

Реферати

ДІАГНОСТИКА ТА ЛІКУВАННЯ:
ХВОРОБА ВІЛЬСОНА

Труфанов Є.О.

Хвороба Вільсона – хронічне спадкове, аутосомно-рецесивне захворювання, пов'язане з порушенням обміну міді. Незважаючи на характерну клінічну картину, діагностика захворювання ускладнена. Несвоєчасно поставлений діагноз призводить до того, що при відсутності лікування швидко прогресують неврологічні розлади та патологічні зміни в печінці, які протягом кількох років призводять до смерті хворого. Адекватне, безперервне лікування (діста, пеніциламін), розпочате на початкових стадіях захворювання зменшує клінічні прояви та значно покращує прогноз хвороби Вільсона.

Ключові слова: хвороба Вільсона, клінічні прояви, діагностика, лікування.

Стаття надійшла 10.05.18 р.

DIAGNOSIS AND TREATMENT:
WILSON'S DISEASE

Trufanov Ye.O.

Wilson's Disease is a chronic hereditary, autosomal-recessive disorder associated with excessive deposition of copper in the liver, brain, and other tissues. Despite of a characteristic clinical picture, diagnostics of Wilson's Disease is complicated. Diagnosis delay and untimely initiation of treatment lead to a rapid progression of neurological symptoms, pathological changes in the liver and patient's death for several years. Adequate, continuous treatment (diet, penicillamine) initiated in the early stages of the disease greatly improves clinical symptoms and the prognosis of Wilson's Disease.

Keywords: Wilson's Disease, clinical features, diagnostic, treatment.

Рецензент Катеринчук І.П.

DOI 10.26724/2079-8334-2018-4-66-120-124

UDC 616.697-02:616.69-007.5

R.V. Fafula, O.K. Onufrovych, U.P. Iefremova, M.Z. Vorobets,
I.A. Nakonechnyi, O.V. Melnyk, Z.Ya. Fedorovych, Z.D. Vorobets
Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv

PROOXIDANT/ANTIOXIDANT BALANCE IN SPERM CELLS OF INFERTILE MEN

E-mail: roman_fafula@ukr.net

Hyperproduction of reactive oxygen species and disturbances of prooxidant/antioxidant balance can damage sperm cells and are considered as possible mechanisms of male infertility. The aim of present paper was to study the prooxidant/antioxidant balance in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia. In this study, we found the levels of intracellular TBARS in spermatozoa to be elevated and activity of glutathione antioxidant protection system (GPx, GR, GsT) and GSH content to be decreased in infertile individuals with different forms of pathospermia compared with the healthy man with normozoospermia. The index of antioxidant status was calculated by dividing the sum of the activities of antioxidant enzymes (GPx, GR, GsT) and GSH content to the sum of the TBARS and GSSG level. The extent of decrease of indexes of antioxidant status of spermatozoa of infertile men revealed a disorder-associated trend: oligozoospermia > oligoasthenozoospermia ≈ asthenozoospermia >> leucocytospermia. Unidirectional change in the index of antioxidant status in different forms of pathospermia allows to use it as biotest for intensity free radicals processes and resistance to free radicals in spermatozoa.

Keywords: antioxidant enzymes, lipid peroxidation, male infertility, pathospermia.

The present study is a fragment of the research projects "Investigation of systemic and paracrine regulatory mechanisms in providing homeostasis of functional and metabolic parameters of an organism in conditions of adaptation to the extreme factors of different nature" (state registration No 0116U004510) and "Application of mathematical methods for the study of physical and chemical processes in biotechnical systems" (state registration No 0117U001078).

Oxidative stress is a potential prerequisite for the development of pathologies of different genesis [7]. It is considered as the main cause of male infertility. Oxidative stress is defined as an imbalance of free radicals processes and antioxidant defense mechanisms, which is associated with sperm abnormalities, resulting in infertility [8]. In physiological norm antioxidant defense system which includes both enzymatic and non enzymatic scavenges free radical species, mainly reactive Oxygen species, and protect from over-exposure to oxidative stress. The omnipresent nature of both enzymatic and non enzymatic components of the antioxidant machinery underlies the necessity of ROS detoxification for cell survival [9].

One of the most important enzymatic antioxidant defence mechanism in spermatozoa consist of the glutathione system which includes glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) and glutathione S-transferase (GsT, EC 2.5.1.18). The GPxs are a family of enzymes that contain the unique amino acid selenocysteine. They use low-molecular-weight thiols, such as GSH, to reduce H₂O₂ and lipid peroxides to their corresponding alcohols. GSH reductase (GR) converts GSSG to GSH, a co-substrate for the GPxs. GSTs, another antioxidant enzyme family, inactivate secondary metabolites, such as unsaturated aldehydes, epoxides, and hydroperoxides [10]. GSH (low molecular weight thiol tripeptide γ-glutamyl-cysteinyl-glycine) is the major soluble non-enzyme antioxidant which is highly abundant in all cell types. Depletion of glutathione system leads to cytotoxic and destructive lesions [11].

On the other hand it is known that products of lipid peroxidation can be used as damage biomarkers, since the intensity of free radical processes can be estimated by their content. One of the most sensitive markers of lipid peroxidation and oxidative stress are thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). In our previous studies the intensity of lipid peroxidation processes [6] and activities of enzymes of glutathione antioxidant protection system [12] in spermatozoa in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia were studied.

The aim of present paper was to study the prooxidant/antioxidant balance in sperm cells of infertile men with different forms of pathospermia.

Materials and methods. Patients. This study involved 72 infertile men with different forms of pathospermia. They were recruited between January 2014 and April 2016. A detailed medical history was performed for all studied cases. Exclusion criteria: subjects currently on any medication or antioxidant supplementation were not included. In addition, subjects with infertility over 10 years, azoospermia, genital infection, chronic illness and serious systemic diseases, smokers and alcoholic men were excluded from the study because of their well-known high seminal reactive oxygen species (ROS) levels and decreased antioxidant activity [4,13].

According to semen analysis all infertile men were divided into 4 groups: oligozoospermia (16.7 %), asthenozoospermia (23.6 %), oligoasthenozoospermia (13.9 %) and leukocytospermia (45.8 %). The control group consisted of 20 healthy men with somatic fertility, normozoospermia and confirmed parenthood (married for 3-10 years and have healthy 1-3 children). All patients and healthy donors were matched by age. Semen samples were obtained by masturbation and collected into sterile containers, following 3 - 5 days' abstinence from sexual activity. After liquefaction at 37 C with 5% CO₂ in air, semen samples were examined for volume, sperm concentration, pH, morphology and motility according to the World Health Organization guidelines [14]. Before turning to the study, all men were aware of patient information leaflets and gave informed consent to participate in research. Terms of sample selection meet the requirements of the principles of the Helsinki Declaration on protection of human rights, Convention of Europe Council on human rights and biomedicine and the provisions of laws of Ukraine. Approval for the study was taken from the ethics committee of Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Ethical Committee Approval, protocol No 2 from February 16, 2015).

Cell preparation. Sperm cells were washed from semen plasma by 3 times centrifugation at 3000 *xg* for 10 min in media which contained (mM): 120 NaCl, 30 KCl, 30 Hepes (pH 7.4). The content of total protein in the samples was determined by Lowry method using a kit to determine its concentration ("Simko Ltd"). Determination of oxidative stress parameters was carried out in permeabilized spermatozoa. The detergent saponin in a final concentration of 0.5% was added to sperm suspension for permeabilization of sperm membranes [12].

Assay of oxidative stress parameters. Oxidative stress was evaluated by the measurement of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The TBARS reaction evaluates the levels of malondialdehyde, a product of lipid peroxidation [5]. GPx activity was determined by the oxidation of glutathione [3]. GR activity was assayed by measuring the oxidation of NADPH [1]. GsT was determined by the rate of conjugate by reaction with 1-chloro-2,4 dinitrobenzene as described [2]. The content of total glutathione was determined after complete reduction of glutathione through the use of glutathione reductase by means of Ellman's reagent [15]. The level of 5-trinitrobenzoic acid was monitored with a spectrophotometer at 412 nm. To determine the content of oxidized glutathione (GSSG), 2-vinylpyridine was added to the incubation mixture to a final concentration of 2 % 60 min before the determination [16]. The content of reduced glutathione (GSH) was calculated as the difference of contents between total glutathione and its oxidized form. All results concerning antioxidant ratios were expressed in relative units – R.U. [17].

Statistical analysis. Experimental data were processed by methods of variation statistics using software MS Office. Differences were calculated using the t-Student test for independent groups, assuming $p \leq 0.05$ as the minimum significance level. The results are presented as the mean \pm standard deviation of the mean.

Results of the study and their discussion. TBARS and GSSG level in the sperm cells was found to be significantly higher in the abnormal groups than in fertile group (Fig. 1). The highest TBARS level is observed in patients with leukocytospermia than in other forms of pathospermia ($p < 0.001$ compared to normozoospermic samples). This can be explained by the fact that leucocytes stimulate the ROS formation, induction and development of oxidative stress, thus inhibiting the sperm motility and functional activity [18].

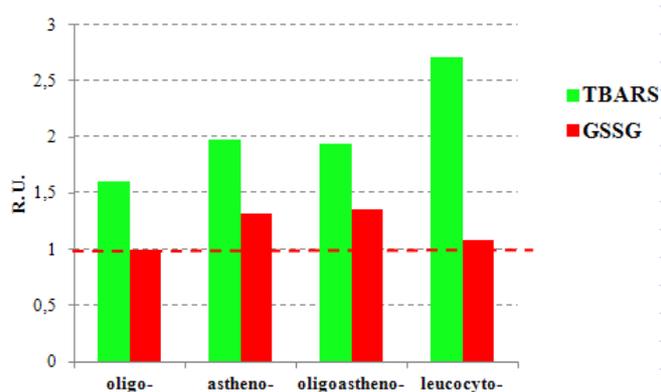


Fig. 1. Normalized indices of TBARS and GSSG levels in the sperm cells of infertile men. Hereinafter: 1 represents the value in sperm cells of normozoospermic samples (men with preserved fertility).

groups with the most decrease in leucocytospermic samples ($p < 0.05$). Infertile groups showed significantly decreased values of reduced glutathione in sperm cells vs. fertile men ($p < 0.01$), indicating an alteration of oxidative status (Fig. 3). The most expressed changes in the GSH content were observed in patients with oligozoospermia. However, the GSH level in leucocytospermic patients was lower than in patients with normozoospermia, but these changes were not significant.

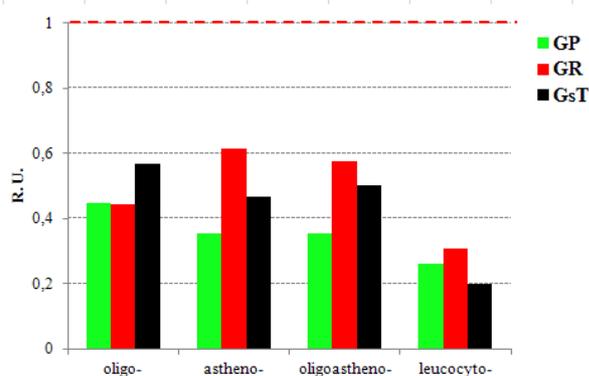


Fig. 2. Normalized indices of activities of antioxidant enzymes of glutathione system in the sperm cells of infertile men

The activity of antioxidant enzymes of glutathione system in ejaculated spermatozoa infertile men is represented on Fig. 2. GPx activity was significantly decreased in patients with all forms of pathospermia compared with healthy men with normozoospermia ($p < 0.01$). The activity of GR also was decreased in all studied groups of infertile men ($p < 0.05$). However, the most expressed decrease in GR activity was observed in leucocytospermic and oligozoospermic samples. Furthermore, GsT activity was significantly decreased in the abnormal

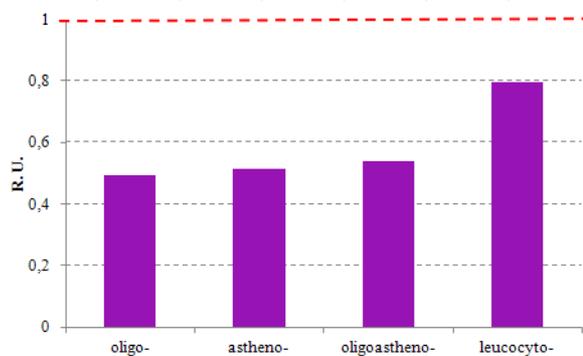


Fig. 3. Normalized indices of GSH level as non-enzyme antioxidant in the sperm cells of infertile men

It should be noted that each form of pathospermia can be characterized by a certain level of oxidative stress markers (TBARS) and activity of enzyme (GPx, GR, GsT) and non-enzyme (GSH) antioxidant systems. The decrease in activity (level) of enzyme and non-enzyme antioxidant systems in patients with pathospermia can be explained by the depletion of compensatory mechanisms occurs in sperm cells. The changes in glutathione antioxidant defence system might either result from GSH synthesis or its utilisation in the detoxification process against oxidative stress. Most diseases are characterized by the intensification of free radical processes and the decrease of the antioxidant capacity. Reduction in activity antioxidant enzymes can be related both to the oxidative destruction of the corresponding DNA regions and with the direct damage to enzyme molecules as a result of the reactive oxygen species effects [19]. In addition, studies indicate that OS is also involved in impaired sperm DNA packaging [20].

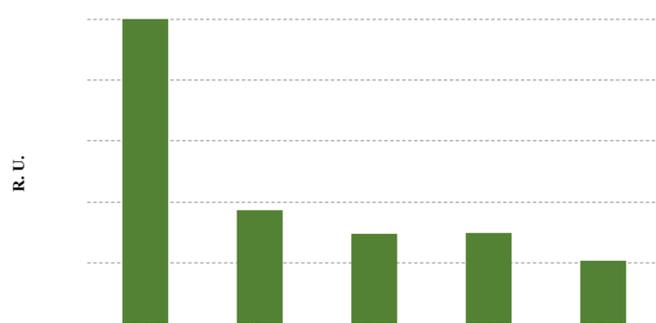


Fig. 4. Indexes of antioxidant status of spermatozoa of fertile and infertile men with different forms of pathospermia

An important factor that promotes the pathogenesis of many diseases is the ratio of antioxidant system to antioxidant systems, which is known as the antioxidant status of cell. The index of antioxidant status was calculated by dividing the sum of the activities of antioxidant enzymes (GPx, GR, GsT) and GSH content to the sum of TBARS and GSSG level. The activities of antioxidant enzymes, GSH, GSSG and TBARS level in sperm cells of normozoospermic samples (men with

preserved fertility) was assumed as 100% and consequently the index of antioxidant status equalled to 1 (which contributes to the unification of this index) [21]. The calculated index of antioxidant status indicates the resistance of cells to oxygen free radicals.

The obtained indexes of antioxidant status of spermatozoa of fertile and infertile men with different forms of pathospermia are represented on Fig. 4. The index of antioxidant status reflects changes in the system of prooxidant/antioxidant balance. The extent of decrease of indexes of antioxidant status of spermatozoa of infertile men revealed a disorder-associated trend: oligozoospermia > oligoasthenozoospermia \approx asthenozoospermia \gg leucocytospermia. The most expressed decrease in index of antioxidant status was observed in spermatozoa of patients with leucocytospermia. Evaluation of the indexes of antioxidant status can be helpful in the diagnosis and the prognosis of the male infertility.

Conclusion

The extent of decrease of indexes of antioxidant status of spermatozoa of infertile men revealed a disorder-associated trend: oligozoospermia > oligoasthenozoospermia \approx asthenozoospermia \gg leucocytospermia. The most expressed disturbance of prooxidant/antioxidant balance was in spermatozoa of patients with leucocytospermia. Unidirectional change in the index of antioxidant status in different forms of pathospermia allows to use it as biotest for intensity free radicals processes and resistance to free radicals in spermatozoa.

References

1. Onufrovych OK, Vorobets DZ, Vorobets ZD. Vplyv preparativ z antyoksydantnyimi vlastyvostyamy na stan antyoksydantnoyi systemy spermatozoidiv pry ekskretorno-toksychniy formi neplidnosti cholovikiv. Visnyk Dnipropetrovskoho universytetu. Biologiya, medycyna. 2013;4(2):52-6. [in Ukrainian]
2. Fafula RV, Onufrovych OK, Yefremova UP, Nakonechnyy YA, Vorobets' ZD. Intensyvnyy protsesiv lipoperoksydatsiyi u spermatozoidakh cholovikiv iz porushennyam fertyl'nosti. Visnyk problem biologiyi i medycyny. 2017;1(135):199-204. [in Ukrainian]
3. Agarwal AL, Tvrda E, Sharma R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. Reproductive Biology and Endocrinology. 2014;12:1-8.
4. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 2010;48:909-30
5. Birben E, Sahiner MU, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J. 2012 Jan;5(1):9-19.
6. Kalinina EV, Chernov NN, Novichkova MD. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. Biochemistry. 2014;79(13):1562-83.
7. Fafula RV, Onufrovych OK, Yefremova UP, Vorobets ZD. Glutathione antioxidant protection system in ejaculated spermatozoa of infertile men with different forms of pathospermia. Biol Studii. 2017;11(1):17-24.
8. Atig F, Raffa M, Habib B-A, Kerani A, Saad A., Mounir A. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. BMC Urol. – 2012;12(6). Available from: URL: doi: 10.1186/1471-2490-12-6
9. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization Press; 2010. 271p.
10. Hamilton TR, de Castro LS, Delgado JdeC, de Assis PM, Siqueira AF, Mendes CM et al. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. Reproduction. 2016 Apr;151(4):379-90.
11. Hammadeh M, Hamad M, Montenarh M, Fisher-Hammadeh C. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. Human Reproduction. 2010;25:2708-20.
12. Bodnar OI, Lukashiv OYa, Vinyarska GB, Grubinko VV. Changes of indicators of the oxidative status of rats in experimental type 2 diabetes and their correction by a selenium-chrome-lipid substances from chlorella Vulgaris beij. Med. and clin. chem. 2017 Nov;19(3):71-81.

Реферат

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНА РІВНОВАГА В СПЕРМАТОЗОЇДАХ ІНФЕРТИЛЬНИХ ЧОЛОВІКІВ

Фафула Р.В., Онуфрович О.К., Єфремова У.П., Воробець М.З., Наконечний Й.А., Мельник О.В., Федорович З.Я., Воробець З.Д.

Гіперпродукція активних форм кисню і порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги розглядаються як можливі механізми розвитку чоловічого непліддя. Метою роботи було оцінити зміни прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в сперматозоїдах неплідних чоловіків з різними формами патоспермій. Виявлено зниження активності ензимів глутатіонової ланки антиоксидантного захисту, зниження вмісту відновленого глутатіону та зростання вмісту ТБК-позитивних продуктів у сперматозоїдах інфертильних чоловіків стосовно величин у сперматозоїдах

ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ РАВНОВЕСИЕ В СПЕРМАТОЗОИДАХ ИНФЕРТИЛЬНЫХ МУЖЧИН

Фафула Р.В., Онуфрович Е.К., Ефремова У.П., Воробець М.З., Наконечный И.А., Мельник О.В., Федорович З.Я., Воробець З.Д.

Гіперпродукція активних форм кисню і порушення прооксидантно-антиоксидантного рівноваги розглядаються як можливі механізми розвитку чоловічого непліддя. Метою роботи було оцінити зміни прооксидантно-антиоксидантного рівноваги в сперматозоїдах бесплодних чоловіків з різними формами патоспермій. Виявлено зниження активності ензимів глутатіонової ланки антиоксидантного захисту, зниження вмісту відновленого глутатіону та зростання ТБК-позитивних продуктів у сперматозоїдах інфертильних чоловіків стосовно величин у сперматозоїдах чоловіків з

чоловіків із збереженою фертильністю. Коефіцієнт антиоксидантного стану розраховували як відношення суми активностей основних антиоксидантних ензимів та відновленого глутатіону до сумарного вмісту продуктів ліпопероксидації (ТБК-позитивних продуктів і окисненого глутатіону). З'ясовано, що порушення прооксидантно-антиоксидантної рівноваги утворює наступну патологічну асоційовану (патоспермія) послідовність (a disorder-associated trend): олигозооспермія > олигоастенозооспермія ≈ астенозооспермія >> лейкоцитоспермія. Однонаправленість змін коефіцієнта антиоксидантного стану за умов патоспермії дозволяє запропонувати його як біотест для оцінки вільнорадикальних процесів та опірності вільним радикалам в сперматозоїдах.

Ключові слова: антиоксидантні ензими, перекисне окислення ліпідів, чоловіче непліддя, патоспермія.

Стаття надійшла: 15.03.18 р.

сохраненной фертильністю. Коэффициент антиоксидантного состояния рассчитывали как отношение суммы активностей основных антиоксидантных ферментов и восстановленного глутатиона к суммарному содержанию продуктов липопероксидации (ТБК-положительных продуктов и окисленного глутатиона). Установлено, что нарушения прооксидантно-антиоксидантного равновесия образует следующую патологическую ассоциированную (патоспермия) последовательность (a disorder-associated trend): олигозооспермия > олигоастенозооспермия ≈ астенозооспермия >> лейкоцитоспермия. Однонаправленность изменений коэффициента антиоксидантного состояния в условиях патоспермии позволяет предложить его как биотест для оценки свободнорадикальных процессов и сопротивляемости свободным радикалам в сперматозоидах.

Ключевые слова: антиоксидантные ферменты, перекисное окисление липидов, мужское бесплодие, патоспермия.

Рецензент: Саричев Л.П.

DOI 10.26724/2079-8334-2018-4-66-124-130

УДК 616.12-005.8-036.1-06-08-039.76

М.І. Швед, Л.В. Левицька

ДНУЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського», Тернопіль

ПІДХОДИ ДО ОЦІНКИ РИЗИКІВ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИХ РЕЗЕРВІВ СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ У ХВОРИХ НА ІНФАРКТ МІОКАРДА З КОМОРБІДНОЮ ПАТОЛОГІЄЮ, ЯКІ ПЕРЕБУВАЮТЬ У ГОСТРОМУ ПЕРІОДІ КАРДІОРЕАБІЛІТАЦІЇ

E-mail: larlev752@gmail.com

З метою вивчення можливостей кількісної оцінки та вірогідності впливу коморбідної патології на перебіг інфаркту міокарда, стан функціональних резервів у хворих на інфаркт міокарда та її роль в призначенні адекватної індивідуалізованої програми реабілітації у даній категорії пацієнтів, обстежено 97 хворих, які проходили гострий (стаціонарний) період реабілітації у кардіологічному відділенні. Встановлено, що параметри загальноприйнятих гемодинамічних та метаболічних показників у хворих на інфаркт міокарда з коморбідною патологією не дозволяють використовувати їх в якості диференційно-діагностичних критеріїв оцінки функціональних резервів серцево-судинної системи. Одночасно виявлено пряму кореляційну залежність між наявністю коморбідного стану та віком пацієнтів, тривалістю артеріальної гіпертензії, частотою дихання, рівнем плазмового креатиніну та індексом коморбідності Чарльсона, а також обернену достовірну кореляцію з ліпопротеїдами високої густини, SPO2 та тестом 6-хвилинної ходьби. Отримані результати стали обґрунтуванням для стратифікації ризиків у пацієнтів, які включаються в програму реабілітації не лише за традиційними маркерами електричної та гемодинамічної стабільності серцево-судинної системи, але і за вищенаведеними прихованими ризик-факторами.

Ключові слова: інфаркт міокарда, коморбідна патологія, кардіореабілітація, індекс Чарльсона, ліпопротеїди високої густини.

Дане дослідження є фрагментом НДР «Комплексний підхід до контролю симптомів, безпосереднього і віддаленого прогнозу в умовах коморбідної патології в клініці внутрішніх хвороб та практиці сімейного лікаря», № державної реєстрації 0118U000361.

Формування сучасних негативних медико-демографічних тенденцій в Україні насамперед відбувається за рахунок серцево-судинних захворювань. Саме вони істотно впливають на основні показники здоров'я: захворюваність, смертність, інвалідність, тривалість та якість життя населення. За останні роки частка померлих від хвороб системи кровообігу (ХСК) поступово зростала і досягла в 2015 р. 68,0%. Перше місце в структурі смертності при ХСК традиційно займає ішемічна хвороба серця (ІХС), питома вага якої збільшилась від 66,6 в 2005 році до 68,9% у 2015 році, причому показники смертності від ІХС за цей період серед осіб працездатного віку залишалися стабільно високими. Гострий інфаркт міокарда (ІМ) на сьогодні залишається однією з головних причин смертності, а ризик подальших серцево-судинних ускладнень, включаючи рецидив інфаркту міокарда, раптову серцеву смерть, серцеву недостатність та інсульт для тих, хто переживає гострий інфаркт міокарда, є істотними навіть у епоху оптимального стратегії реперфузії [1].

Вирішення питання надання медичної допомоги пацієнтам з ІХС часто поглиблюється наявністю у таких хворих супутньої та поєднаної патології, яка передусім зумовлена подовженням тривалості життя в сучасній цивілізації. Лікування коморбідного пацієнта потребує