

Р. В. Фафула, У. П. Єфремова, О. К. Онуфрович, Н. М. Воробець, З. Д. Воробець
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ NO-СИНТАЗИ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ

Вступ. Нітроген (II) оксид (NO) є високореакційноздатною молекулою, що бере участь у регуляції практично всіх біохімічних процесів і фізіологічних функцій. Роль системи NO/NO-синтаза (NOS) сперматозоїдів при чоловічій неплідності широко вивчають з метою з'ясування регуляторних механізмів, що призводять до розвитку цієї патології. Раніше було встановлено, що в неплідних чоловіків з різними формами патоспермії відбувається перерозподіл активності в системі NO-синтаз із зсувом у бік Ca²⁺-незалежної індукцйбельної ізоформи, що свідчить про дисметаболичні зміни в системі синтезу NO, зокрема про його гіперпродукування. Однак достовірно невідомо, які біохімічні механізми зумовлюють порушення функціональної активності окремих ізоформ NOS.

Мета дослідження – вивчити кінетичні властивості окремих ізоформ NO-синтази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків з різними формами патоспермії.

Методи дослідження. Дослідження проводили на сперматозоїдах чоловіків, які проходили первинне обстеження у зв'язку з неплідністю. У роботі використовували критерії ВООЗ (2010) для оцінки морфологічних характеристик сперматозоїдів. Активність NOS визначали високоспецифічним методом за утворенням L-цитруліну, в кольоровій реакції з антипірином. Кінетичні властивості NOS вивчали в стандартному середовищі інкубації, модифікованому за концентрацією субстрату. Уявні кінетичні параметри, що характеризують NOS-реакцію, розраховували в координатах Лайнуївера – Берка.

Результати й обговорення. Значення початкової максимальної активності cNOS у сперматозоїдах астенозооспермічних чоловіків в 1,5 рази ($p < 0,001$) нижче щодо цієї величини у фертильних чоловіків з нормозооспермією. Водночас не відмічено статистично достовірної різниці у величині початкової максимальної швидкості ензиматичної реакції між нормо- та олігозооспермічними зразками. Значення уявної константи афінності cNOS до L-аргініну в сперматозоїдах інфертильних чоловіків в 1,6–2,7 рази перевищувало цей показник у сперматозоїдах чоловіків з нормозооспермією, що свідчило про зниження спорідненості ензиму до L-аргініну при патоспермії. Значення початкової максимальної швидкості NO-синтазної реакції в чоловіків з патоспермією було більшим від цього показника для cNOS в 1,7–2,3 рази.

Висновок. При олігозооспермії активність cNOS пригнічується за рахунок зростання афінності до субстрату реакції, а при астенозооспермії – в результаті як зниження спорідненості ензиму до субстрату, так і зменшення числа обертів ензиму.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нітроген (II) оксид; NO-синтаза; чоловіча неплідність; патоспермія.

ВСТУП. Нітроген (II) оксид (NO) є високо-реакційноздатною молекулою, що бере участь у регуляції практично всіх біохімічних процесів і фізіологічних функцій. Відомо, що низька концентрація NO забезпечує регулювання численних фізіологічних функцій, а його висока концентрація є цитотоксичною [1]. Показано, що NO модулює статеві та репродуктивні функції [2]. Виявлено, що рівень NO в сім'яній рідині інфертильних чоловіків є вищим, ніж у фертильних, і його зростання призводить до зниження рухливості та життєздатності сперматозоїдів [3].

Нітроген (II) оксид продукується безперервно з L-аргініну в реакції, яку каталізує NO-синта-

© Р. В. Фафула, У. П. Єфремова, О. К. Онуфрович, Н. М. Воробець, З. Д. Воробець, 2019.

за (NOS, 1.14.13.39) та яка включає 5-електронне окиснення атома Нітрогену в L-аргініні, поєднане з окисненням НАДФН(H⁺). NO-синтаза належить до найбільш складно регульованих ензимів, містить ряд кофакторів (тетрагідробіоптерин, кальмодулін, гем, флавін, NADPH і молекулярний кисень). Розрізняють дві Ca²⁺-залежні ізоформи NOS, що забезпечують базальний (конститутивний) синтез NO (cNOS) у фізіологічному режимі, та індукцйбельну Ca²⁺-незалежну ізоформу (iNOS), яка активується при патологічних станах. Остання продукує на декілька порядків вищий рівень NO [4]. Усі три ізоформи було ідентифіковано в різних клітинах яєчка, у тому числі в клітинах Сертолі, клітинах Лейдїга, міофібробластах, ендотеліальних клі-

тинах і сперматозоїдах. Повсюдна присутність різних ізоформ NOS в яєчку свідчить про важливість ензиму для сперматогенезу [5, 6].

Участь системи NO/NOS сперматозоїдів при чоловічій неплідності широко вивчають. Раніше ми встановили, що в неплідних чоловіків з різними формами патоспермії відбувається перерозподіл активності в системі NO-синтаз із зсувом у бік Ca^{2+} -незалежної індукційної ізоформи, що свідчить про дисметаболичні зміни в системі синтезу NO, зокрема про його гіперпродукування [7].

Проте достовірно невідомо, які біохімічні механізми зумовлюють порушення функціональної активності NO-синтаз.

Мета дослідження – вивчити кінетичні властивості окремих ізоформ NO-синтази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків з різними формами патоспермії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на сперматозоїдах чоловіків, які проходили первинне обстеження у зв'язку з неплідністю в консультативній поліклініці Львівської обласної клінічної лікарні. Критерії включення: вік 21–39 років, неплідність у шлюбі 1–10 років, чоловічий фактор неплідності. Критерії виключення: неплідність у шлюбі понад 10 років, азооспермія, надмірне вживання алкоголю та вплив будь-яких шкідливих фізико-хімічних чинників. У роботі використовували критерії ВООЗ (2010) для оцінки морфологічних характеристик сперматозоїдів [8]. До контрольної групи ввійшло 20 соматично здорових чоловіків віком від 22 до 39 років зі збереженою фертильністю і нормозооспермією та підтвердженим батьківством.

Сперматозоїди відмивали від плазми еякуляту шляхом триразового центрифугування при 3000 g протягом 10 хв у середовищі, яке містило (мМ): NaCl – 120, KCl – 30, HEPES (pH 7,4) – 30. Вміст загального протеїну в пробах визначали за методом Лоурі з використанням набору виробництва НВФ “Simko Ltd” (Україна). Для пермеабілізації мембран сперматозоїдів та розкриття латентної активності NOS до суспензії сперматозоїдів додавали 0,2 % розчин сапоніну [9].

Активність NOS у пермеабілізованих сперматозоїдах визначали (60 хв при 37 °C) в реакційній суміші (мМ): KH_2PO_4 – 50, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 2, NADPH (“Sigma”, США) – 1, L-аргінін – 2. Реакцію ініціювали шляхом внесення аліквоти сперматозоїдів у реакційну суміш, а зупиняли, додавши 0,3 мл 2N HClO_4 . Як контроль використовували аналогічні проби, попередньо денатуровані 2N HClO_4 . Суміш центрифугували при 3500 g упродовж 10 хв і в надосадовій безбілковій суміші визначали вміст L-цитруліну

високоспецифічним методом за кольоровою реакцією з антипірином. Активність NOS виражали у пмолях цитруліну/хв·мг протеїну [10].

Активність Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS, що відповідає індукційній ізоформі NOS (iNOS), визначали аналогічно, додаючи в інкубаційне середовище хелатор Ca^{2+} EGTA (2 мМ) замість CaCl_2 . Активність Ca^{2+} -залежної ізоформи NOS, що відповідає конститутивній ізоформі NOS (cNOS), розраховували як різницю між загальною активністю NOS і активністю Ca^{2+} -незалежної ізоформи NOS.

Кінетичні властивості NOS вивчали в стандартному середовищі інкубації, модифікованому за концентрацією субстрату. Уявні кінетичні параметри, що характеризують NOS-реакцію, – уявну константу спорідненості (афінності) до L-аргініну ($K_{L\text{-Arg}}$) та початкову максимальну швидкість реакції (V_{max}), визначену за L-аргініном, розраховували в координатах Лайнуївера – Берка [11]. Кінетичні та статистичні розрахунки проводили в MS Office. Результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Оскільки субстратом для NOS є L-аргінін, його локальна біодоступність може впливати на активність NOS. Відомо, що L-аргінін не тільки виступає субстратом для NOS, він також сприяє димеризації ізоформ ензиму, що відіграє важливу роль у регуляції їх каталітичної активності [12]. З огляду на це, зміни концентрації L-аргініну в інкубаційному середовищі впливають, імовірно, на швидкість реакції, яку каталізує NOS.

З'ясовано, що підвищення концентрації L-аргініну в середовищі інкубації в діапазоні концентрацій від 5 до 500 мМ (за сталої концентрації CaCl_2 – 2 мМ та NADPH – 1 мМ) призводило до поступового зростання ензиматичної активності cNOS із виходом на плато (рис. 1, а). Максимальну активність cNOS сперматозоїдів фертильних чоловіків (нормозооспермія) відмічали за наявності 250 мМ L-аргініну в інкубаційному середовищі. Подальше підвищення концентрації L-аргініну в середовищі інкубації не призводило до зростання ензиматичної активності cNOS. Водночас для оліго- та астенозооспермічних зразків концентраційна залежність впливу L-аргініну на активність cNOS відрізнялася від такої в нормозооспермічних зразках. Дані, представлені на рисунку 1, а, свідчать про те, що у всьому діапазоні досліджуваних концентрацій субстрату активність cNOS сперматозоїдів інфертильних чоловіків з оліго- та астенозооспермією була

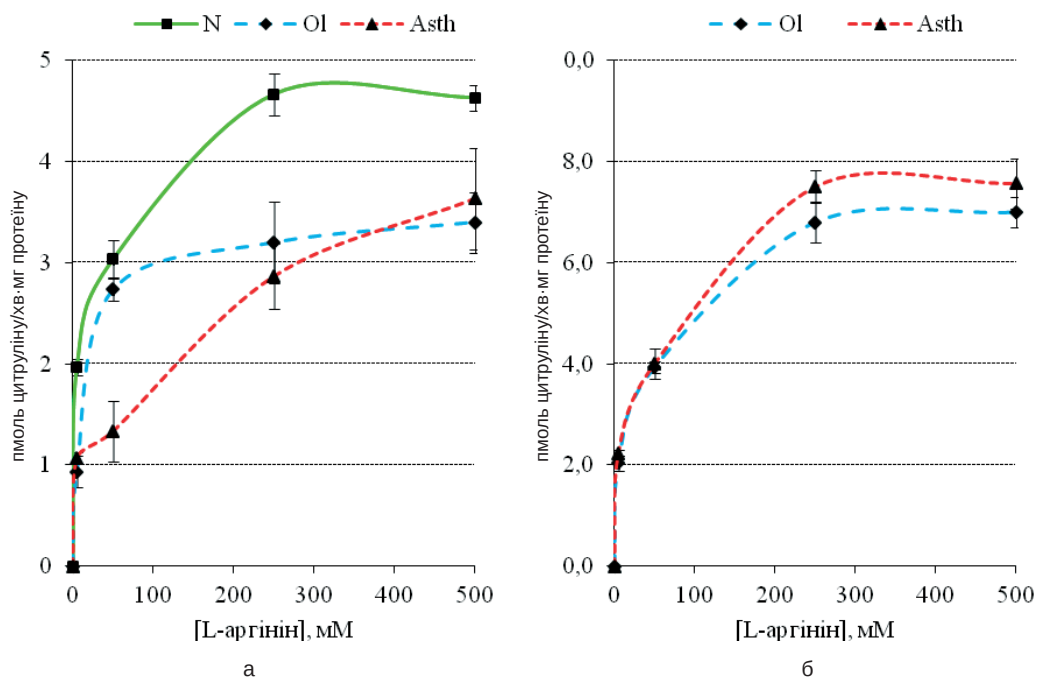


Рис. 1. Концентраційна залежність впливу L-аргініну на активність конститутивної (а) та індукційної ізоформ NO-синтази (б) сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія – N) й інфертильних (олігозооспермія – OI; астенозооспермія – Asth) чоловіків ($M \pm m$, $n=6-8$).

зниженою порівняно з її величиною у сперматозоїдах фертильних чоловіків.

Зниження активності конститутивної ізоформи ензиму супроводжувалось зростанням активності індукційної ізоформи NOS. Остання, на відміну від cNOS, не експресувалась постійно (конститутивно). Встановлено, що активність iNOS сперматозоїдів фертильних чоловіків ідентифікувалась незначною мірою і становила ($0,28 \pm 0,09$) пмоль цитруліну/хв-мг протеїну. Залежність активності iNOS від концентрації L-аргініну в патоспермічних зразках була схожа на цю залежність для cNOS та характеризувалась поступовим підвищенням активності в діапазоні концентрацій субстрату від 5 до 500 мМ (за сталої концентрації $\text{CaCl}_2 - 2$ мМ та $\text{NADPH} - 1$ мМ) з виходом на плато при 250 мМ (рис. 1, б).

Шляхом лінеаризації отриманих даних у зворотних координатах Лайнуївера – Берка визначено основні кінетичні параметри реакції,

каталізованої NOS сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків (табл. 1).

Як свідчать дані, наведені в таблиці, значення початкової максимальної активності cNOS у сперматозоїдах астенозооспермічних чоловіків в 1,5 раза ($p < 0,001$) нижче щодо цієї величини у фертильних чоловіків з нормозооспермією. Водночас не відмічено статистично достовірної різниці у величині початкової максимальної активності ензиму між нормо- та олігозооспермічними зразками. Значення уявної константи афінності (спорідненості) cNOS до L-аргініну в сперматозоїдах інфертильних чоловіків в 1,6–2,7 раза перевищувало цей показник у сперматозоїдах чоловіків з нормозооспермією, що свідчило про зниження спорідненості ензиму до L-аргініну при патоспермії. Значення початкової максимальної активності iNOS у чоловіків з патоспермією було більшим від цього показника для cNOS в 1,7–2,3 раза.

Таблиця 1 – Кінетичні параметри NO-синтази сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків ($M \pm m$, $n=6-8$)

Кінетичний параметр	Фертильні чоловіки (нормозооспермія)	Інфертильні чоловіки	
		олігозооспермія	астенозооспермія
cNOS			
V_{max} , пмоль цитруліну/хв-мг протеїну	$4,2 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,2^*$
K_{L-Arg} , мкМ	$5,7 \pm 0,4$	$15,4 \pm 4,5^{**}$	$9,4 \pm 1,1^{**}$
iNOS			
V_{max} , пмоль цитруліну/хв-мг протеїну	–	$6,0 \pm 0,2$	$6,3 \pm 0,4$
K_{L-Arg} , мкМ	–	$9,9 \pm 0,8$	$9,3 \pm 0,6$

Примітка. Зміни вірогідні стосовно величин у сперматозоїдах фертильних чоловіків: * – $p < 0,001$; ** – $p < 0,01$.

ВИСНОВОК. При олігозооспермії активність cNOS пригнічується за рахунок зростання афінності до субстрату реакції, а при астенозооспермії – в результаті як зниження спорідненості ензиму до субстрату, так і зменшення числа обертів ензиму.

Робота містить результати досліджень НДР “Молекулярно-біологічні регуляторні ме-

ханізми порушення запліднювальної здатності сперматозоїдів і розробка нових імунобіохімічних методів діагностики фертильності у чоловіків”, проведених за грантом Президента України (розпорядження від 13.04.2016 р. № 97/2016-рп) та профінансованих Державним фондом фундаментальних досліджень (договір від 10.08.2016 р. № Ф63/97-2016).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis / H. T. Chung, H. O. Pae, B. M. Choi [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – **282** (5). – P. 1075–1079.
2. Lee N. P. Nitric oxide synthase, spermatogenesis and tight junction dynamics / N. P. Lee, C. Y. Cheng // *Biol. Reprod.* – 2004. – **70**. – P. 267–276. doi:0.1095/biolreprod.103.021329
3. Amiri I. Nitric Oxide level in seminal plasma of fertile and infertile males and its correlation with sperm parameters / I. Amiri, N. Sheike, R. Najafi // *DARU*. – 2006. – **14** (4). – P. 197–202.
4. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology / L. A. Ridnour, D. D. Thomas, S. Donzelli [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2006. – **8**. – P. 7–8. 1329–1337. 15 doi:https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1329
5. Foghi K. Immuno-histochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in testicular cells of men with nonobstructive azoospermia / K. Foghi, M. G. Novin, Z. M. Jabbari [et al.] // *Iran J. Reprod. Med.* – 2011. – **9**. – P. 277–280.
6. Role of reactive nitrogen species in male infertility / S. B. Doshi, K. Khullar, R. K. Sharma, A. Agarwal // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2012. – **10**. – P. 109. doi:10.1186/1477-7827-10-109.
7. The NO-synthase pathway of L-arginine transformation in spermatozoa of infertile men with different forms of patospermia / D. Z. Vorobets, O. K. Onufrovych, R. V. Fafula [et al.] // *Exper. and Clin. Phys. and Bioch.* – 2016. – No. 3. – P. 47–53.
8. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen, in 5th ed. / Geneva: World Health Organization, 2010 – 271p.
9. Вплив детергентів на ферментативну активність та ультраструктуру сперматозоїдів / Н. С. Кочешкова, З. Д. Воробець, В. Ф. Горчев, О. Р. Колачковський // *Експерим. та клініч. фізіологія і біохімія*. – 2007. – № 2. – С. 24–29.
10. Раваева М. Ю. Изменение активности системы синтеза оксида азота под действием низкоинтенсивного миллиметрового излучения / М. Ю. Раваева, Е. Н. Чуян // *Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В. И. Вернадского*. – 2011. – **24** (63), № 4. – С. 201–210.
11. Келети Т. Основы ферментативной кинетики / Т. Келети ; пер. с англ. Л. Ю. Бровко и др. – М. : Мир, 1990. – 350 с.
12. Ferrier D. R. *Biochemistry. Lippincott illustrated reviews* / Lippincott Williams & Wilkins. – India, 2015.

REFERENCES

1. Chung, H.T., Pae, H.O., Choi, B.M., Billiar, T.R., & Kim, Y.M. (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *282*, 1075-1079.
2. Lee, N.P. & Cheng, C.Y. (2004). Nitric oxide synthase, spermatogenesis and tight junction dynamics. *Biol. Reprod.*, *70*, 267-276. doi:0.1095/biolreprod.103.021329
3. Amiri, I., Sheike, N., & Najafi R. (2006). Nitric oxide level in seminal plasma of fertile and infertile males and its correlation with sperm parameters. *DARU*, *14* (4), 197-202.
4. Ridnour, L.A., Thomas, D.D., Donzelli, S., Espey, M.G., Roberts, D.D., & Wink, D.A. (2006). The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid. Redox Signal*, *8* (7-8), 1329-1337. 15 doi:https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1329
5. Foghi, K., Novin, M.G., Jabbari, Z.M., Najafi, T., Heidari, M.H., & Yasoori, A.R. (2011). Immuno-histochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in testicular cells of men with nonobstructive azoospermia. *Iran J. Reprod. Med.*, (9), 277-280.
6. Doshi, S.B., Khullar, K., Sharma, R.K., & Agarwal, A. (2012). Role of reactive nitrogen species in male

infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 10, 109. doi: 10.1186/1477-7827-10-109.

7. Vorobets, D.Z., Onufrovych, O.K., Fafula, R.V., Iefremova, U.P., & Vorobets, Z.D. (2016). The NO-synthase pathway of L-arginine transformation in spermatozoa of infertile men with different forms of patospermia. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*, 3, 47-53. doi: 10.25040/ecpb2016.03.047

8. (2010). *WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen*, in 5th ed. Geneva: World Health Organization.

9. Kocheshkova, N.S., Vorobets, Z.D., Horchev, V.F., & Kolachkovskiy, O.R. (2007). Vplyv deterhentiv na fermentatyvnu aktivnist ta ultrastrukturu spermatozoidiv [Effect of detergents on the enzymatic activity and sperm ultrastructure]. *Eksperyment ta klinich. fiziologiya i biokhimiya* – *Experimental and Clinic Physiology and Biochemistry*, 2, 24-29. [in Ukrainian].

10. Ravaieva, M.Iu., & Chuian, O.M. (2011). Zmieneniya aktivnosti sistemy sinteza oksida azota pod deystviem nizkointensivnogo milimetrovogo izlucheniya [Change of activity of the synthesis of nitric oxide under the influence of low-intensity millimeter radiation]. *Vcheni zapysky Tavriiskoho natsionalnogo universytetu im. V.I. Vernadskoho. Seriya "Biologiya, khimiya"* – *Scientific notes of Vernadskyi Taurida National University. A series of "Biology and Chemistry"*, 24 (63), 4, 201-210 [in Russian].

11. Keleti, T. (1990). *Osnovy fermentativnoy kinetiki [Fundamentals of enzymatic kinetics]*. Moscow: Mir [in Russian].

12. Ferrier, D.R. (2015). *Biochemistry*. Lippincott illustrated reviews. India. Lippincott Williams & Wilkins.

Р. В. Фафула, У. П. Ефремова, О. К. Онурович, Н. М. Воробец, З. Д. Воробец
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА NO-СИНТАЗЫ СПЕРМАТОЗОИДОВ ИНФЕРТИЛЬНЫХ МУЖЧИН

Резюме

Вступление. Нитроген (II) оксид (NO) является высокореакционноспособной молекулой, которая участвует в регуляции практически всех биохимических процессов и физиологических функций. Роль системы NO/NO-синтаза (NOS) сперматозоидов при мужском бесплодии широко изучают с целью выяснения регуляторных механизмов, которые ведут к развитию этой патологии. Ранее было установлено, что у бесплодных мужчин с различными формами патоспермии происходит перераспределение активности в системе NO-синтаз со сдвигом в сторону Ca²⁺-независимой индуцибельной изоформы, что свидетельствует о дисметаболических изменениях в системе синтеза NO, в частности о его гиперпродукции. Однако достоверно неизвестно, какие биохимические механизмы обуславливают нарушения функциональной активности отдельных изоформ NOS.

Цель исследования – изучить кинетические свойства отдельных изоформ NO-синтазы сперматозоидов фертильных и инфертильных мужчин с различными формами патоспермии.

Методы исследования. Исследования проводили на сперматозоидах мужчин, проходивших первичное обследование в связи с бесплодием. В работе использовали критерии ВОЗ (2010) для оценки морфологических характеристик сперматозоидов. Активность NOS определяли высокоспецифичным методом по образованию L-цитруллина, в цветной реакции с антипирином. Кинетические свойства NOS изучали в стандартной среде инкубации, модифицированной по концентрации субстрата. Мнимые кинетические параметры, характеризующие NOS-реакцию, рассчитывали в координатах Лайнуивера – Берка.

Результаты и обсуждение. Значение начальной максимальной активности cNOS в сперматозоидах астенозооспермичных мужчин в 1,5 раза ($p < 0,001$) ниже относительно этой величины у фертильных мужчин с нормозооспермией. В то же время не отмечено статистически достоверной разницы в величине начальной максимальной скорости ферментативной реакции между нормо- и олигозооспермичными образцами. Значение мнимой константы аффинности cNOS к L-аргнину в сперматозоидах инфертильных мужчин в 1,6–2,7 раза превышало этот показатель в сперматозоидах мужчин с нормозооспермией, что свидетельствовало о снижении сродства фермента к L-аргнину при патоспермии. Значение начальной максимальной скорости NO-синтазной реакции у мужчин с патоспермией было больше от этого показателя для cNOS в 1,7–2,3 раза.

Вывод. При олигозооспермии активность cNOS подавляется за счет роста аффинности к субстрату реакции, а при астенозооспермии – в результате как снижения сродства фермента к субстрату, так и уменьшения числа оборотов фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нитроген (II) оксид; NO-синтаза; мужское бесплодие; патоспермия.

KINETIC PROPERTIES OF NO-SYNTHASE OF SPERMATOZOA OF INFERTILE MEN

Summary

Introduction. Nitrogen (II) oxide (NO) is a highly reactive molecule involved in the regulation of numerous biochemical processes and physiological functions. The role of NO/NO-synthase of spermatozoa in the NO/NOS system of sperm cells in male infertility is widely studied. Previously, we found redistribution of activities in the NO-synthase system with their shift toward Ca^{2+} -independent inducible isoform, which indicates dismetabolic changes in NO synthesis, namely its hyperproduction. However, it is unclear which biochemical mechanisms cause a disturbance of functional activity of NOS.

The aim of the study – to learn the kinetic properties of NOS isoforms of spermatozoa in fertile and infertile men with different forms of pathospermia.

Research Methods. Studies were conducted on sperm cells from men who had undergone a primary examination related to infertility. The WHO criteria (2010) were used in this work to assess morphological characteristics of spermatozoa. The NOS activity was determined by the formation of L-citrulline by a highly specific method of color reaction with antipyrine. The study of the kinetic properties of NOS was carried out in a standard incubation medium that was modified by substrate concentration. The imaginary kinetic parameters characterizing the NOS reaction were calculated in the Lineweaver-Burk plot.

Results and Discussion. The value of the initial maximum activity of cNOS in the spermatozoa of asthenozoospermic men was 1.5 fold ($p < 0.001$) lower than this value in fertile men with normozoospermia. At the same time, there was no statistically significant difference in the value of the initial maximal activity of the enzyme between the normo- and oligozoospermic samples. The value of the apparent affinity constant of cNOS to L-arginine in spermatozoa from infertile men was 1.6–2.7 fold higher than that in normozoospermic men, indicating a decrease in the affinity of enzyme to L-arginine in pathospermic men. The value of the initial maximal activity of iNOS in pathospermic men exceeds this value for cNOS in 1.7–2.3 fold.

Conclusion. The obtained results indicate that in case of oligozoospermia the inhibition of cNOS activity is due to the increase in enzyme affinity to the substrate. In the case of asthenozoospermia the inhibition of cNOS activity is due to the decrease of the enzyme affinity to the substrate and decrease in enzyme rate.

KEY WORDS: nitric oxide; NO synthase; male infertility; pathospermia.

Отримано 05.02.19

Адреса для листування: Р. В. Фафула, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: roman_fafula@ukr.net.