

## СПЕРМАТОГЕННА ФУНКЦІЯ В УМОВАХ ВПЛИВУ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І КОРЕКЦІЇ ПРЕПАРАТОМ «ТІВОРТІН»<sup>®</sup>

*Романюк А.М., Сауляк С.В., Москаленко Р.А., Москаленко Ю.В.*

*Кафедра патоморфології Медичного інституту СумДУ*

### **Резюме.**

Надходження порогових концентрацій солей міді, цинку, заліза, марганцю, свинцю, хрому в організм статевозрілих самців щурів призводить до порушення секреторної функції сім'яників, що проявляється зменшенням концентрації сперматозоїдів в еякуляті, зменшенням відсотка рухливих гамет, збільшенням частки морфологічно аномальних форм сперматозоїдів. Виразність порушень параметрів спермограми прямо залежить від тривалості впливу комбінації солей важких металів. Застосування «Тівортину»<sup>®</sup> на фоні інтоксикації солями важких металів частково зменшує несприятливі зміни кількісних та якісних параметрів спермограми щурів, оскільки препарат покращує кровопостачання сім'яників, стимулює проліферацію і диференціювання клітин, пригнічує оксидативний апоптоз. Цим може пояснюватися сприятливий вплив препарату на процеси росту і дозрівання статевих клітин. в умовах несприятливого впливу комбінації солей важких металів на орган і організм в цілому.

Робота є складовою частиною науково-дослідної теми "Морфофункціональні особливості перебудови скелета та внутрішніх органів в умовах порушеного гомеостазу" (№ держреєстрації 0107U001287). Збереження здоров'я та функціональної повноцінності репродуктивної системи чоловіка належить до числа найактуальніших проблем сучасної андрології та репродуктології [1]. В Україні за останні два десятиліття склалася складна демографічна ситуація, обумовлена зниженням народжуваності, різким збільшенням населення похилого віку, впливом несприятливих екологічних факторів («екологічна криза») та соціально-економічними причинами [10]. Темпи скорочення населення України є одними з найвищих в Європі (0,9-1,1% на рік), при чому народжуваність компенсує смертність лише на 51% [1]. Згідно даних літератури, 13-19% подружніх пар страждають від безпліддя [8]. Саме чоловічий фактор у 40-50 % випадків безплідного шлюбу є причиною відсутності дітей [10]. Це обумовлює необхідність проведення наукових досліджень, спрямованих на визначення факторів ризику виникнення порушень репродуктивної функції у чоловіків.

Останні дослідження підтвердили прямий зв'язок між станом чоловічої репродуктивної функції та рівнем накопичення полютантів у навколишньому середовищі [11, 14, 15]. При цьому важливе значення належить сполукам деяких солей важких металів (СВМ), які мають пряму цитотоксичну та опосередковану дію на клітини сім'яників [14, 15]. Відомо, що іони важких металів мають фізико-хімічні властивості кислот Льюїса (акцептори електронів) і здатні до ковалентного зв'язування з SH-групами, що обумовлює їх токсичність як тіолових отрут з вираженими мембранотропними ефектами. Блокування SH-груп відновленого глутатіону та ферментів антиоксидантної дії є біохімічною основою прооксидантної дії СВМ, що при інтоксикації призводить до функціональної недостатності антиоксидантного захисту [9].

Для зменшення негативного впливу СВМ на різні органи і тканини застосовують різні препарати. Вибір «Тівортину» для корекції ушкоджуючої дії СВМ на організм взагалі, обумовлюється тим, що на передній лінії впливу СВМ опиняється ендотелій гемокапілярів мікроциркуляторного русла, в тому числі і сім'яників. «Тівортін» – препарат вітчизняного виробництва (фармацевтична компанія «Юрія-Фарм», Україна), діючою речовиною якого є аргінін, що утворюється при дисоціації солі L-аргініну аспартату. L – аргінін – єдиний субстрат для синтезу NO: цей фізіологічний процес спрямований на підтримку нормального функціонування ендотелію [5, 13].

Проведення морфофункціонального аналізу змін, виявлених при дії на тканину статевих залоз СВМ та за умов корекції їх негативного впливу за допомогою препарату "Тівортін", сприятиме пошуку пояснення сутності механізмів репаративних та пристосувальних реакцій тестикулярної паренхіми.

Матеріали про застосування "Тівортину" для корекції негативного впливу солей важких металів на організм та сім'яники відсутні.

Метою нашого дослідження стало вивчення в експерименті впливу комбінації солей важких металів на сперматогенез щурів та застосування препарату «Тівортін»<sup>®</sup> для корекції виявлених змін.

### **Об'єкти і методи дослідження**

Дослідження проведене на 128 лабораторних статевозрілих білих щурах-самцях (5 місяців від народження, з вихідною масою 180-200 г). Щури, як об'єкт морфологічного дослідження, були вибрані у зв'язку з подібністю будови і функціонального статусу їх сім'яників до чоловічих статевих залоз. Під час експерименту лабораторних тварин утримували відповідно до правил, прийнятих Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, яких використовували для експерименту і наукових завдань (Страсбург, 1986р), «Загальних етичних правил експериментів над тваринами», затверджених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) та закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р [16].

Для виведення морфофункціональної системи сім'яників з стану рівноваги експериментальні тварини отримували комбінацію СВМ, яка моделювала стан мікроелементозу, характерного для північних районів Сумської області (підвищена кількість цинку, міді, заліза, марганцю, свинцю, хрому) [6].

Піддослідні тварини поділені на групи в залежності від отриманого набору ксенобіотиків. Першу групу становили контрольні щури, яким внутрішньоочеревинно вводили 2 мл фізіологічного розчину. Тварини другої групи отримували дистильовану воду з комбінацією СВМ: цинку ( $ZnSO_4 \times 7H_2O$ ) – 5 мг/л, міді ( $CuSO_4 \times 5H_2O$ ) – 1 мг/л, заліза ( $FeSO_4$ ) - 10 мг/л, марганцю ( $MnSO_4 \times 5H_2O$ ) - 0,1 мг/л, свинцю ( $Pb(NO_3)_2$ ) – 0,1 мг/л, хрому ( $K_2Cr_2O_7$ ) – 0,1 мг/л. У третій групі щури отримували «Тівортін» у дозі 336 мг/кг внутрішньоочеревинно. У четвертій групі щурів, на фоні впливу вищевказаної комбінації металів, також внутрішньоочеревинно вводили 336 мг/кг «Тівортину». Тривалість експерименту (48 діб) дорівнювала одному циклу сперматогенезу і часу, необхідному для проходження статевими гаметами додатка сім'яника [2]. Для дослідження динаміки морфологічних змін тварини виводилися з експерименту на 7, 14, 30 та 48 добу експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. Виділяли сім'яники, зважували їх на аналітичних вагах ВЛА-200. У суспензії, отриманій при дозованому відмиванні в фізіологічному розчині поздовжньо розрізаного надяєчка, визначали концентрацію сперматозоїдів, процент рухливих та патологічно змінених клітин [3].

Статистичний аналіз передбачував перевірку нормальності розподілу даних з використанням критерію Колмогорова-Смірнова. Порівняння між групами проведено за допомогою t-критерію Ст'юдента, різниця вважалася вірогідною при  $p < 0,05$ .

### Результати власних досліджень

Вживання лабораторними щурами-самцями питної води, забрудненої СВМ, негативним чином відображалася на параметрах спермограми. Ступінь виразності виявлених змін посилювався зі збільшенням термінів експерименту.

Якість процесу сперматогенезу характеризується такими показниками як концентрація сперматозоїдів в еякуляті, їх рухомість, кількість патологічних форм гамет. Для отримання нативної сперми застосовували методику дозованого вимивання сперматозоїдів. У кожній тварини відпрепарувували хвостові відділи додатків надяєчка та сім'яиносні протоки. Їх розміщували у 2 мл теплої ( $37^\circ C$ ) фізіологічного розчину. Використовуючи тонкі очні пінцети, проколювали стінку сім'яиносного протоку і обережно вичавлювали їх вміст. Після ресуспендування сперму інкубували у стерильних пробірках при  $37^\circ C$  на протязі 25 хв у вологій атмосфері. Підрахунок загальної кількості сперматозоїдів проводили у камері Горяєва за допомогою світлового методу мікроскопіювання при збільшенні  $\times 600$ . Результат виражали в млн. клітин в 1 мл розчину. Для визначення рухливих та патологічних сперматозоїдів проби розбавляли в 20 разів фізіологічним розчином при підрахуванні кількості рухливих сперматозоїдів. Патологічні форми визначали після фарбування сперматозоїдів нігрозин-еозином за Блюмом. Препарати досліджувалися під світловим мікроскопом при збільшеннях  $\times 600$  та  $\times 800$ . Кількість рухливих сперматозоїдів визначали в млн., а патологічно змінені гаметиди визначали підрахунком у випадковій вибірці 100 клітин в одній пробі [2].

За допомогою цього методу було встановлено, що в 1 мл суспензії, отриманої з сім'яників інтактних щурів, міститься в середньому 49,35-53,6 млн. сперматозоїдів, 73,23-76,46% з яких рухливі, 14-14,73% гаметиди мали аномалії морфологічної будови у вигляді деформації головки і хвостового відділу, перегину шийки. Показники спермограми щурів, які отримували тільки препарат «Тівортін»®, достовірно не відрізнялися від показників інтактних тварин, що свідчить про відсутність негативного чи позитивного впливу коректора на сперматогенез.

В умовах впливу комбінації СВМ, яка моделює мікроелементозний стан, після 7 діб експерименту концентрація сперматозоїдів знизилася на 34,5% ( $p < 0,001$ ), після 14 діб – на 50,67% ( $p < 0,001$ ), після 30 діб – на 63,75% ( $p < 0,001$ ), після 48 діб – на 77,29% ( $p < 0,001$ ), що яскраво ілюструє негативний вплив досліджуваних ксенобіотиків на кількісні параметри спермограми. Якісні показники сперматозоїдів також зазнають негативних змін: рухливість гаметиди зменшується після 7 діб на 33,93% ( $p < 0,001$ ), після 14 діб – на 53,18% ( $p < 0,001$ ), після 30 діб – на 67,97% ( $p < 0,001$ ), а на закінчення експерименту – на 77,41% ( $p < 0,001$ ). Відсоток патологічних форм сперматозоїдів зростає після 7 діб – на 41,75% ( $p < 0,05$ ), після 14 діб – на 115,79% ( $p < 0,01$ ), після 30 діб – на 167,58% ( $p < 0,001$ ), після 48 діб – на 226,15% ( $p < 0,001$ ).

Параметри спермограми тварин, в яких вплив СВМ коригувався «Тівортіном»®, свідчать про покращення кількісних і якісних показників сперматозоїдів. В умовах протекції впливу мікроелементів-важких металів «Тівортіном»® кількість сперматозоїдів в 1 мл суспензії на 7 добу зростає на 31,5% ( $p < 0,01$ ), на 14 добу – на 33,05% ( $p < 0,05$ ), після 30 діб – на 51,57% ( $p < 0,05$ ), після 48 діб – на 54,89% ( $p < 0,05$ ). Відсоток рухливих гаметиди збільшується на 22,61% ( $p < 0,05$ ), 39,14% ( $p < 0,05$ ), 66,93% ( $p < 0,001$ ), 97,58% ( $p < 0,01$ ) після 7, 14, 30, 48 діб відповідно. Частка морфологічно аномальних форм сперматозоїдів вірогідно зменшується після 30 діб корекції на 28,7% ( $p < 0,05$ ), після 48 діб – на 31,19% ( $p < 0,05$ ).

Зростання частки патологічних форм сперматозоїдів можна пояснити ушкодженням нуклеїнових кислот іонами важких металів-мікроелементів під час активного поділу гермінативних клітин на початкових стадіях сперматогенезу [14, 15]. Ушкодження ферментативних систем може обумовлювати порушення окисного фосфорилювання і зниження продукції АТФ, внаслідок чого виникає зниження рухливості гаметиди. Вказані процеси сприяють запуску оксидативного апоптозу в гермінативних клітинах та клітинах сім'яників, що обумовлює зниження концентрації сперматозоїдів в еякуляті [11]. Саме за таких умов, на нашу думку, є ефективним застосування «Тівортину», адже основною діючою речовиною препарату є аргінін, аргінін, який має антигіпоксичну, мембраностабілізуючу, цитопротекторну, антиоксидантну, дезінтоксикаційну дію [5].

Таблиця 1. Спермограма щурів в різні терміни експерименту

Група	Стат п-к	Концентрація спермійв, млн/мл				Рухливість гамет, %				Патологічні форми гамет,%			
		7 доба	14 доба	30 доба	48 доба	7 доба	14 доба	30 доба	48 доба	7 доба	14 доба	30 доба	48 доба
I	X <sup>-</sup>	49,35	53,35	51,95	53,6	74,1	75,35	76,46	73,23	14,73	14,0	14,65	14,61
	S <sub>X</sub>	3,23	3,54	3,52	3,44	3,74	3,8	3,93	4,08	1,13	1,44	1,16	1,38
II	X <sup>-</sup>	32,32	26,32	18,83	12,17	48,96	35,28	24,49	16,54	20,88	30,21	39,2	47,65
	S <sub>X</sub>	2,3	2,74	2,51	2,04	3,44	2,76	2,32	2,27	2,4	3,9	3,81	4,59
	P <sub>1-2</sub>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,01	<0,001	<0,001
III	X <sup>-</sup>	52,25	56,25	53,51	58,41	74,24	74,2	75,18	72,61	14,94	14,73	14,7	14,21
	S <sub>X</sub>	4,73	4,42	3,95	4,52	4,35	3,73	4,3	3,91	1,52	1,89	1,45	1,27
	P <sub>1-3</sub>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
IV	X <sup>-</sup>	42,5	35,02	28,54	18,85	60,03	49,09	40,08	32,68	16,34	20,28	27,95	32,79
	S <sub>X</sub>	2,12	2,66	2,56	2,2	2,81	2,81	2,91	3,39	2,11	2,67	3,24	3,46
	P <sub>2-4</sub>	<0,01	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,01	<0,001	<0,01	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05

Примітки.

I – група інтактного контролю;

II – група тварин, які отримували комбінацію СВМ;

III – група тварин, які отримували «Тівортін»®;

IV – група тварин, яка отримувала «Тівортін»® на фоні надходження в організм СВМ

Окрім того, відомо, що аргінін підвищує у крові вміст інсуліну, глюкагону, соматотропного гормону (СТГ) і пролактину, які приймають опосередковану участь у регуляції процесів сперматогенезу [5, 12]. Аргінін бере участь у синтезі поліамінів (путресцину, сперміну, спермідину, агматину та інших), які сприяють проліферації та диференціюванню, пригнічують апоптоз клітин, що, можливо, пов'язано зі здатністю цих сполук активізувати розчинну гуанілатциклазу і підвищувати рівень цГМФ [4, 5, 7]. «Тівортін», опосередковано через оксид азоту (II), підтримує системну та локальну гемодинаміку, розслаблюючи непосмуговану мускулатуру судин, що призводить до розширення їх просвіту і покращення кровотоку; також попереджується агрегація тромбоцитів і адгезія їх на ендотелії [5]. Саме тому покращення кровопостачання в умовах несприятливого впливу комбінації СВМ на орган і організм в цілому, стимулювання проліферації і диференціювання клітин, пригнічення оксидативного апоптозу, на нашу думку, пояснює сприятливий вплив препарату на процеси росту і дозрівання статевих клітин.

## ВИСНОВКИ

1. Надходження підвищеної кількості СВМ в організм самців щурів призводить до порушення секреторної функції сім'яників, що проявляється зменшенням концентрації сперматозоїдів в еякуляті, зменшенням відсотка рухливих гамет, збільшенням частки морфологічно аномальних форм сперматозоїдів.
2. Застосування «Тівортіну»® зменшує несприятливі зміни кількісних та якісних параметрів спермограми щурів, які отримували комбінацію солей важких металів.
3. Покращення кровопостачання в умовах несприятливого впливу комбінації СВМ на орган і організм в цілому, стимулювання проліферації і диференціювання клітин, пригнічення оксидативного апоптозу пояснює сприятливий вплив препарату «Тівортін»® на процеси росту і дозрівання статевих клітин.