

УДК 577.152.3

ЕФЕКТИ ГІДРОГЕН ПЕРОКСИДУ НА ОСНОВНІ КІНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ ГІДРОЛІЗУ АТР УАБАЇНЧУТЛИВОЮ Na^+ , K^+ -АТР-АЗОЮ СПЕРМАТОЗОЇДІВ ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ

Р.В. Фафула, О.І. Мескало, Е.І. Личковський, З.Д. Воробець

*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69,
м. Львів, 79010, Україна*

e-mail: roman_fafula@ukr.net

Надійшла до редакції 13 листопада 2017 року

Прийнята 17 листопада 2017 року

Актуальність. Na^+ , K^+ -АТР-аза відіграє вирішальну роль у фізіології сперматозоїдів та підтриманні їх фертилізаційної здатності. Na^+ , K^+ -АТР-аза є однією з мішеней для активних форм кисню. Гіперпродукція активних форм кисню може пошкодити клітини сперматозоїдів і вважається одним із механізмів чоловічого непліддя.

Мета роботи. Оцінити вплив H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР уабаїнчутливою Na^+ , K^+ -АТР-азою сперматозоїдів фертильних (нормозооспермія) та інфертильних чоловіків (астенозооспермія).

Матеріали і методи. Активність Na^+ , K^+ -АТР-ази визначали спектрофотометрично за утворенням P_i . Концентраційні залежності лінеаризовано в координатах Лайнуївера-Берка.

Результати. Продемонстровано ефективний інгібуючий вплив H_2O_2 на уабаїнчутливу Na^+ , K^+ -АТР-азу активність сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків. У зв'язку з інгібуючим ефектом H_2O_2 було досліджено вплив цього ефектора на основні кінетичні параметри гідролізу АТР за участю Na^+ , K^+ -АТР-ази. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТР активність Na^+ , K^+ -АТР-ази сперматозоїдів плідних та неплідних чоловіків знижена за присутності H_2O_2 в середовищі інкубації. Проте, оптимальна активність Na^+ , K^+ -АТР-ази сперматозоїдів чоловіків з нормо- та астенозооспермією спостерігається за наявності 5 мМ АТР в інкубаційному середовищі. Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуївера-Берка визначено основні кінетичні параметри Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТР в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків. За дії H_2O_2 константа спорідненості Na^+ , K^+ -АТР-ази до АТР в сперматозоїдах чоловіків з нормо- і астенозооспермією зростає в декілька разів. Початкова максимальна швидкість гідролізу АТР суттєво знижується лише в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозооспермією.

Висновки. За умов H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу пригнічення активності уабаїнчутливої Na^+ , K^+ -АТР-ази в сперматозоїдах чоловіків відбувається за рахунок зниження спорідненості ензиму до субстрату та зниження числа обертів ензиму (лише для сперматозоїдів фертильних чоловіків).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Na^+ , K^+ -АТР-аза; інгібування; кінетичний аналіз; сперматозоїди; інфертильність у чоловіків.

EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON THE MAIN KINETIC PARAMETERS OF ATP HYDROLYSIS BY OUBAIN SENSITIVE Na^+ , K^+ -ATP-ASE IN SPERMATOOZA OF INFERTILE MEN

R.V. Fafula, O.I. Meskalo, E.I. Lychkovskyy, Z.D. Vorobets

Danylo Halysky Lviv National Medical University, Pekarska Str., 69, Lviv, 79010, Ukraine

Background: It is known that Na^+ , K^+ -ATPase plays important role in physiology of spermatozoa including their motility. Na^+ , K^+ -ATPase is one of the targets for reactive oxygen species. Hyperproduction of reactive oxygen species can damage sperm cells and is considered to be as one of the mechanisms of male infertility.

Objectives: To evaluate the H_2O_2 effect on the main kinetic parameters of ATP hydrolysis by oubain-sensitive Na^+ , K^+ -ATPase of spermatozoa of fertile (normozoospermia) and infertility men (asthenozoospermia).

Materials and methods: Na^+ , K^+ -ATPase activity was determined spectrophotometrically by production of P_i . Concentration dependencies were linearized in Lineweaver-Burk plot.

Results: Effective inhibitory effect of H_2O_2 on ouabain-sensitive Na^+, K^+ -ATP-ase activity of sperm cells of fertile and infertile men was demonstrated. The effects of H_2O_2 on the main kinetic parameters of the ATP hydrolysis with the involvement of Na^+, K^+ -ATP-ase was studied. In the whole range of studied concentrations of ATP the Na^+, K^+ -ATP-ase activity of spermatozoa of fertile and infertile men was reduced in the presence of H_2O_2 in the incubation medium. However, the optimal activity of the Na^+, K^+ -ATPase activity of sperm cells in both normozoospermic and asthenozoospermic men was observed in the presence of 5 mM ATP in the incubation medium. By linearization of concentration curves in Lineweaver-Burk plot the main kinetic parameters of Na^+, K^+ -activated, Mg^{2+} -dependent ATP hydrolysis in the sperm cells of fertile and infertile men were determined. Under the effect of H_2O_2 , the affinity constant of enzyme to ATP in normozoospermic and asthenozoospermic men increases several times. The initial maximum rate of ATP hydrolysis was significantly reduced only in the spermatozoa of fertile men with normozoospermia.

Conclusions: Under conditions of H_2O_2 -induced oxidative stress inhibition of ouabain-sensitive Na^+, K^+ -ATP-ase activity in sperm cells occurs due to a decrease in the enzyme affinity to the substrate and a decrease in the maximum reaction rate (only for asthenozoospermic men).

KEY WORDS: Na^+, K^+ -ATPase; inhibition; kinetic analysis; spermatozoa; male infertility.

ЭФФЕКТЫ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА НА ОСНОВНЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ГИДРОЛИЗА АТФ УБАИИНЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ Na^+, K^+ -АТФ-АЗОЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ НЕФЕРТИЛЬНЫХ МУЖЧИН

Р.В. Фафула, О.И. Мескало, Е.И. Лычковский, З.Д. Воробець

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого, ул. Пекарская, 69, г. Львов, 79010, Украина

Актуальность. Na^+, K^+ -АТФ-аза играет решающую роль в физиологии сперматозоидов и поддержании их фертилизационной способности. Na^+, K^+ -АТФ-аза является одной из мишеней для активных форм кислорода. Гиперпродукция активных форм кислорода может повреждать клетки сперматозоидов и считается одним из механизмов мужского бесплодия.

Цель работы. Оценить влияние H_2O_2 на основные кинетические параметры гидролиза АТФ убаинчувствительной Na^+, K^+ -АТФ-азой сперматозоидов фертильных (нормозооспермия) и нефертильных мужчин (астенозооспермия).

Материалы и методы. Активность Na^+, K^+ -АТФ-азы определяли спектрофотометрически по образованию P_i . Концентрационные зависимости линеаризованно в координатах Лайнуивера-Берка.

Результаты. Продемонстрировано эффективное ингибирующее влияние H_2O_2 на убаинчувствительную Na^+, K^+ -АТФ-азную активность сперматозоидов фертильных и инфертильных мужчин. В связи с ингибирующим эффектом H_2O_2 было исследовано влияние этого агента на основные кинетические параметры гидролиза АТФ с участием Na^+, K^+ -АТФ-азы. Во всем диапазоне исследуемых концентраций АТФ активность Na^+, K^+ -АТФ-азы сперматозоидов фертильных и бесплодных мужчин снижена в присутствии H_2O_2 в среде инкубации. Однако, оптимальная активность Na^+, K^+ -АТФ-азы сперматозоидов мужчин с нормо- и астенозооспермией наблюдается при наличии 5 мМ АТФ в инкубационной среде. Путем линеаризации полученных данных в координатах Лайнуивера-Берка определены основные кинетические параметры Na^+, K^+ -активированного, Mg^{2+} зависимого гидролиза АТФ в сперматозоидах фертильных и нефертильных мужчин. Под влиянием H_2O_2 константа сродства Na^+, K^+ -АТФ-азы в АТФ в сперматозоидах мужчин с нормо- и астенозооспермией растет в несколько раз. Начальная максимальная скорость гидролиза АТФ существенно снижается только в сперматозоидах фертильных мужчин с нормозооспермией.

Выводы. В условиях H_2O_2 -индуцированного оксидативного стресса подавление активности убаинчувствительной Na^+, K^+ -АТФ-азы в сперматозоидах мужчин происходит за счет снижения сродства энзима к субстрату и снижения числа оборотов фермента (только для сперматозоидов фертильных мужчин).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Na^+, K^+ -АТФ-аза; ингибирование; кинетический анализ; сперматозоиды; мужское бесплодие.

Na^+, K^+ -АТРаза (Na^+, K^+ -активована, Mg^{2+} -залежна АТФ-гідролаза, ЕС 3.6.1.37) ідентифікована в різних клітинах, зокрема, і в сперматозоїдах. Дві ізоформи каталітичної субодиноці Na^+, K^+ -АТРази, $\alpha 1$ та $\alpha 4$, які мають різні каталітичні

властивості, ідентифіковано в сперматозоїдах. Сперматозоїди трансгенних мишей, нокаутних за геном $\alpha 4$, втрачали здатність до запліднення яйцеклітин, що вказує на вагомую роль Na^+, K^+ -АТР-ази для підтримання фертилізаційної здатності сперматозоїдів [2]. Відомо, що Na^+, K^+ -АТР-аза відіграє вирішальну роль у фізіології сперматозоїдів. Ензим регулює рухливість клітин, проліферацію клітин, синтез глікогену, внутрішньоклітинний кальцієвий рівень, гомеостаз йонів натрію, сигналізацію кальцію, апоптоз, тощо [3-5]. Сигнальні функції ензиму були продемонстровані в різних типах клітин, зокрема, в сперматозоїдах [1].

Гіперпродукція активних форм кисню (АФО) може пошкодити клітини сперматозоїдів і вважається одним із механізмів чоловічого неплоддя [6]. АФО постійно виробляється в більшості клітин, а їхній вміст регулюється рядом ензиматичних і неензиматичних антиоксидантів. АФО можуть змінювати структуру і функції біомолекул, включаючи поліненасичені жирні кислоти спермальних 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 [7]. Крім утворення високоефективних реактивних молекул, H_2O_2 може викликати ряд прямих впливів на клітини, порушувати їх метаболізм та функціонування ензимів.

Метою роботи було оцінити вплив H_2O_2 на основні кінетичні параметри гідролізу АТР уабайнчутливою Na^+, K^+ -АТР-азою сперматозоїдів фертильних та інфертильних чоловіків.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для дослідження були зразки сім'яної рідини, яку отримували після статевої абстиненції 3-5 днів. Показники спермограм (концентрація сперматозоїдів, їх рухливість, морфологія та відсоток живих форм) оцінювали за допомогою світлооптичної мікроскопії, згідно з директивами щодо їх проведення (ВООЗ, 2010) [8]. 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 включенням до дослідження всі чоловіки були ознайомлені з інформаційним листком пацієнта та давали інформовану згоду на участь в дослідженні. У дослідження включені 10 пацієнтів з астенозооспермією (зниження рухливості сперматозоїдів), які проходили первинне обстеження у зв'язку з неплоддям у консультативній поліклініці Львівської обласної клінічної лікарні. Критерії включення: вік 21-39 років, неплодність у шлюбі 1-10 років, чоловічий фактор неплодності за умов астенозооспермії. Критерії виключення: неплодність 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 підтвердженим 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 (рН 7,4) – 30. Вміст загального протеїну в пробах визначали методом Лоурі з використанням набору виробництва НВФ "Simko Ltd" (Україна) [9].

Визначення загальної АТР-азної ензиматичної активності лімфоцитів проводили при 37°C у середовищі інкубації (об'ємом 1 мл) наступного складу (мМ): 120 NaCl , 30 KCl , 5 MgCl_2 , 5 АТР, 1 ЕГТА, 1 NaN_3 (інгібітор мітохондріальної АТР-ази), 20 Hepes-Tris -буфер (рН = 7,4), 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -АТР-ази

ендоплазматичного ретикулуму). Наявність Ca^{2+} -хелатора ЕГТА в середовищі інкубації забезпечувало зв'язування в ньому ендогенних іонів Ca^{2+} . Ензиматичну 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 наступного складу: 1,5 М натрій ацетат, 3,7 % формальдегід, 14 % етанол, 5 % ТХО (рН = 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 [10] і виражали у нмоль P_i /(хв·мг) протеїну. Уабаїнчутливу Na^+, K^+ -АТФ-азну активність обчислювали за різницею між величиною загальної АТФ-азної і базальної Mg^{2+} активності в присутності 1 мМ уабаїну [11]. Уявні кінетичні параметри, які характеризують Na^+, K^+ -активовану, Mg^{2+} -залежну АТФ-гідролазну реакцію – константу спорідненості до АТФ та початкову максимальну швидкість реакції гідролізу АТФ визначали за методом Лайнуівера-Берка. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням програми “MS Excel-2003” для Windows. Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали критерій Стьюдента. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

В наших попередніх дослідженнях показано, що активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів чоловіків із збереженою фертильністю (нормозооспермія, група контролю) становила $46,3 \pm 4,2$ нмоль P_i /год на 1 мг протеїну. В сперматозоїдах неплідних чоловіків з астенозооспермією активність уабаїнчутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази була суттєво нижчою і становила $23,6 \pm 2,6$ нмоль P_i /год на 1 мг протеїну. Зроблено припущення, що інгібування АТФ-азної активності сперматозоїдів чоловіків з неплідністю може бути зумовлене зниженням вмісту внутрішньоклітинного аденозинтрифосфату та пошкодженням спермальних мембран продуктами пероксидного окиснення ліпідів [12]. Na^+, K^+ -АТФ-аза є однією з мішеней для АФО. Сперматозоїди піддавали H_2O_2 -індукованому окисному стресу. Показано дозозалежний інгібувальний ефект H_2O_2 на уабаїнчутливу активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів плідних та неплідних чоловіків з різними формами патоспермій. Ми припускаємо, що можливими механізмами інгібування є окиснення функціонально важливих тіольних залишків ензиму H_2O_2 .

Отримані результати узгоджуються з даними інших досліджень. Зокрема, показано пригнічення Na^+, K^+ -АТФ-азної активності в тучних клітинах за наявності 0,5 мМ H_2O_2 (Derham et al., 2003) [13]. Liu et al. показали, що окисний стрес, індукований АФО, викликав такі ж ефекти як і уабаїн і пригнічував активність Na^+, K^+ -АТФ-ази [14]. Проте, в інших дослідженнях виявлено різке зростання Na^+, K^+ -АТФ-азної активності в *Leishmania amazonensis* у відповідь на низькі (0,1 мкМ) концентрації H_2O_2 (Россо-Мачадо et al., 2015) [15].

Пригнічення активності Na^+, K^+ -АТФ-ази може бути зумовлене оксидативним стресом, який супроводжується ліпопероксидацією спермальних мембран. Сперматозоїди особливо чутливі до гіпероксидації внаслідок наявності в складі їх мембран високої концентрації поліненасичених жирних кислот та через неможливість репарації ДНК. Поліненасичені жирні кислоти є головними мішенями процесів гіпероксидації, які ведуть до зниження в'язкості та інших структурних перебудов спермальних мембран [16, 17]. Відомо, що одним із найбільш чутливих маркерів пероксидного окиснення ліпідів та оксидативного стресу є ТБК-активні продукти [18].

В наших попередніх дослідженнях [19] виявлено значне підвищення вмісту ТБК-позитивних продуктів в сперматозоїдах чоловіків з астенозооспермією.

У зв'язку з інгібуючим ефектом H_2O_2 було досліджено вплив цього ефектора на основні кінетичні параметри гідролізу АТФ за участю Na^+, K^+ -АТФ-ази. В діапазоні концентрацій АТФ від 1 до 5 мМ (за сталої концентрації $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}$) відбувається монотонне збільшення ензиматичної активності уабічутливої Na^+, K^+ -АТФ-ази з виходом на плато. У всьому діапазоні досліджуваних концентрацій АТФ активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів плідних та неплідних чоловіків знижена за присутності H_2O_2 в середовищі інкубації. Проте, оптимальна активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів чоловіків з нормо- та астенозооспермією спостерігається за наявності 5 мМ АТФ в інкубаційному середовищі (рис. 1). Характер залежності Na^+, K^+ -АТФ-азної активності від субстрату для інших досліджуваних груп інфертильних чоловіків був схожий.

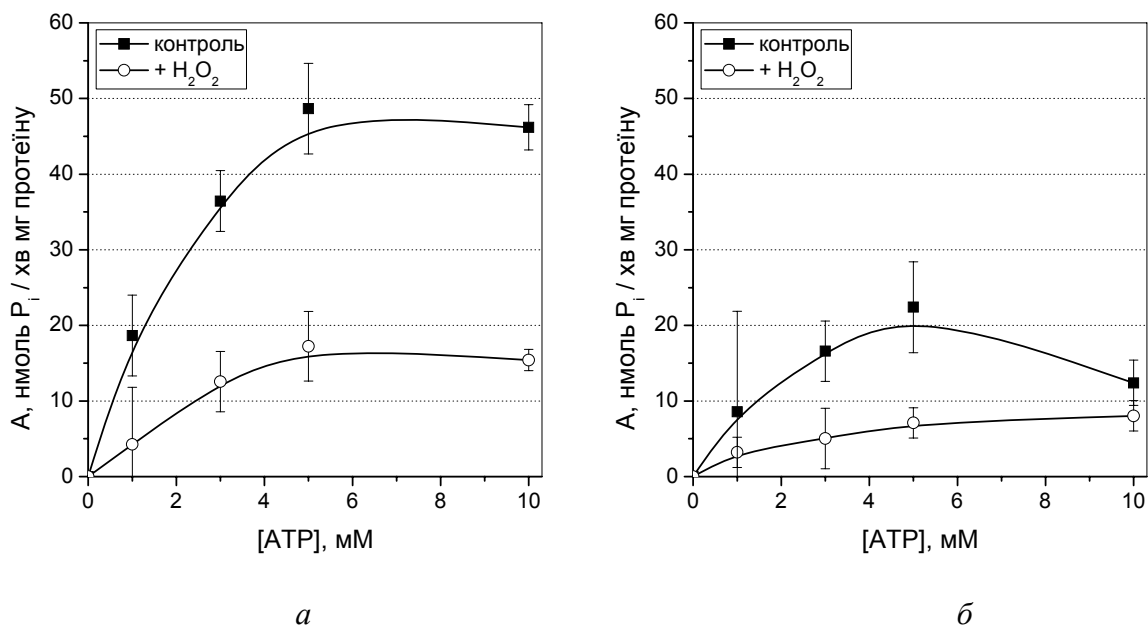


Рис. 1. Вплив 100 нМ H_2O_2 на активність Na^+, K^+ -АТФ-ази сперматозоїдів фертильних (а, нормозооспермія) та інфертильних (б, астенозооспермія) чоловіків за зміни концентрації АТФ в середовищі інкубації.

Для з'ясування можливого механізму зміни ензиматичної активності Na^+, K^+ -АТФ-ази в сперматозоїдах чоловіків проведено визначення основних кінетичних параметрів Na^+, K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу (рис. 2). Як видно з рис. 2, криві залежностей $\{1/V; 1/[\text{АТФ}]\}$ за наявності інгібітора в середовищі інкубації відрізняються тангенсом кута нахилу.

Шляхом лінеаризації отриманих даних у координатах Лайнуівера - Берка визначено основні кінетичні параметри Na^+, K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків (рис. 3).

За дії H_2O_2 константа спорідненості Na^+, K^+ -АТФ-ази до АТФ в сперматозоїдах чоловіків з нормо- і астенозооспермією зростає в декілька разів. Початкова максимальна швидкість гідролізу АТФ суттєво знижується лише в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозооспермією.

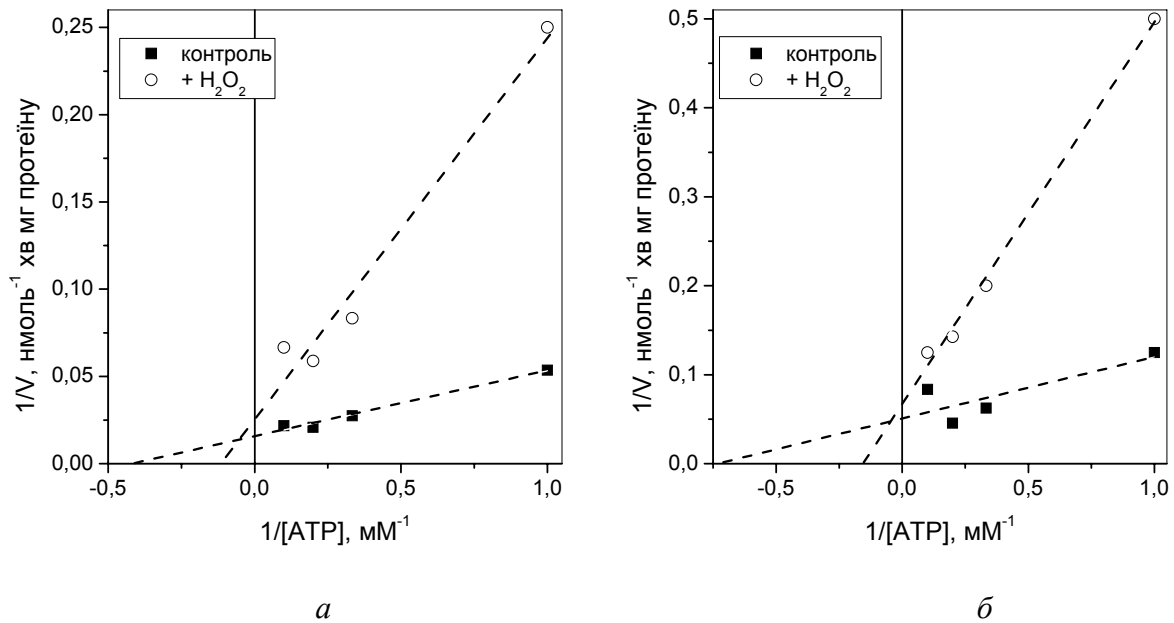


Рис. 2. Лінеаризація концентраційних кривих, наведених на рис. 1, у координатах Лайнуівера-Берка, де V – уабайнчутлива Na^+ , K^+ -АТР-азна активність в сперматозоїдах фертильних (а, нормозооспермія) та інфертильних (б, астенозооспермія) чоловіків.

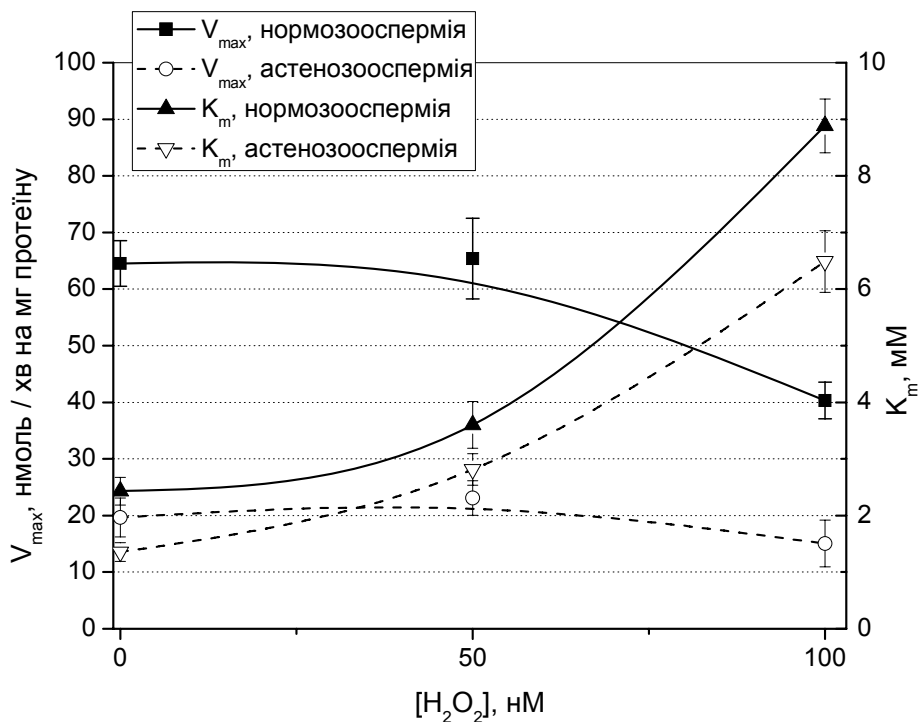


Рис. 3. Вплив різних концентрацій H_2O_2 на кінетичні параметри за АТР (K_m і V_{\max}) в сперматозоїдах фертильних та інфертильних чоловіків.

Отже, за формальними ознаками за умов дії H_2O_2 в сперматозоїдах фертильних чоловіків з нормозооспермією спостерігається змішаний тип інгібування (зростає спорідненість до субстрату, знижується максимальна швидкість реакції). Проте, в

сперматозоїдах інфертильних чоловіків спостерігається неконкурентний тип інгібування (зростає спорідненість до субстрату, максимальна швидкість реакції достовірно не змінюється).

ВИСНОВКИ

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

Подяка

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. Thundathil J. C., Anzar M., Buhr M. M. Na^+/K^+ -ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation // *Biology of Reproduction*. 2006. Vol.75. P. 308–317.
2. Sanchez G., Nguyen A. T., Timmerberg B., Tash J. S., Blanco G. The Na,K -ATPase $\alpha 4$ isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility // *Molecular Human Reproduction*. 2006. Vol. 12. P. 565–576.
3. Barwe S. P., Anilkumar G., Moon S. Y., Zheng Y., Whitelegge J. P., Rajasekaran S. A., Rajasekaran A. K. Novel role for Na,K -ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility // *Molecular Biology of the Cell*. 2005. Vol. 16(3). P. 1082–1094.
4. Khundmiri S. J., Metzler M. A., Ameen M., Amin V., Rane M. J., Delamere N. A. Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells // *American Journal of Physiology, Cell Physiology*. 2006. Vol. 291(6). P. 1247–1257.
5. Nguyen N. T., Wallace D. P., Blanco G. Ouabain binds with high affinity to the Na,K -ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation // *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007. Vol. 18(1), P. 46–57.
6. Mahfouz R. Z., du Plessis S. S., 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. Vol. 93(3). P. 814–821.
7. Mahfouz R. Z., 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. Vol. 90(Suppl 1). P. 320–321.
8. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen, in 5th ed (2010). WHO, 271 p.
9. Онуфрович О. К., Фафула Р. В., Наконечний Й. А., Воробець Д. З., Єфремова У. П., Воробець З. Д. Активність глутатіонзалежних ензимів сперматозоїдів за умов патоспермії // *Медицина та клінічна хімія*. 2016. Т. 18. № 4. С. 5–10.
10. Vignini A, Buldreghini E., Nanetti L., Amoroso S., Boscaro M., Ricciardo-Lamonica G., Mazzanti L., Balercia G. Free thiols in human spermatozoa: are Na^+/K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase activities involved in sperm motility through peroxynitrite formation? // *Reproductive BioMedicine Online*. 2009. Vol. 18(1). P. 132–140.
11. Мельник О. В., Корнійчук О. П., Першин О. І., Воробець З. Д. Властивості Na^+,K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФ-гідролази лімфоцитів крові у хворих на реактивний артрит. // *Вісник Дніпропетровського університету. Серія Біологія. Медицина*. 2014. № 4(2). С. 57–62.
12. Meskalo O. I., Fafula R. V., Lychkovskij E. I., Vorobets Z. D. Na^+, K^+ -ATPase and Ca^{2+}, Mg^{2+} -ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia // *Studia Biologica*. 2017. Vol. 11(2). P. 5–12.
13. Derham B. K., Ellory J. C., Bron A. J., & Harding J. J. The molecular chaperone α -crystallin incorporated into red cell ghosts protects membrane Na/K -ATPase against glycation and oxidative stress // *European Journal of Biochemistry*. 2003. Vol. 270. P. 2605–2611.

14. Liu J., Kesiry R., Periyasamy S. M., Malhotra D., Xie Z., Shapiro J. I. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism // *Kidney International*. 2004. Vol. 66(1). P. 227–241.
15. Rocco-Machado N., Cosentino-Gomes D., Meyer-Fernandes J. R. Modulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity by hydrogen peroxide generated through heme in *L. amazonensis* // *PLoS One*. 2015. Vol. 10(6), e0129604.
16. Colagar A. H., Karimi F., Jorsaraei S. G. A. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno- teratospermic men // *Iran. Red. Cresc. Med. J*. 2013. Vol. 15 (9). P. 780–785.
17. Aitken R. J., Jones K. T., Robertson S. A. Reactive oxygen species and sperm function – in sickness and in health // *J. Androl*. 2012. Vol. 33(6). P. 1096–1106.
18. Januszewski A. S., Alderson N. L., Jenkins A. J., Thorpe S. R., Baynes J. W. Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids // *Journal of Lipid Research*. 2005. Vol. 46(7). P. 1440–1449.
19. Фафула Р.В., Онуфрович О.К., Єфремова У.П., Наконечний Й.А., Воробець З.Д. Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах чоловіків із порушенням фертильності // *Вісник проблем біології та медицини*. 2017. Vol. 1 (135). P. 199–204.

REFERENCES

1. Thundathil, J. C., Anzar, M., Buhr, M. M. (2006). Na⁺/K⁺-ATPase as a signaling molecule during bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 75, 308–317.
2. Sanchez, G., Nguyen, A. T., Timmerberg, B., Tash, J. S., Blanco, G. (2006). The Na,K-ATPase a4 isoform from humans has distinct enzymatic properties and is important for sperm motility. *Molecular Human Reproduction*, 12, 565–576.
3. Barwe, S. P., Anilkumar, G., Moon, S. Y., Zheng, Y., Whitelegge, J. P., Rajasekaran, S. A., & Rajasekaran, A. K. (2005). Novel role for Na,K-ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. *Molecular Biology of the Cell*, 16(3), 1082–1094.
4. Khundmiri, S. J., Metzler, M. A., Ameen, M., Amin, V., Rane, M. J., Delamere, N. A. (2006). Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 291(6), P. 1247–1257.
5. Nguyen, N. T., Wallace, D. P., Blanco, G. (2007). Ouabain binds with high affinity to the Na,K-ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(1), 46–57.
6. Mahfouz, R. Z., du Plessis, S. S., Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2010). Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and Sterility*, 93(3), 814–821.
7. Mahfouz, R. Z., Aziz, N., Sharma, R., Bykova, M., Sabanegh, E., Agarwal, A. (2008). Assessment of intracellular human sperm reactive oxygen species after hydrogen peroxide exposure using four different probes. *Fertility and Sterility*, 90(1), 320–321.
8. WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen (2010). WHO.
9. Onufrovych, O. K., Fafula, R. V., Nakonechnyi, Io. A., Vorobets, D. Z., Iefremova, U. P., Vorobets, Z. D. (2016). Activity of glutathione-dependent enzymes in spermatozoa in patients with pathospermia. *Medical and Clinical Chemistry*, 18(4), 5–10. (in Ukrainian)
10. Vignini, A., Buldreghini, E., Nanetti, L., Amoroso, S., Boscaro, M., Ricciardo-Lamonica, G., Mazzanti, L., Balercia, G. (2009). Free thiols in human spermatozoa: are Na⁺/K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase activities involved in sperm motility through peroxynitrite formation? *Reproductive BioMedicine Online*, 18(1), 132–140.
11. Melnyk O. V., Kornijchuk O. P., Pershyn O.I., Vorobets Z.D. (2014). Properties of Na⁺,K⁺-activated, Mg²⁺-dependent ATP-hydrolase of blood lymphocytes in patients with reactive arthritis. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Med.*, 4(2), 57–62. (in Ukrainian)
12. Meskalo, O. I., Fafula, R. V., Lychkovskiy, E. I., Vorobets, Z. D. (2017). Na⁺, K⁺ -ATPase and Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity in spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. *Studia Biologica*, 11(2), 5–12.
13. Derham, B. K., Ellory, J. C., Bron, A. J., & Harding, J. J. (2003). The molecular chaperone a-crystallin incorporated into red cell ghosts protects membrane Na/K-ATPase against glycation and oxidative stress. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2605–2611.
14. Liu, J., Kesiry, R., Periyasamy, S. M., Malhotra, D., Xie, Z., Shapiro, J. I. (2004). Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. *Kidney International*, 66(1), 227–241.
15. Rocco-Machado, N., Cosentino-Gomes, D., Meyer-Fernandes, J. R. (2015). Modulation of Na⁺/K⁺ ATPase activity by hydrogen peroxide generated through heme in *L. amazonensis*. *PLoS One*, 10(6), e0129604.

16. Colagar, A. H., Karimi, F., Jorsaraei, S. G. A. (2013). Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno- teratospermic men. *Iran. Red. Cresc. Med. J.*, 15(9), 780–785.
17. Aitken, R. J., Jones, K. T., Robertson, S. A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function – in sickness and in health. *J. Androl.*, 33(6), 1096–1106.
18. Januszewski, A. S., Alderson, N. L., Jenkins, A. J., Thorpe, S. R., Baynes, J. W. (2005). Chemical modification of proteins during peroxidation of phospholipids. *Journal of Lipid Research*, 46(7), 1440–1449.
19. Fafula, R. V., Onofrovych, O. K., Iefremova, U. P., Nakonechnyi, Io. A., Vorobets, Z. D. (2017). Інтенсивність процесів ліпопероксидації у сперматозоїдах чоловіків із порушенням фертильності. [Intensity of processes of lipid peroxidation in sperm of men with fertility breach]. *Bulletin of problems biology and medicine*, 1 (135), 199–204. (in Ukrainian).