

О. В. Мельник, М. З. Воробець, Р. В. Фафула, І. В. Коваленко, З. Д. Воробець
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

ПАТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ АРГІНАЗА/NO-СИНТАЗНОЇ СИСТЕМИ В СІМ'ЯНІЙ ПЛАЗМІ ЧОЛОВІКІВ З ІДІОПАТИЧНИМ НЕПЛІДДЯМ

Вступ. Питома вага чоловіків з непліддям постійно зростає як в Україні, так і в усьому світі. За відсутності достовірних етіологічних чинників виникнення непліддя його ідентифікують як ідіопатичне. Воно трапляється у 25–30 % чоловіків. Щодо патохімічних досліджень, то припускається, що в багатьох випадках ідіопатичне непліддя чоловіків спричинене оксидативним стресом. Однак також відомо, що важлива регуляторна роль у підтриманні клітинного гомеостазу належить оксиду азоту як вторинному месенджеру – універсальному регулятору практично всіх фізіологічних функцій організму.

Мета дослідження – з'ясувати функціональну активність ензимів аргіназа/NO-синтазної системи та виявити нові потенційні маркери ідіопатичного непліддя чоловіків.

Методи дослідження. Дослідження проводили на сім'яній плазмі 33 інфертильних чоловіків з ідіопатичним непліддям віком 22–48 років. До контрольної групи увійшли 27 фертильних практично здорових чоловіків того ж віку. В сім'яній плазмі визначали активність таких ензимів, як аргіназа, конститутивна й індукційна ізоформи NO-синтази (cNOS, iNOS), а також концентрацію нітрат- та нітрит-аніонів (NO_3^- , NO_2^-) і малонового діальдегіду (МДА).

Результати й обговорення. При ідіопатичному неплідді чоловіків активність аргінази в сім'яній плазмі зменшилася в 1,6 раза. Одночасно знизилась активність cNOS в 1,3 раза і зросла активність iNOS у 24,6 раза. Виявлене зменшення співвідношення аргіназа/NOS у 3,1 раза засвідчило зниження активності неокисного, аргіназного метаболізму, який конкурує з окисним NO-синтазним метаболізмом L-аргініну. Зниження в сім'яній плазмі співвідношення активності аргіназа/iNOS у 25,7 раза може бути важливим показником розвитку ідіопатичного непліддя. Під час оцінювання інтенсивності функціонування NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну при ідіопатичному неплідді відзначено вірогідне зростання в сім'яній плазмі концентрації NO_3^- в 1,4 раза та зниження NO_2^- в 1,5 раза. Виявлено пряму кореляційну залежність між концентрацією МДА і стабільних метаболітів оксиду азоту – NO_3^- . Продемонстрований прямий кореляційний зв'язок між активністю iNOS та концентрацією МДА в сім'яній плазмі ($r=0,87$) свідчить про те, що при ідіопатичному неплідді iNOS може активувати процеси пероксидації ліпідів.

Висновки. Розвиток ідіопатичного непліддя чоловіків супроводжується змінами активності ензимів аргіназа/NO-синтазної системи, зокрема зниженням активності аргінази та cNOS і зростанням активності iNOS, що свідчать про домінування окисного шляху метаболізму L-аргініну. Зменшення в сім'яній плазмі співвідношення активності аргіназа/iNOS може бути важливим показником розвитку ідіопатичного непліддя.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ідіопатичне непліддя; сім'яна плазма; аргіназа; конститутивна й індукційна ізоформи NO-синтази; малоновий діальдегід.

ВСТУП. У сучасному світі питома вага чоловіків з непліддям постійно зростає. За даними ряду дослідників, чоловічий фактор непліддя в шлюбі становить до 50 % [1–3]. За відсутності достовірних етіологічних чинників виникнення непліддя його називають ідіопатичним [1, 3–7]. Воно трапляється у 25–30 % чоловіків. Згідно з даними ВООЗ, ідіопатичне непліддя – це нездатність пари зачати дитину, при цьому причини порушення фертильності залишаються нез'ясо-

© О. В. Мельник, М. З. Воробець, Р. В. Фафула, І. В. Коваленко, З. Д. Воробець, 2022.

ваними. Підтверджують ідіопатичний генез непліддя у чоловіків, які не мають нащадків протягом 1 року, після виключення низки патологічних станів (відсутність порушень в ендокринній і статевій системах; наявність незначних порушень у вигляді астенозооспермії або нормоспермії; відсутність захворювань, що передаються статевим шляхом; відсутність антиспермальних антитіл і подібності за HLA-антигенами; відсутність генетичних захворювань та ін.). У ряді досліджень встановлено, що відповідна частка випадків ідіопатичного непліддя пов'язана з

наявністю аномальних хромосом, що внаслідок неефективної діагностики виявити зазвичай не вдається [1, 8, 9]. Сперматозоїд, який видається нормальним, може мати ушкодження на рівні ДНК [1, 8, 10].

Вважають, що до порушення сперматогенезу та якості сперми можуть призвести вплив негативних факторів довкілля, професійна шкідливість, нездоровий спосіб життя тощо [1, 6].

Удосконалення схем комплексного клініко-андрологічного, генетичного та біохімічного обстеження пацієнтів з порушенням репродуктивної функції є важливим завданням у діагностиці ідіопатичного непліддя чоловіків.

Щодо патохімічних досліджень, то на даний час припускається, що у 80 % випадків ідіопатичне непліддя чоловіків спричинене оксидативним стресом [1, 7, 11, 12]. Останній розвивається в результаті дисбалансу між продукуванням активних форм кисню (АФК) та антиоксидантною здатністю еякуляту. Так, показано, що в еякуляті чоловіків з ідіопатичним непліддям АФК значно більше, ніж у фертильних чоловіків [7]. Слід відмітити, що сперматозоїди надзвичайно чутливі до оксидативного стресу, що призводить до порушення цілісності мембрани через високий вміст поліненасичених жирних кислот, її проникності, структурних ушкоджень ДНК та апоптозу.

У сім'яній плазмі АФК також можуть генеруватись при лейкоцитоспермії. Так, у чоловіків з тератозооспермією та/або лейкоцитоспермією їх вміст суттєво більший. Підвищений рівень АФК корелює з кількістю морфологічно аномальних сперматозоїдів і лімфоцитів у крові та еякуляті [2, 7].

У сім'яній плазмі фертильних чоловіків наявна необхідна кількість неензиматичних та ензиматичних систем антиоксидантів, які контролюють і запобігають шкідливому впливу АФК. Таким чином, пероксидне ушкодження сперматозоїдів залежить не тільки від надлишкового продукування АФК, але й від ефективності всієї антиоксидантної системи сім'яної плазми [11, 13].

За дії на організм періодично чи систематично шкідливих факторів тонкий баланс між продукуванням АФК та активністю антиоксидантної системи порушується [2, 14, 15].

Окрім важливої ролі про- й антиоксидантної систем у підтриманні клітинного гомеостазу, важлива регуляторна роль належить оксиду азоту (NO) як вторинному месенджеру – універсальному регулятору практично всіх фізіологічних функцій організму. Проте синтез NO у високій концентрації може спричинити розвиток нітрозативного стресу, який зумовлений продукуванням активних форм нітрогену, зокрема пероксинітриту.

Мета дослідження – з'ясувати функціональну активність ензимів аргіназа/NO-синтазної системи та виявити нові потенційні маркери ідіопатичного непліддя чоловіків.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Забір матеріалу – еякуляту – здійснювали в урологічному відділенні та консультативній поліклініці КНП ЛОР “Львівська обласна клінічна лікарня”. Було зібрано детальний анамнез щодо захворювань, а також медикаментозного та хірургічного лікування. Проведено ретельне обстеження сечостатевої системи чоловіків для встановлення критеріїв виключення. Ідіопатичну форму непліддя, що характеризується невивченим етіопатогенезом, діагностували за відсутністю запліднення впродовж 1 року регулярного статевого життя пари та неможливістю з'ясування причини, що викликала хворобу.

Було обстежено 33 інфертильних чоловіків віком 22–48 років. До контрольної групи ввійшли 27 фертильних практично здорових чоловіків того ж віку.

Усі дослідження проводили з належного дозволу Комісії з питань біоетичної експертизи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та письмової згоди пацієнтів.

Спермограму, зокрема концентрацію, рухливість, морфологію сперматозоїдів, оцінювали згідно з рекомендаціями ВООЗ [16].

Активність аргінази лімфоцитів периферичної крові визначали за утворенням сечовини, вміст якої вимірювали за допомогою діагностичного набору відповідно до інструкції фірми-виробника (“Simko”, Україна). Активність аргінази обчислювали і виражали в наномолях сечовини/хв на 1 мг загального протеїну в пробі [17].

Активність Ca^{2+} -залежної конститутивної NO-синтази (cNOS) визначали за окисненням NADPH(H) при наявності 10 мМ CaCl_2 [18]. Активність Ca^{2+} -незалежної індукційної NO-синтази (iNOS) визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище селективний інгібітор індукційної ізоформи – аміногуанідин замість CaCl_2 . Активність NO-синтази виражали в наномолях окисненого NADPH(H⁺)/хв на 1 мг загального протеїну в пробі.

Оксидативний стрес оцінювали шляхом вимірювання концентрації малонового діальдегіду (МДА) в сім'яній плазмі та сперматозоїдах, застосовуючи метод на основі реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою [19].

Кількість нітрит-аніонів (NO_2^-) визначали в сім'яній плазмі в колориметричній реакції з використанням реактиву Гліса, кількість нітрат-

аніонів (NO₃⁻) – бруциновим методом спектрофотометрично [20].

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 стандартна похибка (m). Результати представлено як середнє арифметичне (M) ± стандартна похибка середнього (m). Кількість дослідів (n) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку (кожного разу застосовували сперматозоїди, отримані від одного пацієнта або практично здорового донора).

Достовірність змін між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей параметричних даних встановлювали за t-критерієм Стюдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях становили 0,95, 0,99 та 0,999.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Оскільки субстратом для NO-синтази є L-аргінін [21], ми оцінювали неокисний метаболізм цієї амінокислоти, яка метаболізує під дією ензиму аргінази до сечовини й орнітину. Результати досліджень, проведених на сім'яній плазмі фертильних чоловіків і чоловіків з ідіопатичним непліддям, показали, що активність аргінази при неплідді знижувалася з (11,5±1,8) нмоль/хв·мг протеїну (контроль) до (7,2±1,8) нмоль/хв·мг протеїну, тобто в 1,6 раза (p<0,05) (табл. 1). Пригнічення активності аргінази, яка могла б спричинити обмеження гіперпродукування NO шляхом конкуренції за спільний із NO-синтазою субстрат, створює більш сприятливі умови для функціонування iNOS при патоспермії.

Активність конститутивного біосинтезу NO в сім'яній плазмі чоловіків з ідіопатичним непліддям становила (16,2±2,2) нмоль/хв·мг протеїну і була в 1,3 раза нижчою, ніж у фертильних чоловіків.

Інтенсивність індукцибельного синтезу оксиду нітрогену зростала при ідіопатичному неплідді

у 24,6 раза і становила (27,6±2,9) хв·мг протеїну. Отримані дані свідчать про зниження активності неокисного, аргіназного метаболізму, який конкурує з окисним NO-синтазним метаболізмом L-аргініну. Співвідношення неокисного та окисного метаболізму L-аргініну (аргіназа/NOS) у чоловіків при патології достовірно зменшувалось – у 3,1 раза порівняно з фертильними чоловіками, що вказувало на переважання окисного метаболізму L-аргініну, який призводив до утворення оксиду нітрогену. Показано, що сумарна активність конститутивної та індукцибельної ізоформ NOS при ідіопатичному неплідді була в 1,9 раза вищою, ніж у фертильних чоловіків з нормозооспермією. Це засвідчує вагомую роль NOS в етіології та патофізіології ідіопатичного непліддя.

Слід відмітити, що cNOS, яка є Ca²⁺-залежною, експресується постійно. Натомість iNOS у нормі практично не експресується, експресується тільки при запальних процесах, патологічних станах. З огляду на це, ми вивчали співвідношення аргінази до iNOS. У сім'яній плазмі фертильних чоловіків з нормозооспермією воно становило 10,3, а при ідіопатичному неплідді – 0,4. Таким чином, співвідношення в сім'яній плазмі аргіназа/iNOS може бути важливим показником розвитку ідіопатичного непліддя.

Із цього також випливає, що інгібування iNOS може бути потенційною терапевтичною мішенню при лікуванні даної патології.

Пригнічення активності cNOS у сім'яній плазмі при ідіопатичному неплідді може бути зумовлене зниженням експресії відповідного гена або дисфункцією ензиму за умов патології, порушенням співвідношення субстратів та/або кофакторів, необхідних для функціонування cNOS.

Індукцибельна NOS може активувати процеси пероксидного окиснення ліпідів [2, 21]. Підвищений синтез NO, спричинений індукцією iNOS, призводить до непрямого механізму дії оксиду нітрогену. Ця дія NO опосередковується через його реактивні форми, які є продуктом реакції NO з O₂, O₂⁻ або H₂O₂, і поєднується з посиленням

Таблиця 1 – Показники аргіназа/NO-синтазної системи в сім'яній плазмі чоловіків з ідіопатичним непліддям (M±m)

Показник	Контроль (n=27)	Ідіопатичне непліддя (n=33)
МДА, мкмоль/л	2,3±0,3	3,6±0,4*
Аргіназа, нмоль/хв·мг протеїну	11,5±1,8	7,2±0,8*
cNOS, нмоль/хв·мг протеїну	21,4±2,9	16,2±2,2*
iNOS, нмоль/хв·мг протеїну	1,1±0,02	27,6±2,9*
Відсоток cNOS	95,1	37,0*
Аргіназа/NOS	0,5	0,16*
Аргіназа/iNOS	10,3	0,4*
iNOS/cNOS	0,05	1,7*

Примітка. * – достовірність різниці порівняно з контролем (p<0,05).

утворення реактивних форм кисню [2, 21–24]. Частка фізіологічного конститутивного синтезу оксиду нітрогену (окисного метаболізму L-аргініну за відсотком cNOS) у сім'яній плазмі практично здорових осіб у середньому становила 95,1 %, тоді як у пацієнтів з ідіопатичним непліддям спостерігали виражене зниження даного показника – до 37,0 %.

Проведений кореляційний зв'язок між активністю iNOS та концентрацією МДА в сім'яній плазмі свідчить про те, що при ідіопатичному неплідді iNOS може активувати процеси пероксидації ліпідів (рис. 1). Це підтверджується визначеною кореляційною залежністю між концентрацією МДА як біомаркера пероксидації ліпідів та активністю iNOS у сім'яній плазмі (коефіцієнт кореляції $r=0,87$).

Результати щодо збільшення активності iNOS узгоджуються з даними, отриманими раніше, стосовно зростання активності та експресії iNOS у пацієнтів з іншими формами непліддя [2, 21]. Показано, що iNOS, яка розташована в сім'яниках, бере участь у сперматогенезі й апоптозі клітин Сертолі та Лейдига. З'ясовано, що експресія cNOS у клітинах Сертолі в контролі значно вища, ніж при патоспермії [1, 2, 6]. Вважають, що експресія cNOS у клітинах Сертолі асоційована з розвитком герміногенних клітин [1, 2, 6].

Оксид нітрогену як продукт окисного метаболізму L-аргініну конститутивною та неконститутивною ізоформами NOS зазнає окисно-від-

новних перетворень ензимним і неензимним шляхами з наступним відновленням NO. Основними ланками циклу перетворень NO є нітрозилування протеїнів, його окиснення до нітриту (NO_2^-) та нітрату (NO_3^-), розщеплення нітрозотіолів, а також відновлення NO_2^- і NO_3^- нітрит- та нітратредуктазами відповідно.

Для оцінки інтенсивності функціонування NO-синтазного шляху метаболізму L-аргініну при ідіопатичному неплідді визначали вміст у сім'яній плазмі стабільних метаболітів NO: нітрит- і нітрат-аніонів (табл. 2). При ідіопатичному неплідді концентрація в сім'яній плазмі NO_3^- достовірно зростала в 1,4 раза до $(6,81 \pm 0,72)$ нмоль/мл ($p < 0,05$), а NO_2^- – знижувалася в 1,5 раза до 1,51 нмоль/мл ($p < 0,05$).

Зростання вмісту NO_3^- , який є маркером утворення (супероксид+оксид нітрогену) і нерадикального розпаду пероксинітрит, свідчить, з одного боку, про значне утворення та розпад токсичного пероксинітрит, з іншого – про індукцію як оксидативного, так і нітрозативного стресу (на тлі високої активності iNOS) при ідіопатичному неплідді.

Виявлено пряму кореляційну залежність між концентрацією МДА і стабільних метаболітів NO – нітрат-аніонів (рис. 2).

Пероксинітрит має набагато більшу реакційну здатність порівняно із супероксидним радикалом та NO. Він бере участь у багатьох хімічних реакціях, зокрема у нітруванні залишків тирозину

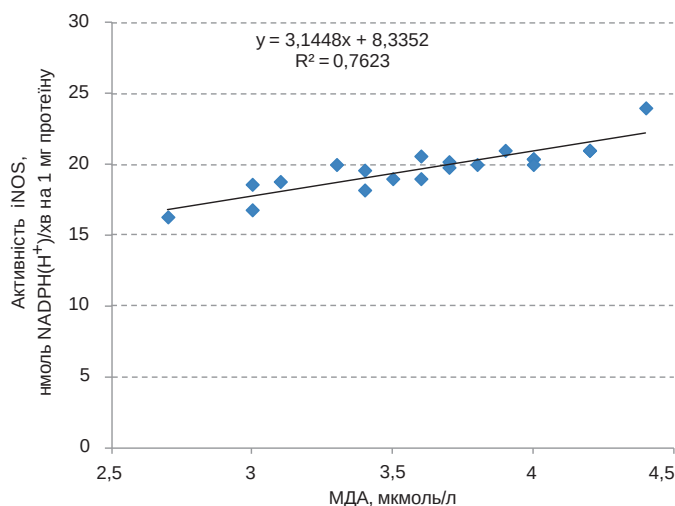


Рис. 1. Кореляційний зв'язок між концентрацією малонового діальдегіду та активністю індукційної NO-синтази в сім'яній плазмі.

Таблиця 2 – Вміст стабільних метаболітів нітрит- і нітрат-аніонів у сім'яній плазмі чоловіків з ідіопатичним непліддям ($M \pm m$)

Пацієнти	Вміст NO_2^- , нмоль/мл	Вміст NO_3^- , нмоль/мл	$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$
Нормозооспермія	$2,32 \pm 0,03$	$4,71 \pm 0,03$	2,0*
Ідіопатичне непліддя	$1,51 \pm 0,22^*$	$6,81 \pm 0,72^*$	4,5*

Примітка. Зміни достовірні щодо величин у практично здорових осіб (* – $p < 0,05$).

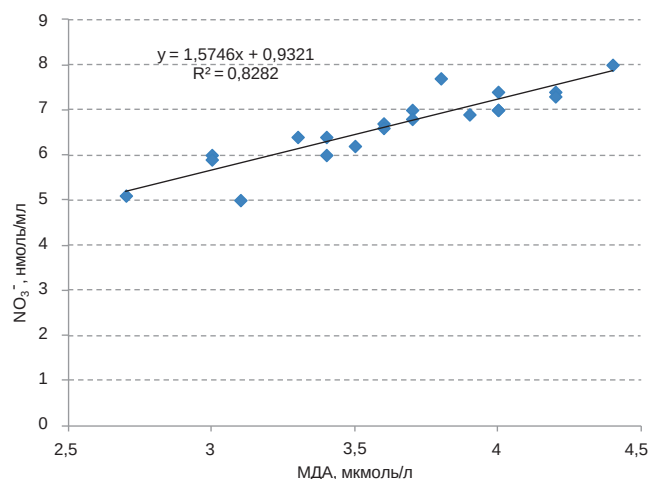


Рис. 2. Кореляційний зв'язок між концентрацією малонового діальдегіду та нітрат-аніонів.

в протеїнах, ініціації пероксидного окиснення ліпідів, порушенні структури ДНК, що спричиняє виникнення мутацій, пригніченні транспорту електронів у мітохондріях тощо. Крім того, активує циклооксигеназу – ключовий фермент синтезу простагландинів, які є потужними медіаторами запалення [2].

Особливе зацікавлення механізмами регуляції кожної з ізоформ ферменту зумовлене тим, що NO викликає плейотропні фізіологічні ефекти.

Оксид азоту також легко вступає в реакцію із супероксидним аніон-радикалом. Реакція NO із супероксид-аніоном (O_2^-) з наступним утворенням пероксинітриту ($ONOO^-$) і гідроксил-радикала (O^-) – це другий шлях метаболізму NO. Дані сполуки є високореакційними вільними радикалами, володіють прооксидантними властивостями та спричиняють деструктивні ефекти щодо протеїнів і ліпідів [2, 7]. Пероксинітрит опосередковує цитотоксичні ефекти NO, такі, як ушкодження ДНК, окиснення ліпопротеїнів низької щільності, – утворення нітрозотіолів і динітрозольних комплексів негемового заліза, які є депривоформою NO.

Рівень активності NOS, аргінази та концентрація NO, поряд з іншими параметрами, можуть свідчити про функціональний стан клітини і бути прогностичними показниками для діагностування та оцінки ефективності фармакотерапії.

У цілому результати, які ми отримали, вказують на порушення аргіназа/NO-синтазної системи в сім'яній плазмі, що призводить до дисбалансу регуляторних систем, зокрема регуляторної функції NO. Підвищення активності iNOS свідчить про гіперпродукування NO. Оксид азоту, що утворюється в надмірній кількості, при патологічних станах організму має, як уже було відмічено, виражену цитотоксичну дію внаслідок

утворення пероксинітриту – продукту взаємодії NO та супероксидного аніон-радикала, здатного до деструкції практично всіх компонентів клітини [2, 23, 24]. Зростання активності iNOS та розвиток оксидативного і нітрозативного стресу – наслідок генерації активних форм кисню та нітрогену, які є високореакційними.

Так, NO з високою спорідненістю взаємодіє із супероксид-аніоном, у результаті чого утворюється пероксинітрит ($ONOO^-$), який має виражені цитотоксичні та мутагенні властивості [2, 23–25]. Зазвичай утворення $ONOO^-$ не значне, оскільки надлишок супероксиду видаляє супероксиддисмутаза, але при оксидативному стресі в організмі складаються всі передумови для продукування $ONOO^-$ у кількості, достатній для виникнення та розвитку патологічних процесів [2].

ВИСНОВКИ. 1. У результаті дослідження активності ферментів аргіназа/NO-синтазної системи в сім'яній плазмі чоловіків з ідіопатичним непліддям виявлено зниження активності неокисного, аргіназного метаболізму, який конкурує з окисним NO-синтазним метаболізмом L-аргініну, та домінування NO-синтазного, що призводить до утворення оксиду нітрогену.

2. Отримані результати свідчать про вагомий роль ізоформ NO-синтази в етіології та патофізіології ідіопатичного непліддя.

3. Кореляційний зв'язок між активністю індукцибельної NO-синтази і концентрацією малонового діальдегіду в сім'яній плазмі свідчить про те, що при ідіопатичному неплідді індукцибельна NO-синтаза може активувати процеси пероксидації ліпідів.

4. Співвідношення в сім'яній плазмі аргіназа/індуцибельна NO-синтаза може бути важливим показником розвитку ідіопатичного непліддя.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мужское бесплодие: этиология, патогенез, классификация, диагностика и методы лечения / И. И. Горпинченко, В. П. Стусь, Д. И. Малышкин, Н. Ю. Полион. – Днепр : ООО “Акцент ПП”, 2016. – 344 с.
2. Фафула Р. В. Біохімічні механізми зниження фертилізаційного потенціалу сперматозоїдів чоловіків за різних форм патоспермії / Р. В. Фафула, Д. З. Воробець, З. Д. Воробець. – Львів : Кварт, 2020. – 200 с.
3. Understanding male infertility for promising ART / M. H. Zargar, F. Ahmad, M. Lateef, T. M. Malla // *Infertility and Assisted Reproduction*. – 2021. – **141**. – P. 1–10. DOI: 10.5772/intechopen.98504.
4. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility // A. Bracke, K. Peeters, U. Punjabi [et al.] // *Reproductive Bio Medicine Online*. – 2018. – **36** (3). – P. 327–339.
5. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm: a case-control study // Q. Tang, F. Pan, J. Yang [et al.] // *Clin. Epigenet.* – 2018. – **10**. – 134. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0568-y>
6. Kashanian J. A. Male infertility / J. A. Kashanian, R. E. Brannigan // *Free JAMA*. – 2015. – **313** (7). – P.1770–1779. DOI:10.1001/jama/jama.2015.3222
7. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? / G. Aktan, S. Dogru-Abbaso, A. Kadioglu [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – **99** (5). – P. 1211–1215. DOI:10.1016/j.fertnstert.2012.11.045
8. Pathogenic landscape of idiopathic male infertility: new insight towards its regulatory networks / N. Kothandaraman, A. Agarwal, M. Abu-Elmagd, M. Al-Qahtani // *Genomic Medicine*. – 2016. – **1**. – 16023. DOI:10.1038/npgenmed.2016.23
9. Editorial: Male idiopathic infertility: novel possible targets, Volume I / R. Cannarella, R. A. Condorelli, D. Jezek, A. E. Calogero // *Front. Endocrinol.* – 2021. – **12** (1). – 797228. DOI: 10.3389/fendo.2021.797228
10. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress / R. Smith, H. Kaune, D. Parodi [et al.] // *Rev. Med. Chil.* – 2007. – **135**. – P. 279–286.
11. Ayaz A. Impact of precise modulation of reactive oxygen species levels on spermatozoa proteins in infertile men / A. Ayaz, A. Agarwal, R. Sharma // *Clinical Proteomics*. – 2015. – **12** (4). – P. 224–240.
12. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa / R. J. Aitken, Z. Gibb, M. A. Baker, J. Drevet, P. Gharagozloo // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2016. – **28**. – 1. DOI: 10.1071/RD15325
13. A unique view on male infertility around the globe / A. Agarwal, A. Mulgund, A. Hamada, M. R. Chyatte // *Reproductive Biology and Reproductology*. – 2015. – **37** (13). – P. 1–9. DOI: 10.1186/s12958-015-0032-1.
14. Prooxidant/antioxidant balance in sperm cells of infertile men / R. V. Fafula, O. K. Onufrovych, U. P. Iefremova [et al.] // *Світ медицини та біології*. – 2018. – 4 (66). – С. 120-124. DOI: 10.26724/2079-8334-2018-4-66-120-124
15. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: correlation with semen parameter / F. Ben Abdallah, I. Dammak, H. Attia [et al.] // *J. Clin. Lab. Anal.* – 2009. – **23**. – P. 99–104.
16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. – WHO Press, 2010.
17. Шугалей В. С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду / В. С. Шугалей, А. С. Козина // *Физиол. журн. СССР*. – 1997. – № 8. – С. 1199–1202.
18. Giraldez R. R. An improved assay for measurement of nitric oxide synthase activity in biological tissues / R. R. Giraldez, J. L. Zweier // *Anal. Biochem.* – 1998. – 261 (1). – P. 29–35. DOI: 10.1006/abio.1998.2721.
19. Hsieh Y.-Y. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility / Y.-Y. Hsieh, Ch.-Ch Chang, Ch.-Sh Lin // *Int. J. Biol. Sci.* – 2006. – **2** (1). – P. 23–29.
20. Лаповець Л. Є. Клінічна лабораторна діагностика : навч. посіб. / Л. Є. Лаповець, Б. Д. Луцик, Г. Б. Лебедь. – К. : Медицина, 2018. – 288 с.
21. The peculiarities of arginase pathway of L-arginine metabolism in spermatozoa of men with different forms pathospermia / R. V. Fafula, O. K. Onufrovych, U. P. Iefremova [et al.] // *Intern. J. of Physiology and Pathophysiology*. – 2017. – **8** (4). – P. 309–318. DOI: 10.1615/IntJPhysPathophys.v8.i4.30
22. Glutathione content in sperm cells of infertile men / R. V. Fafula, O. K. Onufrovych, U. P. Iefremova // *Regulatory Mechanism in Biosystems*. – 2017. – **8** (2). – P. 157–161. DOI: <https://doi.org/10.15421/021725>
23. Nitric oxide levels and total antioxidant capacity in the seminal plasma of infertile smoking men / Y. Yousefniapasha, G. Jorsaraei, M. Gholinezhadchari [et al.] // *Cell Journal*. – 2015. – **17** (1). – P. 129–136.
24. Role of reactive nitrogen species in male infertility / S. B. Doshi, K. Khullar, R. K. Sharma, A. Agarwal // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2012. – **10**. – Article 109.
25. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) T-786C, 4a4b, and G894T Polymorphisms and Male Infertility: Study for Idiopathic Asthenozoospermia and Meta-Analysis1 / P. Song, S. Zou, H. Jiang, T. Chen [et al.] // *Biology of Reproduction*. – 2015. – **92** (2). – P. 1–9. DOI 10.1095/biolreprod.114.123240

REFERENCES

1. Horpinchenko, I.I., Stus, V.P., Malyskin, D.I., Polyon, N.Yu. (2016). *Male infertility: etiology, pathogenesis, classification, diagnostics and treatment methods*. Dnipro: OOO Aksent. 2016. [in Russian].
2. Fafula, R.V., Vorobets, D.Z., Vorobets, Z.D. (2020). *Biochemical mechanisms of reduction of the fertilization potential of male spermatozoa in various forms of pathospermia*. Lviv: Kvant [in Ukrainian].
3. Zargar, M.H., Ahmad, F., Lateef, M., Malla, T.M. (2021). Understanding male infertility for promising ART. *Infertility and Assisted Reproduction*, 141, 1-10. DOI: 10.5772/intechopen.98504.
4. Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D., Dewilde, S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive Bio-Medicine Online*, 36 (3), 327-339.
5. Tang, Q., Pan, F., Yang J. (2018). Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm: a case-control study. *Clin. Epigenet.*, 10, 134. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0568-y>
6. Kashanian, J.A., Brannigan, R.E. (2015). Male Infertility. *Free JAMA*, 313 (7), 1770-1779. DOI: 10.1001/jama/jama.2015.3222
7. Aktan, G., Dogru-Abbaso, S., Kadioglu A. (2013). Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertil. Steril.* 99 (5), 1211-1215. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.045
8. Kothandaraman, N., Agarwal, A., Abu-Elmagd, M., Al-Qahtani, M. (2016). Pathogenic landscape of idiopathic male infertility: new insight towards its regulatory networks. *Genomic Medicine*, 1, 16023. doi:10.1038/npi-genmed.2016.23
9. Cannarella, R., Condorelli, R.A., Jezek, D., Calogero, A.E. (2021). Editorial: Male idiopathic infertility: novel possible targets, Volume I. *Front. Endocrinol.*, 12 (1), 797228. DOI: 10.3389/fendo.2021.797228
10. Smith, R., Kaune, H., & Parodi, D. (2007). Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for infertility. Relationship with oxidative stress. *Rev. Med. Chil.*, 135, 279-286.
11. Ayaz, A., Agarwal, A., Sharma R. (2015). Impact of precise modulation of reactive oxygen species levels on spermatozoa proteins in infertile men. *Clinical Proteomics*, 12 (4), 224-240.
12. Aitken, R.J., Gibb, Z., Baker, M.A., Drevet, J., Gharagzloo P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 28, 1. DOI:10.1071/RD15325
13. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M.R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Reproductology*, 37 (13), 1-9. DOI: 10.1186/s12958-015-0032-1.
14. Fafula, R.V., Onufrovych, O.K., Iefremova, U.P., Vorobets, M.Z., Nakonechnyi, I.A., Melnyk, O.V., Fedorovych, Z.Ya., Vorobets, Z.D. (2018). Prooxidant/antioxidant balance in sperm cells of infertile men. *World of Medicine and Biology*, 4 (66), 120-124. DOI: 10.26724/2079-8334-2018-4-66-120-124
15. Ben Abdallah, F., Dammak, I., Attia H. (2009). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in infertile men: correlation with semen parameter. *J. Clin. Lab. Anal.*, 23, 99-104.
16. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 5th ed. WHO Press, 2010.
17. Shugaley, V.S., Kozina, A.S. (1977). Soderzhaniye mocheviny i aktivnost' arginazy v organakh krysi pri akklimatizatsii k kholodu. *Physiol. Journal of USSR*, 8, 1199-1202 [in Russian].
18. Giraldez, R.R., Giraldez, R.R., J.L. Zweier J.L. (1998). An improved assay for measurement of nitric oxide synthase activity in biological tissues. *Anal. Biochem.*, 261 (1), 29-35. DOI: 10.1006/abio.1998.2721.
19. Hsieh, Y.-Y., Chang, Ch.-Ch., Lin, Ch.-Sh. (2006). Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int. J. Biol. Sci.*, 2 (1), 23-29.
20. Lapovets, L.E., Lutsyk, B.D., Lebed, G.B. (2018). *Clinical laboratory diagnostics: study guide*. Kyiv: Medicine [in Ukrainian].
21. Fafula, R.V., Onufrovych, O.K., Iefremova, U.P., Vorobets, D.Z., Melnyk, O.V., Vorobets Z.D. (2017). The peculiarities of arginase pathway of L-arginine metabolism in spermatozoa of men with different forms pathospermia. *Intern. J. of Physiology and Pathophysiology*, 8 (4), 309-318. DOI: 10.1615/IntJPhysPathophys.v8.i4.30
22. Fafula, R.V., Onufrovych, O.K., Iefremova, U.P., Melnyk, O.V., Vorobets, D.Z., Vorobets, Z.D. (2017). Glutathione content in sperm cells of infertile men. *Regulatory Mechanism in Biosystems*, 8 (2), 157-161. DOI: <https://doi.org/10.15421/021725>
23. Yousefnipasha, Y., G. Jorsaraei, G., Gholinezhadchari M. (2015). Nitric oxide levels and total antioxidant capacity in the seminal plasma of infertile smoking men. *Cell Journal*, 17 (1), 129-136.
24. Doshi, S.B., Khullar, K., Sharma, R.K., Agarwal A. (2012). Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 10, Article 109.
25. Song, P., Zou, S., Jiang, H., Chen T. [et al.] (2015). Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) T-786C, 4a4b, and G894T polymorphisms and male infertility: study for Idiopathic asthenozoospermia and meta-analysis1. *Biology of Reproduction*, 92 (2), 1-9. DOI 10.1095/biolreprod.114.123240

PATHOGENETIC FEATURES OF THE FUNCTIONING OF THE ARGINASE/ NO-SYNTHASE SYSTEM IN SEMINAL PLASMA OF MEN WITH IDIOPATHIC INFERTILITY

Summary

Introduction. The specific gravity of men with infertility is constantly increasing both in Ukraine and throughout the world. In the absence of reliable etiological factors of its occurrence, infertility is identified as idiopathic. It occurs in 25–30 % of men. As for pathochemical studies, it is assumed that in many cases idiopathic male infertility is caused by oxidative stress. However, it is also known that an important regulatory role in maintaining cellular homeostasis belongs to nitric oxide as a secondary messenger – a universal regulator of almost all physiological functions of the body.

The aim of the study – to find out the functional activity of the enzymes of the arginase/NO-synthase system and to identify new potential markers of idiopathic male infertility.

Research Methods. The study was conducted on the seminal plasma of 33 infertile men with idiopathic infertility aged 22–48. The control group included 27 fertile healthy men of the same age. The activity of such enzymes as arginase, constitutive and inducible isoforms of NO-synthase, as well as concentrations of nitrate and nitrite anions and malondialdehyde were studied in seminal plasma.

Results and Discussion. It was found that with idiopathic male infertility, arginase activity in seminal plasma decreases by 1.6 times. At the same time, cNOS activity decreased by 1.3 times and iNOS activity increased by 24.6 times. The detected decrease in the arginase/iNOS ratio by 3.1 times indicates a decrease in the activity of non-oxidative, arginase metabolism, which competes with the oxidative NO-synthase metabolism of L-arginine. A 25.7-fold decrease in the ratio of arginase/iNOS activity in seminal plasma can be an important indicator of the development of idiopathic infertility. When evaluating the intensity of functioning of the NO-synthase pathway of L-arginine metabolism in idiopathic infertility, a probable increase in seminal plasma NO_3^- by 1.4 times and a decrease in NO_2^- by 1.5 times were found. A direct correlation between MDA concentrations and stable metabolites of NO – nitrate (NO_3^-) anions was revealed. The demonstrated direct correlation between iNOS activity and MDA concentration in seminal plasma ($r=0.87$) indicates that iNOS can activate lipid peroxidation processes in idiopathic infertility.

Conclusions. The development of idiopathic male infertility is accompanied by changes in the activity of enzymes of the arginine/NO-synthase system – a decrease in the activity of arginase and cNOS and an increase in the activity of iNOS, which indicates the dominance of the oxidative pathway of L-arginine metabolism. A decrease in the ratio of arginase/iNOS activity in seminal plasma can be an important indicator of the development of idiopathic infertility.

KEY WORDS: idiopathic infertility; seminal plasma; arginase; cNO-synthase; iNO-synthase; malondialdehyde.

Отримано 10.08.22

Адреса для листування: О. В. Мельник, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: viruszet8@gmail.com.