УДК 616. 686–092.9–06:613.632:615 Надійшла 02.12.2011

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

ВПЛИВ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА СПЕРМАТОГЕННУ ФУНКЦІЮ І ІЇ КОРЕКЦІЯ ПРЕПАРАТОМ ТИВОРТИН®

Кафедра патоморфології (зав. – проф. А. М. Романюк) Сумського державного університету <ser-sau1976@yandex.ru>

Надходження порогових концентрацій солей міді, цинку, заліза, марганцю, свинцю, хрому в організм статевозрілих самців щурів призводить до порушення секреторної функції сім'яників, що проявляється у зменшенні концентрації сперматозоїдів в еякуляті, відсотка рухливих гамет, збільшенні частки морфологічно аномальних форм сперматозоїдів. Вираженість порушень параметрів спермограми прямо залежить від тривалості впливу комбінації солей важких металів. Застосування Тівортіну® 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 можна пояснювати сприятливий вплив препарату на процеси росту і дозрівання статевих клітин в умовах несприятливого впливу комбінації солей важких металів на орган і організм в цілому.

Ключові слова: *сім'яники, спермограма, солі важких металів, сперматозоїди, Тівортін®.*

Дослідження є складовою частиною науково-дослідної теми "Морфофункціональні особливості перебудови скелета та внутрішніх органів в умовах порушеного гомеостазу" (держреєстрація № 0107U001287).

Збереження здоров'я та функціональної повноцінності репродуктивної системи чоловіка є однією з найактуальніших проблем сучасної андрології та репродуктології [1]. В Україні за останні два десятиліття спостерігається складна демографічна ситуація, зумовлена зниженням народжуваності, різким збільшенням населення похилого віку, впливом несприятливих екологічних факторів («екологічна криза») та соціально-економічними причинами [4]. Темпи скорочення населення України одні з найвищих в Європі (0,9–1,1 % на рік), при цьому народжуваність компенсує смертність лише на 51 % [1]. Згідно з даними літератури, у 13–19 % подружніх пар відмічається безпліддя [9]. Саме чоловічий фактор у 40–50 % випадків безплідного шлюбу є причиною відсутності дітей [10]. Це зумовлює необхідність проведення наукових досліджень, спрямованих на визначення факторів ризику виникнення порушень репродуктивної функції у чоловіків.

Дослідження останніх років підтвердили прямий зв'язок між станом чоловічої репродуктивної функції та рівнем нагромадження полютантів у навколишньому середовищі [14–16]. При цьому важливе значення належить сполукам деяких солей важких металів (СВМ), які мають пряму цитотоксичну та опосередковану дію на клітини сім'яників [15, 16]. Відомо, що іони важких металів мають фізико-хімічні властивості кислот Льюїса (акцептори електронів) і здатні до ковалентного зв'язування з SH-групами, що зумовлює 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 [10].

Для зменшення негативного впливу СВМ на різні органи і тканини застосовують різні препарати. Вибір Тівортіну® для корекції ушкоджувальної дії СВМ на організм взагалі зумовлений тим, що на передній лінії впливу СВМ знаходиться ендотелій гемокапілярів мікроциркуляторного русла, в тому числі й 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 ізотонічний процес спрямований на підтримку нормального функціонування ендотелію [6, 13].

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

Дані про застосування Тівортіну® для корекції негативного впливу солей важких металів на організм та сім’яники відсутні.

Мета дослідження – вивчення в експерименті впливу комбінації солей важких металів на сперматогенез щурів та застосування Тівортіну® для корекції виявлених змін.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на 128 лабораторних статевозрілих білих щурах-самцях (5 міс від народження, вихідна маса тіла – 180–200 г). Щури як об'єкт морфологічного дослідження 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, 1986), «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. [12].

Для виведення морфофункціональної системи сім'яників із 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) [7].

Піддослідні тварини розподілені на групи залежно від отримуваного набору ксенобіотиків. I (контрольну) групу становили щури, яким внутрішньоочеревинно вводили 2 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Тварини II групи отримували дистильовану воду з комбінацією СВМ: цинку ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) – 5 мг/л, міді ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) – 1 мг/л, заліза ($FeSO_4$) – 10 мг/л, марганцю ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$) – 0,1 мг/л, свинцю ($Pb(NO_3)_2$) – 0,1 мг/л, хрому

($K_2Cr_2O_7$) – 0,1 мг/л. Щури III групи одержували Тівортін® у дозі 336 мг/кг внутрішньоочеревинно. Щурам IV групі на фони впливу вищевказаної комбінації металів також внутрішньоочеревинно вводили 336 мг/кг Тивортину®. Тривалість експерименту (48 діб) становила однин цикл сперматогенезу і часу, необхідний для проходження статевими гаметами додатка сім’яника [2]. Для дослідження динаміки морфологічних змін тварини виводили з експерименту на 7, 14, 30 та 48-му добу експерименту декапітацією під ефірним наркозом. Виділяли сім'яники, зважували їх на аналітичних вагах ВЛА-200. У суспензії, отриманої при дозованому відмиванні ізотонічному розчині натрію хлориду поздовжньо розрізаного над’яєчка визначали концентрацію сперматозоїдів, процент рухливих та патологічно змінених клітин [3].

Статистичний аналіз передбачав перевірку нормальності розподілу даних з використанням критерію Колмогорова–Смірнова. Порівняння між групами проведено за t-критерієм Стьюдента, різницю вважали достовірною при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Вживання лабораторними щурами-самцями питної води, забрудненої СВМ, негативно впливало на параметри спермограми. Ступінь вираженості виявлених змін збільшувався з подовженням терміну 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 кожної тварини відпрепаровували хвіст над’яєчка та сім'явиносні протоки. Їх розміщували у 2 мл теплого (37 ºС) ізотонічного розчину натрію хлориду. Тонким очним пінцетом проколювали стінку сім'явиносної протоки і обережно видавлювали її вміст. Після ресуспендування сперму інкубували у стерильних пробірках при 37 ºС протягом 25 хв у вологій атмосфері. Загальну кількість сперматозоїдів підраховували в камері Горяєва за світловим методом мікроскопіювання при збільшенні ×600. Результат виражали в кількості клітин в 1 мл розчину. Для визначення рухливих та патологічних сперматозоїдів проби розбавляли в 20 разів ізотонічним розчином натрію хлоріжу при підрахуванні кількості рухливих сперматозоїдів. Патологічні форми визначали після забарвлення сперматозоїдів нігрозином та еозином за методом Блюма. Препарати досліджували під світловим мікроскопом при збільшеннях ×600 та ×800. Кількість рухливих сперматозоїдів визначали в мільйонах, а патологічно змінених гамет – підрахунком у випадковій вибірці 100 клітин в одній пробі [2].

За цим методом було встановлено, що в 1 мл суспензії, отриманої із сім'яників інтактних щурів, міститься в середньому 49,35–53,6 млн сперматозоїдів, 73,23–76,46 % з яких рухливі, 14–14,73 % гамет 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 препарату 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 – на 50,67 % ($P < 0,001$), після 30 – на 63,75 % ($P < 0,001$), після 48 діб – на 77,29 % ($P < 0,001$), що підтверджує негативний вплив досліджуваних ксенобіотиків на кількісні параметри спермограми. Якісні показники сперматозоїдів також зазнали негативних змін: рухливість гамет зменшилась після 7 діб на 33,93 % ($P < 0,001$), після 14 – на 53,18 % ($P < 0,001$), після 30 – на 67,97 % ($P < 0,001$), а після 48 діб – на 77,41 % ($P < 0,001$). Відсоток патологічних форм сперматозоїдів збільшився після 7 діб на 41,75% ($P < 0,05$), після 14 – на 115,79 % ($P < 0,01$), після 30 – на 167,58 % ($P < 0,001$), після 48 діб – на 226,15% ($P < 0,001$).

Параметри сперматограми тварин, у яких вплив СВМ коригували Тівортіном® свідчать про покращання кількісних і якісних показників сперматозоїдів. В умовах корекції впливу мікроелементів важких металів Тівортіном® кількість сперматозоїдів в 1 мл суспензії на 7-му добу збільшилась на 31,5 % ($P < 0,01$), на 14-ту – на 33,05 % ($P < 0,05$), на 30-ту – на 51,57 % ($P < 0,05$), на 48-му – на 54,89 % ($P < 0,05$). Відсоток рухливих гамет збільшився відповідно на 22,61 % ($P < 0,05$), 39,14 % ($P < 0,01$), 66,93 % ($P < 0,001$) та 97,58 % ($P < 0,01$) після 7, 14, 30, 48 діб. Частка морфологічно аномальних форм сперматозоїдів достовірно зменшилась після 30 діб корекції на 28,7 % ($P < 0,05$), після 48 діб – на 31,19 % ($P < 0,05$).

Збільшення частки патологічних форм сперматозоїдів можна пояснити ушкодженням нуклеїнових кислот іонами важких металів під час активного поділу гермінативних клітин на початкових стадіях сперматогенезу [15, 16]. Ушкодження ферментативних систем може зумовити порушення окисного фосфорилювання і зниження продукування АТФ, внаслідок чого виникає зниження рухливості гамет. Вказані процеси спричинюють запуск оксидативного апоптозу в гермінативних клітинах та клітинах сім'яників, що зумовлює зниження концентрації сперматозоїдів в еякуляті [14]. Саме за таких умов, на нашу думку, ефективним є застосування Тівортіну®, бо основна діюча речовина препарату – аргінін, який має антигіпоксичну, мембраностабілізуючу, цитопротекторну, антиоксидантну, дезінтоксикаційну дію [6].

Крім того, відомо, що аргінін підвищує у крові вміст інсуліну, глюкагону, соматотропного гормону (СТГ) і пролактину, які беруть опосередковану участь у регуляції процесів сперматогенезу [6, 11]. Аргінін бере участь у синтезі поліамінів (путресцин, спермін, спермідин, агматин тощо), які стимулюють проліферацію та диференціюванню, пригнічують апоптоз клітин, що, можливо, пов'язано із здатністю цих сполук активізувати розчинну гуанілатциклазу і підвищувати рівень цГМФ [5, 6, 8]. Тівортін®

опосередковано через оксид азоту (II) підтримує системну та локальну гемодинаміку, розслабляючи непосмуговану м’язову тканину судин, що приводить до розширення їх просвіту і покращання кровотоку; також запобігає агрегації тромбоцитів і їх адгезії на ендотелії [6].

Спермограма щурів в різні терміни експерименту

Група	Статистичний показник	Концентрація сперматозоїдів, млн/мл				Рухливість гамет, %				Патологічні форми гамет, %			
		7-ма доба	14-та доба	30-та доба	48-ма доба	7-ма доба	14-та доба	30-та доба	48-ма доба	7-ма доба	14-та доба	30-та доба	48-ма доба
I	$\bar{X}$	49,35	53,35	51,95	53,6	74,1	75,35	76,46	73,23	14,73	14	14,65	14,61
	S_X	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	$\bar{X}$	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_X	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_{1-2}	< 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	$\bar{X}$	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_X	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_{1-3}	> 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	$\bar{X}$	42,5	352	28,54	18,85	603	499	408	32,68	16,34	20,28	27,95	32,79
	S_X	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_{2-4}	< 0,01	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,001	< 0,01	> 0,05	> 0,05	< 0,05	< 0,05

Саме тому покращання 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 у зменшені концентрації сперматозоїдів в еякуляті, відсотка рухливих гамет, збільшені частки морфологічно аномальних форм сперматозоїдів. 2. Застосування Тівортіну® зменшує несприятливі зміни кількісних та якісних параметрів спермограми щурів, які отримували комбінацію солей важких металів. 3. Покращання кровопостачання в умовах несприятливого впливу комбінації СВМ на орган і організм в цілому, стимулювання проліферації і диференціювання клітин, пригнічення оксидативного апоптозу пояснюють сприятливий вплив препарату Тивортин® на процеси росту і дозрівання статевих клітин.

Список літератури

1. *Абубакиров А. Н.* Повреждение ДНК сперматозоидов и мужское бесплодие // Урология. – 2009. – № 3. – С. 86–91.
2. *Андрусишина И. Н.* Морфофункциональные изменения сперматогенеза при воздействии свинца и кадмия на самцов белых крыс // Соврем. пробл. токсикологии. – 1999. – № 2. – С. 22–26.
3. *Гладкова А. И., Сидорова И. В.* Ближайшие и отдаленные последствия эстрогенизации для сперматогенной функции крыс // Пробл. ендокрин. патології. – 2010. – № 2. – С. 74–79.
4. *Горпинченко И. И., Гурженко Ю. Н., Клименко П. М., Спиридонов В. В.* Практический опыт комплексного лечения больных экскреторно-токсическим бесплодием // Здоровье мужчины. – 2010. – № 2. – С. 238–244.

5. *Дмитренко Н. П., Кишко Т. О., Шандренко С. Г.* Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота // Укр. хіміотерапевт. журн. – 2008. – № 1–2. – С. 137–140.
6. *Компендиум 2008* – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторов. – К.: МОРИОН, 2008. – 2270 с. (с. Л–1402–Л–1403) [http://www.compendium.com.ua/info/171576/jurijafarm/tivortin-sup-sup].
7. *Москаленко Р. А.* Морфогенез щитоподібної залози в умовах впливу модельованого мікроелементозу та корекції його впливу глутаргіном // Вісн. Сум. держ. ун-ту. Серія Медицина. – 2010. – Т. 1, № 1. – С. 31–38.
8. *Мушкамбаров Н. П., Кузнецов С. Л.* Молекулярная біологія. – М.: МИА, 2003. – 535 с.
9. *Мхитаров В. А*. Морфофункциональные изменения системы гипофиз–надпочечники–гонады самцов крыс вистар при длительном употреблении этанола в условиях свободного выбора // Арх. патологии. – 2008. – Т. 70, № 6. – С. 38–41.
10. *Нейко Є. М., Губський Ю. І., Ерстенюк Г. М.* Інтоксикація кадмієм: токсикокінетика і механізм біоцидних ефектів // Журн. АМН України. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 262–277.
11. *Holdcraft R. T. W., Braun R. E.* Hormonal regulation of spermatogenesis // Int. J. of Androl. – 2004. – Vol. 27. – P. 335–342.
12. *http*://zakon.rada.gov.ua/cgiin/laws/main.cgi?nreg=3447–1.
13. *Lee N. P. Y., Cheng C. Yan.* Nitric oxide and cyclic nucleotides // Oxidative med. and cellular longevity. – 2007. – Vol. 1, N 1. – P. 25–32.
14. *Meeker J. D, Rossano M. G, Protas B.* et al. Cadmium, lead and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant // Enviromental health perspectives. – 2008. – Vol. 116, N 11. – P. 1473–1479.

15. *Telisman S., Colak B., Pizent A. J.* et al. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men // Environ. Res. – 2007. – Vol. 105, N 2. – P. 256–266.

16. *Wirth J. J., Mijal R. S.* Adverse effects of low lewel heavy metal exposure on male reproductive function // Syst. Biol. Reprod. Med. – 2010. – Vol. 56, N 2. – P. 147–67.

В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СПЕРМАТОГЕННУЮ ФУНКЦИЮ И ЕЁ КОРРЕКЦИЯ ПРЕПАРАТОМ ТИВОРТИН®

А. Н. Романюк, С. В. Сауляк, Р. А. Москаленко, Ю. В. Москаленко (Сумы)

Поступление пороговых концентраций солей меди, цинка, железа, марганца, свинца, хрома в организм половозрелых самцов крыс приводит к нарушению секреторной функции семенников, что проявляется уменьшением концентрации сперматозоидов в эякуляте, процентного содержания подвижных гамет, увеличением доли морфологически аномальних форм сперматозоидов. Выраженность нарушений параметров спермограммы прямо зависит от длительности влияния комбинации солей тяжёлых металлов. Применение препарата Тивортин® на фоне интоксикации солями тяжёлых металлов уменьшает неблагоприятные изменения количественных и качественных параметров спермограммы крыс, поскольку Тивортин® улучшает кровоснабжение семенников, стимулирует пролиферацию и дифференцировку клеток, угнетает оксидативный апоптоз. Этим можно объяснить благоприятное влияние препарата на процессы роста и дозревания половых клеток в условиях влияния комбинации солей тяжёлых металлов на орган и организм в целом.

***Ключевые слова**: семенники, спермограмма, соли тяжёлых металлов, сперматозоиды, Тивортин®.*

SPERMATOGENIC FUNCTION UNDER THE INFLUENCE OF HEAVY METALS SALTS AND CORRECTION OF PREPARATION TIVORTIN ®

A. M. Romanyuk, S. V. Saulyak, R. A. Moskalenko, Yu. V. Moskalenko (Sumy)

Entrance of threshold concentrations of copper, zinc, iron, manganese, lead, limp into the body of sexually mature male of rats leads to secretory malfunction of the testicles, which manifests by a decrease of sperm concentration in the ejaculate, a decrease of percentage of motile gametes, an increase in the proportion of morphologically abnormal sperm forms. The evidence of disorders in spermatogram's parameters is directly depends on the duration of the influence of combination of heavy metal salts. The application of the drug Tivortin® against intoxication of heavy metal salts decrease the adverse movement of quantitative and qualitative parameters of rat's spermatogramms, so far as Tivortin® improves blood circulation, stimulates cell proliferation and cell differentiation, inhibits oxidative apoptosis. These explain beneficial effects of the drug on the growth and maturation of germ cells in case of the influence heavy metal salts combination on organ and the whole body.

Key words: testicles, spermatogram, heavy metal salts, spermatozoa, Tivortin®.