

М. З. Воробець, О. К. Онуфрович, З. Д. Воробець, А. С. Беседіна,  
О. В. Мельник, Р. В. Фафула, Д. З. Воробець

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗНИКІВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ В ЧОЛОВІКІВ, ПОСТРАЖДАЛИХ ВНАСЛІДОК БОЙОВИХ ДІЙ

**Вступ.** У ряді робіт встановлено, що оксидативний стрес призводить до зниження запліднювальної здатності сперматозоїдів, їх ушкодження та є одним із чинників, пов'язаних з чоловічим непліддям. У нормі підтримується баланс між прооксидантними й антиоксидантними процесами. За патологічного стану він порушується в напрямку неконтрольованої генерації вільних радикалів. Антиоксидантна захисна система включає як ензимні, так і неензимні компоненти, які знешкоджують активні форми кисню та вільні радикали, і захищає від надмірного впливу оксидативного стресу.

**Мета дослідження** – оцінити стан пероксидації ліпідів і неензиматичної ланки глутатіонової антиоксидантної системи лімфоцитів та сироватки периферичної крові у чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій (осколкові й кульові поранення).

**Методи дослідження.** Дослідження проводили на лімфоцитах і сироватці периферичної крові чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій, оскільки лімфоцити вважають "метаболічним дзеркалом" організму і вони оперативно реагують на всі зовнішні та внутрішні впливи. Визначали концентрацію малонового діальдегіду, загальну антиоксидантну активність, концентрацію відновленого, загального й окисненого глутатіону.

**Результати й обговорення.** Концентрація відновленого глутатіону в сироватці крові чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій, 1-ї вікової групи (20–39 років) знижувалася в 1,4 раза, а 2-ї (40–53 роки) – в 1,6 раза щодо контрольних значень. Концентрація загального глутатіону зменшувалася у постраждалих обох вікових груп в 1,2 раза. При цьому достовірних змін концентрації окисненого глутатіону не було виявлено. Визначення аналогічних показників неензиматичної ланки глутатіонової антиоксидантної системи у лімфоцитах крові показало подібні закономірності, що й у сироватці крові. Обчислення редокс-індексу (RI GSH) продемонструвало зниження сумарної потужності антиоксидантної системи у лімфоцитах крові чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій, в 1,5 раза щодо практично здорових чоловіків.

**Висновки.** У чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій (осколкові й кульові поранення), які перебувають на стаціонарному лікуванні, як у лімфоцитах, так і в сироватці крові інтенсифіковані процеси пероксидації ліпідів, знижена концентрація відновленого глутатіону та зменшене співвідношення відновленого глутатіону до окисненого, що свідчить про порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в бік наростання прооксидантних процесів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** чоловіки, постраждали внаслідок бойових дій; відновлений глутатіон; загальний глутатіон; окиснений глутатіон; малоновий діальдегід; загальна антиоксидантна активність.

ВСТУП. Окрім основних причин чоловічого непліддя, таких, як уроджені дефекти й аномалії будови органів сечостатевої системи, варикоцеле, інфекції, обструктивні ураження, кістозний фіброз, порушення гормонального статусу, поява аутоімунних антиспермальних антитіл, травми та пухлини, важливою причиною вважають також оксидативний стрес [1–11]. Останній виникає внаслідок дисбалансу між утворенням активних форм кисню (АФК) та активністю систем антиоксидантного захисту [12–18].

© М. З. Воробець, О. К. Онуфрович, З. Д. Воробець, А. С. Беседіна, О. В. Мельник, Р. В. Фафула, Д. З. Воробець, 2023.

Згідно із сучасними уявленнями, розвиток патологічних процесів в організмі, зокрема пов'язаних з непліддям, супроводжується порушенням механізмів антиоксидантного захисту клітин [19–25].

Зв'язок між чоловічим непліддям, зумовленим дисфункцією сперматозоїдів, та оксидативним стресом не викликає сумнівів. У ряді робіт встановлено, що оксидативний стрес призводить до зниження запліднювальної здатності сперматозоїдів, їх ушкодження та є одним із чинників, пов'язаних з чоловічим непліддям [1, 4, 5, 26–29].

Згідно із сучасними літературними даними, АФК можуть бути фактором, що спричиняє 30–

80 % чоловічого непліддя, пов'язаного з ушкодженням сперматозоїдів [7, 18, 27, 28]. У нормі підтримується баланс між прооксидантними й антиоксидантними процесами. За патологічного стану він порушується в напрямку неконтрольованої генерації вільних радикалів. Відомо, що АФК є вільнорадикальними похідними кисню, які мають високу реакційну здатність [13, 16].

Найбільш потужним внутрішнім джерелом АФК є лейкоцити, наявні в спермі (в основному – поліморфноядерні лейкоцити і макрофаги). Коли лейкоцити активуються різними внутрішньо- або позаклітинними стимулами, такими, як інфекція та запалення, вони можуть продукувати АФК у кількості, яка на 2–3 порядки більша, ніж в аеробному метаболізмі [14, 28].

Активні форми кисню, що продукуються лейкоцитами, можуть спричиняти ушкодження структури ДНК сперматозоїдів [29, 30]. Ушкодження ДНК сперматозоїдів призводить до зниження показників запліднення, погіршення ембріонального розвитку та збільшення ризику викидня.

Патофізіологічні стани, що викликають системний оксидативний стрес організму, пов'язані з оксидативним ушкодженням сперматозоїдів та зниженням їх фертилізаційного потенціалу [9, 13].

До екзогенних факторів впливу належать шкідливі звички та спосіб життя, тютюнокуріння і надмірне вживання алкоголю, а також вплив чинників навколишнього середовища (іонізуюча та неіонізуюча радіація, токсини тощо) [5]. Ці фактори можуть тимчасово або постійно спричинити порушення сперматогенезу, знижують рухливість сперматозоїдів у чоловічому і жіночому репродуктивному тракті, призводять до порушення структури та функцій сперматозоїдів (акросомної реакції, злиття з яйцеклітиною). Важливими факторами, що можуть викликати оксидативний стрес, є травми, осколкові й кульові поранення, нервові розлади [26].

Розвитку оксидативного стресу та процесам вільнорадикального окиснення за фізіологічних умов перешкоджає складна багатокomпонентна система антиоксидантного захисту. Вона перериває ланцюгові вільнорадикальні реакції, елімінує АФК до нетоксичних продуктів. Антиоксидантна захисна система включає як ензимні, так і неензимні компоненти, які знешкоджують АФК та вільні радикали, і захищає від надмірного впливу оксидативного стресу [3, 13, 19, 20, 22, 31–33].

Для вивчення біохімічних змін, що відбуваються в організмі при дії на нього різних екзогенних чинників, найбільш адекватною моделлю можуть слугувати лімфоцити периферичної

крові, які здатні об'єктивно відображати зміни метаболічного гомеостазу організму [14, 28].

Мета дослідження – оцінити стан пероксидації ліпідів і неензиматичної ланки глутатионової антиоксидантної системи лімфоцитів та сироватки периферичної крові у чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій (осколкові й кульові поранення).

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Основу роботи становили результати дослідження показників про- та антиоксидантної системи лімфоцитів і сироватки крові у 68 чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій (осколкові й кульові поранення). Для виділення лімфоцитів забір периферичної крові у пацієнтів проводили після попереднього завершення їх клінічного обстеження, перед призначенням їм курсу лікування.

Крім того, у дослідженні взяли участь 48 практично здорових чоловіків, які становили референтну групу. В них не було скарг на сексуальну дисфункцію чи кардіологічну, неврологічну або ж ендокринологічну патологію. Серед чоловіків контрольної групи – 30 чоловіків віком 20–39 років і 18 чоловіків віком 40–55 років.

Лімфоцити периферичної крові виділяли за модифікованим методом А. Воуит [34]. Кров, розведена в співвідношенні 1:1 фізіологічним розчином, нашаровували у градієнті густини фікол-тріумбасту ( $\rho=1,08 \text{ г/см}^3$ ) і центрифугували при 500 g протягом 20 хв. Зняті інтерфазні кільця мононуклеарних клітин двічі відмивали впродовж 10 хв фізіологічним розчином.

Після останнього центрифугування до осаду додавали невелику кількість фізіологічного розчину, ресуспензували та, за допомогою трипанового синього, проводили підрахунок кількості живих і мертвих клітин у камері Горяєва. Цілісність і життєздатність лімфоцитів крові в усіх дослідах становили не менше 95 %.

Для пермеабілізації мембран лімфоцитів крові та розкриття латентних ензиматичних активностей до суспензії додавали сапонін [14, 21]. Лімфоцити крові інкубували впродовж 10 хв при помірному струшуванні в розчині, який містив сапонін у концентрації 0,2 % (оптимальна концентрація) [14, 21].

Сироватку отримували з крові, відібраної в одноразові пробірки без антикоагулянту. Для цього кров витримували при кімнатній температурі протягом 30 хв до повного утворення згустку або поміщали у термостат при 37° С на 15 хв. Після цього центрифугували при 1200–2000 g упродовж 15 хв.

Стан пероксидації ліпідів оцінювали за концентрацією малонового діальдегіду (МДА). Принцип методу її визначення полягає в тому,

що при високій температурі в кислому середовищі він реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиленовий комплекс із максимумом поглинання при  $\lambda=532$  нм [17, 35].

Вміст загального глутатіону (GSht) визначали в суспензії клітин після повного відновлення глутатіону за допомогою глутатіонредуктази ("Sigma", США) з використанням реактиву Елмана [23, 36].

Ензимну реакцію ініціювали шляхом додавання глутатіонредуктази (1,9 од., 0,037 мл 50 U/ml), і реєстрували рівень утворення 5,5'-дітіо-біс-2-нітробензойної кислоти спектрофотометрично при 412 нм кожні 30 с протягом 120 с. Стандартні розчини виготовляли з відновленого глутатіону. Для визначення вмісту окисненого глутатіону (GSSG) за 60 хв до визначення в інкубаційну суміш додавали 2-вінілпіридин до кінцевої концентрації 2 %, а вміст відновленого глутатіону (GSH) обчислювали як різницю концентрацій загального та окисненого глутатіону. Редокс-індекс (RI) GSH обраховували як співвідношення  $([GSht]-[GSSG])/[GSht]$ .

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення ( $M$ ), стандартна похибка ( $m$ ) та середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ). Достовірність змін встановлювали за  $t$ -критерієм Ст'юдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях брали рівними 0,95, 0,99 та 0,999.

Результати представлено як середнє арифметичне ( $M$ )  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $m$ ). Кількість дослідів ( $n$ ) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку (кожного разу використовували лімфоцити крові від одного пацієнта або практично здорового донора).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Стан неензиматичної компоненти антиоксидантної системи у сироватці крові оцінювали за вмістом відновленого, загального й окисненого глутатіону і редокс-індексом глутатіону, обчисленим за співвідношенням різниці загального та окисненого глутатіону до загального.

При вивченні окремих неензиматичних компонентів глутатінової антиоксидантної системи у сироватці крові чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій, було з'ясовано, що загальна антиоксидантна активність знижувалася в обох вікових групах в 1,2 раза, проте ці зміни не були статистично достовірними ( $p>0,05$ ) (табл. 1).

Концентрація відновленого глутатіону в чоловіків 1-ї вікової групи знижувалася в 1,4 раза, 2-ї – в 1,6 раза ( $p<0,05$ ). Вміст загального глутатіону достовірно зменшувався в постраждалих обох вікових груп в 1,2 раза ( $p<0,05$ ;  $p<0,001$ ). При цьому достовірних змін концентрації окисненого глутатіону не виявлено.

Різде зниження концентрації відновленого глутатіону і його співвідношення до окисненого глутатіону в сироватці крові свідчить про посилене його використання.

Обчислення редокс-індексу (RI GSH) не виявило змін сумарної потужності антиоксидантної системи у сироватці крові чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій, щодо контрольних значень.

Визначення аналогічних показників неензиматичної ланки глутатінової антиоксидантної системи у лімфоцитах крові показало подібні закономірності, що й у сироватці крові (табл. 2).

Однак у лімфоцитах менш чітко виражена різниця у співвідношенні відновленого глутатіону до окисненого у чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій, щодо контрольних значень. На відміну від цього, обчислення редокс-індексу (RI GSH) продемонструвало

Таблиця 1 – Показники про- та антиоксидантної неензиматичної системи у сироватці крові чоловіків ( $M \pm m$ )

Показник	Група чоловіків			
	чоловіки, постраждали внаслідок бойових дій		контроль (практично здорові чоловіки)	
	20–39 років (n=42)	40–53 роки (n=26)	20–39 років (n=30)	40–55 років (n=18)
МДА, мкмоль/мг протеїну	38,6 $\pm$ 3,5*	42,4 $\pm$ 3,3*	28,2 $\pm$ 3,1	31,1 $\pm$ 3,3
Загальна антиоксидантна активність, мкмоль/мг протеїну	0,99 $\pm$ 0,12	0,98 $\pm$ 0,12	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1
GSH, нмоль/мг протеїну	13,7 $\pm$ 1,5*	11,2 $\pm$ 1,15***	19,9 $\pm$ 1,4	17,8 $\pm$ 1,2
GSht, нмоль/мг протеїну	16,6 $\pm$ 1,6	16,1 $\pm$ 1,5	19,8 $\pm$ 1,9	19,6 $\pm$ 1,8
GSSG, нмоль/мг протеїну	1,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2
GSH/GSSG	9,8	7,0	16,6	13,7
RI GSH	0,9	0,9	0,9	0,9

Примітка. Зміни достовірні щодо величин в осіб контрольної групи (\* –  $p<0,05$ ; \*\*\* –  $p<0,001$ ).

Таблиця 2 – Показники про- та антиоксидантної неензиматичної системи у лімфоцитах крові чоловіків (M±m)

Показник	Група чоловіків			
	чоловіки, постраждали внаслідок бойових дій		контроль (практично здорові чоловіки)	
	20–39 років (n=42)	40–53 роки (n=26)	20–39 років (n=30)	40–55 років (n=18)
МДА, мкмоль/мг протеїну	78,4±5,8*	87,6±6,3**	61,5±4,3	63,2±5,7
Загальна антиоксидантна активність, мкмоль/л	2,8±0,2**	2,4±0,1***	3,6±0,2	3,4±0,2
GSH, мкмоль/л	18,4±1,8**	18,3±1,5*	27,8±2,9	26,3±2,8
GSHt, мкмоль/л	34,1±4,9*	35,4±3,4**	50,1±4,9	51,3±4,9
GSSG, мкмоль/л	18,8±2,0	18,9±2,0	19,9±2,2	20,5±2,2
GSH/GSSG	1,2	1,1	1,4	1,3
RI GSH	0,4	0,4	0,6	0,6

Примітка. Зміни достовірні щодо величин в осіб контрольної групи (\* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001).

зниження сумарної потужності антиоксидантної системи у лімфоцитах крові чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій, в 1,5 раза (p<0,01; p<0,001) щодо практично здорових чоловіків. Достовірних змін концентрації окисненого глутатіону, як і у випадку із сироваткою крові, не виявлено.

Важливим фактором у патогенезі цілого ряду захворювань є співвідношення антиоксидантної системи до прооксидантних показників, що відоме як антиоксидантний статус клітини. Про- та антиоксидантні системи перебувають у стані динамічної рівноваги, а порушення цієї рівноваги спричиняє оксидативний стрес. Більшість патологічних станів і захворювань характеризується посиленням вільнорадикальних процесів і зниженням антиоксидантної здатності [3, 7, 12, 13].

Вміст МДА, який є кінцевим продуктом пероксидного окиснення ліпідів, використовується як індикатор оксидативного стресу, що відображає ступінь ушкодження ліпідів унаслідок впливу АФК [14, 21].

Отримані дані узгоджуються з іншими, які показали зростання рівня МДА та зниження концентрації відновленого глутатіону в сім'яній плазмі при окремих формах патоспермії [14, 21]. Вільнорадикальні процеси найінтенсивніше відбуваються у патозооспермічних зразках чоловіків з лейкоцитоспермією. Встановлений факт, на нашу думку, можна пояснити тим, що лейкоцити можуть генерувати АФК у високій концентрації [14, 28]. Збільшення вмісту АФК при лейкоцитоспермії зумовлене прямою взаємодією лейкоцитів зі сперматозоїдами або виділенням лейкоцитами розчинних продуктів, що діють на сперматозоїди.

Крім того, високий рівень вільних радикалів, що утворюються внаслідок патогенного впливу мікроорганізмів, може знижувати запліднювальну здатність сперматозоїдів [13, 29].

З огляду на те, що GSH не тільки захищає клітини від токсичних вільних радикалів, але й у цілому визначає окисно-відновні характеристики внутрішньоклітинного середовища, зменшення вмісту GSH свідчить про пригнічення антиоксидантної здатності. Це призводить до збільшення утворення АФК, подальшого виснаження пулу біоантиоксидантів і підвищення пероксидного окиснення ліпідів, що спричиняє порушення структури та функцій клітин. Антиоксидантні властивості GSH зумовлені його прямою взаємодією з АФК та функціонуванням глутатіонозалежних ензимів, таких, як глутатіонпероксидаза і глутатіон-S-трансфераза. Останні використовують GSH як субстрат. Відтак виснаження його пулу призводить до пригнічення активності глутатіонпероксидази і глутатіон-S-трансферази.

Порушення у системі глутатіону в сперматозоїдах є одним з патогенетичних механізмів, що пов'язані з непліддям [14, 21, 33]. Зниження активності ензимів глутатіонової ланки вказує на виснаження компенсаторних механізмів у сперматозоїдах інфертильних чоловіків з різними формами патоспермії. Визначення показників глутатіонової антиоксидантної системи при різних формах патоспермії може бути важливим допоміжним критерієм у діагностиці чоловічого непліддя та оцінці ефективності його лікування специфічними антиоксидантними засобами. Також визначення вмісту GSH, співвідношення GSH/GSSG, активності глутатіонозалежних ензимів можна використовувати як додатковий біохімічний показник для оцінки фертилізаційного потенціалу сперматозоїдів.

Зменшення вмісту GSH у сперматозоїдах чоловіків з непліддям, отримане в наших експериментах раніше, було зумовлене низькою активністю глутатіонредуктази, що вказувало на інактивацію регенерації GSH. Відомо, що глутатіонредуктаза використовує NADPH (як джерело



відновних еквівалентів), вміст якого зменшується за умов оксидативного стресу [30, 33]. Відомо також, що GSH утворюється не лише внаслідок його біосинтезу *de novo*, а й з участю глутатіонредуктази – ензиму, який забезпечує відновлення GSSG до GSH за наявності NADPH як джерела відновних еквівалентів. Активність глутатіонредуктази в сперматозоїдах інфертильних чоловіків була зниженою при всіх формах патоспермії, що узгоджується зі зменшеним змістом GSH.

Наслідком редукції GSH може бути накопичення вільних радикалів, яке посилюється з подальшим утворенням OH-радикала й ушкодженням високомолекулярних структур, зокрема ДНК [29, 30].

Загалом наші результати узгоджуються з результатами інших дослідників. Зокрема, було

показано, що вміст GSH у сперматозоїдах неплідних чоловіків з олігозооспермією був значно меншим, ніж у контрольній групі [14]. У цьому ж дослідженні доведено наявність прямого кореляційного зв'язку (помірної сили) між вмістом GSH і порушенням морфології та рухливості сперматозоїдів [37].

**ВИСНОВКИ.** У чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій (осколкові й кульові поранення), які перебувають на стаціонарному лікуванні, як у лімфоцитах, так і в сироватці крові інтенсифіковані процеси пероксидації ліпідів, знижена концентрація відновленого глутатіону та зменшене співвідношення відновленого глутатіону до окисненого, що свідчить про порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги і бік наростання прооксидантних процесів.

*Стаття публікується за підтримки гранту Національного фонду досліджень України "Вдосконалення діагностики та лікування порушень (розладів) статевої та репродуктивної функцій чоловіків, постраждалих внаслідок бойових дій" (реєстраційний № 2022.01/0151).*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Взаємозв'язок між показниками оксидативного стресу та ідіопатичною неплідністю чоловіків / О. В. Мельник, М. З. Воробець, О. К. Онуфрович [та ін.] // *Експерим. і клініч. медицина.* – 2022. – **91**, № 2. – С. 1–11. <https://doi.org/10.35339/ekm.2022.91.2.mvo>.
2. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах чоловіків із порушенням фертильності / Р. В. Фафула, О. К. Онуфрович, У. П. Єфремова [та ін.] // *Вісн. проблем біології медицини.* – 2017. – Вип. 1 (135). – С. 199–204.
3. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility / O. Adeoye, J. Olawumi, A. Opeyemi, O. Christiania // *JBRA Assisted Reproduction.* – 2018. – **22** (1). – P. 61–66. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180003>
4. Male oxidative stress infertility (MOSI): Proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility / A. Agarwal, N. Parekh, M. K. Panner Selvam [et al.] // *The World Journal of Men's Health.* – 2019. – **37** (3). – P. 296–312. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190055>
5. Male infertility and oxidative stress: A focus on the underlying mechanisms / R. J. Aitken, J. R. Drevet, A. Moazamian, P. Gharagozloo // *Antioxidants.* – 2022. – **11** (2). – P. 306–315. <https://doi.org/10.3390/antiox11020306>
6. Aitken R. J. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility / R. J. Aitken // *Reproduction (Cambridge, England).* – 2020. – **159** (4). – R189–R201. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0452>
7. Impact of precise modulation of reactive oxygen species levels on spermatozoa proteins in infertile men / A. Ayaz, A. Agarwal, R. Sharma [et al.] // *Clinical Proteomics.* – 2015. – **12** (1). – 4. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-12-4>
8. Badade Z. G. Role of Oxidative Stress in Male Infertility / Z. G. Badade, P. M. Samant // *J. Biomed. Sci. and Res.* – 2011. – **3** (2). – P. 385–391.
9. Barati E. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management / E. Barati, H. Nikzad, M. Karimian // *Cell Mol. Life Sci.* – 2020. – **77** (1). – P. 93–113. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8>.
10. Oxidative stress and male infertility / S. Bisht, M. Faiq, M. Tolahunase, R. Dada // *Nature Reviews Urology.* – 2017. – **14** (8). – P. 470–485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
11. Condition of urogenital tract microbiotes and pro- and antioxidant system in male azoospermia / M. Z. Vorobets, O. V. Melnyk, I. V. Kovalenko [et al.] // *Regulatory Mechanisms in Biosystems.* – 2021. – **12** (4). – P. 696–701. <https://doi.org/10.15421/022196>
12. Determination of seminal oxidation-reduction potential (ORP) as an easy and cost-effective clinical marker of male infertility / A. Agarwal, R. Henkel, R. Sharma, [et al.] // *Andrologia.* – 2018. – **50** (3). <https://doi.org/10.1111/and.12914>
13. Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases / P. Chaudhary, P. Janmeda, A. O. Docea, B. Yeskaliyeva, A. Razis // *Front. Chem.* – 2023. – **11**. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198>
14. Prooxidant-antioxidant balance in seminal and blood plasma of men with idiopathic infertility and infertile

- men in combination with rheumatoid arthritis / R. Fafula, O. Melnyk, N. Gromnatska [et al.] // *Studia Biologica*. – 2023. – **17** (2). – P. 15–26. <https://doi.org/10.30970/sbi.1702.719>
15. Hosseinzadeh A. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno-teratospermic men / A. Hosseinzadeh, F. Karimi, S. G. Jorsaraei // *Iranian Red Crescent Medical Journal*. – 2013. – **15** (9). – P. 780–785. <https://doi.org/10.5812/ircmj.6409>
16. Ko E.Y. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity / E. Y. Ko, E. S. Sabaneh, A. Agarwal // *Fertility and Sterility*. – 2014. – **102** (6). – P. 1518–1527. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.020>
17. Nabil H. Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma / H. Nabil, L. A. Moemen, M. Abuelela // *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. – 2008. – **2**. – P. 773–778.
18. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility / N. Garrido, M. Meseguer, C. Simon [et al.] // *Asian Journal of Andrology*. – 2004. – **6** (1). – P. 59–65.
19. Averill-Bates D. A. The antioxidant glutathione / D. A. Averill-Bates // *Vitamins and hormones*. – 2023. – **121**. – P. 109–141. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>
20. Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels / I. Cacciatore, C. Cornacchia, F. Pinnen [et al.] // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2010. – **15** (3). – P. 1242–1264. <https://doi.org/10.3390/molecules15031242>
21. Glutathione content in sperm cells of infertile men / R. V. Fafula, O. K. Onufrovych, U. P. Iefremova [et al.] // *Regulatory Mechanism in Biosystems*. – 2017. – **8** (2). – P. 157–161. <https://doi.org/10.15421/021725>
22. Forman H. J. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis / H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2009. – **30** (1–2). – P. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
23. Monostori P. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review / P. Monostori, G. Wittmann, E. Karg, S. Túri // *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2009. – **877** (28). – P. 3331–3346. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.016>
24. Hsieh Y. Y. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility / Y. Hsieh, C. C. Chang, C. S. Lin // *International Journal of Biological Sciences*. – 2006. – **2** (1). – P. 23–29. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.23>
25. Characteristics of oxidative stress and non-enzymatic link of the glutathione system in sperm plasma and spermatozoa in men with different fertilization potential / M. Z. Vorobets, R. V. Fafula, O. V. Melnyk [et al.] // *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. – 2022. – **112**(94). – P. 5–12. <https://doi.org/10.25040/escpb2022.01-02.005>
26. Охорона психічного здоров'я в умовах війни : у 2 т. – К. : Наш формат, 2017. – Т. 1. – 568 с., Т. 2. – 549 с.
27. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality / S. Benedetti, M. S. Tagliamonte, S. Catalani [et al.] // *Reproductive Biomedicine Online*. – 2012. – **25** (3). – P. 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.05.011>
28. Henkel R. R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility / R. R. Henkel // *Asian Journal of Andrology*. – 2011. – **13** (1). – P. 43–52. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.76>
29. Cigarette smoking affects specific sperm oxidative defenses but does not cause oxidative DNA damage in infertile men / T. Vilorio, M. Meseguer, J. A. Martínez-Conejero [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2010. – **94** (2). – P. 631–637. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.024>
30. Gavrieliouk D. Damage to sperm DNA mediated by reactive oxygen species: Its impact on human reproduction and the health trajectory of offspring / D. Gavrieliouk, R. J. Aitken // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2015. – **868**. – P. 23–47. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2_2)
31. Kalinina E. V. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes / E. V. Kalinina, N. N. Chernov, M. D. Novichkova // *Biochemistry*. – 2014. – **79** (13). – P. 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>
32. Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels / I. Cacciatore, C. Cornacchia, F. Pinnen [et al.] // *Molecules (Basel, Switzerland)*. – 2010. – **15** (3). – P. 1242–1264. <https://doi.org/10.3390/molecules15031242>
33. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase / glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men / N. Garrido, M. Meseguer, J. Alvarez [et al.] // *Fertility and Sterility*. – 2024. – **82** (3). – P. 1059–1066. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.033>
34. Лаповець Л. Лабораторна імунологія / Л. Лаповець, Б. Луцик. – К. : Арал, 2004. – 173 с.
35. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal / A. Ayala, F. Mario, M. F. Muñoz, S. // *Oxid. Med. Cell Longev*. – 2014. – P. 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
36. Anderson M. E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples / M. E. Anderson // *Meth. Enzymol*. – 1985. – **113**. – P. 548–555.
37. Асоціативний зв'язок між рухливістю сперматозоїдів, оксидативним стресом і цитокинами / О. В. Мельник, М. З. Воробець, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець // *Медицина сьогодні і завтра*. – 2022. – **91**, № 2. – P. 26–35. <https://doi.org/10.35339/msz.2022.91.2.mvf>

## REFERENCES

- Melnyk, O., Vorobets, M., Onufrovysh, O., Besedina, A., Fafula, R., & Vorobets, Z. (2022). Relationship between indicators of oxidative stress and idiopathic male infertility. *Experimental and clinical medicine*, 91(2), 6-15. <https://doi.org/10.35339/ekm.2022.91.2.mvo> [in Ukrainian].
- Fafula, R.V., Onufrovysh, O.K., Yefremova, U.P., Nakonechny, Y.A., & Vorobets, Z.D. (2017). Intensity of lipoperoxidation processes in spermatozoa of men with impaired fertility. *Herald of problems of biology and medicine*, (1), 199-204 [in Ukrainian].
- Adeoye, O., Olawumi, J., Opeyemi, A., & Christiana, O. (2018). Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA assisted reproduction*, 22(1), 61-66. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180003> [in English].
- Agarwal, A., Parekh, N., Panner Selvam, M.K., Henkel, R., Shah, R., Homa, S.T., Ramasamy, R., et al. (2019). Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *The world journal of men's health*, 37(3), 296-312. <https://doi.org/10.5534/wjmh.190055> [in English].
- Aitken, R.J., Drevet, J.R., Moazamian, A., & Gharagozloo, P. (2022). Male Infertility and Oxidative Stress: A Focus on the Underlying Mechanisms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(2), 306. <https://doi.org/10.3390/antiox11020306>.
- Aitken, R.J. (2020). Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction (Cambridge, England)*, 159(4), R189–R201. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0452> [in English].
- Ayaz, A., Agarwal, A., Sharma, R., Arafa, M., Elbardisi, H., & Cui, Z. (2015). Impact of precise modulation of reactive oxygen species levels on spermatozoa proteins in infertile men. *Clinical proteomics*, 12(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-12-4> [in English].
- Takalani, N.B., Monageng, E.M., Mohlala, K., Monsees, T.K., Henkel, R., & Opuwari, C.S. (2023). Role of oxidative stress in male infertility. *Reproduction & fertility*, 4(3), e230024. <https://doi.org/10.1530/RAF-23-0024> [in English].
- Barati, E., Nikzad, H., & Karimian, M. (2020). Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 77(1), 93-113. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8> [in English].
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., & Dada, R. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature reviews. Urology*, 14(8), 470-485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69> [in English].
- Vorobets, M.Z., Melnyk, O.V., Kovalenko, I.V., Fafula, R.V., Borzhievsky, A.T., & Vorobets, Z.D. (2021). Condition of urogenital tract microbiotes and pro- and antioxidant system in male azoospermia. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(4), 696-701. <https://doi.org/10.15421/022196> [in English].
- Agarwal, A., Henkel, R., Sharma, R., Tadros, N.N., & Sabanegh, E. (2018). Determination of seminal oxidation-reduction potential (ORP) as an easy and cost-effective clinical marker of male infertility. *Andrologia*, 50(3), <https://doi.org/10.1111/and.12914> [in English].
- Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A.O., Yeskaliyeva, B., Abdull Razis, A.F., Modu, B., Calina, D., & Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in chemistry*, 11, 1158198. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1158198> [in English].
- Fafula R, Melnyk O, Gromnatska N, Vorobets D., Fedorovych Z, A. Besedina, Z. Vorobets. (2023). Prooxidant-antioxidant balance in seminal and blood plasma of men with idiopathic infertility and infertile men in combination with rheumatoid arthritis. *Studia Biologica*. 17(2). P. 15-26. <https://doi.org/10.30970/sbi.1702.719> [in English].
- Hosseinzadeh Colagar, A., Karimi, F., & Jorsaraei, S.G. (2013). Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno-teratospermic men. *Iranian Red Crescent medical journal*, 15 (9), 780–785. <https://doi.org/10.5812/ircmj.6409>.
- Ko, E.Y., Sabanegh, E.S., Jr, & Agarwal, A. (2014). Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertility and sterility*, 102(6), 1518-1527. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.020> [in English].
- Nabil H. Moemen L.A., Abuelela M. (2008). Studying the levels of malondialdehyde and antioxidant parameters in normal and abnormal human seminal plasma. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2, 773-778. [in English].
- Garrido, N., Meseguer, M., Simon, C., Pellicer, A., & Remohi, J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian journal of andrology*, 6(1), 59-65.
- Averill-Bates, D.A. (2023). The antioxidant glutathione. *Vitamins and Hormones*, 121, 109-141. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2022.09.002>.
- Cacciatore, I., Cornacchia, C., Pinnen, F., Mollica A., & Di Stefano, A. (2010). Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15 (3), 1242-1264. <https://doi.org/10.3390/molecules15031242>
- Fafula, R.V., Onufrovysh, O.K., Iefremova, U.P., Melnyk, O.V., Nakonechnyi, I.A., Vorobets, D.Z., & Vorobets, Z.D. (2017). Glutathione content in sperm cells of infertile men. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8 (2), 157-161. <https://doi.org/10.15421/021725>
- Forman, H.J., Zhang, H., & Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30 (1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
- Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E., Túri, S. (2009). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 15, 877 (28), 3331-3346. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.016>. Epub 2009 Jun 13. PMID: 19560987.
- Hsieh, Y.Y., Chang, C.C., & Lin, C.S. (2006). Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *International Journal of Biological Sciences*, 2(1), 23-29. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.23>.
- Vorobets, M.Z., Fafula, R.V., Melnyk, O.V., Kovalenko, I.V., Borzhievsky, A.Ts., Vorobets, Z.D. (2022). Characteristics of oxidative stress and non-enzymatic



link of the glutathione system in sperm plasma and spermatozoa in men with different fertilization potential. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*, 1/2 (94), 5-12. <https://doi.org/10.25040/ecpb2022.01-02.005>.

26. (2017). Public health care in war conditions. Kyiv: Nash format in 2 vol. [in Ukrainian].

27. Benedetti, S., Tagliamonte, M. C., Catalani, S., Primiterra, M., Canestrari, F., De Stefani, S., Palini, S., & Bulletti, C. (2012). Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reproductive biomedicine online*, 25 (3), 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.05.011>.

28. Henkel, R.R. (2011). Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian journal of andrology*, 13 (1), 43-52. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.76>.

29. Viloria, T., Meseguer, M., Martínez-Conejero, J.A., O'Connor, J. E., Remohí, J., Pellicer, A., & Garrido, N. (2010). Cigarette smoking affects specific sperm oxidative defenses but does not cause oxidative DNA damage in infertile men. *Fertility and sterility*, 94 (2), 631-637. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.024>

30. Gavriliouk, D., & Aitken, R.J. (2015). Damage to Sperm DNA Mediated by Reactive Oxygen Species: Its Impact on Human Reproduction and the Health Trajectory of Offspring. *Advances in experimental medicine and biology*, 868, 23-47. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2_2)

31. Kalinina, E.V., Chernov, N.N., & Novichkova, M.D. (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes.

Biochemistry. *Biokhimiia*, 79(13), 1562-1583. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082> [in Ukrainian].

32. Cacciatore, I., Cornacchia, C., Pinnen, F., Mollica, A., & Di Stefano, A. (2010). Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15 (3), 1242-1264. <https://doi.org/10.3390/molecules15031242>

33. Garrido, N., Meseguer, M., Alvarez, J., Simón, C., Pellicer, A., & Remohí, J. (2004). Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertility and sterility*, 82 Suppl 3, 1059-1066. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.04.033>

34. Lapovets, L., Lutsyk, B. (2004). *Laboratory immunology*. Kyiv: Aral [in Ukrainian].

35. Ayala, A., Muñoz, M.F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>

36. Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E., & Túri, S. (2009). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 877 (28), 3331-3346. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.016>.

37. Melnyk, O., Vorobets, M., Fafula, R., & Vorobets, Z. (2025). Association between sperm motility, oxidative stress and cytokines. *Medicine Today and Tomorrow*, 91 (2), 26-35. <https://doi.org/10.35339/msz.2022.91.2.mvf> [in Ukrainian].

Отримано 29.09.2023

Адреса для листування: З. Д. Воробець, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: vorobetsz@ukr.net.

M. Z. Vorobets, O. K. Onufrovych, Z. D. Vorobets, A. S. Besedina,  
O. V. Melnyk, R. V. Fafula, D. Z. Vorobets  
DANYLO HALITSKY LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## CHARACTERISTICS OF INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS OF MEN SUFFERED AS A RESULT OF COMBAT ACTIONS

### Summary

**Introduction.** In a number of works, it was established that oxidative stress leads to a decrease in the fertilizing ability of spermatozoa, their damage and is one of the factors associated with male infertility. Normally, the balance between pro-oxidant and antioxidant processes is maintained. In a pathological condition, this balance is disturbed in the direction of uncontrolled generation of free radicals. The antioxidant defense system includes both enzymatic and non-enzymatic components that neutralize ROS and free radicals and protect against excessive exposure to oxidative stress.

**The aim of the study** – to assess the state of lipid peroxidation and the non-enzymatic link of the glutathione antioxidant system of lymphocytes and peripheral blood plasma in men injured as a result of combat operations (bullet and shrapnel wounds).

**Research Methods.** Research was conducted on lymphocytes and serum of peripheral blood of men injured as a result of hostilities, because lymphocytes are considered the "metabolic mirror" of the body and they quickly respond to all external and internal influences. The concentration of malondialdehyde, total antioxidant activity, concentrations of reduced, total and oxidized glutathione were determined.

**Results and Discussion.** It was found that the concentration of reduced glutathione in the blood serum of men injured as a result of hostilities, the 1st age group (20–39 years old) decreased by 1.4 times, and for the second



(40–53 years old) – by 1.6 times compared to control values. The concentration of total glutathione decreases for both affected age groups by 1.2 times. At the same time, no significant changes in the concentration of oxidized glutathione were detected. Determination of similar parameters of the non-enzymatic link of the glutathione anti-oxidant system in blood lymphocytes showed similar patterns as in blood serum. The calculation of the redox index (RI GSH) showed a decrease in the total capacity of the antioxidant system in the blood lymphocytes of men affected by hostilities by 1.5 times compared to the control group.

**Conclusion.** In men who suffered as a result of combat (shrapnel and bullet wounds) and are undergoing inpatient treatment, both in lymphocytes and blood serum, lipid peroxidation processes are intensified, the concentration of reduced glutathione is reduced, and the ratio of restored glutathione to oxidized glutathione is reduced, which indicates a violation of pro-oxidant antioxidant balance in the direction of increasing pro-oxidant processes.

**KEY WORDS:** male combat casualties; reduced glutathione; total glutathione; oxidized glutathione; malondialdehyde; total antioxidant activity.