УДК 577.152.3

Ефекти гідроген пероксиду на основні кінетичні параметри гідролізу АТР Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азою сперматозоїдів інфертильних чоловіків

Р.В. ФАФУЛА, О.І. МЕСКАЛО, Е.І. ЛИЧКОВСЬКИЙ, З.Д. ВОРОБЕЦЬ
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,
Львів, Україна

E-mail: roman_fafula@ukr.net

За фізіологічних умов йони Ca^{2+} регулюють рухливість, гіперактивацію, хемотаксис, акросомну реакцію, капацитацію сперматозоїдів [3, 5, 11]. Ці процеси мають відбуватися в певний момент часу, тому чоловічі гамети, як і соматичні клітини, повинні здійснювати прецизійний контроль Ca^{2+} -активованих (Ca^{2+} -залежних) процесів. Він реалізується шляхом просторово-часового контролю $[\text{Ca}^{2+}]$, за участю Ca^{2+} -транспортувальних систем. До однієї з таких систем належить Ca^{2+} -помпа – система енергозалежного виведення Ca^{2+} з цитоплазми, функціонування якої забезпечуються Ca^{2+} -транспортувальною, Mg^{2+} -залежною АТР-гідролазою (Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азою) [4].

Гіперпродукція активних форм Оксигену (АФО) може пошкодити клітини сперматозоїдів і вважається одним із механізмів чоловічого непліддя [9]. АФО постійно виробляється в більшості клітин, а їх вміст регулюється низкою ензиматичних і неензиматичних антиоксидантів. АФО можуть змінювати структуру і функції біомолекул, включаючи поліненасичені жирні кислоти сперматальних мембран, в результаті чого відбувається пероксидне окиснення ліпідів і порушення мембранних білків. Показано, що екзогенне додавання H_2O_2 збільшує рівень внутрішньоклітинних АФО в сперматозоїдах [8]. Окрім утворення високоефективних реактивних молекул H_2O_2 може викликати низку прямих впливів на клітини, їх метаболізм і функціонування ензимів.

Мета роботи – оцінити вплив H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТР-азою сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків.

Матеріали й методи дослідження. Матеріалом для дослідження були зразки сім'яної рідини, яку отримували після статевої абстиненції 3–5 днів у клінічній лабораторії Львівської обласної клінічної лікарні. Показники спермограм (концентрація сперматозоїдів, їх рухливість, морфологія та відсоток живих форм) оцінювали за допомогою світлооптичної мікроскопії, згідно з директивами щодо їх проведення (ВООЗ, 2010) [13]. Матеріал отримували відповідно до передбачених заходів, спрямованих на забезпечення задовільних умов збереження здоров'я пацієнта, дотримання його прав, людської гідності та морально-етичних норм. Умови відбору дослідних зразків відповідали вимогам принципів Гельсінської декларації охорони прав людини, конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та положенням відповідних законів України. Перед початком дослідження всі чоловіки ознайомились з інформаційним листком пацієнта та дали інформовану згоду на участь в дослідженні.

У дослідження були включені 10 пацієнтів з астенозооспермією (зниження рухливості сперматозоїдів), які проходили первинне обстеження у зв'язку з непліддям у консультативній поліклініці Львівської обласної клінічної лікарні. Критерії включення: вік 21–39 років, неплідність у шлюбі 1–10 років, чоловічий фактор неплідності за умов астенозооспермії. Критерії

виключення: неплідність у шлюбі понад 10 років, азооспермія, надмірне вживання алкоголю та вплив будь-яких шкідливих фізико-хімічних чинників під час діагностично-лікувальних заходів. Групу контролю становили чоловіки з нормозооспермією і підтвердженням батьківством.

Сперматозоїди відмивали від плазми еякуляту 3-разовим центрифугуванням при 3000 об./хв протягом 10 хв у середовищі, яке містило (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 30, Hepes (pH 7,4) – 30. Вміст загального протеїну у пробках визначали методом Лоурі з використанням набору виробництва НВФ “Simko Ltd” (Україна).

Визначення загальної АТР-азної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37 °C у середовищі інкубації (об'ємом 1 мл) такого складу (мМ): 150 KCl, 5 MgCl₂, 5 АТР, 0.05 CaCl₂, 1 убаїн (інгібітор Na⁺, K⁺-АТР-ази), 1 NaN₃ (інгібітор мітохондріальної АТР-ази), 20 Hepes-Tris-буфер (pH = 7,4). АТР-гідролазну реакцію ініціювали внесенням до інкубаційного середовища аліквоти клітин; кількість білка у пробі не перевищувала 50 мкг/мл. Тривалість інкубації – 5 хв. Ензиматичну реакцію зупиняли додаванням 1 мл охолодженого стоп-розчину такого складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО (pH = 4,3). Суспензію центрифугували (10 хв, 1600 g) і в отриманому безбілковому супернатанті визначали вміст неорганічного фосфору P_i. Кількість продукту реакції визначали за методом Fiske-Subbarow [12]. Питому Ca²⁺,Mg²⁺-АТР-азну активність розраховували як різницю між активністю АТР-азних систем у Ca²⁺-вмісному та безкальцієвому середовищах (1 мМ ЕГТА) і виражали у нмоль P_i/хв на 1 мг протеїну, вивільненого в результаті АТР-гідролазної реакції. З метою розділення сумарної Ca²⁺,Mg²⁺-АТР-азної активності на компоненти: тапсигаргін-нечутливу Ca²⁺,Mg²⁺-АТР-азу плазматичної мембрани та тапсигаргін-чутливу Ca²⁺,Mg²⁺-АТР-азу внутрішньоклітинних Ca²⁺-депо до стандартного Ca²⁺- та Mg²⁺-вмісного середовища інкубації додавали селективний інгібітор тапсигаргін (0,1 мМ). Уявні кінетичні параметри, які характеризують Ca²⁺,Mg²⁺-залежну АТР-гідролазну реакцію – константу афінності до АТР (K_m) та початкову максимальну швидкість реакції гідролізу АТР (V_{max}) визначали в координатах Лайнуївера–Берка. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програми MS Excel-2007. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стюдента. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. У наших попередніх дослідженнях [10] показано, що активність тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-нечутливої компоненти Ca²⁺,Mg²⁺-АТР-ази сперматозоїдів чоловіків зі збереженою фертильністю (нормозооспермія, група контролю) становила відповідно $4,9 \pm 0,5$ і $9,2 \pm 1,1$ нмоль P_i/год на 1 мг протеїну. Показано, що у пацієнтів з астенозоо-, олігоастенозоо- і лейкоцитоспермією активність тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-нечутливої компоненти Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-ази сперматозоїдів знижена порівняно зі здоровими чоловіками. Однак Ca²⁺,Mg²⁺-АТР-азна активність сперматозоїдів вища у пацієнтів з олігозооспермією, проте ці зміни не є статистично достовірними. Зроблено припущення, що інгібування АТР-азної активності сперматозоїдів чоловіків з неплідністю може бути зумовлене зниженням вмісту внутрішньоклітинного аденозинтрифосфату та пошкодженням спермальних мембран продуктами пероксидного окиснення ліпідів.

Пригнічення активності Ca²⁺, Mg²⁺-АТР-ази може бути зумовлене оксидативним стресом, який супроводжується ліпопероксидацією спермальних мембран. Сперматозоїди особливо чутливі до гіпероксидації внаслідок наявності у складі їх мембран високої концентрації поліненасичених жирних кислот та через неможливість репарації ДНК. Поліненасичені жирні кислоти є головними мішенями процесів гіпероксидації, які ведуть до знижен-

ня в'язкості та інших структурних перебудов спермальных мембран [2, 6]. Відомо, що одним із найбільш чутливих маркерів пероксидного окиснення ліпідів та оксидативного стресу є ТБК-активні продукти [7]. У наших попередніх дослідженнях [1] виявлено значне підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів у сперматозоїдах чоловіків з астенозооспермією.

Оскільки відомо, що $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-аза є однією з мішеней для АФО, сперматозоїди піддавали H_2O_2 -індукованому окисному стресу. Показано дозозалежний інгібуючий ефект H_2O_2 на гідролазну активність тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-нечутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків з різними формами патоспермій. У зв'язку з інгібуючим ефектом H_2O_2 було досліджено вплив цього ефектора на основні кінетичні параметри гідролізу АТР за участю $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази. У діапазоні концентрацій АТР від 1 до 5 мМ (за сталої концентрації йонів Mg^{2+} та Ca^{2+}) відбувається монотонне зростання ензиматичної активності тапсигаргін-чутливої та тапсигаргін-нечутливої компоненти $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних (астенозооспермія) чоловіків з виходом на плато (рис. 1).

Рис. 1. Вплив 100 нМ H_2O_2 на активність тапсигаргін-чутливої (а) та тапсигаргін-нечутливої (б) $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних (астенозооспермія) чоловіків за зміни концентрації АТР у середовищі інкубації ($M \pm m$, $n = 5-7$):

1 – нормозооспермія; 2 – нормозооспермія + 100 нМ H_2O_2
3 – астенозооспермія; 4 – астенозооспермія + 100 нМ H_2O_2

Оптимальна концентрація субстрату для функціонування обох ензимів, при якій його гідролазна активність найвища, становить 5 мМ. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР активність обох компонент $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази сперматозоїдів чоловіків з нормозооспермією та астенозооспермією знижена за присутності H_2O_2 в середовищі інкубації. Характер залежності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-азної активності від субстрату у присутності інгібітора для інших досліджуваних груп інфертильних чоловіків був схожий (дані не представлено).

Для з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази сперматозоїдів чоловіків проведено визначення основних кінетичних параметрів Ca^{2+} -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР. Шляхом лінеаризації отриманих концентраційних залежностей, наведених на рис. 1 у координатах Лайнуївера–Берка, визначено максимальну швид-

кість гідролізу АТР та константу афінності до АТР тапсигаргін-чутливої (рис. 2) та тапсигаргін-нечутливої (рис. 3) $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази.

Рис. 2. Зміни кінетичних параметрів тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-азної ензиматичної реакції сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних (астенозооспермія) чоловіків за дії H_2O_2 ($M \pm m$, $n = 5-7$)

Рис. 3. Зміни кінетичних параметрів тапсигаргін-нечутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-азної ензиматичної реакції сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних (астенозооспермія) чоловіків за дії H_2O_2 ($M \pm m$, $n = 5-7$)

За дії H_2O_2 початкова максимальна швидкість гідролізу АТР тапсигаргін-чутливою $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-азою достовірно знижується лише в сперматозоїдах чоловіків з нормозооспермією. Водночас константа афінності тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази до АТР достовірно зростає в сперматозоїдах чоловіків з астенозооспермією. Під час вивчення впливу H_2O_2 на тапсигаргін-нечутливу компоненту $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТФ-ази ($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-аза плазма-

тичної мембрани) встановлено достовірне зростання величини константи афінності до АТР в обох досліджуваних групах чоловіків, що свідчить про зниження афінності ензиму до субстрату. Причому у патоспермічних чоловіків зростання константи афінності до АТР має більш виражений характер. Водночас відмічається тенденція до зниження максимальної швидкості гідролізу АТР тапсигаргін-нечутливою $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-азою сперматозоїдів фертильних чоловіків, проте ці зміни не є достовірними.

Відтак, за формальними ознаками за дії H_2O_2 у сперматозоїдах фертильних чоловіків пригнічення тапсигаргін-чутливої $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази відбувається за неконкурентним типом (знижується максимальна швидкість реакції, спорідненість за субстратом не змінюється). Водночас відмічається конкурентний тип інгібування (зростає спорідненість до субстрату) $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази плазматичної мембрани.

Проте у сперматозоїдах інфертильних чоловіків з астенозооспермією спостерігається конкурентний тип інгібування (зростає спорідненість за субстратом, максимальна швидкість реакції достовірно не змінюється) для обох $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-азних компонент.

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

Стаття містить результати досліджень НДР “Молекулярно-біологічні регуляторні механізми порушення запліднювальної здатності сперматозоїдів і розробка нових імунобіохімічних методів діагностики фертильності у чоловіків”, проведених за грантом Президента України (розпорядження № 97/2016-рп від 13.04.2016 р.).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Фафула РВ, Онуфровіч ОК, Сфремова УП, Наконечний ЙА, Воробець ЗД. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах чоловіків із порушенням фертильності. Вісн. пробл. біології та медицини. 2017;1(135):199–204 (Fafula RV, Onofrovych OK, Iefremova UP, Nakonechnyi IoA, Vorobets ZD. Intensity of processes of lipid peroxidation in sperm of men with fertility breach. Bulletin of problems Biology and Medicine. 2017;1(135):199–204).
2. Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive oxygen species and sperm function – in sickness and in health. J Androl. 2012;33(6):1096–106. DOI: 10.2164/jandrol.112.016535.
3. Banjoko SO, Adeseolu FO. Seminal plasma pH, inorganic phosphate, total and ionized calcium concentrations in the assessment of human spermatozoa function. J Clin Diagn Res. 2013;7(11):2483–6. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6194.3585.
4. Berridge MJ. Unlocking the secrets of cell signalling. Annu Rev Physiol. 2005;67:1–21. DOI: 10.1146/annurev.physiol.67.040103.152647.
5. Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B et al. CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:14864–8. DOI: 10.1073/pnas.2536658100.
6. 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 Cresc Med J. 2013;15(9):780–5. DOI:10.5812/ircmj.6409.
7. Januszewski AS, Alderson NL, Jenkins AJ, Thorpe SR, Baynes JW. Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids. Journal of Lipid Research. 2005;46(7):1440–9. DOI: 10.1194/jlr.M400442-JLR200.
8. 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. Fertility and Sterility. 2008;90(1):320–1. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1667>.
9. 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.
10. Meskalo OI, Fafula RV, Lychkovskiy 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. Studia Biologica. 2017;11(2):5–12.
11. Publicover S, Harper CV, Barratt C. $[\text{Ca}^{2+}]$; signalling in sperm – making the most of what you’ve got. Nat Cell Biol. 2007;9:235–42. DOI: 10.1038/ncb0307-235.
12. Vignini A, Buldreghini E, Nanetti L, Amoroso S, Boscaro M, Ricciardo-Lamonica G et al. 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. 13. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen, in 5th ed (2010). WHO, 271.

Стаття надійшла до редколегії 29.11.2017

RESEARCH ARTICLES

Effect of Hydrogen Peroxide on the Main Kinetic Parameters of ATP Hydrolysis by Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP-ase in Spermatozoa of Infertile Men

R.V. FAFULA, O.I. MESKALO, E.I. LYCHKOVSKYY, Z.D. VOROBETS

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

Under the physiological conditions, Ca^{2+} ions regulate sperm motility, hyperactivation, chemotaxis, acrosomal response. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level in cytoplasm is maintained by Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase which is one of the targets of reactive oxygen species. Hyperproduction of reactive oxygen species can damage sperm cells and is considered to be one of the mechanisms of male infertility. This paper is aimed at evaluation of the H_2O_2 effect on the main kinetic parameters of ATP hydrolysis by Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of spermatozoa of fertile (normozoospermia) and infertility men (asthenozoospermia).

Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity has been determined spectrophotometrically by production of P_i . Concentration dependencies have been linearized in Lineweaver-Burk plot.

Effective inhibitory effect of H_2O_2 on thapsigargin-sensitive and thapsigargin-insensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of sperm cells in the fertile and infertile men has been demonstrated. The effects of H_2O_2 on the main kinetic parameters of the ATP hydrolysis with the involvement of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase has been studied. In the whole range of studied concentrations of ATP the thapsigargin-sensitive and thapsigargin-insensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of spermatozoa in the fertile and infertile men has been reduced because of presence of H_2O_2 in the incubation medium. However, the optimal activity of the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of sperm cells in both normozoospermic and asthenozoospermic men has been observed taking into account 5 mM of ATP in the incubation medium. By linearization of concentration curves in Lineweaver-Burk plot the main kinetic parameters of Ca^{2+} -activated, Mg^{2+} -dependent ATP hydrolysis in the sperm cells of fertile and infertile men have been determined.

Under the influence of H_2O_2 , the initial maximum rate of ATP hydrolysis by thapsigargin-sensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase significantly decreases only in spermatozoa of men with normozoospermia. At the same time, the affinity constant of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase to ATP is significantly increased in spermatozoa of men with asthenozoospermia. A significant increase in the affinity constant of thapsigargin-insensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase to ATP has been found in both normozoospermic and asthenozoospermic men. Moreover, in the pathospermic men the increase in the affinity constant to ATP is more expressed than in normozoospermic men. At the same time, there is a tendency of decreasing in the maximum rate of ATP hydrolysis by thapsigargin-insensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase of spermatozoa of fertile men, but these changes are not significant.

Under conditions of H_2O_2 -induced oxidative stress, inhibition of Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity in sperm cells of asthenozoospermic men occurs due to decreasing in the enzyme affinity to the substrate. In spermatozoa of normozoospermic men the inhibition of thapsigargin-sensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity is caused by decreasing in the maximum reaction rate, and the inhibition of thapsigargin-insensitive Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase occurs by reducing the affinity to the substrate.

Key words: Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase; inhibition; kinetic analysis; spermatozoa; male infertility.