до АТР зростає в декілька разів. Початкова максимальна швидкість гідролізу АТР суттєво знижується лише в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозоспермією. Отже, за умов дії H_2O_2 спостерігається зростання спорідненості до субстрату та зниження максимальної швидкості реакції в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозоспермією.

Проте, в сперматозоїдах інфертильних чоловіків спостерігається зростання спорідненості до субстрату а максимальна швидкість реакції достовірно не змінюється [23].

Висновок:

В результаті проведених досліджень виявлено достовірне зниження убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРазної активності сперматозоїдів з астено-, олігоастенозоо- і лейкоцитоспермією стосовно величин у сперматозоїдах фертильних чоловіків.

Встановлено, що калікс[4]арен С-107 може потенційно впливати на ензиматичну або транспортну активність Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів чоловіків. У нормозооспермічних зразках високоефективний інгібуючий ефект калікс[4]арену С-107 на Na^+, K^+ -АТРазу має неконкурентний характер і пов'язаний зі зниженням максимальної швидкості реакції. Водночас, в патоспермічних зразках інгібіторний ефект калікс[4]арену С-107 викликає зростання коефіцієнта (напів-) активації MgCl_2 .

Отримані дані вказують на те, що Na^+, K^+ -АТРаза сперматозоїдів чоловіків із патозооспермією більш сприйнятлива до H_2O_2 -індукованого пошкодження, ніж у чоловіків із нормозооспермією. Коефіцієнт Хілла був суттєво вищий лише для пацієнтів з астенозооспермією, що свідчить про зростання позитивно кооперативного зв'язування. За впливу H_2O_2 у сперматозоїдах фертильних чоловіків знижується спорідненість до субстрату та максимальна швидкість реакції, що характерно для змішаного типу інгібування. У сперматозоїдах інфертильних чоловіків спостерігається конкурентний тип інгібування.

Матеріали даного розділу опубліковано у наукових працях автора [23, 82, 84, 85, 142, 145, 146].

РОЗДІЛ 4

ХАРАКТЕРИСТИКА Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаЗ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ФЕРТИЛЬНИХ ТА ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ

4.1 Зміни Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаЗної активності сперматозоїдів інфертильних чоловіків

Іони кальцію відіграють вирішальну роль у регуляції сперматогенезу та заплідненні, в тому числі і акросомної реакції [109]. Градієнти Ca^{2+} у плазматичній мембрані сперматозоїдів, необхідні для сигналізації Ca^{2+} , підтримуються в суперпозиції різних систем транспортування іонів. Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза (ЕС 3.6.1.38) відіграє ключову роль у перенесенні Ca^{2+} з цитоплазми, підтримуючи їх концентрацію в низькому наномолярному діапазоні. Загальна активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази складається з тапсигаргін-резистентної компоненти АТРази плазматичної мембрана (PMCA) та тапсигаргін-чутливої компоненти АТРази (SERCA).

Активність тапсигаргін-чутливої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази в сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків становить $4,9 \pm 0,5$ нмоль P_i / хв.мг протеїну (рис. 4.1). Активність ензиму в сперматозоїдах чоловіків із олігозооспермією зростала ($5,5 \pm 0,4$) нмоль P_i / хв. мг протеїну), але ці зміни не були статистично достовірними.

У пацієнтів з астенозооспермією активність тапсигаргін-чутливої компоненти Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази складає $(42,85 \pm 6,12)$ % активності в нормозооспермічних чоловіків. У пацієнтів із олігоастенозооспермією активність тапсигаргін-чутливої компоненти Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази достовірно відрізняється від величини у чоловіків зі збереженою фертильністю і становить $(38,8 \pm 4,08)$ % активності осіб групи контролю (нормозооспермія). У хворих на лейкоцитоспермію активність тапсигаргін-чутливої компоненти

$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази складає $(26,5 \pm 4,08)$ % активності в нормозооспермічних чоловіків.

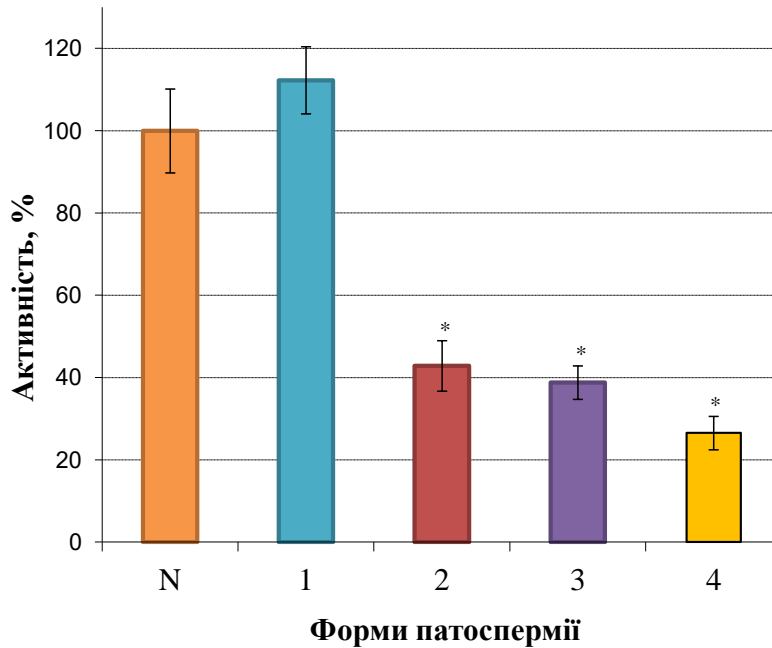


Рисунок 4.1 – Активність тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -

АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків із різними формами патоспермії ($M \pm m, n = 20-42$). За 100 % прийнято активність Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів нормозооспермічних чоловіків

Примітка 1. $*p < 0,05$ стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

Примітка 2. N – контроль; 1 – олігозооспермія; 2 – астенозооспермія; 3 – олігоастенозооспермія; 4 – лейкоцитоспермія.

У сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків активність тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази становить $(9,2 \pm 1,1)$ нмоль P_i / хв. мг протеїну (рис. 4.2). У пацієнтів з астенозооспермією активність тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази становить $(3,6 \pm 0,5)$ нмоль P_i / хв. мг протеїну, що складає $(39,13 \pm 5,43)$ % активності осіб групи контролю (нормозооспермія). Активність тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази

зростала у сперматозоїдах олігозооспермічних чоловіків, і становить $(9,8 \pm 0,8)$ нмоль P_i / хв. мг протеїну, але ці зміни не були статистично достовірними.

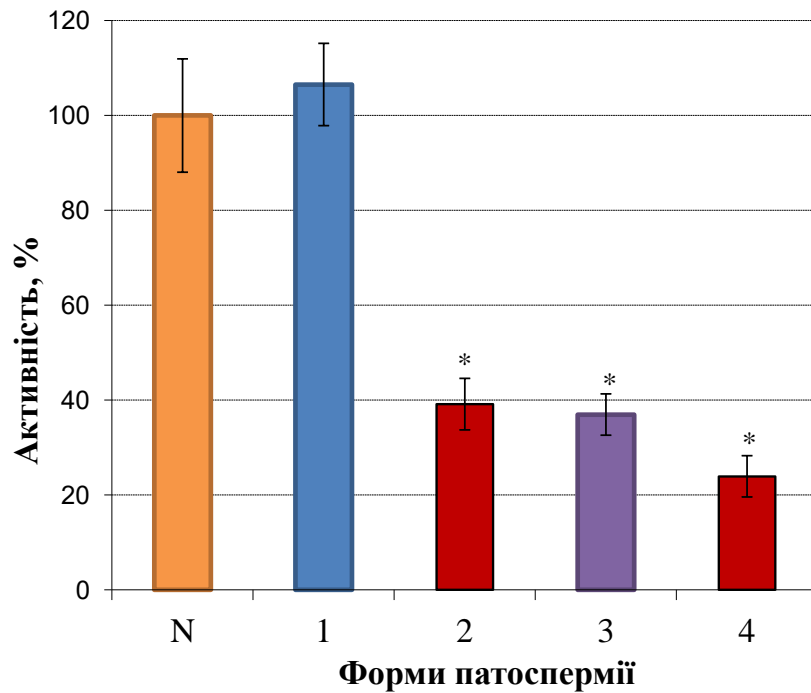


Рисунок 4.2 – Активність тапсигаргін-резистентної компоненти Ca^{2+},Mg^{2+} -

АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків із різними формами патоспермії ($M \pm m, n = 20-42$). За 100 % прийнято активність Na^+,K^+ -АТРази сперматозоїдів нормозооспермічних чоловіків

Примітка 1. $*p < 0,05$ стосовно величин в осіб групи контролю (нормозооспермія).

Примітка 2. N – контроль; 1 – олігозооспермія; 2 – астенозооспермія; 3 – олігоастенозооспермія; 4 – лейкоцитоспермія.

Для олігоастенозооспермічних чоловіків активність тапсигаргін-резистентної Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази статистично достовірно відрізняється від контрольної групи та становить $(3,4 \pm 0,4)$ нмоль P_i / хв. мг протеїну. Це складає $(36,95 \pm 4,34)$ % активності тапсигаргін-резистентної Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази в чоловіків зі збереженою фертильністю.

У сперматозоїдах чоловіків із лейкоцитоспермією найбільш виражене пригнічення активності тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, щодо величин у здорових чоловіків зі збереженою фертильністю. Це складає $(23,9 \pm 4,34)$ % активності тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази осіб групи контролю (нормозооспермія).

Отже, у пацієнтів з астено-, олігоастенозооспермією та лейкоцитоспермією активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази значно знизилася порівняно з контрольною групою, що свідчить про зростання $[\text{Ca}^{2+}]_i$ у цитозолі сперматозоїдів [19, 91, 146].

4.2 Кінетика вивільнення P_i під час Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах інфертильних чоловіків

Для визначення кінетичних параметрів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР у сапонін-пермеабілізованих сперматозоїдах досліджували динаміку накопичення продукту АТР-гідролазної реакції – неорганічного фосфату (P_i).

Для цього суспензію сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків інкубували у стандартному середовищі інкубації протягом різних інтервалів часу (1–10 хв). Експериментальні дані показали, що кінетичні криві $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР в сперматозоїдах чоловіків мають тенденцію до насичення (рис. 4.3).

Аналіз отриманих результатів вказує, що накопичення P_i в реакції каталізується тапсигаргін-резистентною АТРазою в нормозооспермічних зразках, у часовому інтервалі 0–2 хв узгоджується із закономірностями реакції нульового порядку. У цьому часовому інтервалі графік залежності утворення P_i протягом часу інкубації є практично лінійним. Схожа залежність спостерігається і для тапсигаргін-чутливої АТРази.

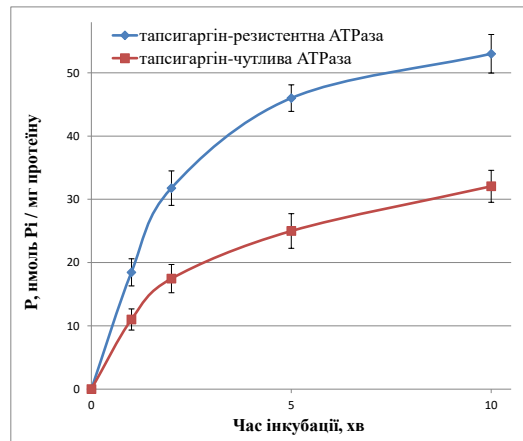


Рисунок 4.3 – Динаміка накопичення неорганічного фосфату в процесі Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків ($M \pm m$, $n = 7$)

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах $\{P/t; P\}$ (рис. 4.4), обчислено основні кінетичні параметри реакції Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків (табл. 4.1).

Як видно з даних, наведених у таблиці, значення кінетичних параметрів гідролізу АТР, каталізований тапсигаргін-чутливою та тапсигаргін-резистентною АТРазою нормозооспермічних чоловіків відрізняються між собою. За відсутності статистично достовірної різниці між величинами τ і V_0 реакції гідролізу АТР, значення P_{\max} в реакції, каталізованій тапсигаргін-резистентною АТРазою, було в 1,75 рази більшим порівняно зі значеннями для чутливої до тапсигаргін АТРази у сперматозоїдах фертильних чоловіків.

Значення кінетичних параметрів гідролізу АТР за участю тапсигаргін-резистентної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази у фертильних та інфертильних чоловіків відрізняються між собою (табл. 4.1).

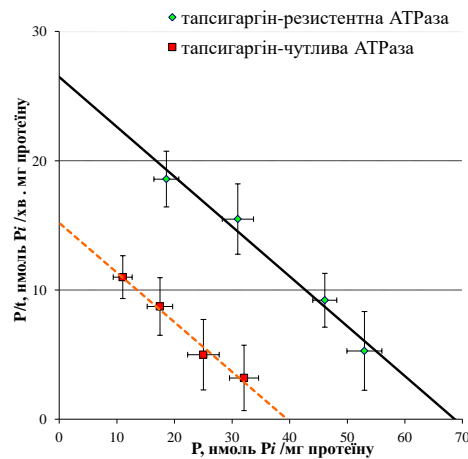


Рисунок 4.4 – Лінеаризація кривих накопичення неорганічного фосфату P_i у процесі Ca^{2+}, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків у координатах $\{P/t; P\}$ ($n = 7$); $r > 0,95$

Таблиця 4.1 – Кінетичні параметри Ca^{2+}, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах чоловіків із нормозоо- та патоспермією, $M \pm m$, $n = 5-7$

Кінетичні параметри	Досліджувані групи		
	нормозооспермія	патоспермія	
		астенозооспермія	олігоастенозооспермія
1	2	3	4
Тапсигаргін-резистентна Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРаза			
V_0 , нмоль P_i / хв на 1 мг протеїну	$26,17 \pm 4,04$	$7,8 \pm 2,12^{**}$	$6,5 \pm 1,72^{**}$
P_{max} , нмоль P_i / мг протеїну	$70,5 \pm 6,8$	$36,6 \pm 6,4^{**}$	$33,7 \pm 2,3^{***}$
τ , хв	$2,77 \pm 0,68$	$5,02 \pm 1,84$	$5,51 \pm 1,74$

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4
Тапсигаргін-чутлива $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза			
V_0 , нмоль P_i / хв на 1 мг протеїну	$15,22 \pm 2,9$	$8,27 \pm 3,6$	$4,72 \pm 1,9^*$
P_{\max} , нмоль P_i / мг протеїну	$40,1 \pm 3,65^{\$}$	$15,95 \pm 1,64^{***}$	$15,6 \pm 2,28^{***}$
τ , хв	$2,7 \pm 0,53$	$2,29 \pm 0,9$	$3,93 \pm 1,3$
Примітка 1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ стосовно величин у здорових донорів. Примітка 2. \$ $p < 0,01$ стосовно величин для тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.			

Кінетичні криві $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР сперматозоїдів інфертильних чоловіки з астенозооспермією та олігоастенозооспермією мають схожий вигляд, але значення кінетичних параметрів відрізняються від значень для нормозооспермічних зразків (рис. 4.5; рис. 4.6).

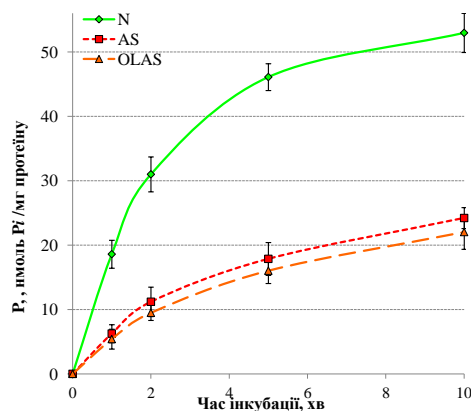


Рисунок 4.5 – Динаміка накопичення неорганічного фосфату у процесі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР за участю тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів чоловіків із нормозоо- та патоспермією

($M \pm m$, $n = 5-7$)

Зокрема, значення V_0 гідролізу АТФ в астено- та олігозоозоспермічних зразках достовірно знижується у 4 рази порівняно з нормозоспермічними зразками ($p < 0,01$).

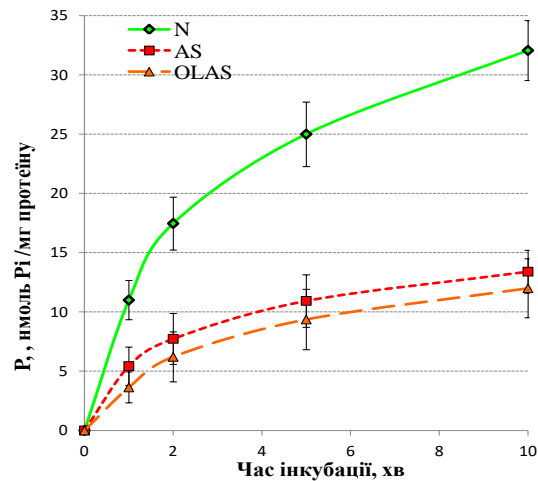


Рисунок 4.6 – Динаміка накопичення неорганічного фосфату у процесі $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТФ за участю тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів чоловіків із нормозоо- та патоспермією ($M \pm m, n = 5-7$)

Значення P_{\max} у зразках, отриманих від інфертильних чоловіків, було достовірно нижчим у 2 рази стосовно сперматозоїдів чоловіків із нормозоспермією ($p < 0,01$; $p < 0,001$).

Величина τ реакції гідролізу АТФ за участю тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у сперматозоїдах чоловіків з астено- та олігоастеносооспермією була в 1,8-2,0 рази більша стосовно сперматозоїдів чоловіків із нормозоспермією ($p > 0,05$).

За відсутності статистично достовірної різниці величини τ реакції гідролізу АТР за участю тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазиди у сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків, нами показано, що значення V_0 в олігоастенозооспермічних зразках знижується у 3,0 рази порівняно з нормозооспермічними зразками ($p < 0,05$). Значення P_{\max} у сперматозоїдах інфертильних чоловіків було у 2,5 рази нижчим ніж у нормозооспермічних зразках ($p < 0,001$).

На основі цих результатів ми припускаємо, що в сперматозоїдах інфертильних чоловіків транспорт іонів Ca^{2+} є менш активним і характеризується зниженою ємністю, ніж у сперматозоїдах фертильних чоловіків [143, 144].

4.3 Залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності у сперматозоїдах інфертильних чоловіків від концентрації АТР

Важливою характеристикою $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазиди є залежність швидкості АТР-гідролізної реакції за участю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазиди від концентрації субстрату в середовищі інкубації, яка визначається величиною уявної константи спорідненості (аффіності) до субстрату.

У стандартному середовищі інкубації, яке містило АТР в діапазоні концентрацій від 0,5 до 5 мМ, шляхом визначення питомої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності, розраховували $K_{\text{АТР}}$ (за сталої концентрації $\text{Ca}^{2+} - 0,05$ мМ і $\text{Mg}^{2+} - 5$ мМ).

З'ясовано, що підвищення концентрації АТР в інкубаційному середовищі, веде до монотонного збільшення ензиматичної активності тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазиди та тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазиди сперматозоїдів чоловіків із нормозооспермією з виходом на плато, за наявності 3 мМ АТР в середовищі інкубації (рис. 4.7).

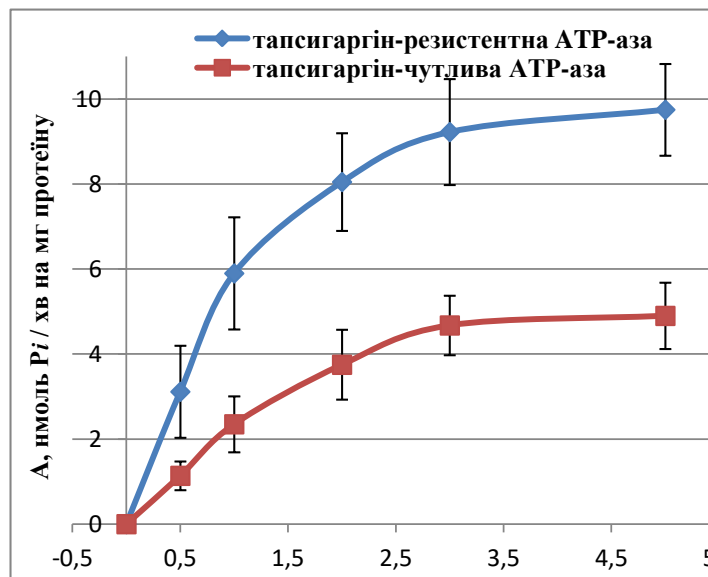
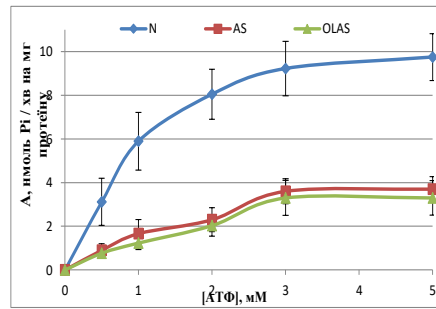


Рисунок 4.7 – Залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності від концентрації АТР у сперматозоїдах нормозоспермічних чоловіків ($M \pm m, n = 4-6$)

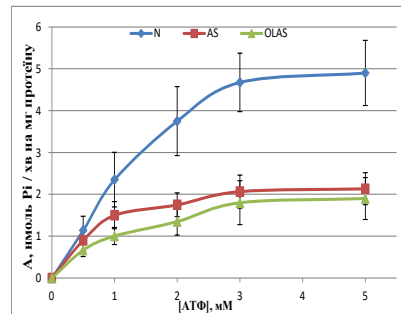
У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР, активність у сперматозоїдах тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази була знижена порівняно з величиною активності в сперматозоїдах нормозоспермічних чоловіків (рис. 4.8).

Для визначення основних кінетичних параметрів і з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР за участю тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів концентраційних залежностей лінеаризовано у координатах Лайнуївера-Берка $\{1/[V]$ від $1/[S]\}$ (рис. 4.9; рис. 4.10).

Як видно з рис. 4.9, криві залежностей $\{1/V; 1/[АТР]\}$ відрізняються тангенсом нахилу, але перетинають вісь ординат в одній точці, що свідчить про однакову спорідненість тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів нормозоспермічних чоловіків до субстрату.



а



б

Рисунок 4.8 – Залежність активності тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази (а) і тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази (б) у сперматозоїдах інфертильних чоловіків від концентрації АТР ($M \pm m, n = 4-6$).

Криві залежностей $\{1/V; 1/[АТР]\}$ на рис. 4.10 відрізняються тангенсом нахилу, і перетинають вісь абсцис і вісь ординат в різних точках. Дана залежність активності ензиму від концентрації субстрату відповідає змішаному типу інгібування тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків.

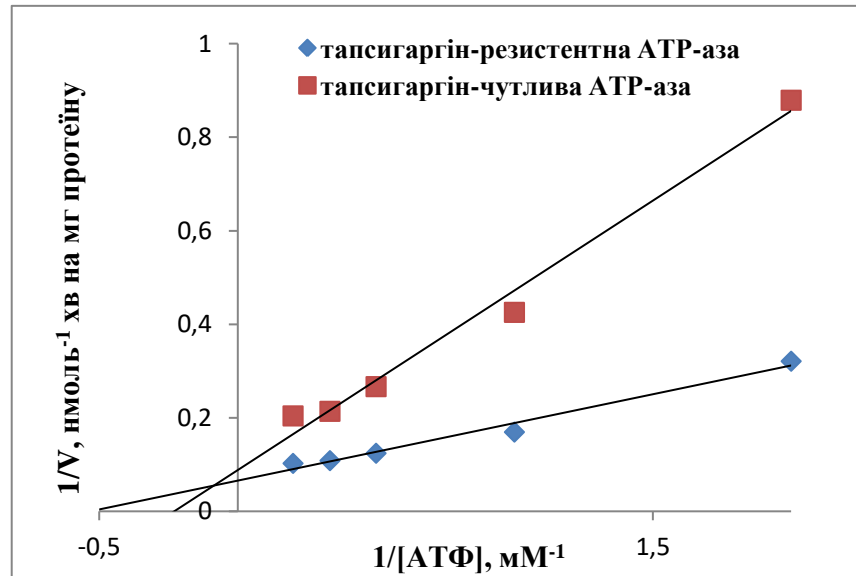


Рисунок 4.9 – Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 4.7, у координатах Лайнуївера-Берка ($n = 4-6$); $r > 0,95$.

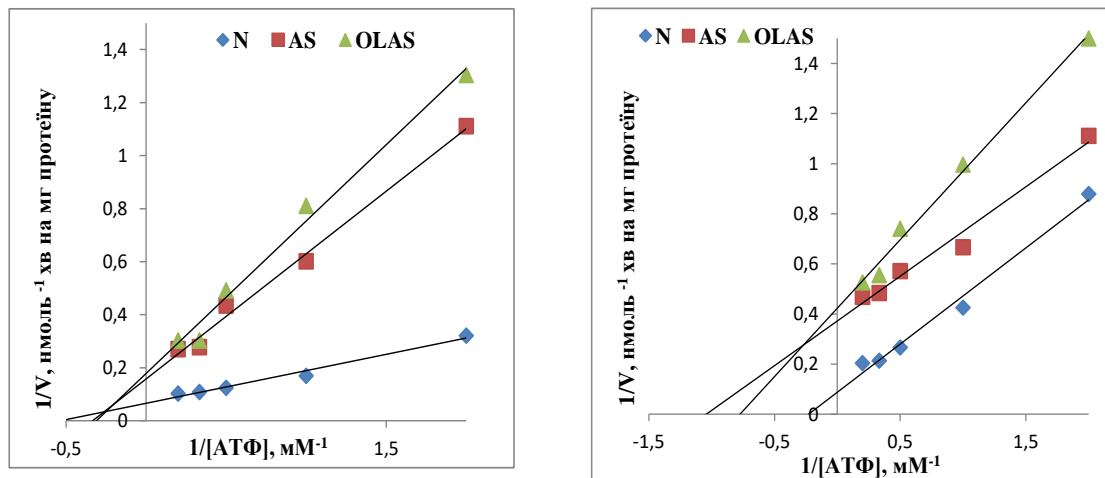


Рисунок 4.10 – Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 4.8, у координатах Лайнуївера-Берка ($n = 4-6$); $r > 0,95$

Як впливає з табл. 4.2, значення V_{\max} гідролізу за участю тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів нормозооспермічних чоловіків дещо перевищує це значення для тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

Водночас, значення $K_{\text{АТР}}$ статистично достовірно відрізняються між собою у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків.

Таблиця 4.2 – Кінетичні параметри Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків, визначені за АТР ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Кінетичні параметри	Досліджувані групи		
	нормозооспермія	патоспермія	
		астенозооспермія	олігоастенозооспермія
Тапсигаргін-резистентна $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза			
V_{max} , нмоль $\text{P}_i/\text{хв}$ на 1 мг протеїну	$13,98 \pm 0,77$	$6,8 \pm 0,65^{***}$	$5,7 \pm 0,58^{***}$
$K_{\text{АТР}}$, мМ	$1,58 \pm 0,16$	$3,7 \pm 0,97$	$3,33 \pm 0,26^{**}$
Тапсигаргін-чутлива $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза			
V_{max} , нмоль $\text{P}_i/\text{хв}$ на 1 мг протеїну	$12,22 \pm 0,78$	$2,72 \pm 0,12^{***}$	$2,37 \pm 0,35^{***}$
$K_{\text{АТР}}$, мМ	$5,16 \pm 1,03$	$1,06 \pm 0,19^{**}$	$1,29 \pm 0,11^{**}$
Примітка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ зміни статистично достовірні стосовно величин в осіб групи контролю			

Розрахунок уявних кінетичних параметрів тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів свідчить, що V_{max} гідролізу АТР (визначена за АТР) статистично достовірно відрізняються у нормі та при патоспермії.

Величини $K_{\text{АТР}}$ для тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів чоловіків із астенозооспермією та олігоастенозооспермією відповідно у 2,3 і 2,1 рази перевищують ці значення для тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів чоловіків із нормозооспермією. Однак, ці зміни є статистично достовірними лише для

тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів чоловіків із олігоастенозооспермією.

Отже, у сперматозоїдах неплідних чоловіків пригнічення активності тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відбувається за змішаним типом – як за рахунок зменшення числа обертів ензиму (V_{\max} знижується), так і за рахунок зниження спорідненості Ca^{2+} -АТР-аз до субстрату ($K_{\text{АТР}}$ зростає).

Для тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів патоспермічних чоловіків величини $K_{\text{АТР}}$ в 4 рази ($p < 0,01$) нижча за це значення у сперматозоїдах фертильних чоловіків. Величини V_{\max} для тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів чоловіків із астенозооспермією та олігоастенозооспермією знижується відповідно в 4,5 і 5,2 рази ($p < 0,001$), що вказує на зменшення числа обертів ензиму.

4.4 Залежність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності у сперматозоїдах інфертильних чоловіків від концентрації йонів Mg^{2+}

Для функціонування $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, крім АТР, необхідними є йони магнію, які утворюють хелатний комплекс $\text{Mg} \cdot \text{АТР}$. У стандартному середовищі інкубації, яке містило MgCl_2 діапазоні концентрацій від 0 до 7 мМ, шляхом визначення питомої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності, розраховували $K_{\text{Mg}^{2+}}$ (за сталої концентрації АТР – 4 мМ та Ca^{2+} – 0,05 мМ).

Як видно з рис. 4.11, крива, яка відображає залежність активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів фертильних чоловіків від вмісту йонів Mg^{2+} в інкубаційному середовищі, має типовий куполоподібний вигляд.

Графіки залежності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності сперматозоїдів інфертильних чоловіків від концентрації Mg^{2+} мають схожий вигляд. Максимальне значення АТР-гідролази активності тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів фертильних

чоловіків спостерігається за наявності 5 мМ MgCl_2 в інкубаційному середовищі.

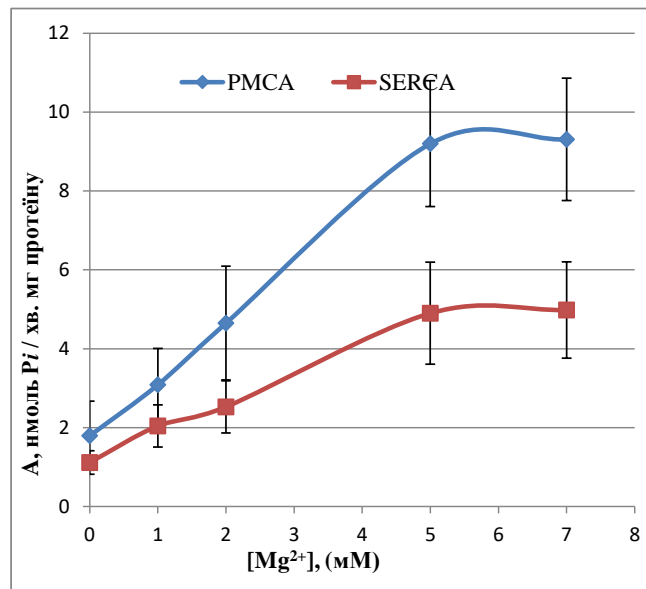


Рисунок 4.11 – Залежність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності сперматозоїдів фертильних чоловіків від концентрації Mg^{2+} ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Подальше підвищення концентрації MgCl_2 призводить до зниження активності тапсигаргін-резистентної та тапсингаргін-чутливої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази.

Графіки залежності активності тапсигаргін-резистентної та тапсингаргін-чутливої компоненти Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів фертильних та чоловіків від концентрації Mg^{2+} в середовищі інкубації лінеаризовано у координатах Лайнуївера-Берка у висхідній частині кривих (від 1 до 5 мМ) (рис. 4.12).

Розрахунок кінетичних характеристик Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів чоловіків свідчить, що $K_{\text{Mg}^{2+}}$ статистично достовірно відрізняються лише для тапсигаргін-чутливої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази у сперматозоїдів нормо- і олігозооспермічних чоловіків. (табл. 4.3).

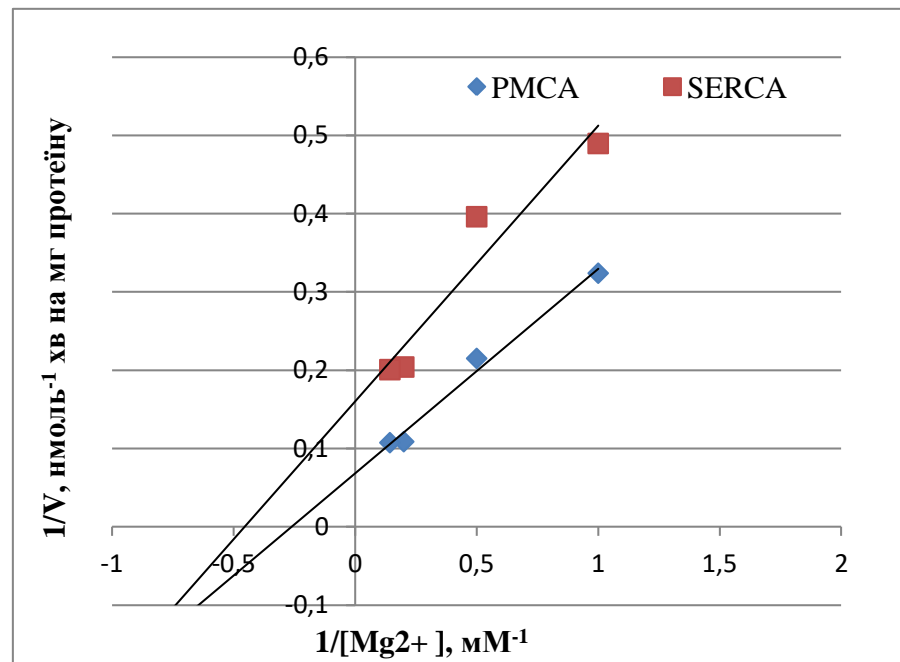


Рисунок 4.12 – Лінеаризація кривих Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази активності сперматозоїдів фертильних чоловіків від концентрації $MgCl_2$ в середовищі інкубації у координатах Лайнуівера-Берка ($n = 4-5$); $r > 0,9$

Значення V_{max} гідролізу за участю тапсигаргін-резистентної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази дещо вище, ніж для тапсигаргін-чутливої Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази, що підтверджує наше припущення, що у нормі транспортування Ca^{2+} за участю тапсигаргін-резистентної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази характеризується дещо вищою буферною ємністю, ніж для тапсигаргін-чутливої Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів фертильних чоловіків.

Так, початкова максимальна активність ензиму, визначена за Mg^{2+} ($V_{Mg^{2+}}$), за участю тапсигаргін-резистентної Ca^{2+}, Mg^{2+} -АТРази в олігоастенозооспермічних зразках в 3,5 раза ($p < 0,05$) нижча щодо величини $V_{Mg^{2+}}$ у нормозооспермічних зразках.

В астенозооспермічних зразках величина $V_{Mg^{2+}}$ в 3,2 раза ($p < 0,05$) нижча за це значення у сперматозоїдах фертильних чоловіків. Отже, на основі цих даних ми припускаємо, що у патоспермічних зразках пригнічення

АТР-гідролісної активності зумовлене зниженням числа обертів ензиму (величина $V_{Mg^{2+}}$ знижується).

Таблиця 4.3 – Кінетичні параметри Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків, від концентрації Mg^{2+} ($M \pm m$, $n = 6-8$)

Кінетичні параметри	Досліджувані групи		
	нормозооспермія	патоспермія	
		астенозооспермія	олігоастенозооспермія
тапсигаргін-резистентна Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза			
V_{max} , нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну	$15,07 \pm 2,8$	$4,65 \pm 1,16^*$	$4,34 \pm 1,17^*$
$K_{Mg^{2+}}$, мМ	$4,26 \pm 1,55$	$1,15 \pm 0,51$	$1,4 \pm 0,27$
тапсигаргін-чутлива Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза			
V_{max} , нмоль P_i /хв на 1 мг протеїну	$6,26 \pm 1,6^{\$}$	$2,37 \pm 0,5$	$2,17 \pm 0,57$
$K_{Mg^{2+}}$, мМ	$2,22 \pm 0,31$	$0,6 \pm 0,37^*$	$0,78 \pm 0,29^*$
Примітка 1. * $p < 0,05$ зміни статистично достовірні стосовно величин в осіб групи контролю.			
Примітка 2. $\$ p < 0,05$ стосовно величин для тапсигаргін-резистентної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази.			

Висновок:

В результаті проведених досліджень встановлено достовірне зниження тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої компоненти Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазної активності сперматозоїдів з астено-, олігоастенозоо- і лейкоцитоспермією стосовно величин у сперматозоїдах фертильних чоловіків.

Встановлено, що у сперматозоїдах патоспермічних чоловіків транспортування йонів Ca^{2+} за участю обох компонент $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відбувається менш інтенсивно і характеризується нижчою ємністю порівняно з сперматозоїдами чоловіків зі збереженою фертильністю.

У сперматозоїдах неплідних чоловіків пригнічення активності тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відбувається за рахунок зменшення числа обертів ензиму так і за рахунок зниження спорідненості Ca^{2+} -АТРаз до субстрату. Для тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів патоспермічних чоловіків пригнічення активності відбувається за рахунок зниження спорідненості Ca^{2+} -АТРаз до субстрату.

Матеріали даного розділу опубліковано у наукових працях автора [19, 82, 91, 143, 144, 146].

РОЗДІЛ 5

ЕФЕКТИ H_2O_2 НА ОСНОВНІ КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаЗ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ФЕРТИЛЬНИХ ТА ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ

5.1 Ефекти H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків

Оскільки відомо, що $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза є однією з мішеней для АФО, сперматозоїди піддавали H_2O_2 -індукованому окисному стресу. Показано дозозалежний інгібувальний ефект H_2O_2 на гідролазну активність тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків з різними формами патоспермій. Було досліджено вплив H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР за участю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

Спостерігалось зростання ензиматичної активності тапсигаргін-чутливої (рис. 5.1) та тапсигаргін-резистентної (рис. 5.2) компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних (астенозооспермія) чоловіків у діапазоні концентрацій АТР від 1 до 5 мМ (за сталої концентрації йонів Mg^{2+} та Ca^{2+}) з виходом на плато.

Для функціонування обох ензимів оптимальна концентрація субстрату при якій його гідролазна активність найвища, становить 5 мМ. За присутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі, у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР знижена активність тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів чоловіків з нормозооспермією та астенозооспермією. Для інших досліджуваних груп інфертильних чоловіків, у присутності інгібітора, характер залежності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності від субстрату був схожий (дані не представлено).

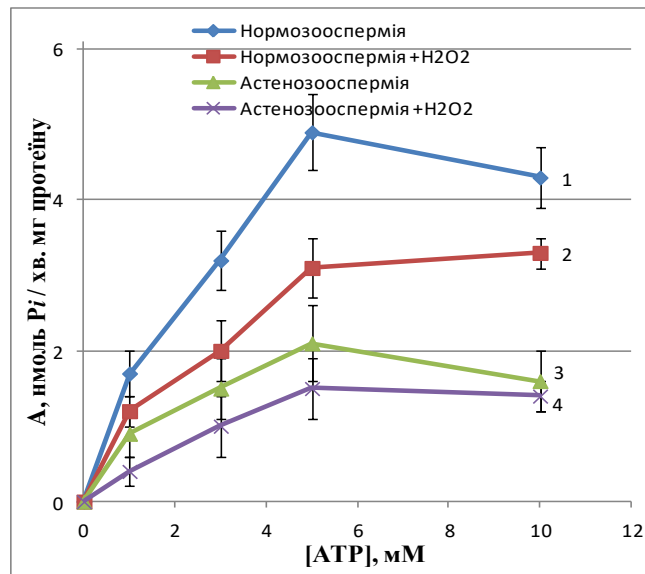


Рисунок 5.1 – Вплив 100 нМ H_2O_2 на активність тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів нормозооспермічних та астенозооспермічних чоловіків за зміни концентрації АТР в середовищі інкубації ($M \pm m, n = 5-7$)

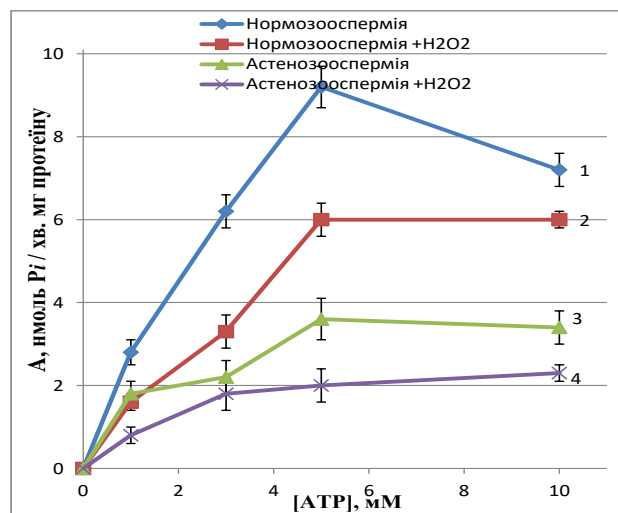


Рисунок 5.2 – Вплив 100 нМ H_2O_2 на активність тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів нормозооспермічних та астенозооспермічних чоловіків за зміни концентрації АТР в середовищі інкубації ($M \pm m, n = 5-7$)

Проведено визначення основних кінетичних параметрів Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР для з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів чоловіків. Шляхом лінеаризації отриманих концентраційних залежностей наведених на рис. 5.1 та рис. 5.2 у координатах Лайнуівера–Берка, визначено максимальну швидкість гідролізу АТР та константу афінності до АТР тапсигаргін-чутливої (рис. 5.3.) та тапсигаргін-резистентної (рис. 5.4) $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

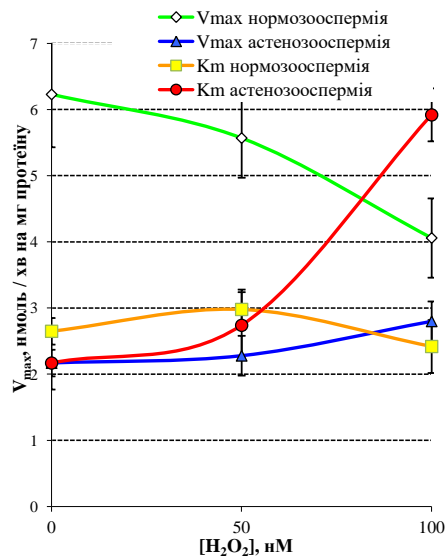


Рисунок 5.3 – Зміни кінетичних параметрів тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної ензиматичної реакції сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних (астензооспермія) чоловіків за дії H_2O_2 ($M \pm m, n = 5-7$)

Лише в сперматозоїдах чоловіків з нормозооспермією за дії H_2O_2 достовірно знижується початкова максимальна швидкість гідролізу АТР тапсигаргін-чутливою $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою. Водночас константа афінності до

АТР в сперматозоїдах чоловіків з астенозооспермією тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази достовірно зростає.

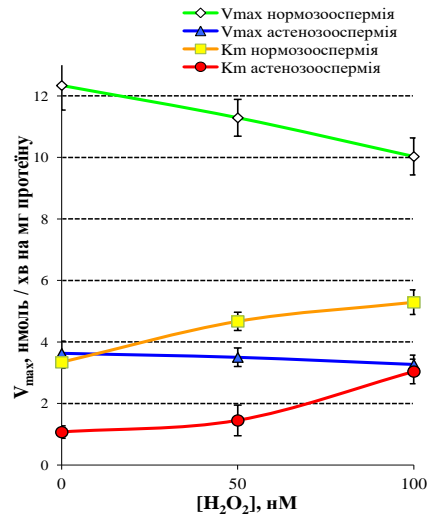


Рисунок 5.4 – Зміни кінетичних параметрів тапсигаргін-нечутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази еніматичної реакції сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних (астенозооспермія) чоловіків за дії H_2O_2 ($M \pm m, n = 5-7$)

Встановлено достовірне зростання величини константи афінності до АТР, що свідчить про зниження афінності еніму до субстрату, під час вивчення впливу H_2O_2 на тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в обох досліджуваних групах чоловіків. Зростання константи афінності до АТР має більш виражений характер у патоспермічних чоловіків.

Також спостерігається тенденція до зниження максимальної швидкості гідролізу АТР тапсигаргін-резистентною $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою сперматозоїдів фертильних чоловіків, проте ці зміни не є достовірними [22, 24].

5.2 Ефекти H_2O_2 на основні кінетичні параметри транспортування Ca^{2+} за участю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків

Оскільки $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза є однією з мішеней для АФК і бере безпосередню участь при окисидативному стресі, сперматозоїди отримані від нормо- та патозооспермічних зразків піддавали окисидативному стресу у вигляді екзогенного H_2O_2 в діапазоні різних концентрацій (25, 50, 100 і 200 мкМ).

Також визначали кількість продукту, що утворився в реакції АТР гідролізу тапсигаргін-чутливою $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою в середовищах з різними концентраціями Ca^{2+} (рис. 5.5).

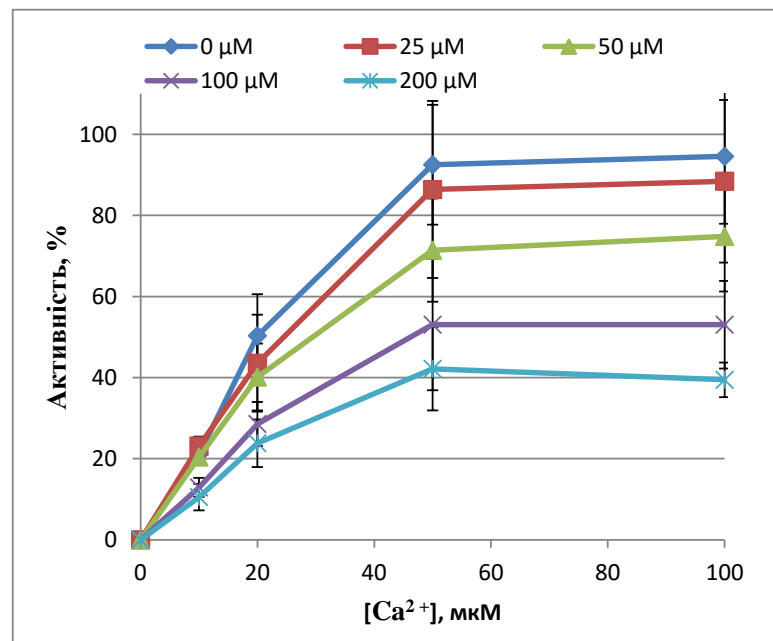


Рисунок 5.5 – Концентраційна залежність впливу H_2O_2 на тапсигаргін-чутливу $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активність сперматозоїдів нормозооспермічних зразків від вмісту йонів Ca^{2+} в середовищі інкубації ($M \pm m, n = 8$)

Примітка. За 100 % прийнято значення ензиматичної активності за відсутності в середовищі інкубації H_2O_2 .

Концентрації H_2O_2 , знаходились в межах 25-200 мкМ, що лише трохи перевищує раніше отриману константу напівінгібування H_2O_2 для тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази ($IC_{50} = 123,8 \pm 22,6$ мкМ).

В діапазоні концентрацій Ca^{2+} від 10 до 50 мкМ в інкубаційному середовищі спостерігалось зростання активності тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів з постійною концентрацією АТР (див. рис. 5.5). Зниження ензиматичної активності спостерігалось у тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в присутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі.

Схожі результати були отримано для тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків. В присутності 50 мкМ Ca^{2+} в інкубаційному середовищі спостерігалась оптимальна активність ензимів як в нормозооспемічних, так і в астенозооспермічних зразках за одночасної наявності чи відсутності H_2O_2 в середовищі інкубації.

З метою з'ясування можливих механізмів зміни тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності при оксидативному стресі, викликаний H_2O_2 , криві концентраційних залежностей були лінеаризовані методом Хайнса-Вульфа (у координатах $\{[S]/V; [S]\}$).

Концентраційні криві відрізняються за тангенсом кута нахилу в присутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі. На рис. 5.6 та рис. 5.7 представлені кінетичні параметри для тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів фертильних і інфертильних чоловіків, а саме максимальна швидкість гідролізу АТР (V_{\max}) і уявна константа активації йонами Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}$).

Максимальна швидкість гідролізу АТР у інфертильних чоловіків різко знизилася, більш ніж у 2,5 рази. Зниження величини V_{\max} у пацієнтів з астенозооспермією було поступовим.

При H_2O_2 -індукованому оксидативному стресі уявна константа активації йонами Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}$) не змінювалася в сперматозоїдах, отриманих як від нормо-, так і від патоспермічних чоловіків. Однак у патоспермічних зразках, за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу, уявна константа

активації йонами Ca^{2+} мала тенденцію до зниження, проте ці зміни не були статистично достовірними (рис. 5.7).

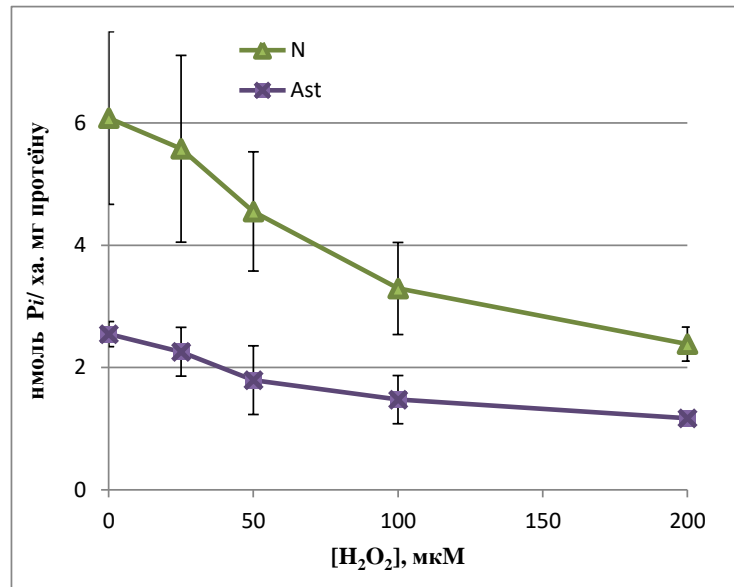


Рисунок 5.6 – Вплив H_2O_2 на максимальну швидкість гідролізу АТР тапсигаргін-чутливою Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою сперматозоїдів нормо- і астенозооспермічних чоловіків ($M \pm m$, $n = 8$)

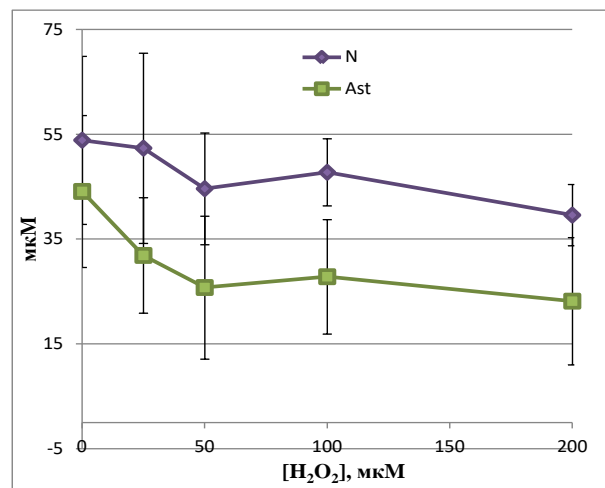


Рисунок 5.7 – Вплив H_2O_2 на уявну константу активації йонами Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}$) тапсигаргін-чутливої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів нормо- і астенозооспермічних чоловіків ($M \pm m$, $n = 8$)

Всі ці результати вказують на те, що як у нормо-, так і в патозооспермічних зразках H_2O_2 реалізує свою інгібуючу дію через механізм неконкурентного гальмування активності тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази (V_{max} зменшується без зміни спорідненості до Ca^{2+}).

Аналогічно вивчали ефекти H_2O_2 на основні кінетичні параметри транспортування Ca^{2+} за участю тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів ($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани). Концентрації H_2O_2 , знаходились в межах 25-200 мкМ, що дещо перевищує раніше отриману константу напівінгібування H_2O_2 для тапсигаргін-нечутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази ($IC_{50} = 191,7 \pm 21,9$ мкМ).

В діапазоні концентрацій Ca^{2+} від 10 до 50 мкМ в інкубаційному середовищі спостерігалось монотонне зростання активності тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів із постійною концентрацією АТР (рис. 5.8).

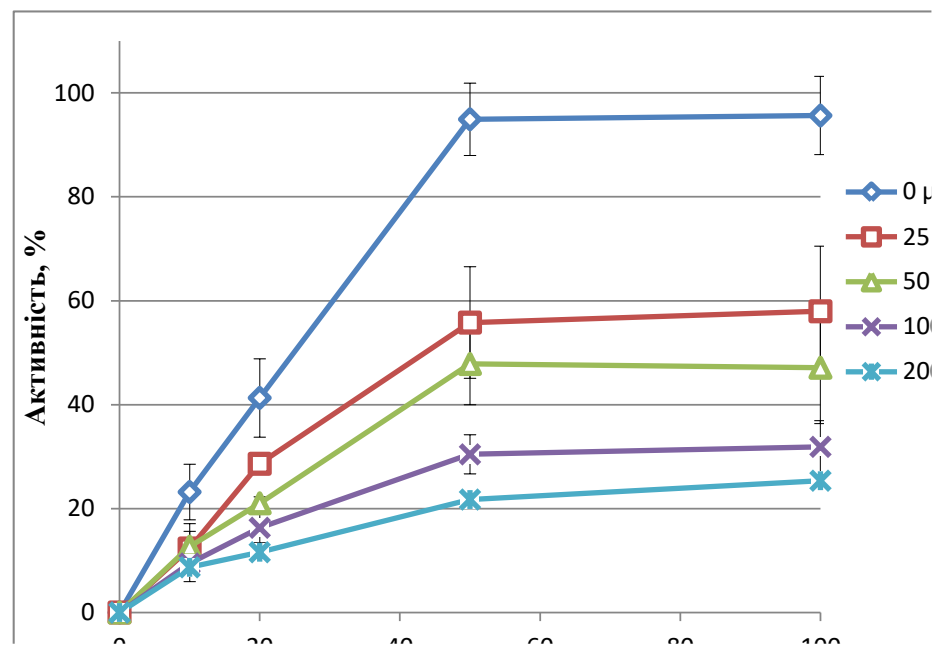


Рисунок 5.8 – Концентраційна залежність впливу H_2O_2 на $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у активності плазматичної мембрани сперматозоїдів нормозооспермічних зразків від вмісту іонів Ca^{2+} в середовищі інкубації ($M \pm m, n = 8$)

Примітка. За 100 % прийнято значення ензиматичної активності за відсутності в середовищі інкубації H_2O_2 .

Спостерігалось зниження ензиматичної активності у тапсигаргін-нечутливої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази в присутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі. Схожі результати були отримано для тапсигаргін-резистентної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів інфертильних чоловіків (астенозооспермія) (рис 5.9).

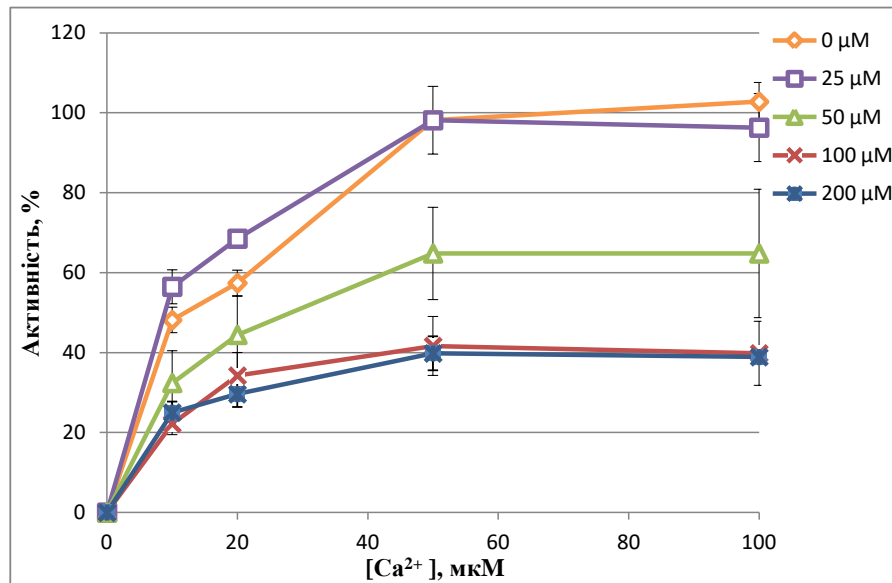


Рисунок 5.9 – Концентраційна залежність впливу H_2O_2 на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазну активність плазматичної мембрани сперматозоїдів астеносооспермічних зразків від вмісту йонів Ca^{2+} в середовищі інкубації ($M \pm m$, $n = 8$)

Примітка. За 100 % прийнято значення ензиматичної активності за відсутності в середовищі інкубації H_2O_2 .

В присутності 50 мкМ Ca^{2+} в інкубаційному середовищі спостерігалася оптимальна активність ферментів як в нормозооспермічних, так і в астеносооспермічних зразках за одночасної наявності чи відсутності H_2O_2 в середовищі інкубації.

У сперматозоїдах неплідних чоловіків чутливість до інгібуючої дії H_2O_2 була нижчою, ніж у нормозооспермічних зразках. Зокрема, у нормозооспермічних зразках ефект 25 мкМ H_2O_2 був більш виражений, ніж у

астенозооспермічних зразках (за 50 мкМ Ca^{2+} – 55 % проти 98 % стосовно активності за відсутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі відповідно).

З метою з'ясування можливих механізмів зміни активності тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазної активності під дією H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу, криві концентраційних залежностей були лінеаризовані методом Хайнса-Вульфа (у координатах $\{[S]/V; [S]\}$). Концентраційні криві відрізняються за тангенсом кута нахилу в присутності H_2O_2 в інкубаційному середовищі.

На рис. 5.10 та рис. 5.11 представлені кінетичні параметри для тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів фертильних і інфертильних чоловіків, а саме максимальна швидкість гідролізу АТР (V_{\max}) і уявна константа активації йонами Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}$).

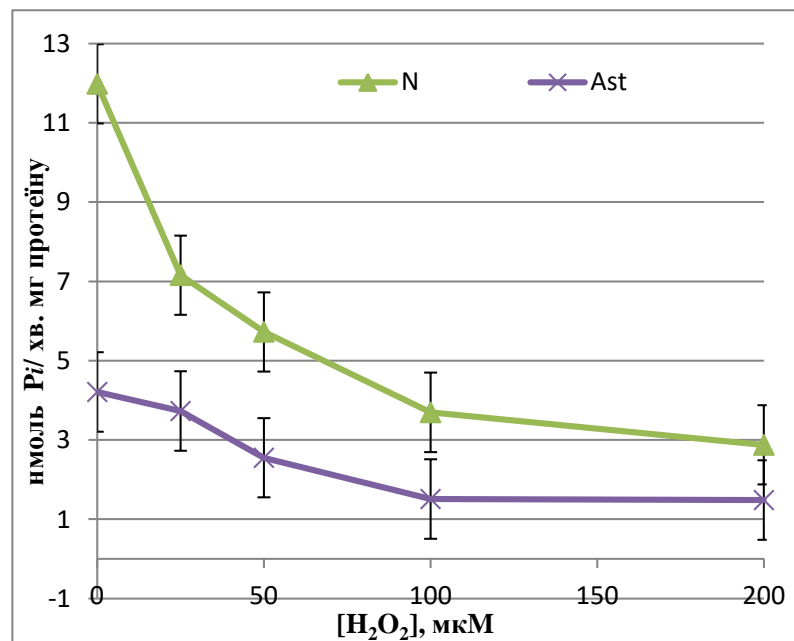


Рисунок 5.10 – Вплив H_2O_2 на максимальну швидкість гідролізу АТР (V_{\max}) тапсигаргін-резистентною $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою сперматозоїдів нормо- і астеноспермічних чоловіків ($M \pm m, n = 8$)

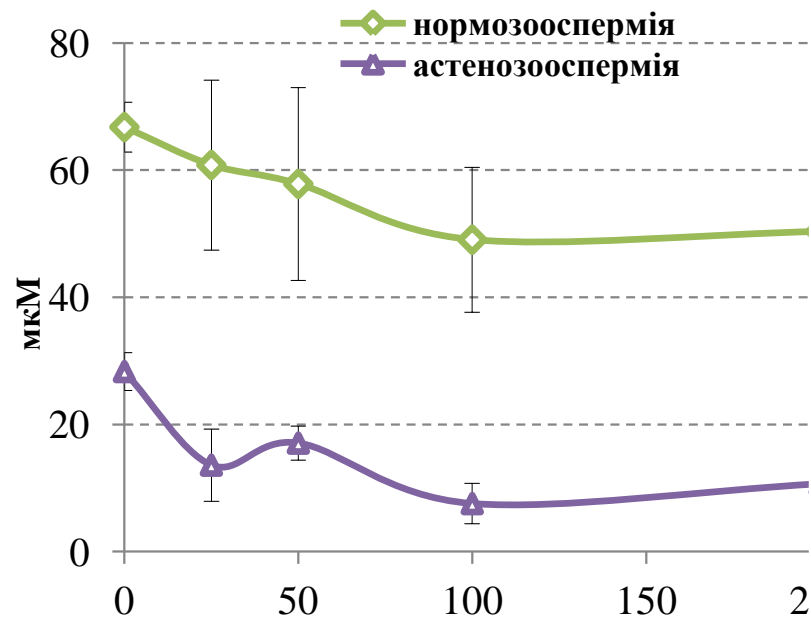


Рисунок 5.11 – Вплив H_2O_2 на уявну константу активації йонами Ca^{2+} ($K_{\text{Ca}^{2+}}$) тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів нормо- і астенозооспермічних чоловіків ($M \pm m, n = 8$)

Максимальна швидкість гідролізу АТР у фертильних чоловіків різко знизилася. Зниження величини V_{max} у пацієнтів з астенозооспермією було поступовим. Отримані уявні константи афінності до йонів Ca^{2+} знаходилися в субмікромолярному діапазоні, що відповідає загальноприйнятій концепції про високоафінні ($K_{\text{Ca}^{2+}} = 0,5$ мкМ або менше) та низькоафінні ($K_{\text{Ca}^{2+}} > 10$ мкМ) центри зв'язування для йонів Ca^{2+} .

Значення $K_{\text{Ca}^{2+}}$ у сперматозоїдах чоловіків із доведеною фертильністю за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу не змінювались, тоді як у астенозооспермічних зразків, $K_{\text{Ca}^{2+}}$ зменшується майже вдвічі під дією оксидативного стресу, викликаного H_2O_2 .

Ці результати показують, що в нормозооспермічних зразках H_2O_2 реалізує свою інгібувальну дію через механізм неконкурентного інгібування активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази плазматичної мембрани. Відповідно до

формальних особливостей кінетики в астенозооспермічних зразках відбувається змішаний тип інгібування ензимів. [88, 89].

Висновок:

Встановлено, що у чоловіків із патозооспермією знижена активність тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у порівнянні із фертильними чоловіками. H_2O_2 дозозалежно пригнічував активність тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків.

За умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу пригнічення активності тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в нормозоо- і патоспермічних зразках пов'язано зі зниженням максимальної швидкості АТР гідролазної реакції, без зміни спорідненості ензиму до Ca^{2+} .

Пригнічення активності тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у пацієнтів з астенозооспермією пов'язано як зі зниженням максимальної швидкості гідролізу АТР, так і зі збільшенням спорідненості ензиму до йонів Ca^{2+} .

У сперматозоїдах неплідних чоловіків пригнічення активності тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відбувається за рахунок зменшення числа обертів ензиму так і за рахунок зниження спорідненості Ca^{2+} -АТРаз до субстрату. Для тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів патоспермічних чоловіків пригнічення активності відбувається за рахунок зниження спорідненості Ca^{2+} -АТРаз до субстрату.

Матеріали даного розділу опубліковано у наукових працях автора [22, 24, 88, 89].

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

В останні роки простежується стійка тенденція: кількість неплідних чоловіків збільшується [162]. Дані про структуру непліддя у чоловіків досить суперечливі. За різними даними, основними причинами чоловічого непліддя є: ендокринна патологія, варикоцеле, генетичні фактори, генітальна інфекція, обструктивна азооспермія, ідіопатична оліго-, астено-, тератозооспермія [18, 29]. Аномальні характеристики сперматозоїдів, такі як астенозооспермія, олігоастенозооспермія є найпоширенішою причиною чоловічого непліддя [199, 200]. Дослідження функціонування сперматозоїдів, які відіграють вирішальну роль у репродуктивній функції, має вирішальне значення.

Оскільки Na^+, K^+ -АТРаза та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза відіграє важливу роль у фізіології сперматозоїдів, це дослідження було розроблене для аналізу Na^+, K^+ -АТРази і $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в сперматозоїдах неплідних чоловіків з різними формами патоспермії. Більшість функціональних досліджень Na^+, K^+ -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази було проведено на сперматозоїдах щурів, мишей та биків; та існує мало експериментальних даних функціонування АТРази в сперматозоїдах людини та їх патологічні зміни.

Активність багатьох інших біохімічних процесів залежить від активності Na^+, K^+ -АТРази. Зокрема, Na^+, K^+ -АТРаза передає сигнали від плазматичної мембрани до ядра клітини за допомогою білок-білкової взаємодії із сенсорними білками [56, 198]. Na^+, K^+ -АТРаза присутня у чоловічих статевих клітинах і диференційованих сперматозоїдах [191]. Дві ізоформи каталітичної субодиниці Na^+, K^+ -АТРази, $\alpha 1$ та $\alpha 4$, які співіснують у сперматозоїдах мають різні біохімічні властивості. Сперматозоїди з нокаутних мишей, за геном $\alpha 4$, не змогли запліднювати яйцеклітини *in vitro*, що вказує на важливу роль Na^+, K^+ -АТРази для фертильності сперматозоїдів

[171]. Транспорт Na^+ та K^+ , каталізований Na^+, K^+ -АТРазою $\alpha 4$, крім того, що сприяє підтримці мембранного потенціалу спокою сперматозоїдів, опосередковано бере участь у підтримці рН та внутрішньоклітинного рівня кальцію [108].

Загальна активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази складається з тапсигаргін-резистентної плазматичної мембрана (PMCA) та тапсигаргін-чутливої АТРази Ca^{2+} -депо. Дві ізоформи PMCA, PMCA1 та PMCA4, експресуються у сперматозоїдах. PMCA4 – найпоширеніша ізоформа сперматозоїдів, локалізована у фрагменті жгутика [154].

Наявність тапсигаргін-чутливого Ca^{2+} депо у сперматозоїдах людини, було показано раніше [195]. Основний претендент на внутрішньоклітинне депо Ca^{2+} у сперматозоїдах – це акросома, оскільки сперматозоїди людини не містять ендоплазматичної сітки [102]. Це дослідження представляє особливий інтерес, оскільки $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза є основним кальцієвий насос у сперматозоїдах, а гомозиготна делеція PMCA4 призводить до чоловічого безпліддя та підвищеного рівня Ca^{2+} .

У результаті проведених досліджень виявлено, що активність Na^+, K^+ -АТРази у сперматозоїдах неплідних чоловіків значно знизилася порівняно з контрольною групою.

Іншими ж дослідженнями отримано схожі значне зниження Na^+, K^+ -АТРази в сперматозоїдах чоловіків з олігоастенозооспермією у порівнянні із здоровими донорами [121]. Динеїн-АТРаза (Mg^{2+} -залежна, Li^+ -чутлива, і нечутливий до 2 мМ убаїну, 1 мкМ олігоміцину та 1 мкМ тапсигаргину) – ензим, який функціонує як внутрішньоклітинний двигун, що сприяє рухливості сперматозоїдів. Було показано, що активність динеїн-АТРази була значно нижчою для астенозооспермічних чоловіків порівняно з нормозооспермічними чоловіками [189].

У цьому дослідженні ми також охарактеризували активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в сперматозоїдах. Результати показали, що активність тапсигаргін-

чутливої та тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів була статистично вірогідно нижчою у пацієнтів із астено-, олігоастенозооспермією та лейкоцитоспермією порівняно із цими величинами у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків. Проте більш виражений характер інгібування було виявлено у тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів неплідних чоловіків з астено-, олігоастенозооспермією та лейкоцитоспермією стосовно контрольних величин.

Знижена активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, ймовірно, сприяє порушенню Ca^{2+} гомеостазу, що є ознакою аномальних сперматозоїдів [101]. Значне зменшення рухливості сперматозоїдів супроводжувалася підвищеним рівнем цитозольного Ca^{2+} і перевантаження Ca^{2+} у мітохондріях мишей, де активність РМСА4 як відомо, значно зменшується [41].

У самців мишей з цілеспрямованою генною делецією ізоформи 4 плазматичної мембрани кальцій/кальмодулін-залежної кальцієвої АТРази (значна кількість зосереджена в хвостовій ділянці сперматозоїда) були неплідними, через сильно порушену рухливість сперматозоїдів [174].

Генетична делеція РМСА4 призвело до 100% непліддя, особливо у самців-мутантів-мишей, завдяки селективному дефекту рухливості сперми, але не впливала на нормальні характеристики спарювання у цих мишей [58]. Kumosani T.A. та ін. не показали різниці активності Ca^{2+} -АТРази в плазматичній мембрані сперматозоїдів, між фертильними та безплідними чоловіками – некурцями, але виявили значно нижчу активність Ca^{2+} -АТРази плазматичної мембрани у фертильних курців, ніж у фертильних некурящих чоловіків [86, 125].

Зниження рухливості сперматозоїдів може бути пов'язане зі зменшенням внутрішньоклітинного аденозинтрифосфату та пошкодженням мембран сперматозоїдів, спричинені продуктами перекисного окислення

ліпідів [76]. Концентрація внутрішньоклітинного АТР у сперматозоїдах субфертильних півнів була меншою, ніж у контрольних особин [140]. Вважається, що зменшення активності Na^+, K^+ -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази може пошкодити функцію сперматозоїдів і може бути однією з можливих причин чоловічого непліддя [86].

Іонообмінні АТРази можуть стати мішенню для пероксинітриду ONOO^- як повідомляє Косак-Токер та ін. [121], який описав зниження активності Na^+, K^+ -АТРази. Встановлено негативно сильну кореляцію між Na^+, K^+ -АТРазою та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою та концентрацією ONOO^- [187]. Показано, що ONOO^- відіграє центральну роль в дисбалансі іонів і нестабільністю мембран при окисненні SH груп ензиму [151].

Іншими ж дослідженнями показано [190], що індукцибельна активність NO-синтази була підвищена в сперматозоїдах неплідних чоловіків. Це свідчить про відсутність гіперпродукції та утворення цитотоксичного ONOO^- який пригнічує активність іонообмінних АТРази насосів. Кореляційний зв'язок підтверджений між $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазою та NO-синтазою в клітинах сперми [156]. В РМСА4 сперматозоїдів, активність NO-синтази була підвищена вдвічі у неконденсованих сперматозоїдів, що супроводжувалося дворазовим збільшенням рівня ONOO^- та суттєвим збільшенням кількості апоптотичних статевих клітин.

У нашому дослідженні спостерігались найбільш виражені зміни активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у хворих на лейкоцитоспермію. Дослідниками виявлена позитивна кореляція між лейкоцитоспермією і дефектами хвоста сперми, акросомними пошкодженнями та високим індексом деформації сперми. Ці спостереження дозволяють припустити, що лейкоцитоспермія пов'язана з порушенням структури цілісності спермальних клітин [42]. Відомо, що лейкоцитоспермія може свідчити про інфекцію або запалення в репродуктивній системі чоловіків. Лейкоцити негативно впливають на сперматозоїди, стимулюють утворення активних форм кисню, індукцію та

розвиток окисного стресу, таким чином, пригнічуючи рухливість сперматозоїдів [110].

Для з'ясування можливих механізмів, які зумовлюють порушення функціональної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази за умов патоспермії, за оцінкою змін гідролазної активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази досліджено кінетику первинно-активного транспортування йонів кальцію крізь плазматичну мембрану і мембрани внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо у сапонін-пермеабілізованих сперматозоїдах інфертильних чоловіків.

Нами встановлено, що у сперматозоїдах нормозооспермічних чоловіків транспортування йонів Ca^{2+} тапсигаргін-резистентною АТРазою характеризується вищою ємністю, ніж крізь мембрани внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо, за допомогою тапсигаргін-чутливої АТРази. Ці результати суперечать з даними, які отримані на лімфоцитах та клітинах піднижньощелепної слинної залози [83, 184].

Наші результати можуть бути пояснені структурною організацією сперматозоїдів. Так як цитоплазма сперматозоїдів має обмежений об'єм, а сперматозоїди мають сильно поляризовану морфологію, вони мають унікальні механізми для підтримки Ca^{2+} -гомеостазу [148]. Стандартні компоненти Ca^{2+} -сигналізації для соматичних клітин присутні в сперматозоїдах у дещо модифікованій формі [161].

Основним кандидатом для внутрішньоклітинних Ca^{2+} -депо у сперматозоїдах є акросома, оскільки сперматозоїди чоловіків не містять ендоплазматичного ретикулуму [102]. Наявність тапсигаргін-чутливої Ca^{2+} -АТРази SERCA2, яка була продемонстрована у сперматозоїдів ссавців, головним чином локалізована в акросомі та середній частині сперматозоїда [66, 127].

Важливим етапом фундаментальних біохімічних досліджень є пошук нових ефекторів (інгібіторів чи активаторів) ферментативних систем. Калікс

[4]арени привертали все більше уваги в останні роки. Калікса[4]аренові матриці мають низький рівень токсичності, достатню конформаційну мобільність в рішеннях, які забезпечують велику перевагу для застосування їх в біомедичних дослідженнях як ензимних ефекторів, імітаторів рецепторів, органічних полімерних стабілізаторів, платформ мікрочипів ДНК тощо [67, 153, 167].

Очевидно, що пошук ефективного інгібітора та активатора Na^+, K^+ -АТРази важливий як з фундаментальної, так і з практичної точки зору. У попередніх дослідженнях показано, що калікс[4]арен С-107 (5,17-діаміно (2-піридил) метилфосфоно-11,23-ді-трети-бутил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропокси калікс-[4]арен) у концентрації 100 мкМ пригнічує активність Na^+, K^+ -АТРази у сперматозоїдах чоловіків майже повністю (ефективніше, ніж уабайн: $I_{0.5}$ для калікс[4]арену С-107 – $(32,6 \pm 2,9)$ нМ), не впливаючи на активність базальної Mg^{2+} -АТРази [8].

Досліджено ефекти калікс[4]арену С-107 на кінетичні характеристики Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів у нормозооспермічних та патоспермічних чоловіків. Пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів нормозооспермічних чоловіків, калікс[4]ареном С-107, відбувається внаслідок зниження максимальної швидкості АТР-гідролазної реакції [142].

Для оліго- і астенозооспермічних зразків спостерігається зниження коефіцієнта Хілла n_H , що вказує на інгібування калікс[4]ареном С-107 АТР-азної реакції. При високих концентраціях калікс[4]арену С-107 коефіцієнт (напів)активації MgCl_2 Na^+, K^+ -АТРази в сперматозоїдах нормоспермічних чоловіків знижується. Всупереч цьому при високих концентраціях калікс[4]арену С-107 (100 нМ) K_{MgCl_2} в олігозооспермічних чоловіків зростає. При збільшенні концентрації калікс[4]арену С-107, відбувається зростання K_{MgCl_2} для Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів астенозооспермічних чоловіків. При

цьому величина коефіцієнта кооперативності Хілла n_H активуючої дії $MgCl_2$ знижується у присутності калікс[4]арену C-107.

Оксидативний стрес відіграє значну роль в етіології чоловічого безпліддя [32]. Він є результатом порушення гомеостатичного балансу між продукцією АФК та антиоксидантною здатністю в сперматозоїдах людини [180].

АФК продукуються головним чином лейкоцитами або аномальними та незрілими сперматозоїдами і є природним побічним продуктом окисних метаболічних шляхів, а також цитозольних та оксидаз плазматичної мембрани. АФК також є природним побічним продуктом при утворенні аденозинтрифосфату в мітохондріях сперматозоїдів. Невеликі кількості АФК необхідні для забезпечення нормальних клітинних фізіологічних функцій, включаючи сперматогенез та різні функції сперматозоїдів, що передують заплідненню, такі як капацитація та акросомна реакція [32]. Гіперпродукція активних форм кисню може пошкодити сперматозоїди і вважається одним із механізмів розвитку непліддя [137].

Оксидативний стрес є результатом не тільки надмірного утворення АФК, але й низької антиоксидантної здатності [180]. АФК постійно виробляються в більшості клітин та їх рівні регулюються низкою ензиматичних та неензиматичних антиоксидантів [99]. АФК може модифікувати різні біомолекули, включаючи поліненасичені жирні кислоти мембран сперматозоїдів, що призводить до перекисного окислення ліпідів і порушення мембранних білків.

Залежно від використовуваної методології аналізу, недавня література свідчить, що від 30% до 80% неплідних чоловіків мають підвищений рівень АФК, що потенційно піддається лікуванню [32].

Na^+, K^+ -АТРаза чутлива до дії АФК. Відомо, що збільшення супероксид-аніону, перекис водню та активних форм азоту, які в основному

генеруються мітохондріями, НАДФН-оксидазою, ксантинооксидазою, можуть модифікувати α - і β -субодиниці Na^+, K^+ -АТРази та інгібувати ензиматичну активність ферменту [131, 157]. Встановлено, що екзогенне додавання H_2O_2 , підвищує внутрішньоклітинний рівень АФК у сперматозоїдах [136].

H_2O_2 , один з найбільш токсичних форм АФК, має здатність дозозалежно пригнічувати активність Na^+, K^+ -АТРази. Отримані нами дані вказують на те, що пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази у сперматозоїдах безплідних чоловіків із різними формами патоспермії відбувалося під впливом H_2O_2 (50-500 мкМ). Сильне пригнічення гідролітичної активності спостерігалось при вищих концентрацій H_2O_2 . Час інкубації з 100 мкМ H_2O_2 показав різке зменшення активності ензиму протягом перших 5 хв інкубації як для нормозооспермічних, так і для патозооспермічних чоловіків. Ензиматична активність Na^+, K^+ -АТРази в сперматозоїдах була повністю пригнічена через 20 хв для астенозооспермічних чоловіків і через 30 хв для нормозооспермічних чоловіків.

Константи напівінгібування для пацієнтів з астенозооспермією була у два рази менше ніж для здорових чоловіків із збереженою фертильністю. Для інших досліджених груп відмінності у величині IC_{50} не були статистично достовірними. Ці спостереження дозволяють припустити, що Na^+, K^+ -АТРаза у патозооспермічних зразках є більш сприйнятлива до H_2O_2 -індукованого пошкодження. Коефіцієнт Хілла був значно вищий лише для пацієнтів із астенозооспермією, що вказує на зростання позитивно кооперативного зв'язування між Na^+, K^+ -АТРазою та H_2O_2 .

Загалом, наші результати узгоджуються з кількома іншими дослідженнями. H_2O_2 , один з найбільш токсичних видів кисню, має здатність дозозалежно пригнічувати активність Na^+, K^+ -АТРази. Liu та ін. показали, що АФК діяв як уабайн і стимулював ендоцитоз Na^+, K^+ -АТРази, що призвело до

значного інгібування активності Na^+, K^+ -АТРази [132]. Однак суперечливі дані були отримані в інших дослідженнях. У деяких попередніх дослідженнях було показано, що H_2O_2 підвищує активність Na^+, K^+ -помпи ендотеліальних клітин легеневих артерій великої рогатої худоби (Meharg et al., 1993). Різке збільшення активності Na^+, K^+ -АТРази спостерігалось в *Leishmania amazonensis* у відповідь на низькі концентрації H_2O_2 (0,1 мкМ) [166].

Na^+, K^+ -АТРаза може служити молекулярною мішенню для АФК та сигналізувати через Na^+, K^+ -АТРазу. АФК може генерувати інші месенджери такі як внутрішньоклітинні іони Ca^{2+} . Було показано, що АФК індукує зміни у внутрішньоклітинному Ca^{2+} які корелюють із ефектами на Na^+, K^+ -АТРазну активність. Крім того, убаїн та АФК мали адитивний ефект на внутрішньоклітинний Ca^{2+} , що передбачає загальну мішень для обох стимулів [133].

Встановлено, що Na^+, K^+ -АТРаза є чутлива до окисно-відновного та кисневого стану клітини [52]. Na^+, K^+ -АТРаза вразлива до окислювально-відновних процесів з «оптимальним діапазоном окисно-відновних потенціалів», де АФК веде до виходу за межі цього «оптимального діапазону» інгібуючи активність Na^+, K^+ -АТРази [157].

Інгібування активності Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів можна пояснити безпосереднім впливом екзогенного H_2O_2 , але також результатом генерування АФК та активних видів азоту (АФА). Було показано, що мітохондрії, як головне місце генерації АФК, можуть суттєво сприяти оксидативному стресу в дефектних сперматозоїдах [122].

Цей непрямий ефект H_2O_2 пов'язаний з пошкодженням сперматозоїдів, зокрема порушення мітохондрій, що змушує їх утворювати високий рівень вільних електронів. У свою чергу, пошкоджені мітохондрії сприяють генерації високих концентрацій АФК та АФА. Результати підтверджують наше припущення що екзогенний H_2O_2 повинен негативно

впливати на параметри рухливості сперматозоїдів і відповідають результатам інших досліджень. Надмірний рівень АФК був пов'язаний з перекисним окисненням ліпідів плазматичної мембрани сперматозоїдів, що призводить до втрати мембранної плинності, структури та функцій [136].

У зв'язку з інгібуючим ефектом H_2O_2 було досліджено вплив цього ефектора на основні кінетичні параметри гідролізу АТР за участю Na^+, K^+ -АТРози. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР активність Na^+, K^+ -АТРози сперматозоїдів плідних та неплодних чоловіків знижена за присутності H_2O_2 в середовищі інкубації. Проте, оптимальна активність Na^+, K^+ -АТРози сперматозоїдів чоловіків з нормо- та астенозооспермією спостерігається за наявності 5 мМ АТР в інкубаційному середовищі.

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуівера-Берка визначено основні кінетичні параметри Na^+, K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків. За дії H_2O_2 константа спорідненості Na^+, K^+ -АТРози до АТР в сперматозоїдах чоловіків з нормо- і астенозооспермією зростає в декілька разів. Початкова максимальна швидкість гідролізу АТР суттєво знижується лише в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозооспермією.

Вивчали вплив H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР за участю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРози сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних чоловіків (астенозооспермія).

У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР тапсигаргін-чутлива $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза та тапсигаргін-резистентна $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза активність сперматозоїдів у фертильних та інфертильних чоловіків знизилася за наявності H_2O_2 в інкубаційному середовищі. Оптимальна активність $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРози сперматозоїдів в нормозооспермічних та

астенозооспермічних чоловіків спостерігались з додованням 5 мМ АТР в інкубаційному середовищі.

Під впливом H_2O_2 початкова максимальна швидкість гідролізу АТР тапсигаргін-чутлива $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза суттєво знижується лише у сперматозоїдах чоловіків із нормозооспермією. У той же час константа спорідненості тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази до АТР значно збільшується у сперматозоїдів чоловіків з астенозооспермією. Значне збільшення константи спорідненості тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази до АТР виявлено як у нормозооспермічних, так і у астенозооспермічних чоловіків. Більше того, у патоспермічних чоловіків збільшення константи спорідненості до АТР більш виражене, ніж у нормозооспермічних чоловіків.

Водночас спостерігається тенденція до зниження максимальної швидкості гідролізу АТР тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази сперматозоїдів фертильних чоловіків, але ці зміни не є статистично достовірними. В умовах оксидативного стресу, викликаного H_2O_2 , інгібування активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в сперматозоїдах астенозооспермічних чоловіків відбувається через зменшення спорідненості ферменту до субстрату.

У сперматозоїдів нормозооспермічних чоловіків пригнічення активності тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази зумовлене зменшенням максимальної швидкості реакції та інгібування тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, відбувається за рахунок зменшення спорідненості до субстрату.

Негативний вплив оксидативного стресу може реалізовуватися через порушення функціонування мембранозв'язаних ензимів, зокрема, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, яка відіграє провідну роль у підтриманні кальцієвого гомеостазу в сперматозоїдах. Досліджено кінетику інгібувальної дії гідроген пероксиду на активність транспортувальної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРаза плазматичної мембрани

сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних чоловіків (астенозооспермія).

Оскільки Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза є однією з мішеней для активних форм кисню і прямо задіяна в розвитку оксидативного стресу, сперматозоїди, отримані від чоловіків з нормо- й астенозооспермією, інкубували за наявності H_2O_2 (25–200 μM) і визначали гідроліз АТР тапсигаргін-резистентною Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазою в інкубаційному середовищі за різних концентрацій Ca^{2+} . Продемонстровано ефективний інгібувальний вплив H_2O_2 на активність тапсигаргін-резистентної компоненти Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази сперматозоїдів. Методом лінеаризації отриманих концентраційних залежностей у координатах Хейнса $\{[S]/V; [S]\}$ розраховано основні кінетичні параметри Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР у сперматозоїдах із нормо- й астенозооспермічних еякулятів.

За умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу уявна константа активації $K_{\text{Ca}^{2+}}$ у сперматозоїдах фертильних чоловіків не змінюється, а у сперматозоїдах чоловіків із астенозооспермією знижується удвічі. Це свідчить про неконкурентний механізм інгібування H_2O_2 Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани сперматозоїдів чоловіків із нормозооспермією. За формальними ознаками у сперматозоїдах чоловіків із астенозооспермією пригнічення тапсигаргін-резистентної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази активності за умов H_2O_2 -індуваного оксидативного стресу відбувається за змішаним типом.

Активність ензиму тапсигаргін-чутливої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази знижувалася за наявності H_2O_2 в інкубаційному середовищі. З метою з'ясування можливих механізмів зміни активності тапсигаргін-чутливої Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази при оксидативному стресі, викликаному H_2O_2 , криві концентраційних залежностей були лінеаризовані методом Хайнса-Вульфа $\{[S]/V; [S]\}$. Максимальна швидкість гідролізу АТР у нормозооспермічних

зразках різко зменшились (більш ніж у 2,5 рази). У пацієнтів з астенозооспермією зменшення V_{max} було не різким, а поступовим. Уявна константа активації $Ca^{2+}(K_{Ca^{2+}})$ не змінилася при індукованому H_2O_2 окисидативному стресі в сперматозоїдах, отриманих у нормо-, так патозооспермічних зразках. Всі ці результати свідчать про те, що H_2O_2 реалізує свою інгібуючу дію за допомогою механізму неконкурентного інгібування активності тапсигаргін-чутливої Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази (V_{max} зменшується без помітних змін $K_{Ca^{2+}}$) і в нормо-, і в патозооспермічних зразках.

H_2O_2 -індукований оксидативний стрес призводить до зниження активності тапсигаргін-чутливої Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази, що призводить до зменшення Ca^{2+} виходу з депо і зниженої здатності протидіяти потенційно шкідливим екситотоксичним навантаженням Ca^{2+} [120]. Потрібні подальші дослідження для з'ясування основних механізмів розвитку інгібування тапсигаргін-чутливої Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази та визначити, чи виявлені зміни його активності та кінетичних властивостей є причиною, або наслідок дисфункції сперматозоїдів. Стратегії захисту від втрат активності Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази може бути корисною для запобігання шкідливих каскадів біохімічних речовин, що призводять до перевантаження Ca^{2+} і дисфункції сперматозоїдів як результат оксидативного стресу.

На основі отриманих нами даних запропонована гіпотетична модель (схема), яка ілюструє причинно-наслідкові зв'язки між порушеннями Na^+,K^+ -АТРазних, Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРазних та вільнорадикальних процесів у сперматозоїдах інфертильних чоловіків (рис. 6.1).

Вважається, що однією з можливих причин чоловічого непліддя є пошкодження функцій сперматозоїдів, зумовлене зменшенням активності Na^+,K^+ -АТРази та Ca^{2+},Mg^{2+} -АТРази [86]. Сперматозоїди людини виявляють здатність генерувати АФК та ініціювати пероксидацію ненасичених жирних

кислот у плазматичній мембрані сперматозоїдів, що відіграє ключову роль в етіології чоловічого безпліддя.

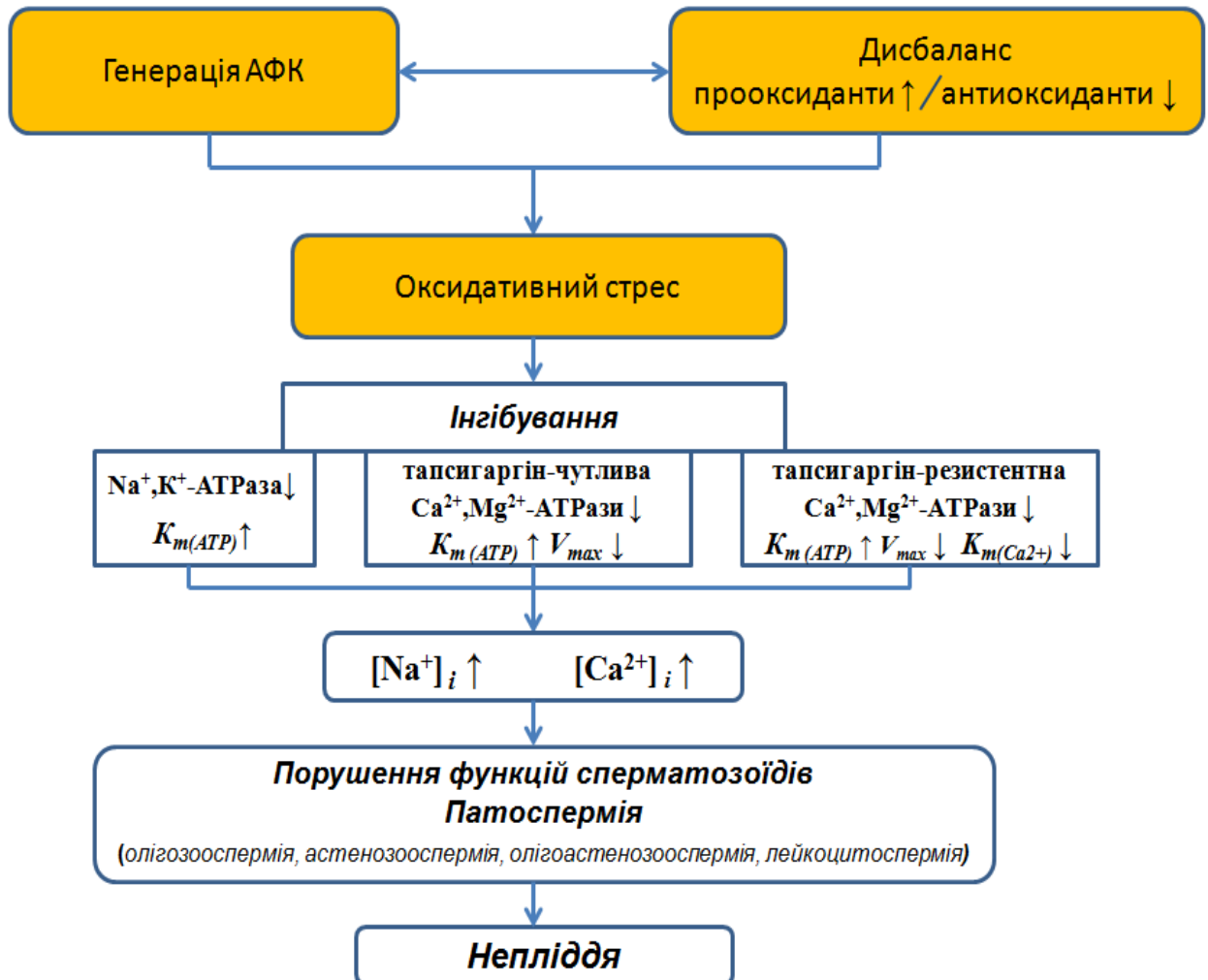


Рисунок 6.1 – Схема причинно-наслідкових зв'язків між порушеннями Na⁺,K⁺-АТРазних, Ca²⁺,Mg²⁺-АТРазних та вільнорадикальних процесів у сперматозоїдах інфертильних чоловіків

У результаті проведених досліджень нами встановлено, що у сперматозоїдах неплідних чоловіків пригнічення активності під дією H₂O₂-індукованого оксидативного стресу Na⁺,K⁺-АТРази, тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої компоненти Ca²⁺,Mg²⁺-АТРази відбувається за рахунок зниження спорідненості АТРаз до субстрату.

Пригнічення активності тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у пацієнтів з астенозооспермією пов'язано як зі зниженням максимальної швидкості гідролізу АТР, так і зі збільшенням спорідненості ензиму до йонів Ca^{2+} .

Пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у сперматозоїдах неплідних чоловіків призводить до перевантаження цитозолу йонами Na^+ та Ca^{2+} та до порушення Ca^{2+} -гомеостазу, та зумовлює зниження фертилізаційного потенціалу сперматозоїдів.

Загальновідомо, що невелика кількість АФК життєво необхідна для етапів, що беруть участь у фізіологічній реакції запліднення – дозрівання сперматозоїдів, гіперактивації, акросомній реакції сперматозоїдів та злитті ооцитів. Однак, коли рівень продукування АФК стає надмірним можуть відбуватися пероксидне окиснення ліпідів в клітинній мембрані, фрагментація ДНК в ядрах та мітохондріях та апоптоз, що негативно впливають на параметри сперми та фертильність чоловіків [162]. Оксидативний стрес, опосередкований пероксидним окисненням ліпідів мембран сперматозоїдів може бути відповідальним за інгібування Na^+, K^+ -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази.

Отже, в сперматозоїдах чоловіків існує тісний функціональний зв'язок між Na^+, K^+ та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазами та прооксидантно-антиоксидантною системами у сперматозоїдах неплідних чоловіків. Порушення функціональної активності однієї з систем призводить до дисбалансу інших.

Вивчення іонообміну АТРази в патогенезі порушень репродуктивної функції чоловіків є перспективним та дозволить поліпшити діагностику і сприятиме розробці правильної тактики лікування. Отримані результати наукової роботи матимуть вагоме теоретичне значення у з'ясуванні фізіологічних, біохімічних та біофізичних механізмів порушення запліднювальної здатності сперматозоїдів, та можуть бути використані

як додаткові діагностичні критерії для підтвердження неплідності, для розробки нових та вдосконалення існуючих лікувальних тактик при корекції патологічних станів. Отримані дані можуть бути використані у навчальному процесі з курсу біохімії, медичної біології, біофізики, патологічної фізіології для студентів біологічних і медичних спеціальностей закладів вищої освіти.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та нове вирішення актуального наукового завдання щодо з'ясування особливостей функціонування в сперматозоїдах чоловіків із патоспермією Na^+, K^+ -АТРази, тапсигаргін-нечутливої та тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, а також інгібувальний вплив гідроген пероксиду та каліксаренів на гідроліз АТР в сперматозоїдах чоловіків із патоспермією.

1. Виявлено достовірне зниження убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРази активності сперматозоїдів чоловіків з оліго-, астено- та олігоастененозооспермією в 2 рази ($p < 0,01$; $p < 0,001$), а у пацієнтів з лейкоцитоспермією в 1,5 рази ($p < 0,05$) стосовно величин у сперматозоїдах фертильних чоловіків.

2. У пацієнтів з астенозооспермією та олігоастенозооспермією виявлено достовірне зниження тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності сперматозоїдів в 2,6-2,7 рази порівняно з нормозооспермічними зразками ($p < 0,001$). Найбільш виражене пригнічення активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відмічалось у сперматозоїдах пацієнтів із лейкоцитоспермією – в 4,2 рази ($p < 0,001$) щодо величин у сперматозоїдах фертильних чоловіків.

3. Показано достовірне зниження тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази активності сперматозоїдів з астено- і олігоастенозооспермією в 2,83 і 2,6 рази ($p < 0,001$), відповідно, а у пацієнтів з лейкоцитоспермією в 3,8 рази ($p < 0,001$) стосовно величин у сперматозоїдах фертильних чоловіків.

4. Вперше, за оцінкою змін гідролазної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази, встановлено, що сперматозоїдах патоспермічних чоловіків транспортування йонів Ca^{2+} за участю обох компонент $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відбувається менш інтенсивно і характеризується нижчою ємністю

порівняно з сперматозоїдами чоловіків зі збереженою фертильністю. Вказані зміни кінетичних параметрів $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -залежного гідролізу АТР призводять до пригнічення активності тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази та викликають зниження фертилізаційного потенціалу сперматозоїдів.

5. Вперше показано, що інгібування АТРадної реакції калікс[4]ареном С-107 в оліго- та астенозооспермічних зразках сперматозоїдів спостерігається зниженням коефіцієнта кооперативності n_H майже в 2 рази. Зокрема, в олігозооспермічних чоловіків K_{MgCl_2} зростає лише при високих концентраціях калікс[4]арену С-107 (100 нМ). Для Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів астенозооспермічних чоловіків збільшення концентрації калікс[4]арену С-107 призводить до зростання K_{MgCl_2} в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій калікс[4]арену. При цьому величина коефіцієнта кооперативності Хілла n_H активуючої дії MgCl_2 знижується у присутності калікс[4]арену С-107.

6. Показано, що H_2O_2 дозозалежно пригнічує активність убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРази сперматозоїдів. За умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу пригнічення активності убаїнчутливої Na^+, K^+ -АТРази в сперматозоїдах чоловіків відбувається за рахунок зниження спорідненості ензиму до субстрату та зниження числа обертів ензиму (лише для сперматозоїдів фертильних чоловіків).

7. За умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу пригнічення активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в сперматозоїдах інфертильних чоловіків відбувається за рахунок зниження спорідненості ензиму до субстрату. У сперматозоїдах чоловіків зі збереженою фертильністю пригнічення тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відбувається за рахунок зниження максимальної швидкості реакції, а тапсигаргін-резистентної $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази – шляхом зниження спорідненості до субстрату.

8. Запропонована гіпотетична модель, що ілюструє причинно-наслідкові зв'язки між порушеннями Na^+, K^+ -АТРазних, $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРазних та вільнорадикальних процесів у сперматозоїдах інфертильних чоловіків. Встановлено, що у сперматозоїдах неплідних чоловіків пригнічення активності під дією H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу Na^+, K^+ -АТРази, тапсигаргін-резистентної та тапсигаргін-чутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази відбувається за рахунок зниження спорідненості АТРаз до субстрату. Пригнічення активності тапсигаргін-резистентної компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази у пацієнтів з астенозооспермією пов'язано як зі зниженням максимальної швидкості гідролізу АТР, так і зі збільшенням спорідненості ензиму до йонів Ca^{2+} .

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Алчинбаев МК, Макажанов МА, Мансурова ИБ, Испосунова ГА. Генетические факторы развития мужского бесплодия (обзор литературы). J. Medicine (Almaty). 2015;10(160):44-49.
2. Атамась ЛІ, Бойко ВІ, Драпайло АБ, Єсипенко ОА, Кальченко ОІ, Клячина МА, Матвеев ЮІ, Мірошниченко СІ, Родік РВ, Черенок СО, Кальченко ВІ. Супрамолекулярна хімія каліксаренів. Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2009;7(2(26)):28-36.
3. Бевза ОВ, Векліч ТО, Шкрабак ОА, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Калікс[4]арен С-107 як високо афінний супрамолекулярний інгібітор Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани. Укр. біохім. журн. 2013;85(2):5-19.
4. Векліч ТО, Костерін СО. Дослідження властивостей Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани клітин міометрія. Буковинський медичний вісник. 2005,9(2):36-38.
5. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Мазур ЮЮ, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Кінетика інгібіторної дії калікс[4]арену С-90 на активність транспортної Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2014,86(5):37-46.
6. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Вплив каліксарену С-107 на кінетичні параметри Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани міоцитів матки. Укр. біохім. журн. 2011,83(2):36-44.
7. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Родік РВ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Каліксарен С-107 збільшує спорідненість Na^+ , K^+ -АТРази плазматичної мембрани гладеньком'язових клітин до убаїну. Укр. біохім. журн. 2011,83(1):38-44.

8. Векліч ТО, Кочешкова НС, Родік РВ, Бойко ВІ, Воробець ЗД, Костерін СО. Порівняльне дослідження впливу каліксаренів на Na^+, K^+ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані скоротливих та рухливих клітин. Укр. біохім. журн. 2007;79(3):19-28.
9. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Костерін СО, Родік РВ, Черенок СО, Бойко ВІ, Кальченко ВІ. Каліксарени С-97 та С-107 стимулюють вплив убаїну на $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТР-азну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2006;78(6):53-63.
10. Векліч ТО, Шкрабак ОА, Родік РВ, Бойко ВІ, Кальченко ВІ, Костерін СО. Просторова будова каліксарен-амінофосфонових кислот є суттєвою для прояву їхньої інгібуючої дії на $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -АТР-азну активність у плазматичних мембранах гладеньком'язових клітин. Укр. біохім. журн. 2010;82(1):21-33.
11. Воробець ДЗ, Кочешкова НС. Неплідність та еректильна дисфункція чоловіків: біохімічні та клінічні аспекти. Тернопіль: Укрмедкнига, 2008; 204 с.
12. Келети Т. Основы ферментативной кинетики: Пер. с англ. М: Мир, 1990; 350 с.
13. Костерин СА, Бурчинская НФ. Метод определения кинетических характеристик Ca^{2+} -транспортирующих систем субклеточных структур гладких мышц. Укр. біохім. журн. 1987;59(2):66-9.
14. Костерін СО, Кальченко ВІ, Векліч ТО, Бабіч ЛГ, Шликов СГ. Калікс[4]арени як модулятори АТР-гідролазних систем гладеньком'язових клітин. Монографія. Київ: Наукова Думка. 2019, 266 с.
15. Кочешкова НС, Воробець ЗД. Еозин-чутлива АТФ-азна активність у сперматозоїдах чоловіків як біохімічний тест на олігоспермію. Укр. біохім. журн. 2007;79(2):45-55.

16. Кочешкова НС. Ідентифікація та властивості іон-транспортувальних АТР-гідролаз сперматозоїдів чоловіків за умов олігозооспермії: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.04 “Біохімія”. 2007; 20 с.
17. Личковський ЕІ, Свердан ПЛ. Вища математика. Теорія наукових досліджень у фармації і медицині. Київ: Знання. 2012; 476 с.
18. Лісовий ВМ, Панасовський МЛ, Гарагатий ІА, Андрєєв СВ. Анамнестично-соціальні аспекти розвитку обтураційного чоловічого безпліддя. Медицина сьогодні і завтра. 2009;3/4:106-10.
19. Мескало ОІ, Фафула РВ, Личковський ЕІ, Мельник ОВ, Воробець ЗД. Дисфункція Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз сперматозоїдів неплідних чоловіків з різними формами патоспермій. Матеріали X Науково-практичної конференції (з міжнародною участю) “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм”; 2017 жовт. 5-6; Тернопіль; 2017, с. 30-31.
20. Остапченко ЛІ, Михайлик ІВ. Біологічні мембрани: методи дослідження структури та функцій. Київ: ВПЦ "Київський університет". 2006; 215 с.
21. Поворознюк МВ. Причини порушень репродуктивного здоров'я у чоловіків із безпліддям у шлюбі. Здоров'є мужчини. 2015;2(53):162-165.
22. Фафула РВ, Мескало ОІ, Воробець ЗД. Особливості гідролізу АТФ та псигаргін-чутливою компонентою Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази сперматозоїдів неплідних чоловіків за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу. Матеріали XI Науково-практичної конференції (з міжнародною участю) “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм”. 2018 жовт. 4-5; Тернопіль; 2018, с. 38-39.
23. Фафула РВ, Мескало ОІ, Личковський ЕІ, Воробець ЗД. Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТР

- уабіінчутливою Na^+, K^+ -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків. Біофізичний вісник. 2017;38(2):45-53.
24. Фафула РВ, Мескало ОІ, Личковський ЕІ, Воробець ЗД. Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТР $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2017;4(80):46-51.
 25. Цимбалюк ОВ, Костерін СО, Родік РВ, Кальченко ВІ. Порівняльне вивчення в досліджах *in vitro* та *in vivo* впливу каліксарену С107 та уабііну на Na^+, K^+ -АТФ-азну активність у плазматичних мембранах гепатоцитів щурів. Укр. біохім. журн. 2010;82(4):78-85.
 26. Шкрабак ОА, Кальченко ОІ, Родік РВ, Векліч ТО, Кальченко ВІ, Костерін СО. Каліксарензалежний гідроліз АТР. І. Кінетика реакції та комплексоутворення між каліксареном С-107 та нуклеозидтрифосфатом. Укр. біохім. журн. 2008;80(2):90-100.
 27. Юзько ОМ, Юзько ТА. Клінічно-статистичний аналіз використання в Україні допоміжних репродуктивних технологій для лікування безпліддя. Буковинський медичний вісник. 2011;15(3):135–137.
 28. Agarwal A, Finelli R, Selvam MKP, et al. A Global Survey of Reproductive Specialists to Determine the Clinical Utility of Oxidative Stress Testing and Antioxidant Use in Male Infertility. *World J Mens Health*. 2021;39(3):470-488. doi:10.5534/wjmh.210025
 29. Agarwal A, Leisegang K, Majzoub A, et al. Utility of Antioxidants in the Treatment of Male Infertility: Clinical Guidelines Based on a Systematic Review and Analysis of Evidence. *World J Mens Health*. 2021;39(2):233-290.
 30. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol*. 2008 Jan;59(1):2-11. doi: 10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x. PMID: 18154591.

31. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online*. 2004 Jun;8(6):616-27. doi: 10.1016/s1472-6483(10)61641-0. PMID: 15169573.
32. Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, et al. Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health*. 2019 Sep;37(3):296-312. doi: 10.5534/wjmh.190055. PMID: 31081299; PMCID: PMC6704307.
33. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health*. 2014 Apr;32(1):1-17.
34. Aitken RJ, Baker MA, De Iuliis GN, Nixon B. New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;(198):99-115. doi: 10.1007/978-3-642-02062-9_7. PMID: 20839089.
35. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*. 2004;16:581-588. doi: 10.1071/RD03089
36. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, spermatozoa and leukocytic infiltration: relationships forged by the opposing forces of microbial invasion and the search for perfection. *J Reprod Immunol*. 2013 Nov;100(1):11-9.
37. Aitken RJ, Curry B J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;14(3):367-381.
38. Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health. *J. Androl*. 2012 Nov-Dec;33(6):1096-106.

39. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl.* 2014 Jan-Feb;16(1):31-8. doi: 10.4103/1008-682X.122203.
40. Aranha I, Bhagya M, Yajurvedi HN. Concentration of cations in different parts of male reproductive system and their influence on in vitro sperm motility in lizard *Mabuya carinata* Schneider. *Indian J. Exp. Biol.* 2008;46(10):720-724.
41. Aravindan GR, Fomin VP, Naik UP, Modelski MJ, Naik MU, Galileo DS, Duncan RL, Martin-DeLeon PA. CASK interacts with PMCA4b and JAM-A on the mouse sperm flagellum to regulate Ca²⁺ homeostasis and motility. *J Cell Physiol.* 2012;227:3138-3150.
42. Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ Jr. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril.* 2004;82(3):621-7.
43. Barwe SP, Anilkumar G, Moon SY, Zheng Y, Whitelegge JP, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK. Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. *Mol Biol Cell.* 2005;16(3):1082-94.
44. Berridge M, Bootman M, Roderick H. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:517-529. doi: 10.1038/nrm1155
45. Bhasin S. Approach to the Infertile Man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2007 June;92(6):1995-2004. doi:10.1210/jc.2007-0634
46. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 2017 Aug;14(8):470-85.
47. Blanco G, Koster JC, Mercer RW. The α subunit of the Na,K-ATPase specifically and stably associates into oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:8542-8546.

48. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na,K-ATPase: Heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*. 1998;275:633–650.
49. Blanco G, Sánchez G, Melton RJ, Tourtellotte WG, Mercer RW. The $\alpha 4$ Isoform of the Na,K-ATPase Is Expressed in the Germ Cells of the Testes. *The Journal of Histochemistry*. 2000;48(8):1023-1032.
50. Blanco G. Na,K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation. *Semin Nephrol*. 2005 Sep;25(5):292-303. doi: 10.1016/j.semnephrol.2005.03.004. PMID: 16139684.
51. Blanco G. The NA/K-ATPase and its isozymes: what we have learned using the baculovirus expression system. *Front Biosci*. 2005 Sep;10:2397-411.
52. Bogdanova A, Petrushanko I, Boldyrev A, Gassmann M. Oxygen- and redox-induced regulation of the Na/K ATPase. *Current Enzyme Inhibition*. 2006;2(1):37-59.
53. Böhmer V. Calixarenes, Macrocycles with (Almost) Unlimited Possibilities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 1995;34:713-745. doi:10.1002/anie.199507131
54. Boldyrev AA. Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble. *Biochemistry (Mosc)*. 2001;66(8):821-831.
55. Brini M, Carafoli E. The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Feb;3(2):a004168. doi:10.1101/cshperspect.a004168.
56. Câmara DR, Kastelic JP, Thundathil JC. Role of the Na⁺/K⁺-ATPase ion pump in male reproduction and embryo development. *Reprod Fertil Dev*. 2017;29(8):1457-1467. doi: 10.1071/RD16091. PMID: 27456939.
57. Carafoli E, Brini MR. Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr Opin Chem Biol*. 2000;4:152-161.
58. Cartwright EJ, Neyses L. Evaluation of plasma membrane calcium/calmodulin-dependent ATPase isoform 4 as a potential target for fertility control. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;198:79-95.

59. Chen SJ, Allam JP, Duan YG, Haidl G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet*. 2013 Jul;288(1):191-9.
60. Chicka MC, Strehler EE. Alternative splicing of the first intracellular loop of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 2 alters its membrane targeting. *J Biol Chem*. 2003;278:18464-18470.
61. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril*. 2018 Oct;110(5):810-814. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.08.015. PMID: 30316415.
62. Clapham DE. Calcium signalling. *Cell*. 2007 Dec;131(6):1047-58.
63. Clausen MJ, Nissen P, Poulsen H. The pumps that fuel a sperm's journey. *Biochem Soc Trans*. 2011 Jun;39(3):741-5. doi: 10.1042/BST0390741.
64. Colagar AH, Karimi F, Jorsaraei SGA. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno- teratospermic men. *Iran Red Crescent Med J*. 2013 Sep;15(9):780-785.
65. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010 May-Jun;16(3):231-45. doi: 10.1093/humupd/dmp048. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19934213.
66. Correia J, Michelangeli F, Publicover S. Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction*. 2015;150(2):65-76. doi: 10.1530/REP-15-0102.
67. Da Silva E, Lazar AN, Coleman AW. Biopharmaceutical applications of calixarenes. *J Drug Sci Tech*. 2004;14(1):3-20.
68. Dada R, Kumar R, Shamsi MB, Kumar R, Kucheria K, Sharma RK, Gupta SK, Gupta NP. Higher frequency of Yq microdeletions in sperm DNA as

- compared to DNA isolated from blood. *Asian J Androl.* 2007 Sep;9(5):720-2. doi: 10.1111/j.1745-7262.2007.00274.x. PMID: 17712493.
69. Darbost U, Rager MN, Petit S, Jabin I, Reinaud O. Polarizing a hydrophobic cavity for the efficient binding of organic guests: the case of calix[6]tren, a highly efficient and versatile receptor for neutral or cationic species. *J Am Chem Soc.* 2005 Jun;127(23):8517-25. doi: 10.1021/ja051299u. PMID: 15941287.
70. Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernández-González EO, Nishigaki T, Treviño CL, Wood C, Beltrán C. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction.* 2006 Jun;131(6):977-88.
71. Darszon A, Nishigaki T, Beltran C, Treviño CL. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1305-1355.
72. Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño CL, Felix R, Beltrán C. Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol.* 2005;243:79-172. doi:10.1016/S0074-7696(05)43002-8. PMID: 15797459.
73. Darszon A, Treviño CL, Wood C, Galindo B, Rodriguez-Miranda E, Acevedo JJ, Hernandez-Gonzalez EO, Beltran C, Martinez-Lopez P, Nishigaki T. Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;65:229-44.
74. Davidson LM, Millar K, Jones C, Fatum M, Coward K. Deleterious effects of obesity upon the hormonal and molecular mechanisms controlling spermatogenesis and male fertility. *Hum Fertil (Camb).* 2015 Sep;18(3):184-93. doi: 10.3109/14647273.2015.1070438. PMID: 26205254.
75. De Blas G, Michaut M, Treviño CL, Tomes CN, Yunes R, Darszon A, Mayorga LS. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49326-31. doi: 10.1074/jbc.M208587200. PMID: 12379648.

76. Dokmeci D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Medica (Plovdiv)*. 2005;47(1):26-30.
77. Dragileva E, Rubinstein S H. Breitbart Intracellular Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 1999;61:1226-1234.
78. Durairajanayagam D, Sharma RK, du Plessis SS, Agarwal A. Testicular Heat Stress and Sperm Quality. In: du Plessis S., Agarwal A., Sabanegh, Jr. E. (eds) *Male Infertility*. Springer, New York, NY. 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1040-3_8
79. Durairajanayagam D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol.* 2018 Feb;16(1):10-20. doi: 10.1016/j.aju.2017.12.004. PMID: 29713532;PMCID: PMC5922227.
80. Esteves SC, Agarwal A. Novel concepts in male infertility. *Int Braz J Urol.* 2011 Jan-Feb;37(1):5-15.
81. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics.* 011;66(4):691-700. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322011000400026>
82. Fafula R, Meskalo O, Vorobets Z. Disturbance of activities of Ca^{2+} -and Na^{+} -ATP-dependent transport systems in spermatozoa of infertile men with different forms of patospermia. 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry; 2017 Sep 18-20; Lublin, Poland; 2017, p.32.
83. Fafula RV, Besedina AS, Iefremova UP, Vorobets ZD. Characterization of Ca^{2+} , Mg^{2+} - dependent hydrolysis of ATP by peripheral blood lymphocytes of patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*, 2012;4:81-87.
84. Fafula RV, Meskalo OI, Besedina AS, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Kinetic properties of Na^{+} , K^{+} -ATPase of spermatozoa from fertile and infertile men under effect of calix[4]arene C-107. *Ukrainian Biochemical Journal.* 2019;91(3):56-64.

85. Fafula RV, Meskalo OI, Lychkovskyy EI, Iefremova UP, Onufrovych OK, Maksymyuk HV, Melnyk OV, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Effect of hydrogen peroxide on Na^+, K^+ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017;8(4):521-526.
86. Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets ZD. Alterations in Ca^{2+} signals and Ca^{2+} -ATPases activities in spermatozoa in human subjects with different fertility potential. *Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю; 2019 трав. 27-30; Київ. Фізіологічний журнал; 2019;65(3 (додаток)):14.*
87. Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets ZD. Ca^{2+} -signals in response to ATP in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia. 6th Ukrainian congress for cell biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine; Proceedings; 2019, p.22.
88. Fafula RV, Meskalo OI, Lychkovskyy EI, Vorobets ZD. Hydrogen peroxide effect on the thapsigargin-sensitive $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity of sperm cells. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2018;1(81):33-38.
89. Fafula RV, Meskalo OI, Lychkovskyy EI, Vorobets ZD. Kinetics of inhibitory effect of hydrogen peroxide on activity of plasma membrane transporting $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of sperm cells. *Біологічні Студії / Studia Biologica*. 2018;12(1):17-24.
90. Fafula RV, Meskalo OI, Lychkovskyy EI, Vorobets ZD. The ATP-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in spermatozoa of infertile men with oligo- and asthenozoospermia. *Біологічні Студії / Studia Biologica*. 2018;12(3-4):47-54.
91. Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets DZ, Vorobets ZD. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men. XVII International Congress of Medical Sciences; 2018 May 10-13; Sofia, Bulgaria; 2018, p.77-78.
92. Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets ZD. Role of mitochondria in progesterone-evoked intracellular calcium signals in ejaculated spermatozoa

- from infertile men. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2019; 1(85):5-9.
93. Fainberg J, Kashanian JA. Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res*. 2019; 8: F1000 Faculty Rev 670.doi:10.12688/f1000research.17076.1
 94. Ficarella R, Di Leva F, Bortolozzi M, Ortolano S, Donaudy F, Petrillo M, Melchionda S, Lelli A, Domi T, Fedrizzi L, et al. A functional study of plasma-membrane calcium-pump isoform 2 mutants causing digenic deafness. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1516-1521. doi:10.1073/pnas.0609775104
 95. Flynn ER, Bradley KN, Muir TC, McCarron JG. Functionally-separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle. *J Biol Chem*. 2001 Sep;276(39):36411-8.
 96. Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*. 2004 Sep-Oct;10(5):387-99.
 97. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2000 Apr;15(4):830-9. doi:10.1093/humrep/15.4.830. PMID: 10739828.
 98. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl*. 2004 Mar;6(1):59-65. PMID: 15064836.
 99. Groeger G, Mackey AM, Pettigrew CA, Bhatt L, Cotter TG. Stress-induced activation of Nox contributes to cell survival signalling via production of hydrogen peroxide. *Journal of Neurochemistry*. 2009;109:1544-1554.
 100. Guthrie H, Welch G. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*. 2012 Nov;78(8):1700-8.
 101. Harchegani A, Irandoost A, Mirnamniha M, Rahmani H, Tahmasbpour E, Shahriary A. Possible mechanisms for the effects of calcium deficiency on

- male infertility. *Int. J. Fertil. Steril.* 2019;12(4):267-272. doi: 10.22074/ijfs.2019.5420.
102. Herrick SB, Schweissinger DL, Kim SW, Bayan KR, Mann S, Cardullo RA. The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J Cell Physiol.* 2005;202(3):663–671. doi: 10.1002/jcp.20172.
103. Hlivko JT, Chakraborty S, Hlivko TJ, Sengupta A, James PF. The human Na,K-ATPase alpha 4 isoform is a ouabain-sensitive alpha isoform that is expressed in sperm. *Mol Reprod Dev.* 2006 Jan;73(1):101-15.
104. Jiao S, Johnson K, Moreno C, Yano S, Holmgren M. Comparative description of the mRNA expression profile of Na⁺/K⁺-ATPase isoforms in adult mouse nervous system. *J Comp Neurol.* 2021;1–21. doi:10.1002/cne.25234.
105. Jimenez T, McDermott JP, Sánchez G, Blanco G. Na,K-ATPase alpha4 isoform is essential for sperm fertility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(2):644-9.
106. Jimenez T, Sanchez G, Blanco G. Activity of the Na, K-ATPase alpha4 isoform is regulated during sperm capacitation to support sperm motility. *J. Androl.* 2012;33(5):1047–1057.
107. Jimenez T, Sanchez G, McDermott JP, Nguyen AN, Kumar TR, Blanco G. Increased expression of the Na,K-ATPase alpha4 isoform enhances sperm motility in transgenic mice. *Biol Reprod.* 2011;84(1):153-61.
108. Jimenez T, Sanchez G, Wertheimer E, Blanco G. Activity of the Na,K-ATPase α 4 isoform is important for membrane potential, intracellular Ca²⁺, and pH to maintain motility in rat spermatozoa. *Society for Reproduction and Fertility.* 2010;3:1470-1626.
109. Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CLR, Publicover SJ. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized ‘toolkit’ of channels, transporters and stores. *Human Reproduction Update.* 2006;12(3):253-267.

110. Jung JH, Kim MH, Kim J, Baik SK, Koh SB, Park HJ, Seo JT. Treatment of Leukocytospermia in Male Infertility: A Systematic Review. *World J Mens Health*. 2016;34(3):165-172.
111. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012 Aug;62(2):324-32. PMID: 22591628.
112. Jungwirth A. (Chair), Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Kopa Z, Krausz C, Tournaye H. Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology Annual Congress Barcelona 2019.
113. Kalchenko O, Cherenok S, Suikov S, Kalchenko V. Study of Calixarene Complexation with Biologically Active. *French-Ukrainian Journal Of Chemistry*. 2017;5(2):49-55. doi:10.17721/fujcV5I2P49-55
114. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil. Steril*. 2008 May;89(5):1183-90.
115. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:511-535.
116. Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *Int J Urol*. 2009;16(5):449-57.
117. Keryanov S, Gardner KL. Physical mapping and characterization of the human Na,K-ATPase isoform, ATP1A4. *Gene*. 2002 Jun;292(1-2):151-66.
118. Khundmiri SJ, Metzler MA, Ameen M. [et al.] Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2006;291(6):1247-1257.
119. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil Steril*. 2001 Feb;75(2):237-48. doi:10.1016/s0015-0282(00)01679-4. PMID: 11172821.

120. Kip SN, Strehler EE. Rapid downregulation of NCX and PMCA in hippocampal neurons following H₂O₂ oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1099:436-9. doi:10.1196/annals.1387.005; PMID:17446483.
121. Koçak-toker N, Aktan G, Aykaç-toker G. The role of Na,K-ATPase in human sperm motility. *Int J Androl.* 2002;25(3):180-185.
122. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughli EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2008;93(8):3199-3207.
123. Krausz C, Riera-Escamilla A. Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol.* 2018;15:369-384. doi:10.1038/s41585-018-0003-3.
124. Kumar N, Singh AK. Reactive oxygen species in seminal plasma as a cause of male infertility. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2018;47(10):565-572.
125. Kumosani TA, Elshal MF, Al-Jonaid AA, Abduljabar HS. The influence of smoking on semen quality, seminal microelements and Ca²⁺-ATPase activity among infertile and fertile men. *Clinical Biochemistry.* 2008;41:1199-1203.
126. Lamartine R, Tsukada M, Wilson D, Shirata A. “Antimicrobial activity of calixarenes.” *Comptes Rendus Chimie.* 2002;5:163-169.
127. Lawson C, Dorval V, Goupil S, Leclerc P. Identification and localisation of SERCA 2 isoforms in mammalian sperm. *Mol. Hum. Reprod.* 2007;13(5):307–316. doi: 10.1093/molehr/gam012.
128. Lee CH, Poburko D, Kuo K.H. [et al.] Ca²⁺ oscillations, gradients, and homeostasis in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 2002;282(5):H1571-H1583.
129. Lee LK, Foo KY. Recent insights on the significance of transcriptomic and metabolomic analysis of male factor infertility. *Clin Biochem.* 2014;47(10-11):973-982.
130. Lewis D, Pilankatta R, Inesi G, Bartolommei G, Moncelli MR, Tadini-Buoninsegni F. Distinctive features of catalytic and transport mechanisms in

- mammalian sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) and Cu^{+} (ATP7A/B) ATPases. *J Biol Chem.* 2012 Sep;287(39):32717-27.
131. Liu CC, Garcia A, Mahmmoud YA, Hamilton EJ, Galougahi KK, Fry NAS, Figtree G.A, Cornelius F, Clarke RJ, Rasmussen HH. Susceptibility of $\beta 1$ Na^{+} - K^{+} pump subunit to glutathionylation and oxidative inhibition depends on conformational state of pump. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;287:12353-12364.
132. Liu J, Kesiry R, Periyasamy SM, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JI. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. *Kidney International.* 2004;66:227-241.
133. Liu L, Li J, Liu J, Yuan Z, Pierre SV, Qu W, Zhao X, Xie Z. Involvement of $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase in hydrogen peroxide-induced hypertrophy in cardiac myocytes. *Free Radical Biology and Medicine.* 2006;41(10):1548-1556.
134. Lopina OD. Interaction of Na,K-ATPase Catalytic Subunit with Cellular Proteins and Other Endogenous Regulators. *Biochemistry (Moscow).* 2001;66(10):1122-1131.
135. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1):265-275.
136. Mahfouz RZ, Aziz N, Sharma R, Bykova M, Sabanegh E, Agarwal A. Assessment of intracellular human sperm reactive oxygen species after hydrogen peroxide exposure using four different probes. *Fertil Steril.* 2008;90(1):320-1.
137. Mahfouz RZ, du Plessis SS, Aziz N, Sharma R, Sabanegh E, Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and Sterility.* 2010;93(3),814-21. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.10.068.
138. McDermott J, Sánchez G, Nangia AK, Blanco G. Role of human Na,K-ATPase alpha 4 in sperm function, derived from studies in transgenic mice. *Mol Reprod Dev.* 2015;82(3):167-81.

139. McDermott JP, Sánchez G, Mitra A, Numata S, Liu LC, Blanco G. Na,K-ATPase $\alpha 4$, and Not Na,K-ATPase $\alpha 1$, is the Main Contributor to Sperm Motility, But its High Ouabain Binding Affinity Site is Not Required for Male Fertility in Mice. *J Membr Biol.* 2021. doi:10.1007/s00232-021-00181-2.
140. McLean DJ, Jones LGJr, Froman DP. Reduced glucose transport in sperm from roosters (*Gallus domesticus*) with heritable subfertility. *Biol Reprod.* 1997;57(4):791-5.
141. Meharg JV, McGowan-Jordan J, Charles A, Parmelee JT, Cutaia MV, Rounds S. Hydrogen peroxide stimulates sodium-potassium pump activity in cultured pulmonary arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology.* 1993;265(6):613-621.
142. Meskalo OI, Fafula RV, Vorobets ZD. Calix[4]arene C-107 effect on kinetic properties of Na⁺,K⁺-ATPase of spermatozoa of men with different form of pathospermia. *Матеріали XII Українського біохімічного конгресу; 2019 вер. 30-жовт. 4; Тернопіль; Медична та клінічна хімія. 2019;21(3(80)) (додаток):36-37.*
143. Meskalo OI, Fafula RV, Vorobets ZD. Characteristics of Ca²⁺, Mg²⁺-dependent ATP hydrolysis in sperm cells of infertile men. *Studia Biologica.* 2020;14(1):33-40.
144. Meskalo OI, Fafula RV, Vorobets ZD. Kinetics of Ca²⁺-transport by ATPases in spermatozoa of infertile men. *Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів присвяченої 75 річниці створення біологічного факультету ЛНУ ім. І. Франка та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача; 27–29 квітня 2020; Львів. Молодь і поступ біології. 2020, 20-21.*
145. Meskalo OI, Fafula RV, Iefremova UP, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ. Na, K-ATPase activity in sperm cells of infertile men. *XVI International*

Congress of Medical Sciences; 2017 May 11-14; Sofia, Bulgaria; Abstract Book; 2017, p.110.

146. Meskalo OI, Fafula RV, Lychkovskyj EI, Vorobets ZD. Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺,Mg²⁺-ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. *Біологічні Студії / Studia Biologica*. 2017;11(2):5-12.
147. Michelangeli F, Ogunbayo OA, Wootton LL. A plethora of interacting organellar Ca²⁺ stores. *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17:135-140.
148. Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: targeting Ca²⁺ transport. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:519-530.
149. Morales GA. The Response of Human Spermatozoa to Chemoattractants. The University of Birmingham, School of Biosciences. 2009 Oct; 269 p.
150. Mosińska P, Salaga M, Fichna J. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gastrointestinal disorders. *Gastrointestinal Tissue*. 2017:53-64.
151. Muriel P, Castaneda G, Ortega M. et al. Insights into the mechanism of erythrocyte Na⁺/K⁺-ATPase inhibition by nitric oxide and peroxynitrite anion. *Journal of Applied Toxicology*, 2003;23:275–278.
152. Nguyen NT, Wallace DP, Blanco G. Ouabain binds with high affinity to the Na,K-ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation. *J. Am.Soc. Nephrol*. 2007;18(1):46-57.
153. Nimse SB, Kim T. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem Soc Rev*. 2013 Jan;42(1):366-86. doi:10.1039/c2cs35233h.
154. Okunade GW, Miller ML, Pyne GJ. et al. Targeted ablation of plasma membrane Ca²⁺ ATPase (PMCA) 1 and 4 indicates a major housekeeping function for Pmca1 and a critical role in hyperactivated sperm motility and male fertility for Pmca4. *J. Biol. Chem*, 2004;279:33742-33750.

155. Olayemi FO. A review on some causes of male infertility. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(20):2834-2842. doi:10.5897/AJB2010.000-3110.
156. Olli KE, Li K, Galileo DS, Martin-DeLeon PA. Plasma membrane calcium ATPase 4 (PMCA4) co-ordinates calcium and nitric oxide signaling in regulating murine sperm functional activity. *J Cell Physiol*. 2018 Jan;233(1):11-22. doi:10.1002/jcp.25882.
157. Petrushanko N, Bogdanov E, Bulygina B, Grenacher T, Leinsoo A, Boldyrev M. , Gassmann M, Bogdanova A. Na-K-ATPase in rat cerebellar granule cells is redox sensitive. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2006;290(4):916-925.
158. Pochet R, Donato R, Haiech J, Heizmann C, Gerke V. Calcium: the molecular basis of calcium action in biology and medicine. Springer Science+Business Media. 2000; 745 p.
159. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*. 2009 Apr; 50(4): 336-47. PMID: 19421675.
160. Pradip K, Sarkar M. A quick assay for Na⁺-K⁺-ATPase specific activity. *Z. Naturforsch*. 2002;57:562-564.
161. Publicover SJ, Giojalas LC, Teves ME, de Oliveira GS, García AA, Barratt CL, Harper CV. Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front. Biosci*. 2008;13:5623-5637. doi:10.2741/3105.
162. Ramasamy R, Campbell B, Reifsnyder JE. Overweight men with nonobstructive ospermia have worse pregnancy outcomes after ssection testicular sperm extraction. *Fertil. Steril*. 2013;99(2):372–376.
163. Reis LO, Dias FG. Male fertility, obesity, and bariatric surgery. *Reprod Sci*. 2012;19(8):778-85.
164. Ribas-Maynou J, Yeste M. Oxidative Stress in Male Infertility: Causes, Effects in Assisted Reproductive Techniques, and Protective Support of Antioxidants. *Biology (Basel)*. 2020;9(4):77. doi:10.3390/biology9040077.

165. Rimessi A, Coletto L, Pinton P, Rizzuto R, Brini M, Carafoli E. Inhibitory interaction of the 14-3-3 ϵ protein with isoform 4 of the plasma membrane Ca⁽²⁺⁾-ATPase pump. *J Biol Chem*. 2005;280:37195-37203.
166. Rocco-Machado N, Cosentino-Gomes D, Meyer-Fernandes JR. Modulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity by hydrogen peroxide generated through heme in *L. amazonensis*. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129604.
167. Rodik RV, Boyko VI, Kalchenko VI. Calixarenes in Biotechnology and Bio-Medical Researches. *Front Med Chem*. 2016;8:206-301.
168. Roy SC, Atreja SK. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2008 Aug;107(1-2):68-84.
169. Safarinejad M, Safarinejad S. The roles of omega-3 and omega-6 fatty acids in idiopathic male infertility. *Asian J Androl*. 2012 Jul;14(4):514-5.
170. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2002 Dec;78(6):1215-24. doi:10.1016/s0015-0282(02)04237-1.
171. Sanchez G, Nguyen AT, Timmerberg B. et al. The Na, K-ATPase α 4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Molecular Human Reproduction*. 2006;12(9):565-576.
172. Sánchez R, Sepúlveda C, Risopatrón J, Villegas J, Giojalas LC. Human sperm chemotaxis depends on critical levels of reactive oxygen species. *Fertil Steril*. 2010 Jan;93(1):150-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.049.
173. Schuh K, Uldrijan S, Telkamp M, Rothlein N, Neyses L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. *J Cell Biol*. 2001.155:201-205.
174. Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschu K, Liebermann J, Williams JC, Armesilla AL, Emerson M, Oceandy D, Knobloch KP, Neyses L.

- Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem.* 2004;279(27):28220-6.
175. Schultz JM, Yang Y, Caride AJ, Filoteo AG, Penheiter AR, Lagziel A, Morell RJ, Mohiddin SA, Fananapazir L, Madeo AC, et al. Modification of human hearing loss by plasma-membrane calcium pump PMCA2. *N Engl J Med.* 2005.352:1557-1564.
176. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Lévy R, Czernichow S; Obesity-Fertility Collaborative Group. Obesity and increased risk for oligozoospermia and azoospermia. *Arch Intern Med.* 2012;172(5):440-442. doi:10.1001/archinternmed.2011.1382
177. Shi LG, Yang RJ, Yue WB, Xun WJ, Zhang CX, Ren YS, Shi L, Lei FL. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Anim Reprod Sci.* 2010 Apr;118(2-4):248-54.
178. Sudo J, Terui J, Iwase H, Kakuno K. Assay of ATPase and Na,K-ATPase activity using high-performance liquid chromatographic determination of ADP derived from ATP. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000 Jul;744(1):19-23. doi:10.1016/s0378-4347(00)00218-8.
179. Syeda SS, Sánchez G, McDermott JP, Hong KH, Blanco G, Georg GI. The Na^+ and K^+ transport system of sperm (ATP1A4) is essential for male fertility and an attractive target for male contraception. *Biol Reprod.* 2020 Aug;103(2):343-356. doi:10.1093/biolre/ioaa093.
180. Takeshima T, Usui K, Mori K, Asai T, Yasuda K, Kuroda S, Yumura Y. Oxidative stress and male infertility. *Reprod Med Biol.* 2020 Oct;20(1):41-52. doi:10.1002/rmb2.12353.
181. Thundathil JC, Anzar M, Buhr MM. Na^+/K^+ -ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction.* 2006;75:308-317.

182. Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*. 2000 Jun;405(6787):647-55. doi:10.1038/35015017.
183. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility a clinical perspective, *Human Reproduction Update*. 2008 May/June;14(3):243-258. doi:10.1093/humupd/dmn004
184. Vats YO, Klevets MY, Fedirko NV. Kinetic characteristics of Ca^{2+} , Mg^{2+} - ATPase of cells of the submandibular salivary gland of rats. *Ukrainian Biochem J*. 2004;76(6):44-54.
185. Veklich TO, Labyntseva RD, Shkrabak OA, Tsymbaluk OV, Rodik RV, Kalchenko VI, Kosterin SO. Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase and activation of myosin ATPase by calix[4]arene C-107 cause stimulation of isolated smooth muscle contractile activity. *Ukr. Biochem. J*. 2020,92(1):21-30.
186. Veklich TO. The inhibitory influence of calix[4]Arene of C-90 on the activity of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPases in plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in myometrium cells. *Ukr Biochem J*. 2016 Mar-Apr;88(2):5-15. doi:10.15407/ubj88.02.005. PMID:29227596.
187. Vignini A, Buldreghini E, Nanetti L, Amoroso S, Boscaro M, Ricciardo-Lamonica G, Mazzanti L, Balercia G. Free thiols in human spermatozoa: are Na^+ / K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase activities involved in sperm motility through peroxynitrite formation? *Reproductive BioMedicine Online*. 2009; 18(1):132-40. doi: 10.1016/S1472-6483(10)60435-X.
188. Vitovic P, Nikolelis DP, Hianik T. Study of calix[4]resorcinarene-dopamine complexation in mixed phospholipid monolayers formed at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Nov;1758(11):1852-61. doi:10.1016/j.bbame.2006.08.011.
189. Vivenes CY, Peralta-Arias RD, Camejo MI, Guerrero K, Fernández VH, Piñero S, Proverbio T, Proverbio F, Marín R. Biochemical identification of

- dynein-ATPase activity in human sperm. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2009 Sep-Oct;64(9-10):747-53. doi:10.1515/znc-2009-9-1022.
190. Vorobets D.Z., Onufrovych O.K., Fafula R.V., Iefremova U.P., Vorobets Z.D. The NO-synthase pathway of L-arginine transformation in spermatozoa of infertile men with different forms of patospermia. *Exper. and Clin. Phys. and Bioch.* 2016;3(75):47-53.
191. Wagoner K, Sanchez G, Nguyen AN, Enders GC, Blanco G. Different expression and activity of the alpha1 and alpha4 isoforms of the Na,K-ATPase during rat male germ cell ontogeny. *Reproduction.* 2005 Nov;130(5):627-41.
192. Wang H, Haas M, Liang M, Cai T, Tian J, Li S, Xie Z. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. *J. Biol Chem.* 2004 Apr;279(17):17250-9.
193. Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF. Bicarbonate actions on flagellar and Ca²⁺-channel responses: initial events in sperm activation. *Development.* 2003 Apr;130(7):1317-26.
194. Williams AC, Ford WC. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. *Fertil. Steril.* 2005 Apr;83(4):929-36.
195. Williams KM, Ford WC. Effects of Ca-ATPase inhibitors on the intracellular calcium activity and motility of human spermatozoa. *Int J Androl.* 2003 Dec;26(6):366-75.
196. Woo AL, James PF, Lingrel JB. Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na, K-ATPase. *J Biol Chem.* 2000;275(27):20693-20699.
197. World Health Organisation. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization. 2010; 287 p.
198. Xie Z, Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. *Eur J Biochem.* 2002;269(10):2434-2439.

199. Zhang L, Liu Z, Li X. et al. Low long non-coding RNA HOTAIR expression is associated with down-regulation of Nrf2 in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia or oligoasthenozoospermia. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8(11):14198–14205.
200. Zhou JH, Zhou QZ, Lyu XM, Zhu T, Chen ZJ, Chen MK, Xia H, Wang CY, Qi T, Li X, Liu CD. The expression of cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) and its specific regulator miR-27b in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia. *Biol Reprod.* 2015;92(1):28.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Meskalo OI, Fafula RV, Lychkovskyj EI, Vorobets ZD. Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. *Біологічні Студії / Studia Biologica*. 2017;11(2):5-12.
2. Fafula RV, Meskalo OI, Lychkovskyu EI, Iefremova UP, Onufrovych OK, Maksymyuk HV, Melnyk OV, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Effect of hydrogen peroxide on Na^+ , K^+ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017;8(4):521-526.
3. Фафула РВ, Мескало ОІ, Личковський ЕІ, Воробець ЗД. Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТР уабайнчутливою Na^+ , K^+ -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків. *Біофізичний вісник*. 2017;38(2):45-53.
4. Фафула РВ, Мескало ОІ, Личковський ЕІ, Воробець ЗД. Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТР Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2017;4(80):46-51.
5. Fafula RV, Meskalo OI, Lychkovskyu EI, Vorobets ZD. Kinetics of inhibitory effect of hydrogen peroxide on activity of plasma membrane transporting Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of sperm cells. *Біологічні Студії / Studia Biologica*. 2018;12(1):17-24.
6. Fafula RV, Meskalo OI, Lychkovskyu EI, Vorobets ZD. Hydrogen peroxide effect on the thapsigargin-sensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of sperm cells. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2018;1(81):33-38.
7. Fafula RV, Meskalo OI, Lychkovskyu EI, Vorobets ZD. The ATP-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in spermatozoa of infertile men with oligo- and asthenozoospermia. *Біологічні Студії / Studia Biologica*. 2018;12(3-4):47-54.

8. Fafula RV, Meskalo OI, Besedina AS, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Kinetic properties of Na^+, K^+ -ATPase of spermatozoa from fertile and infertile men under effect of calix[4]arene C-107. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019;91(3):56-64.
9. Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets ZD. Role of mitochondria in progesterone-evoked intracellular calcium signals in ejaculated spermatozoa from infertile men. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2019;1(85):5-9.
10. Meskalo OI, Fafula RV, Vorobets ZD. Characteristics of $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATP hydrolysis in sperm cells of infertile men. *Studia Biologica*. 2020;14(1):33–40.
11. Meskalo OI, Fafula RV, Iefremova UP, Nakonechnyi IoA, Vorobets DZ. Na, K-ATPase activity in sperm cells of infertile men. XVI International Congress of Medical Sciences; 2017 May 11-14; Sofia, Bulgaria; Abstract Book; 2017, p.110.
12. Fafula R, Meskalo O, Vorobets Z. Disturbance of activities of Ca^{2+} -and Na^+ -ATP-dependent transport systems in spermatozoa of infertile men with different forms of patospermia. 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry; 2017 Sep 18-20; Lublin, Poland; 2017, p.32.
13. Мескало ОІ, Фафула РВ, Личковський ЕІ, Мельник ОВ, Воробець ЗД. Дисфункція $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФаз сперматозоїдів неплідних чоловіків з різними формами патоспермій. Матеріали X Науково-практичної конференції (з міжнародною участю) “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм”; 2017 жовт. 5-6; Тернопіль; 2017, с.30-31.
14. Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets DZ, Vorobets ZD. $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men. XVII International Congress of Medical Sciences; 2018 May 10-13; Sofia, Bulgaria; 2018, p.77-78.

15. Фафула РВ, Мескало ОІ, Воробець ЗД. Особливості гідролізу АТФ тапсигаргін-чутливою компонентою Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази сперматозоїдів неплідних чоловіків за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу. Матеріали XI Науково-практичної конференції (з міжнародною участю) “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм”; 2018 жовт. 4-5; Тернопіль; 2018, с.38-39.

16. Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets ZD. Alterations in Ca^{2+} signals and Ca^{2+} -ATPases activities in spermatozoa in human subjects with different fertility potential. Матеріали XX-го з'їзду Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю; 2019 трав. 27-30; Київ. Фізіологічний журнал; 2019; 65(3 (додаток)):14.

17. Fafula RV, Meskalo OI, Vorobets ZD. Ca^{2+} -signals in response to ATP in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia. 6th Ukrainian congress for cell biology with international representation; 2019 June 18-21; Yaremche, Ukraine; Proceedings; 2019, p.22.

18. Meskalo OI, Fafula RV, Vorobets ZD. Calix[4]arene C-107 effect on kinetic properties of Na^+ , K^+ -ATPase of spermatozoa of men with different form of pathospermia. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу; 2019 вер. 30-жовт. 4; Тернопіль; Медична та клінічна хімія. 2019; 21(3 (80)) (додаток):36-37.

19. Meskalo OI, Fafula RV, Vorobets ZD. Kinetics of Ca^{2+} -transport by ATPases in spermatozoa of infertile men. Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів і аспірантів присвяченої 75 річниці створення біологічного факультету ЛНУ ім. І. Франка та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача; 2020 квіт. 27-29; Львів; Молодь і поступ біології; 2020, с.20-21.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації:

- XVI International Congress of Medical Sciences (Sofia, 11-14 May, 2017) (*форма участі – публікація тез*);
- 8th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Lublin, 18-20 September 2017) (*форма участі – публікація тез*);
- X науково-практична конференція (з міжнародною участю) “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм” (м. Тернопіль, 5-6 жовтня 2017 р.) (*форма участі – публікація тез*);
- XVII International Congress of Medical Sciences (Sofia, 10-13 May 2018) (*форма участі – публікація тез*);
- XI науково-практична конференція (з міжнародною участю) “Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм” (м. Тернопіль, 4-5 жовтня 2018 р.) (*форма участі – публікація тез*);
- XX з’їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю (м. Київ, 27-30 травня 2019 р.) (*форма участі – публікація тез*);
- 6th Ukrainian congress for cell biology with international representation (Yaremche, 18-21 June 2019) (*форма участі – публікація тез*);
- XII Український біохімічний конгрес (м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р.) (*форма участі – публікація тез*);
- XVI Міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів, присвячена 75 річниці створення біологічного факультету ЛНУ ім. І. Франка та 90 річниці від дня народження проф. М.П. Деркача (м. Львів, 27-29 квітня 2020 р.) (*форма участі – публікація тез*).

ДОДАТОК В.1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Буковинського державного
 медичного університету
 професор Олександр ІВАЩУК
 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** активність йон-транспортувальних АТР-гідролазних систем у сперматозоїдах чоловіків із патоспермією.
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Мескало Ольга Іванівна.
3. **Джерело інформації:** Meskalo O.I., Fafula R.V., Lychkovskij E.I., Vorobets Z.D. Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia // *Studia Biologica.* – 2017. – Т. 11, N 2. – С. 5-12.
4. **Де впроваджено:** Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології та генетики
5. **Форма впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** Використання результатів досліджень Мескало О.І. в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення щодо змін ензиматичної активності Na^+ , K^+ -АТРази та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРази в сперматозоїдах неплідних чоловіків із патоспермією.
7. **Терміни впровадження:** 2020-2021 н.р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри
 медичної біології та генетики
 Буковинського державного
 медичного університету,
 доктор медичних наук, професор



Роман БУЛИК

ДОДАТОК В.2

«Затверджую»



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** дисфункція Ca^{2+} , Mg^{2+} - та Na^+ , K^+ -АТФаз в сперматозоїдах неплідних чоловіків з різними формами патоспермій.
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Мескало Ольга Іванівна.
3. **Джерело інформації:**
 1. Meskalo O.I., Fafula R.V., Lychkovskyy E.I., Vorobets Z.D. Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2017. – Т. 11, N 2. – С. 5-12.
 2. Meskalo O.I., Fafula R.V., Vorobets Z.D. Characteristics of Ca^{2+} , Mg^{2+} -dependent ATP hydrolysis in sperm cells of infertile men // Studia Biologica, – 2020. – № 14(1). – Р. 33–40.
4. **Де впроваджено:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра медичної біології.
5. **Форма впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволить розширити знання студентів щодо дисфункції Ca^{2+} , Mg^{2+} - та Na^+ , K^+ -АТФаз в сперматозоїдах неплідних чоловіків з різними формами патоспермій.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 н.р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри медичної біології
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького,
доктор біологічних наук, професор

З.Д. Воробець

ДОДАТОК В.3

«Затверджую»

Директор ННЦ «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету

імені Тараса Шевченка

доктор біологічних наук, професор

Л.І. Остапченко



7 травня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** закономірності інгібувального впливу каліксаренів на гідроліз АТР в сперматозоїдах чоловіків із патоспермією.
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Мескало Ольга Іванівна.
3. **Джерело інформації:**
 1. Fafula R.V., Meskalo O.I., Besedina A.S., Nakonechnyi Io.A., Vorobets D.Z., Vorobets Z.D. Kinetic properties of Na^+, K^+ -ATPase of spermatozoa from fertile and infertile men under effect of calix[4]arene C-107 // Ukrainian Biochemical Journal. – 2019. – Vol. 91, N 3. – P. 56-64.
4. **Де впроваджено:** ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, кафедра біомедицини.
5. **Форма впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** Використання результатів досліджень Мескало О.І. в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення щодо ролі каліксаренів як перспективних молекулярних платформ для створення фізіологічно активних сполук.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 н.р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри біомедицини
 ННЦ «Інститут біології та медицини»
 Київського національного університету
 імені Тараса Шевченка

доктор біологічних наук, лауреат Державної
 премії України в галузі науки і техніки,
 професор

Т.М. Фалалєєва

ДОДАТОК В.4

«Затверджую»
 Проректор з наукової роботи
 Львівського національного
 Медичного університету
 імені Данила Галицького
 професор А.І. Наконечний
 12 червня 2020 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: біофізичні механізми пригнічення йон-транспортуючих АТР-гідролізних систем у сперматозоїдах чоловіків із патоспермією за умов впливу оксидативного стресу і каліксаренів.

2. Установа, автор: Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Мескало Ольга Іванівна.

3. Джерело інформації:

1. Fafula R.V., Meskalo O.I., Besedina A.S., Nakonechnyi Io.A., Vorobets D.Z., Vorobets Z.D. Kinetic properties of Na^+, K^+ -ATPase of spermatozoa from fertile and infertile men under effect of calix[4]arene C-107 // Ukrainian Biochemical Journal. – 2019. – Vol. 91, N 3. – P. 56-64.

2. Fafula R.V., Meskalo O.I., Lychkovskyy E.I., Iefremova U.P., Onufrovyh O.K., Maksymyuk H.V., Melnyk O.V., Nakonechnyi Io.A., Vorobets D.Z., Vorobets Z.D. Effect of hydrogen peroxide on Na^+, K^+ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men // Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2017. – Vol. 8, N. 4. – P. 521-526.

3. Фафула Р.В., Мескало О.І., Личковський Е.І., Воробець З.Д. Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТР уабіччутливою Na^+, K^+ -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків // Біофізичний вісник. – 2017. – Т. 38, № 2. – С. 45-53.

4. Де впроваджено: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра біофізики.

5. Форма впровадження: науково-навчальний процес кафедри.

6. Ефект від впровадження: використання результатів наукових досліджень в навчальному процесі дозволить розширити знання студентів щодо механізмів пригнічення $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ - та Na^+, K^+ -АТРаз у сперматозоїдах чоловіків із патоспермією за умов впливу оксидативного стресу і каліксаренів.

7. Строки впровадження: 2020-2021 н.р.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри біофізики



доц. Личковський Е.І.

ДОДАТОК В.5

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА
IVAN FRANKO NATIONAL UNIVERSITY OF LVIV

БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
вул. Грушевського, 4
Львів, 79005
УКРАЇНА

BIOLOGICAL FACULTY
4, Hrushevsky Str.
Lviv, 79005
UKRAINE

тел./tel.: +38032 2394-153
E-nouma/E-mail: biolog@lnu.edu.ua

18.10 2021 р.

№ 95

**Про впровадження результатів дисертаційної роботи
у навчальний процес**

Джерело впровадження: наукові публікації аспіранта кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України **Мескало Ольги Іванівни** за темою дисертаційної роботи “Функціонування Ca^{2+} , Mg^{2+} - та Na^+ , K^+ -АТФаз в сперматозоїдах чоловіків із патоспермією”, поданої на здобуття ступеня доктора філософії.

Де впроваджується: у навчальний процес кафедри біофізики та біоінформатики Львівського національного університету імені Івана Франка під час викладання:

- 1) нормативних дисциплін «Біофізика мембран» і «Біофізика транспортних процесів»
- 2) вибіркового навчальних дисциплін «Медична біофізика» і «Стрес: біологічні та соціальні аспекти».

Головні положення дисертації, які використовуються у навчальному процесі: У впроваджених матеріалах наведено дані щодо функціонування Ca^{2+} , Mg^{2+} - та Na^+ , K^+ -АТФаз в сперматозоїдах чоловіків із патоспермією. У дисертаційній роботі обґрунтовано, що пригнічення активності Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз у сперматозоїдах неплідних чоловіків призводить до перевантаження цитозолу йонами Na^+ та Ca^{2+} та до порушення Ca^{2+} -гомеостазу, та зумовлює зниження фертилізаційного потенціалу сперматозоїдів.

Отримані дані свідчать, що в сперматозоїдах чоловіків існує тісний функціональний зв'язок між Na^+ , K^+ - та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазами та прооксидантно-антиоксидантною системами у сперматозоїдах неплідних чоловіків. Порушення функціональної активності однієї з систем призводить до дисбалансу інших.

Завідувач кафедри біофізики та біоінформатики,
Львівського національного університету імені Івана Франка,
д.б.н., професор



Андрій БАБСЬКИЙ

Декан біологічного факультету
Львівського національного університету імені Івана Франка,
к.б.н., доцент



Ігор ХАМАР

ДОДАТОК В.6



«Затверджую»

Директор Державної установи

«Інститут спадкової патології НАМН України»

д.мед.н., професор О.З. Гнатейко

15 квітня 2020 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** інтенсивність вільнорадикальних процесів у сперматозоїдах інфертильних чоловіків.
2. **Установа, автор:** Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України, кафедра медичної біохімії, Мескало Ольга Іванівна.
3. **Джерело інформації:**
 1. Fafula R.V., Meskalo O.I., Lychkovskyy E.I., Iefremova U.P., Onufrovych O.K., Maksymyuk H.V., Melnyk O.V., Nakonechnyi Io.A., Vorobets D.Z., Vorobets Z.D. Effect of hydrogen peroxide on Na^+, K^+ -ATPase activity in spermatozoa of infertile men // Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2017. – Vol. 8, N. 4. – P. 521-526.
 2. Фафула Р.В., Мескало О.І., Личковський Е.І., Воробець З.Д. Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТФ убаїнчутливою Na^+, K^+ -АТФ-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків // Біофізичний вісник. – 2017. – Т. 38, № 2. – С. 45-53.
 3. Fafula R.V., Meskalo O.I., Lychkovskyy E.I., Vorobets Z.D. Kinetics of inhibitory effect of hydrogen peroxide on activity of plasma membrane transporting $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase of sperm cells // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2018. – Т. 12, № 1. – С. 17-24.
4. **Де впроваджено:** ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»
5. **Форма впровадження:** науково-навчальний процес кафедри.
6. **Ефект від впровадження:** Використання результатів досліджень Мескало О.І. в науково-навчальному процесі дозволить здобувачам вищої освіти розширити теоретичні уявлення щодо механізмів пригнічення активності Na^+, K^+ -АТРази та $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТРази в сперматозоїдах неплідних чоловіків із патоспермією за умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу.
7. **Строки впровадження:** 2020-2021 н.р.

Відповідальний за впровадження:

Директор
ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»,
доктор медичних наук,
лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки,
заслужений діяч науки і техніки України,
професор

Олег Гнатейко