

Вищий державний навчальний заклад України
“УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ”

На правах рукопису

Шаталін Борис Олегович

УДК 616.681/.69-073.7:615.916'175

РОЛЬ АКТИВНИХ ФОРМ КИСНЮ ТА АЗОТУ В МЕХАНІЗМАХ
УШКОДЖЕННЯ СІМ'ЯНИКІВ І СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ ПОЄДНАНІЙ
ДІЇ НА ОРГАНІЗМ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ ТА
НІТРАТУ НАТРІЮ

14.03.04 – патологічна фізіологія

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Науковий керівник

Костенко Віталій Олександрович

доктор медичних наук, професор

ПОЛТАВА – 2017

ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень	6
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ СІМ'ЯНИКІВ І СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ ПОЄДНАНІЙ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ ТА НІТРАТУ НАТРІЮ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	14
1.1. Роль активних форм кисню та азоту в механізмах ушкодження сім'яників і сперми	14
1.2. Джерела надходження в організм неорганічних нітросполук, їх метаболізм і механізми патогенної дії на репродуктивну систему ссавців	27
1.3. Радіоактивність довкілля. Механізми патогенної дії іонізуючої радіації на чоловічу репродуктивну систему	30
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	39
2.1. Загальна характеристика матеріалів та методів дослідження	39
2.2. Методика введення тваринам нітрату натрію	41
2.3. Методика фракційного рентгенівського опромінення щурів	41
2.4. Режими застосування фізіологічно активних сполук	42
2.5. Біохімічні методи дослідження сім'яників	43
2.6. Біохімічні методи дослідження сперми	45
2.7. Визначення кількості та функціонального стану сперматозоїдів	46
2.8. Статистична обробка результатів експерименту	47
РОЗДІЛ 3. МЕХАНІЗМИ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ПОШКОДЖЕННЯ СІМ'ЯНИКІВ І СПЕРМИ ПРИ ПОЄДНАНІЙ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО	

	3
ОПРОМІНЕННЯ	49
3.1. Утворення активних форм кисню та азоту в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення	49
3.2. Зміни процесів пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення	56
3.3. Зміни окиснювального метаболізму в сперматозоїдах білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення	61
РОЗДІЛ 4. ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СПЕРМИ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СУКУПНОЇ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ	67
4.1. Зміни кількісних і якісних показників сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення	67
4.2. Показники рухливості сперматозоїдів білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення	73
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ОКИСНЮВАЛЬНИЙ МЕТАБОЛІЗМ В СІМ'ЯНИКАХ І СПЕРМИ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СПЕРМИ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СУКУПНОЇ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ	78
5.1. Вплив мелатоніну на утворення активних форм кисню та азоту в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення	78
5.2. Вплив мелатоніну на процеси пероксидного окиснення	

ліпідів та антиоксидантний захист в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення 83

5.3. Вплив мелатоніну на окиснювальний метаболізм у сперматозоїдах білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення 85

5.4. Вплив мелатоніну на кількісні та якісні показники сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення 88

5.5. Вплив мелатоніну на показники рухливості сперматозоїдів білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення 92

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ ІНГІБІТОРА АКТИВАЦІЇ NF-κB НА ОКИСНЮВАЛЬНИЙ МЕТАБОЛІЗМ В СІМ'ЯНИКАХ І СПЕРМИ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СПЕРМИ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СУКУПНОЇ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ 95

6.1. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на утворення активних форм кисню та азоту в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення. 95

6.2. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на процеси пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантний захист в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення. 100

6.3. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на окиснювальний метаболізм в сперматозоїдах білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського

опромінення.	102
6.4. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на кількісні та якісні показники сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення	106
6.5. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на показники рухливості сперматозоїдів білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення	109
РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	113
ВИСНОВКИ	123
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	128

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АО	антиоксидант, антиоксидантний
АОС	антиоксидантна система
АТФ	аденозинтрифосфат
АФА	активні форми азоту
АФК	активні форми кисню
ВРО	вільнорадикальне окиснення
ЕТЛ	електронно-транспортний ланцюг
МФК	мітохондріальний ферментний комплекс
НАДН	нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений
НАДФН	нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений
ПОЛ	пероксидне окиснення ліпідів
САР	супероксидний аніон-радикал
ТБК	тіобарбітурова кислота
цАМФ, цГМФ	циклічний аденозин- та гуанозинмонофосфат
ВН ₄	тетрагідробіоптерин
ІкВ	інгібітор кВ
ІКК	ІкВ-кіназний комплекс
ІІ	інтерлейкін
NOS (nNOS, eNOS, iNOS)	синтаза оксиду азоту (нейрональна, ендотеліальна, індуцибельна)
NF-кВ	транскрипційний ядерний фактор кВ
TNF	фактор некрозу пухлини

ВСТУП

Актуальність теми. Активні форми кисню та азоту (АФК / АФА) у сім'яниках і спермі можуть в залежності від концентрації та інших причин виконувати як фізіологічну роль в регулюванні їхніх нормальних функцій (забезпечують внутрішньоклітинну сигналізацію через механізми фосфорилювання білків, активацію протеїнкіназ і цАМФ [169, 241, 264], регулюють процеси гіперактивації, капацитації сперматозоїдів, акросомальну реакцію [127, 132, 157, 169]), так і чинити негативний вплив на чоловічу репродуктивну систему, викликаючи окисно-нітративний стрес, що супроводжується зниженням життєздатності сперматогенного епітелію та сперматозоїдів. Сучасні дослідження вказують про те, що високі рівні АФК / АФА виявлено в зразках сперми до 40% безплідних чоловіків [12, 112, 241].

До антропогенних чинників, які обумовлюють погіршення показників репродуктивного здоров'я чоловіків, належить іонізуюча радіація та хімічні сполуки.

У світі сучасних досягнень радіобіології надзвичайно актуальною вважається проблема впливу на організм людини та тварин малих і середніх доз зовнішнього опромінення [89, 221, 265], особливо за умов поєднаної дії іонізуючої радіації з іншими стресорами, що дозволяє з'ясувати результати їхньої синергічної або антагоністичної взаємодії [5, 17, 88, 145].

До найпоширеніших забруднювачів довкілля належать неорганічні нітросполуки. На VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (Харків, 2016 р.) була висловлена думка, що тривале навантаження нітратами та нітритами, у значній мірі, обумовлює розвиток соціально важливих захворювань та, навіть, обмежує середню тривалість життя [82].

Нітратно-нітритний фон існування сучасної людини може діяти як хімічний (нітративний) стрес, який у сукупності з оксидативним впливом здатний породжувати утворення високотоксичних сполук - пероксинітриту, діоксиду азоту (NO_2) і $\bullet\text{OH}$ -радикалів [80, 81]. Усі ці сполуки утворюються при іонізуючому опроміненні [87, 141, 177, 179].

Проте наслідки комплексного впливу нітратів та іонізуючої радіації прогнозувати досить важко, оскільки продукт біотрансформації нітрат- та нітрит-йонів – оксид азоту (NO) - грає значну роль як у фізіології, так і патофізіології чоловічої репродуктивної системи [41, 162, 172, 190, 201, 239]. Механізми поєднаної дії рентгенівського опромінення та надлишкового надходження неорганічних нітросполук до організму ссавців на метаболізм і функції сім'яників і сперми ссавців раніше не досліджувалися.

Залишається нез'ясованою роль на метаболічний і функціональний стан чоловічої репродуктивної системи нещодавно виявлених регуляторів утворення АФК / АФА, зокрема мелатоніну та інгібіторів активації транскрипційного ядерного чинника κB (NF- κB). Ці сполуки здатні обмежувати ефекти індукбельної ізоформи NO-синтази (iNOS), прозапальних цитокінів та підвищувати антиоксидантний потенціал в різних органах [106, 165, 214].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана як самостійний фрагмент планових наукових робіт Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України «Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція фізіологічно активними речовинами» (№ держреєстрації №0108U010079) та «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу» (№ держреєстрації №0114U004941). Здобувач є співвиконавцем тем. Тема дисертації

затверджена на засіданні Проблемної комісії МОЗ і НАМН України “Нормальна та патологічна фізіологія” від 31.05.2012 р. (протокол № 2) та на засіданні Вченої ради стоматологічного факультету (протокол №2 від 26.09.2012 р.).

Мета дослідження. Метою цієї роботи було з’ясування механізмів розвитку окисно-нітративного стресу у сім’яниках і сперматозоїдах та порушень функціонального стану останніх при поєднаній дії на організм рентгенівського опромінення та нітрату натрію.

Завдання дослідження:

1. Дослідити спільні механізми змін продукції активних форм кисню та азоту, пероксидного окиснення ліпідів і антиоксидантного захисту у сім’яниках білих щурів при дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та хімічного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників.

2. Вивчити спільні механізми змін продукції супероксидного аніон-радикала, сумарної активності NO-синтази та пероксидного окиснення ліпідів у сперматозоїдах білих щурів при дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та хімічного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників.

3. Дослідити вироблення активних форм кисню та азоту, стан вільнорадикальних процесів у сім’яниках і сперматозоїдах білих щурів за умов поєднаної дії на організм доз рентгенівського опромінення та надлишкового надходження нітрату натрію.

4. З’ясувати функціональний стан сперматозоїдів білих щурів за умов поєднаної дії на організм рентгенівського опромінення та надлишкового надходження нітрату натрію.

5. Дослідити вплив мелатоніну на розвиток окисно-нітративного стресу у сім’яниках і сперматозоїдах та функціональний стан останніх за

умов поєднаної дії на організм рентгенівського опромінення та надлишкового надходження нітрату натрію.

6. Вивчити вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на розвиток окисно-нітративного стресу у сім'яниках і сперматозоїдах та функціональний стан останніх за умов поєднаної дії на організм рентгенівського опромінення та надлишкового надходження нітрату натрію.

Об'єкт дослідження: механізми окисно-нітративного стресу та його роль в ушкодженні чоловічої репродуктивної системи.

Предмет дослідження: роль активних форм кисню та азоту у патогенезі метаболічних розладів і функції сім'яників і сперматозоїдів за умов поєднаної дії на організм рентгенівського опромінення та надлишкового надходження нітрату натрію.

Методи дослідження: поставлена мета досягнута шляхом використання експериментальних, біохімічних та математико-статистичних методів дослідження, сперміологічного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Виявлено, що поєднана дія радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та хімічного (30-денне введення нітрату натрію) чинників потенціює негативні ефекти у сім'яниках (утворення пероксинітриду, розвиток декомпенсованого пероксидного окиснення ліпідів, зменшує активність цитохромоксидази) та сперматозоїдах щурів (збільшує гіперпродукцію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом, сумарну активність NO-синтаз та пероксидне окиснення ліпідів). Показано, що фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію супроводжується більш суттєвим (у порівнянні з ізольованою дією чинників) зниженням середнього числа сперматозоїдів, підвищенням кількості нежиттєздатних клітин та їх

патологічних форм, зменшенням активно-рухливих клітин з поступальним рухом (категорія А), прогресуючим підвищенням нерухомих сперматозоїдів (категорія D).

Вперше виявлено, що введення мелатоніну та інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов поєднаної дії радіаційного та хімічного чинників обмежує у тканинах сім'яників генерацію супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій, підвищує активність цитохромоксидази, зменшує сумарну активність NO-синтаз, концентрацію нітрит-йонів і пероксинітриту, що супроводжується зменшенням утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням антиоксидантного потенціалу.

Вперше виявлено, що введення мелатоніну та інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов експерименту обмежує генерацію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним і НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎-залежними електронно-транспортними ланцюгами сперматозоїдів щурів, зменшує сумарну активність NO-синтаз та утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжується зменшенням відсотка нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм, збільшує число сперматозоїдів із швидким поступальним рухом.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів корекції функціонально-метаболічних розладів органів чоловічої репродуктивної системи (із залученням мелатоніну та інгібіторів активації NF-κB) за умов впливу надмірного ятрогенного або промислового рентгенівського опромінення та тривалого надходження до організму неорганічних нітросполук.

Результати роботи впроваджено в навчальний процес на кафедрах патофізіології Вищого державного навчального закладу України

«Українська медична стоматологічна академія», Запорізького державного медичного університету, Національного фармацевтичного університету, Одеського національного медичного університету, Харківського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Здобувачем особисто здійснено патентно-інформаційний пошук, експериментальні дослідження, проведено статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки дисертації. Разом із науковим керівником розроблена програма, визначені мета і завдання дослідження, методичні підходи до проведення експерименту на тваринах. У працях, опублікованих у співавторстві, дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок: результати власних експериментальних досліджень, участь в аналізі та узагальненні отриманих даних, підготовлено статті до друку.

Апробація результатів дослідження. Основні наукові положення і результати дисертації доповідалися та обговорювалися на науково-практичних конференціях «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів» (Тернопіль, 2011, 2015), XVIII міжміській конференції молодих учених «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, Росія, 2012), VI конгресі патофізіологів України «Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології» (Місхор, 2012), XVII Всеросійській медико-біологічній конференції молодих дослідників (з міжнародною участю) «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, Росія, 2014), 8-й національній науково-практичній конференції з іноземною участю «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (Смоленськ, Росія, 2014), VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю

«Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків, 2016), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Медична наука в практику охорони здоров'я» (Полтава, 2016), засіданні апробаційної ради №1 ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» (Полтава, 2016).

Публікації. Результати дослідження опубліковано в 4 статтях у фахових журналах України, що реферуються міжнародними наукометричними базами даних *PINЦ*, *Index Copernicus International*, *Google Scholar*, 1 статті у фаховому журналі за кордоном (Республіка Білорусь), 1 стаття у збірнику наукових праць, 6 робіт опубліковано у матеріалах конгресів і конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена на 161 сторінці комп'ютерного набору, містить 37 таблиць та 19 рисунків. Складається зі вступу, огляду літератури, характеристики об'єктів і методів дослідження, 4-х розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних джерел, який містить 272 джерела – 124 кирилицею та 148 латиницею (обсягом 33 сторінки).

РОЗДІЛ 1

МЕХАНІЗМИ УШКОДЖЕННЯ СІМ'ЯНИКІВ І СПЕРМАТОЗОЇДІВ ПРИ ПОЄДНАНІЙ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ ТА НІТРАТУ НАТРІЮ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль активних форм кисню та азоту в механізмах ушкодження сім'яників і сперми

У невеликих кількостях АФК, зокрема супероксидний аніон-радикал (САР) та пероксид водню, беруть участь у забезпеченні внутрішньоклітинної сигналізації через механізми фосфорилування білків, активацію протеїнкіназ і цАМФ [169, 264, 241]. Показана регуляторна дія наведених АФК на процеси гіперактивації, капацитації сперміїв та фосфорилування тирозину (в основній частині) та протеїнів р81 і р105 (у хвостовій частині) через цАМФ / протеїнкіназа А-сигнальний шлях [194, 240]. Також відомо, що пероксид водню є необхідним для перебігу акросомальної реакції [127, 128, 129, 130, 132, 157, 169].

У нормі сперматозоїди захищені від окисного стресу ферментами АО системи, яка регулює концентрацію АФК. Сім'яна плазма добре насичена низкою АО сполук для захисту сперматозоїдів від окисного стресу [62, 152]. До них належать ензиматичні АО (СОД, каталаза, ферменти глутатіонової системи) та неензиматичні (аскорбат, токоферол, піруват, глутатіон, лужний тіол ерготіонеїн) [20, 112, 150].

У тканинах сім'яників важливе значення мають низькомолекулярні АО, пов'язані з активністю пентозофосфатного шляху, який постачає НАДФН, необхідний для регенерації ланцюга НАДФН – глутатіон –

аскорбат – токоферол. Проте аскорбат і токоферол містяться у сім'яниках у меншій кількості, ніж у спермі [112, 262].

У процесі формування сперматозоїдів стан продукції АФК у сперматозоїдах значно змінюється на різних стадіях їх дозрівання. Доведено, що рівень генерування цих сполук незрілими сперматозоїдами з аномальною морфологією є досить високим [101, 119, 120].

У тканинах сім'яників продукція АФК забезпечується [45, 112, 175]:

- 1) дихальним ланцюгом мітохондрій;
- 2) мікосомальним ЕТЛ, пов'язаним із цитохромом Р-450, необхідним для процесу стероїдогенезу;
- 3) флавіновими оксидазами пероксисом;
- 4) НАДФН-оксидазою та мієлопероксидазою лейкоцитів;
- 5) пероксидами – інтермедіатами циклооксигеназного та ліпоксигеназного шляхів метаболізму арахідонової кислоти.

Так, мітохондрії сім'яників, сім'яних канальців, клітин Лейдіга здатні генерувати САР [175]. Автори припускають, що одноелектронне відновлення кисню у мітохондріях відбувається на рівні НАДН-дегідрогенази. Введення НАДФН індукує НАДФН-цитохром с редуктазу та цитохром Р₄₅₀, що супроводжується виробленням САР у сім'яниках, сім'яних канальцях і клітинах Лейдіга. Утворення САР у сім'яниках, за даними науковців, корелює з інтенсивністю ПОЛ, причому рівень останнього у мітохондріях приблизно у 2 рази перевищує такий у мікосомах.

У лейкоцитах крові та вогнища запалення містяться НАДФН-оксидаза (НАДФН, ФАД, цитохром В_{245/558}) і мієлопероксидаза (у гранулоцитах), що утворює гіпохлорну кислоту (НОСІ) з потужними мікробіцидними властивостями. НАДФН-оксидаза завдяки

одноелектронному відновленню кисню продукує САР, який далі спонтанно дисмутує з утворенням H_2O_2 . Ці АФК, у свою чергу, здатні неферментативно взаємодіяти між собою з утворенням у реакції Габера-Вейса синглетного кисню та гідроксильного радикала [42, 66, 72, 111].

Завдяки підвищеній продукції АФК фагоцити руйнують мембрани бактеріальних, некробіотичних і трансформованих клітин [21, 112]. Дихальний вибух фагоцитів і ферментативна пероксидація активуються кальцієвою месенджерною системою.

Наявність мітохондрій і залишків ендоплазматичного ретикулуму в сперматозоїдах створює умови для активації кисню.

Відомо два головних джерела АФК у спермі – це лейкоцити і незрілі сперматозоїди [127, 131, 132, 157, 172, 192, 205]. Останні виробляють АФК головним чином тоді, коли дефект виникає під час сперматогенезу, що призводить до утримування цитоплазматичних крапель. У сперматозоїдах АФК продукуються НАДФН-залежними оксидоредуктазами мітохондріального ЕТЛ та мембранною НАДФН-оксидазою (головним чином, у патологічно змінених клітинах) [110, 127, 132]. У зрілих сперматозоїдах цитоплазма є практично відсутньою, тому основним джерелом АФК в них є система мітохондріальних НАДФН-залежних оксидоредуктаз [243].

Порушення транспорту електронів у мітохондріях сперматозоїдів супроводжується збільшенням вироблення АФК на рівні МФК I та III [196]. Найбільший внесок в розвиток окисного стресу та пов'язане з ним зниження рухливості сперматозоїдів забезпечує генерація АФК МФК I та їхнє вивільнення у матрикс мітохондрій.

Серед причин, що призводять до підвищення продукції АФК у сім'яниках і спермі виділяють вік, спосіб життя (куріння, надмірна вага, нестача АО тощо), інфекційно-запальні процеси у чоловічих репродуктивних органах (зокрема, хронічний бактеріальний простатит),

аутоімунні реакції проти сперматозоїдів, варикоцеле, психоемоційний стрес, хвороби цивілізації (атеросклероз, цукровий діабет, метаболічний синдром), а також дію екологічно несприятливих чинників (інтоксикації, іонізуюча та неіонізуюча радіація, порушення хроноструктури організму) [6, 17, 18, 50, 61, 85, 98, 102, 103, 145, 164, 241, 228]. Але значення кожного з них в розвитку окисного стресу сперматозоїдів вимагає уточнення.

Є повідомлення, що сім'яна плазма у фертильних чоловіків має більшу АО активність, ніж така у безплідних чоловіків. Спостерігається кореляція між генерацією АФК і АО активністю сім'яної плазми з чоловічим безпліддям [162]. Проте, на думку дослідників, патологічні рівні АФК, виявлені в спермі у інфертильних чоловіків, більш імовірно є наслідком збільшеної генерації АФК, а не зменшеним АО статусом.

Що стосується репарації, на жаль, сперматозоїди не здатні відновлювати пошкодження, викликані окисним стресом, тому що вони мають обмежений АО потенціал, зокрема ферментативний. Ця особливість сперматозоїдів робить їх унікальними в чутливості до окисного стресу [241].

Численні джерела наводять дані щодо ефективності корекції змін морфофункціональних характеристик сперми за допомогою АО сполук [20, 58, 77, 116, 117, 118, 150, 246, 262].

Призначення глюкози та АО (глутатіону та глутатіонтрансферази) в середовище для культивування сперми знижують генерацію H_2O_2 і альдегідів та сповільнюють апоптоз сперматозоїдів [236]. Додавання в середовище для інкубування сперми аскорбату та токоферолу обмежує у сперматозоїдах кисень-індуковані пошкодження ДНК [186].

Потужну АО активність виявляє гормон епіфізу – мелатонін, який виконує безліч функцій в організмі: синхронізує циркадні ритми, регулює цикл сну і неспанья, стимулює імунну систему, регулює

репродуктивну функцію [3, 65]. Його синтез відбувається вночі під час відсутності світла, що падає на сітківку (вдень, або при наявності штучного освітлення його продукція припиняється). Відразу ж після вивільнення з пінеалоцитів гормон потрапляє у кров, а потім в інші рідини організму, в т.ч. сперму, оскільки він легко розчиняється в ліпідах і водному середовищі і може легко перетинати гематотестикулярний бар'єр [1].

Електрохімічні дослідження також підтверджують антирадикальні властивості мелатоніну. Дослідники встановили кореляцію зміни параметрів процесу електровідновлення АФК в присутності мелатоніну (потенціал та граничний струм хвиль відновлення) з отриманими на нанорівні результатами квантово-хімічних досліджень (перерозподіл електронної густини, порядки зв'язків між атомами, енергетичних характеристик) при взаємодії молекул АО з вільними радикалами [54, 95].

Мелатонін підвищує ефективність переходу електронів між МФК, що є основними джерелами генерації АФК [214, 269]. Він також функціонує як непрямий АО, стимулюючи АО ферменти. Через ядерні рецептори мелатонін стимулює експресію генів СОД, каталази, глутатіонпероксидази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, глутатіонредуктази [37, 112]. Нещодавно доведено зниження експресії гена iNOS [161, 165, 226].

Рівень мелатоніну в сім'яній плазмі значно знижується у безплідних пацієнтів зі зменшеною моторикою сперматозоїдів, лейкоцитоспермією, варикоцеле і необструктивною азооспермією, у патогенезі яких чинне місце займає розвиток окисного стресу [139, 176, 198]. Внутрішньоочеревинне введення мелатоніну обмежує вільнорадикальні розлади в сім'яниках після їхньої експериментальної індукції [193].

Внаслідок оптимального фізіологічного балансу між кількістю АФК і АО у чоловічому репродуктивному тракті залишається тільки мінімальна кількість АФК необхідна для регуляції нормального механізму запліднення (капацитації, акросомної та спермо-ооцитарної реакції) [121, 127, 132]. У осіб з екскреторно-токсичною формою неплідності підвищення ПОЛ у сперматозоїдах корелює зі зниженням їх концентрації та рухливості, збільшенням кількості патологічних форм і порушенням структури [19].

При запальних процесах в органах чоловічої репродуктивної системи рівень АФК у найбільшій мірі залежність від кількості лейкоцитів в секреті передміхурової залози та від рівня лейкоцитів у еякуляті. Спостерігається значний кореляційний зв'язок між концентрацією в спермі лейкоцитів і бактеріоспермією, виразністю останньої та продукцією АФК [12]. На тлі патоспермії окисний стрес є найбільш вираженим за умов піоспермії, наявності антиспермальних антитіл і тератозооспермії.

Крім того, АФК можуть безпосередньо ушкоджувати та ініціювати опосередкований ендонуклеазами апоптоз сперматозоїдів, що призводить, у кінцевому рахунку, до безпліддя [12, 220].

Надлишкова продукція АФК також корелює зі зниженням рухливості сперматозоїдів [28, 63, 64, 126, 127, 132, 160]. Зв'язок між АФК і зниженням моторики відбувається через каскаду подій, які призводять до зниження білкового фосфорилування в аксонемі та дозрівання сперматозоїдів, які пов'язані зі скороченням мембранної текучості, яка необхідна для запліднення.

Рівні генерації АФК та інтенсивності ПОЛ у сперматозоїдах використовуються як прогностичні критерії фертильності тварин та маркери безпліддя [125, 157]. Інкубація сперматозоїдів неплідних

чоловіків у залізо-аскорбатній системі підвищує приблизно у 4 рази продукцію вторинного продукту ПОЛ – малонового діальдегіду [173].

Результати цих проб можуть показувати кореляційну залежність з показниками рухливості сперматозоїда до його злиття з ооцитом. Основою цієї закономірності вважають деструкцію мембран сперматозоїдів [140, 255].

У пацієнтів із астено-, терато- і тератоастенозооспермією суттєво збільшується вміст первинних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів: у сперматозоїдах (відповідно на 76%, 47% і 126%), сім'яній плазмі (на 65%, 37% і 103%). Концентрація малонового діальдегіду при всіх формах патоспермії також була підвищеною як у сперматозоїдах, так і у сім'яній плазмі [15, 16, 151].

Утворення продуктів ПОЛ призводить до появи у мембранах сперматозоїдів своєрідних пор унаслідок збільшення вмісту гідрофільних вуглеводневих хвостів, що порушує проникність мембран [213].

Літературні джерела підкреслюють, що за умов патоспермії спостерігається виснаження АОС у сперматозоїдах і сім'яній плазмі: знижується активність АО ферментів (каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази), низькомолекулярних АО сполук (відновленого глутатіону) [13, 149, 150].

Численні літературні джерела свідчать, що значну роль оксиду азоту (NO) у фізіології та патофізіології чоловічої репродуктивної системи [41, 162, 172, 190, 201, 239].

У репродуктивному тракті самців ссавців виявлено всі ізоформи NOS – конститутивні (cNOS, до яких належать eNOS і nNOS) та індукцибельну (iNOS) [138, 148, 190, 201, 207].

A.L. Burnett et al. [148] за допомогою біохімічних і імуногістохімічних методів дослідили розташування NOS у тканинах

сім'яників, придатка (caput, corpus, cauda), сім'явивідної та еякуляторної проток, сім'яних пухирців і згортальної залози дорослих самців щурів лінії Sprague-Dawley. За даними авторів, низькі рівні активності NOS були виявлені в сім'яниках і сім'яних пухирцях, найвищі – у cauda epididymidis та сім'явивідних протоках, кожний з яких виявляв 7-разове перевищення активності NOS у порівнянні зі сім'яниками. Проміжні рівні активності NOS спостерігалися у згортальній залозі, caput et corpus epididymidis. За даними гістохімічного та імуногістохімічного дослідження НАДФН діафораза і NOS були локалізовані в нервових волокнах, що іннервують гладеньку мускулатуру та субепітеліальні ділянки придатка, сім'явивідної та еякуляторної проток. Ендотеліальні клітини і нервові сплетення в межах адвентиції кровоносних судин, що постачають репродуктивні тканини, також були NOS-позитивними. Додаткові локалізації NOS були виявлені в епітеліальних клітинах придатка та згортальної залози. У сукупності ці результати підтверджують значну роль NO у забезпеченні скорочувальних, гемодинамічних і секреторних процесів у репродуктивній системі самців і підтверджують, що ця молекула грає суттєву роль у регуляторних механізмах, необхідних для забезпечення чоловічої репродуктивної функції.

У 2016 році N. Liman та E. Alan [207] повідомили про локалізацію ізоформ NOS у інтратестикулярних і вивідних протоках дорослих домашніх котів (*Felis catus*). Дослідники виявили, що всі зародкові клітини і клітини Лейдига котів виявляють активність eNOS, nNOS та iNOS. Усі три ізоформи NOS (ядерні та цитоплазматичні) виявлено у епітеліальних клітинах інтратестикулярних та вивідних проток (еферентних каналців, проток придатка, сім'явивідних проток), хвості і цитоплазматичних краплях сперматозоїдів. Ці дані свідчать про те, що активність NO / NOS може мати важливе значення не тільки для

функціонування інтратестикулярних і вивідних проток, але і для дозрівання сперматозоїдів.

Експресію eNOS клітини Сертолі та Лейдіга виявляють на всіх стадіях сперматогенезу [162, 239]. Показано, що ця ізоформа, як і iNOS, структурно пов'язана з білками, такими як оклюдин, актин, альфа-тубулін, віментин, що свідчить про їхнє значення в контролі щільних контактів у сім'яниках. Окрім того, дослідження продемонстрували, що обидва наведених ізоферменту беруть участь у регуляції апоптозу зародкових клітин. На культивованих клітинах Сертолі виявлено цитокін-індукований синтез NO і експресію iNOS, а також iNOS-опосередкований патологічний протеоліз α -фодрину, що викликає некроз сперматогенних клітин [162, 258, 266].

Цікаво відмітити, що специфічний для сім'яників підклас nNOS, відомий як TnNOS, був нещодавно ідентифікований як досить потужне джерело NO [162, 203]. TnNOS розміщується виключно в клітинах Лейдіга сім'яників, що підкреслює її участь у стероїдогенезі. Біля цього ізоферменту локалізуються такі сполуки як тестостерон, кальмодулін, аспартат, глутамат і Ca^{2+} / кальмодулін-залежна протеїнкіназа II [162, 239].

Відомо, що NO у концентрації нижче 1 мкмоль грає важливу роль в регуляції різноманітних сигнальних шляхів, регулює тонус гладеньком'язових клітин, контролює проникність гемато-тестикулярного бар'єру, агрегацію й адгезію тромбоцитів, проліферацію клітин, апоптоз, нейротрансмісію, еректильну функцію [162, 190, 202, 239]. При цьому він здатний безпосередньо взаємодіяти з розчинною гуанілатциклазою, стимулюючи синтез цГМФ, який, в свою чергу, активує цГМФ-регульовану фосфодіестеразу, протеїнкінази G і селективні канали циклічних нуклеотидів. Окрім того, мінімальні концентрації NO можуть індукувати MAP-кіназний каскад. У більших

концентраціях NO (особливо той, що генерується iNOS) виявляє потужні цитотоксичні властивості, активує ПОЛ у сім'яній плазмі [162].

Надлишкові кількості NO беруть участь в утворенні інших АФН – пероксинітриту (ONOO^-), NO_2 , N_2O_3 , нітрокислого йона, нітрозил-вмісних сполук, що викликають нітрозативний стрес, який має суттєвий патологічний вплив на чоловічу репродуктивну систему, порушує здатність сперми до запліднення [162].

Примітно, що відомості наукової літератури щодо участі NO у регуляції рухливості сперматозоїдів та їхньої стійкості до змін умов середовища є досить суперечливими.

З одного боку показано, що NO, що виробляється у сперматозоїдах людини cNOS, грає важливу роль в здатності цих клітин зливатися з ооцитом [170]. Вивільнення NO із його донатора – нітропрусиду натрію – покращують рухливість сперматозоїдів і зменшує ПОЛ їхніх мембран після розморожування кріоконсервованої сперми [182].

Нещодавно доведено, що NO бере участь у регуляції капацитації у спермі людини [183]. Так, сполуки, що вивільняють NO, прискорюють відповідь сперматозоїдів людини на фолікулярну рідину, тоді як інгібітори NOS знижують число акросомальних реакцій. Окрім того, NO модулює фосфорилування тирозину в сперматозоїдах. Авторами виявлена пряма кореляційна залежність між капацитацією та NO-залежним фосфорилуванням тирозину.

З іншого боку, виявлено, що у чоловіків з нормозооспермією концентрація NO є значно нижчою, ніж у безплідних пацієнтів з астенозооспермією [143]. Дослідники виявили значну лінійну негативну кореляція між концентрацією NO і числом рухливих сперматозоїдів. Про негативний вплив NO на рухливість сперматозоїдів повідомляють і інші дослідники [135, 217].

З системою L-аргінін/NO пов'язано погіршення показників спермограми за умов психоемоційного стресу (екзаменаційна сесія) у здорових студентів-медиків [166]. За цих умов було виявлено, що концентрація сперматозоїдів, кількість активно-рухливих клітин з поступальним рухом, активність аргінази у сім'яній плазмі значно поступається відповідним величинам, що виявлялися у менш напружений термін. Дослідники показали, що під час стресу існує негативна кореляція між рівнем NO і числом рухомих сперматозоїдів та активністю аргінази. Отримані результати свідчать, на думку науковців, що психоемоційний стрес викликає збільшення рівня NO і зниження активності конкурентного щодо NOS неокисного (аргіназного) шляху метаболізму L-аргініну. Зменшення якості сперми автори пов'язують з надмірним виробленням NO у осіб, які перебувають у стані психоемоційної напруги.

Примітно, що введення субстрату NOS і аргінази – L-аргініну – не завжди впливає на кількісні та якісні показники сперми. Так, при комплексному морфологічному дослідженні сім'яників інтактних щурів та тварин, що отримували аспартат аргініну, було встановлено, що застосування аспартату аргініну не призводить до статистично вірогідних структурних та функціональних змін сім'яників [211]. Інші дослідники повідомляють про позитивну дію L-аргініну та L-цитруліну в комплексі з іншими біологічно активними добавками на обсяг, концентрацію, рухливість і якісні характеристики сперматозоїдів у порівнянні з плацебо [252].

В останні роки з'ясовано участь транскрипційного ядерного фактора κB (NF-κB) в експресії генів iNOS. Промотор iNOS містить сайти для зв'язування NF-κB [263]. Показано, що пригнічення транскрипції мРНК iNOS зменшує активність NF-κB [137, 156, 168, 235,

249]. Останній опосередковує біосинтез TNF- α та IL-1 β , які є індукторами iNOS.

Повідомляється про існування негативного зворотного зв'язку між концентрацією NO та пероксинітриду та активністю NF- κ B, що стабілізує експресію гена iNOS, обмежуючи надлишковий рівень NO та АФН [204, 247].

Нещодавно показана здатність pNOS викликати down-регуляцію NF- κ B та залежних від активації останнього експресії iNOS та метаболічних зрушень (продукції CAP, ПОЛ тощо) [60, 232, 256].

В останні роки виявлена роль активації NF- κ B у функціонуванні чоловічої репродуктивної системи.

Показано, що субодиниці p50 і p65 конститутивно діють у ядрі клітин Сертолі, культивованих з сім'яників щурів. За природних умов компоненти NF- κ B присутні в ядрах клітин Сертолі протягом усіх 14 (I-XIV) етапів сперматогенезу. Проте ядерна експресія NF- κ B збільшується в стадії XIV і залишається високою в стадії I-VII. На відміну від цього, субодиниці p50 і p65 нетривало експресуються в ядрах зародкових клітин з піковими рівнями, виявленими в пахитенних сперматоцитах на стадіях VII-XI та низькими рівнями на стадії I-VII сперматид [159]. Далі було встановлено наявність у сім'яниках інгібіторних білків I κ B- α і β , але не I κ B- ϵ [206]. Дослідники зробили висновок, що всі стадії сперматогенезу специфічно контролюються NF- κ B, який грає важливу роль у процесі розвитку сперматозоїдів [147, 159, 206].

З'ясована роль NF- κ B у забезпеченні процесу апоптозу сперматогенних клітин [208, 230, 237], стимуляції експресія рецептора андрогенів у клітинах Сертолі [158].

S. Zhang et al. [271] показали участь цього транскрипційного чинника у запальних змінах у сім'яниках при введенні щурам лінії Sprague-Dawley фториду натрію в дозі 25, 50 та 100 мг/л з водою, що

супроводжувалися збільшенням експресії NF-κB –залежних генів – TNF-α, IL-1β, iNOS і циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) – та виражалися в ушкодженні сперматогоній, зниженні сперматоцитів і відсутності подовжених сперматид, а також у тяжких ультраструктурних аномаліях.

Виявлено участь NF-κB в яєчках у ініціації окисного стресу за умов ішемії / реперфузії, що викликає фосфорилювання і деградацію IκB-α та ядерну транслокацію NF-κB із наступною активацією залежних генів [212]. Про NF-κB-опосередковане порушення сперматогенезу повідомляють і інші автори [134, 188, 248, 268].

Роль активації NF-κB у порушенні чоловічої репродуктивної системи при дії іонізуючої радіації відмічають лише одиничні літературні джерела.

Так, R.J. Rasoulpour et al. [238] вказують на те, що NF-κB, який у багатьох типах тканин виявляє антиапоптотичну дію, у сім'яниках мишей за умов дії іонізуючої радіації опосередковує апоптоз елементів сперматогенного епітелію.

Таким чином, дані літератури розкривають різні механізми позитивної та патогенної дії активних форм кисню та нітрогену на чоловічу репродуктивну систему ссавців. Показано зв'язок гонадотоксичної дії цих сполук зі станом активності різних ізоформ NO-синтаз та транскрипційного ядерного фактора κB. Певні перспективи корекції окисного та нітрозативного стресів у тканинах сім'яників і спермі можуть бути пов'язані з використанням мелатоніну, який, поряд з іншим, є селективним інгібітором iNOS. Проте механізми утворення АФК і АФН у органах чоловічої репродуктивної системи за умов поєднаної дії екологічних забруднювачів в іонізуючої радіації залишаються з'ясованими недостатньо.

1.2. Джерела надходження в організм неорганічних нітросполук, їх метаболізм і механізми патогенної дії на репродуктивну систему ссавців

Широке, нерідко нераціональне та безконтрольне, застосування азотних добрив у сільськогосподарському секторі та їхня міграція в харчові продукти та ґрунтові води на сьогодні набуло епідемічного значення для України [94]. До 70% добового надходження нітратів в організм припадає на овочі, решта – з питною водою. Десятки мільйонів людей в країнах Європи вживають воду з підвищеним вмістом розчинних нітратів. Ґрунтова та між пластова вода джерел питного водопостачання в Україні часто має перевищення гранично допустимих кількостей нітратів (більше ніж 50 мг/л) [94, 104]. Також необхідно відмітити, що для осіб, які страждають на серцево-судинну патологію, додатковим шляхом надходження нітросполук є лікарські засоби [227].

Нормована кількість надходження нітратів в організм людини становить 5 мг (у перерахунку на NaNO_3) на добу на 1 кг маси тіла. Дані International Programme on Chemical Safety [223] свідчать, що смертельною для людини є доза 4-50 г за нітрат-іоном (еквівалентно 67-833 мг NO_3^- /кг маси тіла). За рівнем утворення метгемоглобіну токсичні дози коливаються від 2 до 9 г за нітрат-іоном. Ці значення еквівалентні 33-150 мг NO_3^- /кг маси тіла. При надходженні нітратів в організм людини аліментарним шляхом час всмоктування дорівнює 1-3 годинам, пікові рівні вмісту нітратів відмічаються у сироватці крові, слині та сечі [171].

Важливо зазначити, що екзогенне надходження нітратів не є єдиним джерелом – існує можливість ендогенного синтезу нітратів у організмі людини та тварин, величина якого складає приблизно 100 мг нітратів на добу [223, 224].

Біотрансформація нітратів є важливим етапом їхнього перетворення у нітрити та оксид азоту. Нітрат-іони можуть у організмі ссавців відновлюватися до нітрит-іонів як мікрофлорою шлунково-кишкового тракту, так і власними нітратредуктазами тканин [84, 155]. Далі NO_2^- зазнає перетворення у NO під дією нітритредуктаз резидентної мікробіоти системи травлення [84, 155, 251], або шляхом ферментативного відновлення за участю електронно-донорних систем організму ссавців (при взаємодії з дезоксигемоглобіном і міоглобіном, у мітохондріях, ендоплазматичному ретикулумі, у ксантиноксидазній реакції) [78, 83, 114, 154, 155, 185, 197, 225, 245]. За даними дослідників, внесок дезоксигемоглобіну у відновлення NO_2^- в NO складає 60-70%, міоглобіну – близько 15%, мітохондрій – приблизно 12-13%, ендоплазматичного ретикулуму – близько 2-3% [83]. Можливе також неферментативне відновлення NO_2^- при їхньому протонуванні [163, 178, 210], у реакціях за участю відновленого глутатіону, аскорбінової кислоти та поліфенолів [144, 210].

Наведені реакції беруть участь у регуляторному контурі (“цикл оксиду азоту”), що підтримує адекватний рівень оксиду азоту в організмі ссавців і включає дві компоненти: NO -синтазу (забезпечує ендогенний синтез NO з L-аргініну) та нітрат- і нітритредуктазу [78, 80, 83, 114, 209, 210]. Останній шлях може постачати NO у кількості у 10^2 - 10^3 рази вище, ніж NOS (особливо за умов гіпоксії) [83].

Однією з систем організму, що суттєво реагує на зміни концентрації нітратів та нітритів є чоловіча репродуктивна система. Вміст нітритів у сперматозоїдах здорових чоловіків становить $0,4 \pm 0,02$ нмоль/ 10^6 клітин [52].

Літературні джерела містять суперечливу інформацію щодо впливу неорганічних нітросполук на сперматогенез [34, 52, 133, 167]. З одного боку з'ясовано, що у самців, які отримували розчин нітриту

натрію в концентрації 0,3% як екзогенний донатор NO, спостерігається зменшення відносної маси яєчок з наступним повільним зростанням цього показника, хоча й не до рівня контрольних значень. Подібна динаміка змін обумовлена суттєвим пошкодженням сперматогенного епітелія, різким зростанням кількості канальців зі злуценом епітелієм та майже повним зникненням сперматогоній [109]. З іншого боку, на 30-ту добу від початку експерименту з'являються ознаки компенсаторного підсилення сперматогенезу, про що свідчить зростання індексу сперматогенезу на 30% порівняно з контролем.

Інші дослідники повідомляють, що концентрація неорганічних нітросполук чітко корелює з розвитком астено- та тератозооспермій [34, 52, 133].

У динаміці хронічної інтоксикації нітратом натрію в сім'яниках білих щурів відзначається прогресуюче збільшення загального фона продукції САР за рахунок його вироблення мітохондріальним та мікосомальним ЕТЛ [31]. У ранні терміни інтоксикації (на 14-30 добу після початку затруєння білих щурів нітратом натрію у дозі 200 мг/кг) зростання продукції АФК / АФА пов'язано з посиленням утворення САР мітохондріальним ЕТЛ та утворенням NO [31, 30]. Автором виявлено, що після 6-місячного введення нітрату натрію достовірно знижується продукція САР НАДФН-оксидазою лейкоцитів.

Хронічна інтоксикація нітратом натрію призводить до формування комплексу морфологічних порушень у сім'яниках у вигляді дистрофічних змін та аплазії сперматогенного епітелію, особливо на кінцевих етапах його розвитку, зниження індексу сперматогенезу, розладів у судинах мікроциркуляторного русла [35], а також справляє пошкоджуючий вплив на сперму лабораторних тварин, що відбивається у зниженні абсолютної кількості сперматозоїдів, їх життєздатності та рухливості [34]. Комплекс морфофункціональних порушень сперми

формується протягом 1-3-х місяців нітратної інтоксикації та зберігається таким при подальшому введенні токсиканту.

Підвищене надходження нітратів у організм самців призводить до суттєвих розладів ембріо- та фетогенезу у парованих з ними самок, що відображається у зменшенні кількості місць імплантації та живих плодів, підвищенні кількості місць резорбції та загальної ембріональної смертності [33, 93]. Одним з можливих механізмів зазначеної патогенної дії нітратів є ініціація ПОЛ та надлишкове утворення АФК.

Таким чином, численні літературні джерела доводять що типовим механізмом регуляторної та токсичної дії нітрат- та нітрит-іонів є їхнє відновлення до оксиду азоту. Лише незначна кількість джерел висвітлюють механізми впливу неорганічних нітросполук на чоловічу репродуктивну систему. Ці дані носять суперечливий характер, оскільки наслідки такого впливу залежать від низки чинників (دوزи речовини, тривалості її введення, стану захисних механізмів, зокрема антиоксидантної системи, поєднаної дії інших факторів).

1.3. Радіоактивність довкілля. Механізми патогенної дії іонізуючої радіації на чоловічу репродуктивну систему

Широке розповсюдження ядерних технологій неминує спричиняє розширенню кола осіб, які зазнають несприятливого впливу радіаційних факторів [90, 91]. Основними джерелами опромінення населення України є джерела природного походження, які за внеском у сумарну дозу складають близько 90%. За даними Наукового комітету ООН з дії атомної радіації (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, UNSCEAR), глобальна доза опромінення населення планети від усіх природних джерел дорівнює $2,4 \text{ мЗв} \cdot \text{рік}^{-1}$, а в Україні – $6,15 \text{ мЗв} \cdot \text{рік}^{-1}$ [260].

Внесок до сумарної дози (%) різних джерел опромінення населення України має такий вигляд [59, 260]:

1. Джерела природного походження (приблизно 90%):
 - а) фонове опромінення – $1,1 \text{ мЗв} \cdot \text{рік}^{-1}$, або 16%;
 - б) опромінення техногенно підсиленими джерелам природного походження – $5,05 \text{ мЗв} \cdot \text{рік}^{-1}$, або 71%.
2. Опромінення в медицині – $0,5 \text{ мЗв} \cdot \text{рік}^{-1}$, або 7%.
3. Опромінення радіонуклідами аварії на ЧАЕС – $0,3 \text{ мЗв} \cdot \text{рік}^{-1}$, або 4%.
4. Опромінення індустриальними джерелами (АЕС, уранові шахти тощо), або $< 0,1 \text{ мЗв} \cdot \text{рік}^{-1}$, $< 1\%$.

Міжнародна комісія з радіаційного захисту (International Commission on Radiological Protection, ICRP) сформулювала концепцію про лінійну безпорогову залежність, згідно з якою за найменшої дози опромінення популяції виникають певні стохастичні ефекти, очікуване число яких лінійно збільшується із зростанням дози опромінення [44, 187, 189]. Ризик появи стохастичних ефектів впродовж життя (70 років) у популяції в 1 млн. осіб, що дістали дозу 1 сГр, складає 720 випадків (720×10^{-6}) [189].

Проте в останні роки з'явилася низка досліджень, присвячена позитивній дії малих доз іонізуючого випромінювання на найрізноманітніші об'єкти, включаючи людину, що обґрунтовують концепцію радіаційного гормезису [74, 89, 221, 259, 265]. Головний висновок, який випливає з цих робіт, полягає в необхідності природного радіаційного фону (ПРФ) для існування біосфери. Показано, що зниження цього фону призводить до різних відхилень від нормального розвитку. Підвищення ПРФ у 10 і навіть у 100 разів у багатьох випадках має позитивну дію на тривалість життя людини та тварин, імунітет, плодючість і інші показники життєдіяльності.

У радіобіології, включаючи дослідження на людині, поняття «малі дози» зазвичай пов'язують з величиною дози, що на один-два порядки перевищують величину ПРФ (0,1-0,4 сГр/рік), тобто за умов одноразового опромінення вони становлять 1-40 сГр [174]. За визначенням UNSCEAR, малі дози опромінення становлять 0,2 Гр для іонізуючого випромінювання з низьким значенням лінійної передачі енергії (ЛПЕ) та 0,05 Гр – із високим ЛПЕ [259]. В останні роки ICRP і BEIR (Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiation) запропонували знизити межу малих доз до 0,1 Гр [51]. Ймовірно, таке зниження є виправданим, оскільки при дозах близько 0,15 Гр є загальновизнані транзиторні детерміновані ефекти.

Згідно з мікродозиметричним підходом, малими дозами є такі, при яких відбувається лише одноразовий прохід іонізуючого випромінювання через мішень (ядро або клітину) [11, 39]. У практичній діяльності під малими розуміють дози іонізуючого випромінювання, за умов дії яких починає проявлятися радіобіологічний ефект нелетального характеру [254].

До групи професійного ризику радіаційного опромінення (категорія А) відносять: операторів АЕС, дефектоскопістів, персонал рентгенологічних та радіологічних відділень, окремі категорії військових [73].

Опромінення організму може бути зовнішнім (в основному при дії джерел «закритого» типу), внутрішнім – при наявності джерел «відкритого» типу, та комбінованим. Тканини та клітини організму мають різну радіочутливість, що може відрізнятися на декілька порядків [7, 73]. За зниженням радіочутливості тканин виділяються такі класи [14, 124]:

- 1) стовбурові інтермітотичні клітини (клітини крипт кишечника, попередники клітин крові кісткового мозку, сперматозоїдів і яйцеклітин

у гонадах, лімфоцити);

2) диференціювальні клітини що швидко діляться (сперматогонії, овогонії, проміжні клітини миело- і еритропоезу);

3) мультипотентні сполучнотканинні клітини, що нерегулярно діляться (ендотеліоцити, фібробласти, мезотелій);

4) постмітотичні клітини у стані спокою (клітини печінки, нирок, легень, підшлункової, потових, слинних і ендокринних залоз);

5) високорезистентні (нервові і м'язові клітини, еритроцити, сперматозоїди).

Летальні дози γ -опромінення для людини становлять 10-100 Зв (в залежності від дрібності дози та часу опромінення), гостру променеву хворобу викликають дози 1-10 Зв, дози 0,25-1 Зв викликають зміни в системі крові і вегетативні порушення, дози $<0,25$ Зв не дають помітних змін [53]; дози природного радіаційного фону ($<0,000015$ Зв) можуть діяти на окремі клітини, викликаючи мутації і непрогнозовані наслідки, в тому числі мутації для еволюційного процесу [14].

При дії малих доз радіації критичними структурами є мембрани, а при великих - ДНК [8, 14]. Патогенну дію малих доз випромінювання найчастіше пов'язують із гіперпродукцією АФК та АФН [180]. Показано, що через 10-13 с після опромінення у клітинах спостерігається сплеск утворення САР. Цей радикал та продукт його дисмутації H_2O_2 утворюються навіть під час рентгенодіагностичних заходів, однак їхні кількості є незначними.

Важливо відмітити негативний вплив радіаційного ураження клітин репродуктивної системи, так як в цьому випадку ефекти можуть проявлятися в наступних поколіннях внаслідок вертикального переносу дефектної генетичної інформації [124].

Радіочутливість чоловічих гонад відома давно. Ще у 1906 році J. Bergonie та L. Tribondeau, вивчаючи радіаційні пошкодження

сім'яників, виявили залежність радіочутливості клітин від інтенсивності поділу і ступеня диференціювання. Чоловічі репродуктивні органи відносяться до першої групи критичних органів за радіочутливістю [76, 124]. Висока чутливість сім'яників характерна для всіх видів тварин: мишей, щурів, кролів, морських свинок, мавп, собак, і вона виявляється у пригніченні сперматогенезу та зниженні плодючості в ранні пострадіаційні терміни і при відносно низьких рівнях експозиції [51, 70, 76, 124].

Опромінення сім'яників при дозах лише в 0,1-0,35 Зв призводить до тимчасової стерильності як мавп-самців в експериментальних дослідженнях, так і чоловіків в натурних спостереженнях, до порушення і зупинки сперматогенезу [24, 70].

Експериментально доведено, що на ранніх стадіях розвитку уже в діапазонах доз 0,5-3 Зв у переважній більшості тварин і людини відбувається клітинне спустошення сім'яників, аспермія, а дози, вищі за 2 Зв можуть викликати довготривалу стерильність. Однак зрілі клітини - сперматозоїди – є досить радіорезистентними. Клітини Лейдіга належать до радіорезистентних і морфологічно залишаються неушкодженими навіть при кумулятивних дозах 5,0 Зв [70, 124].

За ступенем радіочутливості статеві клітини самців щурів в процесі розвитку і диференціації утворюють такий ряд: сперматиди, сперматозоїди, сперматоцити, сперматогонії [56].

В літературі обговорюється важливе припущення, що сім'яники є єдиним виключенням із загального правила радіочутливості: сумарна доза опромінення, одержана в декілька прийомів, для них більш небезпечна, ніж аналогічна разова доза.

Опромінення яєчок людини у відносно низьких дозах впливає на функції гермінативного епітелію наступним чином: дози в межах 0,35-0,5 Зв, викликають аспермію, яка може бути оборотною. Час, необхідний

для відновлення, збільшується з підвищенням дози, але при її збільшенні до 2 Зв, аспермія може стати постійною [244].

Реакція сім'яників на фракціоноване опромінення з низькою потужністю дози відрізняється від інших тканин підвищеною чутливістю. Збільшення тривалості опромінення не дає так званого «послаблюючого» ефекту. Воно може бути навіть більш ефективним, ніж при одноразовому впливі [38, 231].

Відомо, що опромінення в дозі 0,1–0,12 Гр призводить до помітного ушкодження сперматогенного епітелію людини, але навіть після впливу в дозі 4 Зв можна очікувати відновлення функції сім'яників. Механізми ураження сперматогенних клітин у людини і лабораторних тварин однотипні, у той час як процеси відновлення у людини більш повільні. Таким чином, у цьому дослідженні автори показують, що доза в 0,05 Зв призводить до ураження сперматогенезу мишей. Враховуючи, що радіочутливість сім'яників людини і мишей однакова, є підстави вважати, що доза 0,05 Зв є величиною, близькою до порогової для сперматогенного епітелію людини [2].

Важливим механізмом радіаційного ураження чоловічої репродуктивної системи є активація вільнорадикальних процесів. Показано, що підвищений рівень хемілюмінесценції крові і концентрації продуктів ПОЛ в ній позитивно корелює з інтенсивністю хемілюмінесценції спермальної плазми [92].

З'ясовано, що тотальне γ -випромінювання, іммобілізаційний стрес та їх поєднана дія, призводять до посилення процесу ліпопероксидації в крові та сім'яниках, підвищення вмісту кортикостерону, зменшення вмісту тестостерону в крові [76].

При γ -опроміненні щурів дозою 5 Гр у сім'яниках істотно збільшується вміст первинних (дієнів, триєнів, оксидієнів - у 2-7 разів) і кінцевих (ліпопигментів - у 2 рази) продуктів ПОЛ. При цьому

концентрація есенціальних антиоксидантів (вітамінів Е й А) достовірно зменшується (в 2-3 рази) [112].

При дослідженні впливу ізольованої та поєднаної дії іонізуючого опромінення та важких металів в експерименті виявлено, що провідними морфофункціональними ознаками токсичного і радіаційного пошкодження сперматозоїдів є зниження загальної кількості і кількості рухливих сперматозоїдів, порушення структури плазмолемми та внутрішньоклітинних мембран акросоми та мітохондрій, а також пошкодження апарату руху чоловічих гамет [5]. Структурні порушення сперматозоїдів в значній мірі обумовлені змінами запасів АТФ і фруктози і супроводжуються змінами балансу електролітів K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} і рівнів загальних фосфоліпідів. Автори довели, що біологічний ефект сумісної дії радіації і важких металів є адитивним або перевищує такий.

Незначна кількість праць присвячена дослідженню впливу рентгенівського опромінення на органи чоловічої репродуктивної системи. В експерименті на білих щурах виявлено, що локальне рентгенівське опромінення яєчка (протягом 5 хв дозою 1000 Р в режимі 190 кВ 15 мА стаціонарним рентгенівським апаратом) на 7 добу призводить до розвитку патологічних змін в більшості звивистих сім'яних трубочках, порушуючи сперматогенез [23, 26, 27]. В сім'яних трубочках, що відповідають VII стадії циклу сперматогенного епітелію, за спостереженнями авторів, відсутні прелептотенні сперматоцити. Наявна велика кількість патологічно змінених статевих клітин. Через 30 діб спостерігається повна деструкція звивистих сім'яних трубочок, в яких клітини сперматогенного епітелію не визначаються. На 90 добу експерименту помітних регенеративних змін у звивистих сім'яних трубочках не виявлено, наявні поодинокі підтримуючі клітини та сперматогонії.

Модель опромінення яєчка деякі науковці використовували з метою пошуку стовбурової сперматогоніальної клітини. На думку дослідників, такими клітинами є радіорезистентні сперматогонії типу A₀. Їх кількість та здатність до поділу визначає ступінь регенерації органа. По суті, поняття «регенерація» яєчка після дії радіації зводиться до регенерації тільки сперматогенного епітелію. Це викликає низку протиріч, як наприклад, при дії високих доз іонізуючої радіації в складі сім'яних трубочок не виявляється статевих клітин, хоча в подальшому сперматогенний епітелій може відновлюватись. При цьому джерело відновлення залишається мало вивченими [26].

Лише одиничні роботи присвячені ролі окисно-нітративного стресу у виникненні та прогресуванні радіоіндукованих порушень організму.

Повідомляється про підвищення активності NOS, рівня NO, його стабільних метаболітів (NO_2^- та NO_3^-) та пероксинітриту після опромінення у крові, печінці, легенях, нирках, слинних залозах, кишечнику, серці, головному мозку, кістковому мозку [87, 141, 177, 179]. Продукція NO збільшується інтерфероном α або ліпополісахаридами у опромінених макрофагах [216].

М.В. Сабадашка та співавт. [87, 88] показала, що після впливу рентгенівського випромінювання внаслідок інтенсифікації реакцій пероксинітрит-опосередкованого нітрування тирозинових залишків протеїнів зростає вміст 3'-нітротирозину у лейкоцитах і корковому шарі нирок щурів. Вплив іонізуючого випромінювання призводить до порушення збалансованої роботи АОС, що відображалось у різноспрямованих змінах активності ензимів цієї системи (СОД, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази), внаслідок чого збільшується вміст ТБК-активних продуктів.

Таким чином, літературні джерела містять дані про різні механізми дії іонізуючої радіації на чоловічу репродуктивну систему,

чинне місце серед який займає індукція вільнорадикального окиснення. Проте досить суперечлива інформація стосується впливу на репродукцію та організм у цілому доз випромінювання у діапазоні малі - середні, дискутується можливість забезпечення гормезису та підвищення фертильності, що дає підстави деяким науковцям рекомендувати перегляд норм радіаційної безпеки. Менш з'ясованою залишається роль окисно-нітративного стресу у розвитку радіоіндукованих порушень чоловічої репродуктивної системи. Відсутня інформація про поєднану дію на останню іонізуючої радіації, зокрема рентгенівського випромінювання, та екзогенних неорганічних нітросполук, що у ході біотрансформації утворюють АФА, які мають як важливу фізіологічну роль, так, за певних умов, виявляють потужні цитотоксичні властивості. Виявлення закономірностей, що обумовлюють патогенну дію АФК / АФА в органах чоловічої репродуктивної системи ссавців, з'ясування ролі NOS та транскрипційного ядерного фактора κВ, є важливими для розробки нових підходів до профілактики та терапії небажаних ефектів поєднаної дії рентгенівського опромінення на неорганічних нітросполук, що обґрунтовує доцільність і своєчасність цього дослідження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна характеристика матеріалів та методів дослідження

Експерименти виконані на 84 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-280 г.

Тварин утримували в умовах акредитованого віварію в оптимальних умовах (з забезпеченням температурного, світлового режиму, повноцінного харчування, захисту від інфекцій, шуму та інших перешкод навколишнього середовища) згідно зі “Стандартними правилами по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)”.

Вибір даного виду тварин ґрунтувався на даних літератури щодо використання білих щурів при вивченні біологічної дії нітратів і нітритів [31-34, 108, 109] та рентгенівського опромінення [23, 26, 27, 87, 88, 112].

Для утримання тварин використовували просторі клітки, кожна з яких мала відповідну позначку, що свідчила про ту чи іншу дослідну групу тварин. При роботі з тваринами дотримувались вимог “Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях” (Страсбург, 18.03.1986 р.), “Загальних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2000). Комісією з питань біоетики Вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія” (протокол № 147 від 23.12.2016 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Всі тварини були розділені на 6 груп (таблиця 2.1).

Таблиця 2.1

Розподіл експериментальних груп тварин

№	Характеристика груп	К-сть
1	Інтактна (контрольна)	14
2	Дослідна (нітрат натрію, 200 мг/кг, 30 діб)	14
3	Дослідна (опромінення рентгенівськими променями дозою 0,08 Гр три рази протягом тижня через день, сумарно 0,24 Гр)	14
4	Дослідна (поєднана дія нітрату натрію та рентгенівського опромінення)	14
5	Дослідна (поєднана дія нітрату натрію та рентгенівського опромінення + введення мелатоніну)	14
6	Дослідна (поєднана дія нітрату натрію та рентгенівського опромінення + введення інгібітора активації NF-κB – JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діаміну)	14

Евтаназію білих щурів проводили на відповідних термінах експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом, після чого видаляли сім'яники. Сперму (суспензію сперматозоїдів) отримували із придатка сім'яника [9].

Об'єкти дослідження та показники, що вивчалися, наведено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Об'єкти дослідження та показники, що визначалися

Об'єкти	Показники
1	2

Продовження табл. 2.2

1	2
Сім'яники	Біохімічні показники продукції АФК / АФА, ЦХО, вільнорадикального окиснення, АОС
Сперма (суспензія сперматозоїдів із придатка сім'яника)	Біохімічні показники продукції АФК / АФА, ЦХО, ПОЛ Загальна кількість сперматозоїдів Життєздатність сперматозоїдів Спермограма Кінезіограма

2.2. Методика введення тваринам нітрату натрію

Нітрат натрію вводили тваринам у дозі 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину. Введення здійснювали інтрагастрально за допомогою спеціального зонду щоденно протягом 30 діб. Використання цієї методики дозволяє відтворити надлишкове утворення NO та депонування його у вигляді парамагнітних комплексів з гемовим та негемовим залізом, у т.ч. у сім'яниках [30, 47]. При цьому число спінів змінюється з $69,78 \pm 6,17 \times 10^{13}$ (у контрольній серії) до $137,40 \pm 24,85 \times 10^{13}$ ($p < 0,05$), тобто зростає на 96,9% [30]. Рівень метгемоглобіну (визначений ціангемігلوبіновим методом) в крові не перевищує 15% від загального вмісту гемоглобіну («безсимптомна» метгемоглобінемія).

2.3. Методика фракційного рентгенівського опромінення щурів

Фракційне рентгенівське опромінення у разовій дозі 0,08 Гр здійснювали екстракорпорально три рази через добу (сумарна доза – 0,24 Гр) в останній тиждень нітратної інтоксикації - модель сукупної дії

на організм малих доз іонізуючої радіації та надлишкового надходження нітрату натрію.

Опромінення лабораторних тварин здійснювали рентгенівським апаратом АРД-2. Тварини опромінювались в пластмасових клітках площею підлоги 12 квадратних дециметрів (30 x 40 см), куди одночасно поміщались 7 лабораторних щурів. Використання пластмасових кліток виключало можливість виникнення вторинного наведеного випромінення в разі використання металевих елементів конструкцій. Застосування рентгенівського апарату АРД-2 дозволяло проводити максимально ефективно розфокусування рентгенівського променя по всій площі підлоги клітки. Розрахунок експозиційної дози проводила інженерна група, що обслуговує рентгенівську апаратуру. Враховувались: відстань від променевої трубки до підлоги клітки, регульований рівень вихідної потужності апарату (від 10 до 150 мА при діапазоні анодної напруги – від 40 до 150 кВ). При розрахунку поглинутої дози враховували величину експозиційної дози та час опромінення. Для об'єктивного контролю поглинутої дози застосовували радіометр-дозиметр гама-/бета-випромінювань ДРГЗ-02

2.4. Режими застосування фізіологічно активних сполук

Мелатонін (виробництво “Sigma-Aldrich, Inc.”, США) вводили щоденно о 23 годині вечора у вигляді водного розчину інтрагастрально за допомогою спеціального зонду у дозі 0,3 мг/кг маси тіла на добу протягом 30 діб [115]. Запропонована експериментальна модель супроводжується підвищенням концентрації мелатоніну в крові > 35 пг/мл [107].

Інгібітор активації NF-κB II – JSH-23 (4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діамін) виробництва “Santa Cruz Biotechnology”

(ФРН) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 1 мг/кг маси тварини [199] 2 рази на тиждень протягом періоду відтворення 30-денної інтоксикації нітратом натрію.

2.5. Біохімічні методи дослідження сім'яників

Перелік біохімічних методів дослідження сім'яників наведено в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

Біохімічні методи дослідження сім'яників

Параметр, що вивчається	Автори методу, літературні джерела
<i>Супероксидний аніон-радикал</i>	Костенко В.О., Цебржинський О.І. (2000)
<i>Цитохромоксидаза</i>	Straus W. (1954)
NOS, нітрит-йони	Hevel J.M. (1991)
Пероксинітрит	Шрайбман Г.Н. и соавт. (2011)
<i>ТБК-реактанти</i>	Кайдашев І.П. і співавт. (2003)
СОД	Брусов О.С. и соавт. (1976)
ГSH-пероксидаза	Mills G.C. (1954)
Каталаза	Архипова О.Г. (1980)

2.5.1. Визначення продукції супероксидного аніон-радикала. Утворення супероксидного аніон-радикала оцінювали при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ) у модифікації [49]. При цьому спектрофотометричним НСТ-тестом оцінюється продукція супероксиду в гомогенаті тканин сім'яників з індукторами у вигляді НАДН і НАДФН.

2.5.2. Визначення активності цитохромоксидази. Активність ЦХО в тканинах, як основного споживача молекулярного

кисню в організмі, вивчали за реакцією НАДІ, результат виражали в індофенольних одиницях на г тканини в хвилину (од. акт.) [253].

2.5.3. Визначення сумарної активності NO-синтаз і концентрації нітрит-іонів. Активність NOS визначали за різницею концентрації нітрит-іонів (NO_2^-) до та після інкубації гомогенату тканин сім'яників у середовищі, що містить L-аргінін та НАДФН. Концентрацію NO_2^- визначали шляхом утворення діазосполук у реакції з сульфаніловою кислотою, а потім проводили реакцію з α -нафтилетилендіаміном, у результаті якої утворюються похідні червоного кольору (азобарвники) [184].

2.5.4. Визначення концентрації пероксинітрити. Вміст пероксинітрит-іонів проводили з використанням реакції з йодидом калію в буферизованому середовищі при рН=7,0 спектрофотометрично за поглинанням на довжині хвилі 355 нм [122].

2.5.5. Визначення концентрації ТБК-реактантів. Концентрацію ТБК-реактантів визначали тіобарбітуровим методом [68]. Принцип методу базується на здатності 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК) утворювати стійкий забарвлений комплекс із малоновим діальдегідом та іншими проміжними оксопродуктами ПОЛ. Приріст концентрації ТБК-реактантів при 1,5-годинній інкубації тканин дає інформацію про стан АОС.

2.5.6. Визначення активності супероксиддисмутази. Визначення активності супероксиддисмутази (СОД) проводили за методом О.С. Брусова та співавт. [10]. Принцип методу полягає в тому, що СОД інгібує автоокиснення адреналіну. За різницею швидкості реакції без додавання біологічного матеріалу та з його додаванням обчислюють активність ферменту.

2.5.7. Визначення активності глутатіонпероксидази. Активність глутатіонпероксидази визначали за зниженням концентрації

відновленого глутатіону (GSH) за час інкубації з біологічним матеріалом і пероксидом водню; за одиницю активності брали ммоль GSH / хв. × г [218].

2.5.8. *Визначення активності каталази.* Визначення активності каталази проводили за методом, наведеним у керівництві О.Г.Архипової [67], в основі якого знаходиться здатність каталази, що міститься в біоматеріалі, розкладати пероксид водню. Кількість пероксиду водню, що залишився в пробі, визначають титруванням 0,1 н розчином калію перманганату.

2.6. Біохімічні методи дослідження сперми

Перелік біохімічних методів дослідження сперми наведено в табл. 2.4.

Таблиця 2.4

Біохімічні методи дослідження сперми

Параметр, що вивчається	Автори методу, літературні джерела
Супероксидний аніон-радикал	Цебржинський О.І. (2000)
NOS	Nevel J.M. (1991)
ТБК-реактанти	Кайдашев І.П. і співавт. (2003)

2.6.1. *Визначення продукції супероксидного аніон-радикала.* У спермі проводили тест з нітросинім тетразолієм (НСТ) [110]. До зразків сперми (0,2 мл) додавали та перемішували: а) 0,1 мл буферного розчину (для визначення загальної фонові нестимульованої активності); б) 0,1 мл 3 % розчину НАДФН – субстрату НАДФН-цитохром Р-450 і НАДФН-цитохром В245(558) ЕТЛ; в) 0,1 мл 3 % розчину НАДН – субстрату мітохондріального окиснення. Преінкубували 5 хв при 37 °С. Далі додавали 0,1 мл 0,2 % НСТ на тріс-НСІ буферному розчині (рН 7,4)

та інкубували 10 хв у темряві при 37 °С. Потім утворений формаган елюювали 3 мл діоксану п'ятихвилинним збовтуванням і фотометрували на СФ-46 при 515 нм проти розчинника.

2.6.2. Визначення сумарної активності NO-синтаз і концентрації нітрит-іонів. Активність NOS визначали за різницею концентрації нітрит-іонів (NO_2^-) до та після інкубації зразків сперми у середовищі, що містить L-аргінін та НАДФН. Концентрацію NO_2^- визначали шляхом утворення діазосполук у реакції з сульфаніловою кислотою, а потім проводили реакцію з α -нафтилетилендіаміном, у результаті якої утворюються похідні червоного кольору (азобарвники) [184]. Активність NOS виражали в нмоль/хв $\times 10^6$ сперматозоїдів.

2.6.3. Визначення концентрації ТБК-реактантів. Концентрацію ТБК-реактантів визначали тіобарбітуровим методом [68]. Принцип методу базується на здатності 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК) утворювати стійкий забарвлений комплекс із малоновим діальдегідом та іншими проміжними оксопродуктами ПОЛ. Концентрацію ТБК-реактантів у сперматозоїдах виражали в пмоль/л $\times 10^6$ клітин.

2.7. Визначення кількості та функціонального стану сперматозоїдів

Придатки сім'яників розрізали і обережно гомогенізували кожний з 2 мл 0,9% розчину натрію хлориду. Одержану суспензію використовували для підрахунку кількості і оцінки функціонального стану сперматозоїдів за М.А.Базарноюю та співавт. [86] та методичними рекомендаціями МОЗ України [9]. Суспензію сперматозоїдів набирали в меланжер до мітки 0,5 і доводили спеціальним розчином до мітки 2, змішували і вносили до камери Горяєва. Підраховували кількість клітин

у 5 великих квадратах і перемножували на 1000000 (до складу спеціального розчину входили 5 г натрію бікарбонату, формалін і дистильована вода до 100 мл).

З метою визначення кінезіограми краплю суспензії сперматозоїдів переносили на предметне скло. В нативних препаратах за умов світлової мікроскопії з віконцем Фоніо серед 100 сперматозоїдів підраховували відсоток клітин із швидким поступальним рухом (50 мкм/с) (нормокінезія, категорія А), повільним поступальним рухом (гіпокінезія, категорія В); коливальним невпорядкованим рухом (дискінезія, категорія С) та нерухомих (акінезія, категорія D) [55].

Життєздатність сперматозоїдів визначали за еозиновим тестом. На предметне скло вміщували 1 краплю 1% розчину суспензії сперматозоїдів і 1 краплю 1% розчину еозину, перемішували, накривали покривним склом і негайно піддавали мікроскопії. Підраховували 200 клітин і визначали серед них відсоток живих (незабарвлених) і мертвих (забарвлених в рожевий колір) сперматозоїдів.

Для визначення відносної кількості патологічних форм сперматозоїдів краплю суспензії розподіляли на предметному склі, висушували, фіксували етанолом і фарбували 1% розчином метиленового синього. Мазки досліджували з імерсійним об'єктивом мікроскопу. Підрахунок проводили на 200 сперматозоїдах. Патологічними формами сперматозоїдів вважали ті, що мали аномалії голівки, тіла, хвоста [4, 55]. Сперміологічні дослідження виконано за консультативною допомогою завідувача кафедри біології і основ здоров'я людини Полтавського національного педагогічного університету ім. В.Г. Короленка, д. біол. н., професора Цебржинського О.І.

2.8. Статистична обробка результатів експерименту

Отримані дані піддавали статистичній обробці [22, 69]. Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілка. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували t-критерій Ст'юдента для незалежних вибірок. У випадку, коли ряди даних не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Статистичні розрахунки та побудову діаграм проводили з використанням програм "Microsoft Excel 2007" та "StatisticSoft 6.0".

РОЗДІЛ 3

**МЕХАНІЗМИ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНОГО ПОШКОДЖЕННЯ
СІМ'ЯНИКІВ І СПЕРМИ ПРИ ПОЄДНАНІЙ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ
НІТРАТУ НАТРІЮ ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ**

**3.1. Утворення активних форм кисню та азоту в сім'яниках
білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та
рентгенівського опромінення**

Супероксидний аніон-радикал (САР) досить активно продукується субклітинними структурами сім'яників інтактних щурів. Так, НАДН-залежний (мітохондріальний) ЕТЛ виробляє $18,6 \pm 1,2$ нмоль/г·с, НАДФН-залежний (мікросомальний) ЕТЛ – $16,7 \pm 1,3$ нмоль/г·с (таблиця 3.1).

Таблиця 3.1

Утворення супероксидного аніон-радикала у тканинах сім'яників
білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію
та рентгенівського опромінення, нмоль/г·с ($M \pm m$, $n=28$)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
1	2	3	4	5
Продукція САР мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	$18,6 \pm 1,2$	$22,7 \pm 1,1$ $p1 < 0,02$	$24,3 \pm 1,6$ $p1 < 0,02$	$26,3 \pm 1,2$ $p1 < 0,002$

Продовження табл. 3.1

1	2	3	4	5
Продукція САР мікосомальним ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	16,7 ±1,3	9,3±0,8 p1<0,001	11,2±1,4 p1<0,02	10,2±0,9 p1<0,002

Примітка. p1 – ймовірність похибки у порівнянні з даними першої серії (інтактні щури).

На 30 добу інтоксикації нітратом натрію спостерігається підвищення продукції САР мітохондріальним ЕТЛ – до 22,7±1,1 нмоль/Г×с (на 22,0%, P<0,02). У той же час генерація цього радикала НАДФН-залежним (мікосомальним) ЕТЛ зменшується – до 9,3±0,8 нмоль/Г×с (на 44,3%, P<0,001).

Про переважну участь мітохондріального ЕТЛ у продукції САР субклітинними структурами сім'яників повідомляють і інші дослідники [175]. Вироблення цієї АФК мітохондріями сім'яних каналців і клітин Лейдіга пов'язують з дисфункцією мітохондріального ферментного комплексу I (НАДН – убіхіноноксидоредуктаза [261]. У низьких концентраціях САР бере участь у біосинтезі білка на етапі трансляції та, як внутрішньоклітинний регулятор функціонального стану мітохондрій [191, 242, 241].

Припускаємо, що зменшення генерації САР мікосомами може бути пов'язано зі здатністю нітратів окиснювати Fe⁺² і стабілізувати цитохром P-450, що знижує його активність [142]. Продукт метаболізму нітратів - оксид азоту – здатний блокувати ферменти цього ЕТЛ, утворюючи комплекс з Fe⁺³ за лігандним місцем субстрату.

Фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр також підвищує продукцію САР у тканинах сім'яників НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ – до $24,3 \pm 1,6$ нмоль/Г·с (на 30,6%, $p < 0,02$). При цьому генерація САР НАДФН-залежним (мікросомальним) ЕТЛ зменшується – до $11,2 \pm 1,4$ нмоль/Г·с (на 32,9%, $P < 0,02$).

Пригнічення цитохром Р-450-залежних оксидоредуктаз ендоплазматичного ретикулума та / або автоокиснення цитохрому Р450 може бути результатом прямої або опосередкованої генотоксичної дії іонізуючого опромінення, спрямованої на синтез ферментів [113].

За умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію генерація САР у тканинах сім'яників НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ підвищується до $26,3 \pm 1,2$ нмоль/Г·с, що перевищує на 41,4% ($p < 0,002$) дані інтактної групи, але суттєво не відрізняється від результатів другої та третьої серій.

Порушення мітохондріальної ЕТЛ за умов ізольованої та сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення підтверджуються даними щодо активності у тканинах сім'яників білих щурів термінального ферменту дихального ланцюга мітохондрій цитохромоксидази – ЦХО (таблиця 3.4).

Так, активність ЦХО зменшується за умов 30-денної інтоксикації нітратом натрію з $1,43 \pm 0,12$ од.акт. (у нормі) до $0,67 \pm 0,11$ од.акт. (на 53,1%, $P < 0,02$), при фракційному рентгенівському опроміненні – до $0,94 \pm 0,07$ од. акт. (на 34,3%, $P < 0,05$), при поєднаному впливі названих чинників – до $0,57 \pm 0,07$ (на 60,1%, $P < 0,05$).

Утворення значної кількості САР за умов ізольованої нітратної інтоксикації, впливі рентгенівського опромінення та поєднаної дії цих чинників створює передумови для утворення при збільшенні рівня оксиду азоту високоактивних форм азоту, зокрема, пероксинітриту.

Таблиця 3.2.

Зміни активності цитохромоксидази у тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=28$)

Назва ферменту	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
ЦХО, од.акт.	$1,43 \pm 0,12$	$0,67 \pm 0,11$ $p1 < 0,02$	$0,94 \pm 0,07$ $p1 < 0,05$	$0,57 \pm 0,07$ $p1 < 0,05$ $p3 < 0,001$

Примітки (у табл. 3.2-3.8):

- 1) $p1$ – ймовірність похибки у порівнянні з даними першої серії (інтактні щури);
- 2) $p2$ – ймовірність похибки у порівнянні з даними другої серії;
- 3) $p3$ – ймовірність похибки у порівнянні з даними третьої серії.

При дослідженні тканин сім'яників інтактних щурів виявлено, що сумарна активність NOS складає – $4,71 \pm 0,15$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв.}$, а концентрація нітрит-йонів – $0,14 \pm 0,02$ мкмоль/г (таблиця 3.3). Концентрація пероксинітриту в тканинах сім'яників становить $0,68 \pm 0,02$ мкмоль/г. Низький рівень цієї сполуки забезпечує її сигнальні властивості [190, 239, 162, 202].

Введення нітрату натрію протягом 30 діб істотно не позначається сумарній активності NOS у тканинах сім'яників. Концентрація нітрит-йонів (продуктів метаболізму нітрат-йонів) збільшується до $0,31 \pm 0,02$ мкмоль/г (на 121,4%, $p < 0,001$). Вміст пероксинітриту в тканинах сім'яників підвищується до $1,06 \pm 0,04$ мкмоль/г (на 55,9%, $p < 0,001$).

Таблиця 3.3

Утворення метаболітів системи оксиду азоту в тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=28)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
NOS, мкмоль NO ₂ ⁻ /Г·хв.	4,71±0,15	4,96±0,09	11,11±0,58 p1<0,001 p2<0,001	7,20±0,26 p1<0,001 p2<0,001 p3<0,001
Вміст NO ₂ ⁻ , мкмоль/Г	0,14±0,02	0,31±0,02 p1<0,001	0,18±0,01 p2<0,001	0,38±0,01 p1<0,001 p2<0,01 p3<0,001
Пероксинітрит, мкмоль/Г	0,68±0,02	1,06±0,04 p1<0,001	0,98±0,03 p1<0,001	1,22±0,04 p1<0,001 p2<0,02 p3<0,001

Фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр істотно збільшує сумарну активність NOS у тканинах сім'яників – до 11,11±0,58 мкмоль NO₂⁻/Г·хв., що перевищує на 135,9% (p<0,001) дані інтактної групи та на 124,0% (p<0,001) результат другої серії.

Концентрація нітрит-йонів підвищується до 0,18±0,01 мкмоль/Г (на 28,6%, p<0,001), проте поступається на 41,9% (p<0,001) даним другої

серії. Вміст пероксинітриту в тканинах сім'яників підвищується до $0,98 \pm 0,03$ мкмоль/г (на 44,1%, $p < 0,001$).

За умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію сумарна активність NOS у тканинах сім'яників збільшується до $7,20 \pm 0,26$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв.}$, що перевищує на 52,9% ($p < 0,001$) дані інтактної групи та на 45,2% ($p < 0,001$) – результат другої серії, але поступається на 35,2% ($p < 0,001$) – даним третьої серії.

Концентрація нітрит-йонів за цих умов у тканинах сім'яників підвищується до $0,38 \pm 0,01$ мкмоль/г, що перевищує результат інтактної групи тварин – на 171,4% ($p < 0,001$), результат другої серії – на 22,6% ($p < 0,01$), результат третьої серії – на 111,1% ($p < 0,001$).

Вміст пероксинітриту суттєво збільшується – до $1,22 \pm 0,04$ мкмоль/г, що перевищує результат інтактної групи тварин – на 79,4% ($p < 0,001$), результат другої серії – на 15,1% ($p < 0,02$), результат третьої серії – на 24,5% ($p < 0,001$).

Порівняльна характеристика змін активності NOS, генерації CAP і пероксинітриту в сім'яниках щурів за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 3.1.

Таким чином,

1) 30-денна інтоксикація нітратом натрію супроводжується гіперпродукцією у тканинах сім'яників щурів супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій, зниженням активності термінального ферменту останнього - цитохромоксидази, надлишковим утворенням нітрит-йонів і пероксинітриту, зменшенням продукції супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежним (мікросомальним) електронно-транспортним ланцюгом;

2) фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр призводить до розвитку у тканинах сім'яників щурів гіперпродукції супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій,

зниження активності цитохромоксидази, збільшенням сумарної активності NO-синтаз, концентрації нітрит-йонів і пероксинітриту, зменшенням продукції супероксидного аніон-радикала НАДФН-залежним (мікросомальним) електронно-транспортним ланцюгом;

3) фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію потенціє зменшення у тканинах сім'яників щурів активності цитохромоксидази та утворення пероксинітриту.

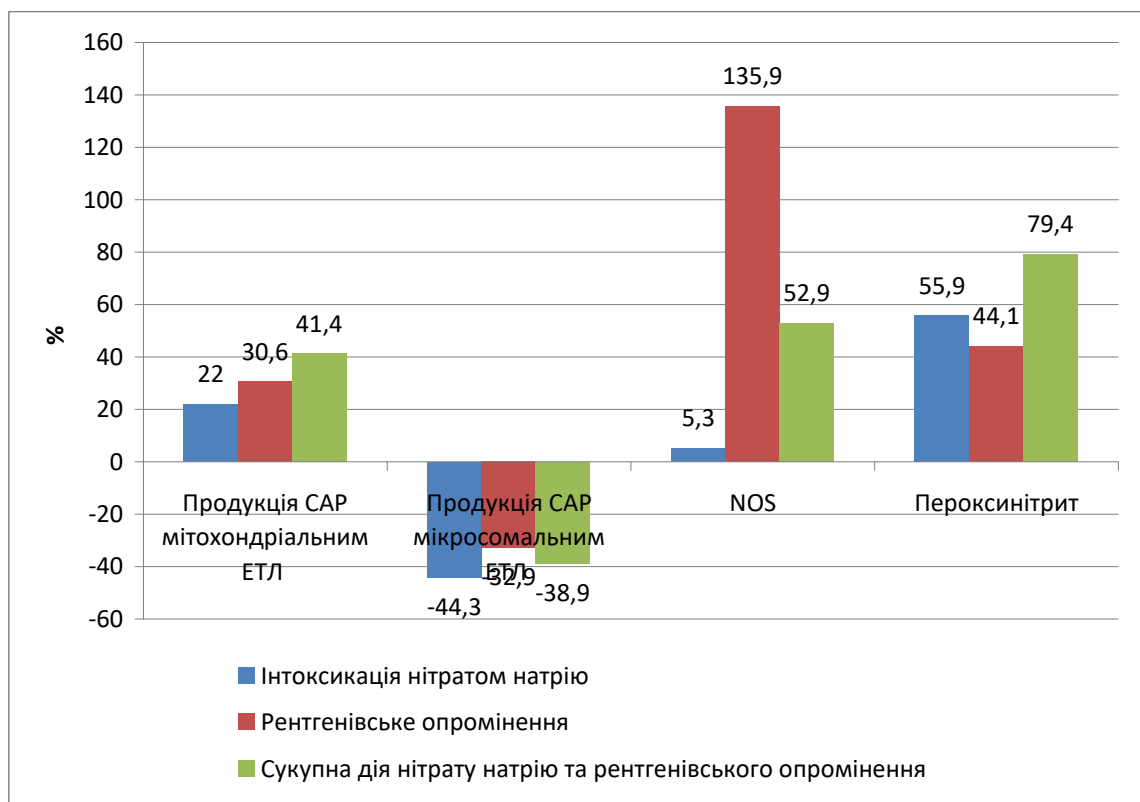


Рис. 3.1. Зміни продукції активності NOS, генерації CAP і пероксинітриту в сім'яниках щурів за умов ізолюваної та сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

3.2. Зміни процесів пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

САР, що виробляється мітохондріальним ЕТЛ, здатний індукувати і продовжувати ланцюг ПОЛ, вторинним продуктом якого є малоновий діальдегід – головна складова ТБК-активних продуктів [112].

За даними дослідження, у гомогенаті тканин сім'яників інтактних щурів концентрація ТБК-активних сполук до та після 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині складає відповідно – $19,3 \pm 2,2$ та $23,2 \pm 3,2$ мкмоль/кг (таблиця 3.4). Приріст концентрації цих речовин за час інкубації – $3,9 \pm 1,7$ мкмоль/кг, тобто 20,2%.

Таблиця 3.4.

Зміни концентрації ТБК-реактантів за умов інкубації гомогенату сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=28$)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
1	2	3	4	5
ТБК-реактанти до інкубації, мкмоль/кг	$19,3 \pm 2,2$	$35,7 \pm 3,1$ $p1 < 0,001$	$28,2 \pm 3,2$ $p1 < 0,05$	$49,3 \pm 2,7$ $p1 < 0,001$ $p2 < 0,01$ $p3 < 0,001$

Продовження таблиці 3.4.

1	2	3	4	5
ТБК-реактанти після інкубації, мкмоль/кг	23,2±3,2	45,1±5,1 p1<0,01	37,4±4,0 p1<0,02	61,7±4,4 p1<0,001 p2>0,05 p3<0,02
Приріст ТБК- реактантів, мкмоль/кг	3,9±1,7 20,2%	9,4±3,3 26%	9,2±1,0 33% p1<0,02	12,4±3,0 24% p1<0,05

На 30 добу інтоксикації нітратом натрію спостерігається підвищення концентрації ТБК-реактантів до та після 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині - відповідно до 35,7±3,1 (на 85,0%, p<0,001) та 45,1±5,1 мкмоль/кг (на 45,1%, p<0,01).

Проте приріст ТБК-активних сполук за час інкубації суттєво не відрізняється від даних інтактної групи, що свідчить про компенсований характер ПОЛ.

Цей висновок підтверджує також підвищення активності АО ферменту СОД – до 4,8±0,2 од. акт. (на 26,3%, P<0,05) (таблиця 3.5). У той же час активність каталази зменшується – до 0,42±0,03 од. акт. (на 55,8%, P<0,001). Активність GSH-пероксидаза – істотно не змінюється.

Таблиця 3.5.

Зміни активності антиоксидантних ферментів у тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=28)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
1	2	3	4	5
СОД, од. акт.	3,8±0,3	4,8±0,2 p1<0,05	3,1±0,2	2,6±0,1 p1<0,002 p2<0,001 p3<0,02
ГSH-пероксидаза, од. акт	82,9±7,4	72,7±5,9	71,7±6,3	65,1±5,6
Каталаза, од. акт.	0,95±0,06	0,42±0,03 p1<0,001	0,75±0,04 p1<0,05	0,52±0,07 p1<0,002 p3<0,02

Відомо, що синтез СОД індукується на рівні трансляції субстратом - САР [75], продукція якого мітохондріальним ЕТЛ, як показано вище, зростає. У той же час, незважаючи на той факт, що СОД забезпечує каталазу субстратом - пероксидом водню, активність останнього ферменту достовірно знижується.

Відомо, що каталаза відрізняється високою чутливістю до NO, при взаємодії з яким утворюється пригнічена форма ферменту - ферікаталаза-NO [195].

Фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр також підвищує концентрацію ТБК-реактивів до та після 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині (див. табл. 3.4) -

відповідно до $28,2 \pm 3,2$ (на 46,1%, $p < 0,05$) та $37,4 \pm 4,0$ мкмоль/кг (на 61,2% $p < 0,02$).

При цьому приріст ТБК-активних сполук за час інкубації складає $9,2 \pm 1,0$ мкмоль/кг, що на 135,9% ($p < 0,02$) перевищує результат інтактної групи. Це свідчить про зниження АО потенціалу та декомпенсований характер ПОЛ.

Цьому сприяє, зокрема, і відсутність підвищення активності АО ферментів – СОД і GSH-пероксидази, а також зменшення активності каталази (на 21,1%, $p < 0,05$) (див. табл. 3.5).

За умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію спостерігається підвищення концентрації ТБК-реактантів до інкубації (див. табл. 3.4) - до $49,3 \pm 2,7$ мкмоль/кг, що перевищує на 155,4% ($p < 0,001$) дані інтактної групи, на 38,1% ($p < 0,01$) – результат другої серії, та на 74,8% ($p < 0,001$) – результат третьої серії.

Концентрація ТБК-активних сполук після 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині також збільшується – до $61,7 \pm 4,4$ мкмоль/кг, що перевищує на 165,9% ($p < 0,001$) дані інтактної групи, на 36,8% ($p < 0,05$) – результат другої серії, та на 65,0% ($p < 0,02$) – результат третьої серії.

Приріст ТБК-реактантів за час інкубації складає $12,4 \pm 3,0$, що на 217,9% ($p < 0,05$) перевищує результат інтактної групи та свідчить про декомпенсований характер ПОЛ.

За цих умов активність СОД (див. табл. 3.5) суттєво зменшується – до $2,6 \pm 0,1$ од. акт. , що поступається на 31,6% ($p < 0,002$) даним інтактної групи, на 45,8% ($p < 0,001$) – результату другої серії, та на 16,1% ($p < 0,02$) – результату третьої серії.

Активність каталази також знижується – до $0,52 \pm 0,07$ од. акт., що поступається на 45,3% ($p < 0,002$) дані інтактної групи та на 30,7%

($p < 0,02$) результату третьої серії. Активність GSH-пероксидази не виявляє достовірних змін.

Порівняльна характеристика змін показників ПОЛ та АО в сім'яниках щурів за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 3.2.

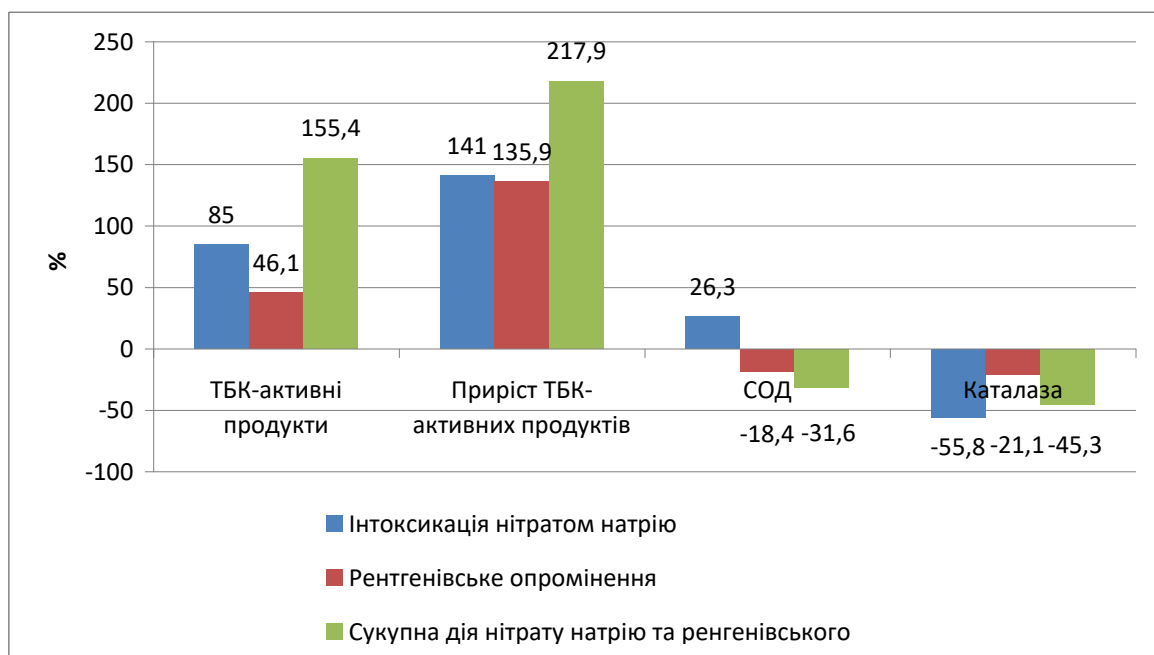


Рис. 3.2. Зміни показників ПОЛ та АО в сім'яниках щурів за умов ізольованої та сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином,

1) 30-денна інтоксикація нітратом натрію супроводжується активацією у тканинах сім'яників щурів компенсованого пероксидного окиснення ліпідів при наявності адекватного антиоксидантного потенціалу, але з різноспрямованими показниками активності ферментів – підвищенням супероксиддисмутази та зменшенням каталази;

2) фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр призводить до розвитку у тканинах сім'яників щурів декомпенсованого пероксидного окиснення ліпідів;

3) фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію потенціює розвиток у тканинах сім'яників щурів декомпенсованого пероксидного окиснення ліпідів та пригнічення антиоксидантних ферментів - супероксиддисмутази та каталази.

3.3. Зміни окиснювального метаболізму в сперматозоїдах білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Супероксидний аніон-радикал продукується у сперматозоїдах ссавців НАДН-залежним (мітохондріальним) та НАДФН-залежними (НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎) ЕТЛ. Так, вироблення САР мітохондріальним ЕТЛ (при стимуляції НАДН) у спермі становить $4,8 \pm 0,2$ пмоль/с $\times 10^6$, а НАДФН-залежними – $4,3 \pm 0,2$ пмоль/с $\times 10^6$ (таблиця 3.6).

На 30 добу інтоксикації нітратом натрію генерація САР мітохондріальним ЕТЛ (при стимуляції НАДН) збільшується – до $7,4 \pm 0,3$ пмоль/с $\times 10^6$ (на 54,2%, P<0,001), а НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎ ЕТЛ (при стимуляції НАДФН) – до $6,8 \pm 0,3$ пмоль/с $\times 10^6$ (на 58,1%, P<0,001).

Таблиця 3.6

Утворення супероксидного аніон-радикала у спермі щурів (за оцінкою екстинкції діоксанового елюату) за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення, пмоль/с $\times 10^6$ (M \pm m, n=28)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
Продукція САР мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	4,8±0,2	7,4±0,3 p1<0,001	7,5±0,3 p1<0,001	9,2±0,6 p1<0,001 p2<0,02 p3<0,02
Продукція САР НАДФН-цитохром P ₄₅₀ і НАДФН-цитохром B ₂₄₅₍₅₅₈₎ ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	4,3±0,2	6,8±0,3 p1<0,001	7,8±0,3 p1<0,001	8,9±0,6 p1<0,001 p2<0,01

Фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр також підвищує продукцію САР у спермі мітохондріальним ЕТЛ (при стимуляції НАДН) – до 7,5±0,3 пмоль/с×10⁶ (на 56,3%, P<0,001), а НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎ ЕТЛ (при стимуляції НАДФН) – до 7,8±0,3 пмоль/с×10⁶ (на 81,4%, P<0,001).

За умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію генерація САР у спермі НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ підвищується до 9,2±0,6 пмоль/с×10⁶, що перевищує на 91,7% (p<0,001) дані інтактної групи, на 24,3% (p<0,02) – результат другої серії, та на 22,7% (p<0,02) – результат третьої серії.

Продукція САР у спермі НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎ ЕТЛ (при стимуляції НАДФН) підвищується до 8,9±0,6 пмоль/с×10⁶, , що перевищує на 107,0% (p<0,001) дані інтактної групи та на 30,9% (p<0,01) – результат другої серії.

В останні роки доведено, що сперматозоїди ссавців містять усі ізоформи NOS (eNOS, nNOS, iNOS) [207, 136, 270].

Згідно з нашими даними, на 30 добу інтоксикації нітратом натрію сумарна активність NOS у сперматозоїдах істотно не змінюється (таблиця 3.7).

Фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр підвищує сумарну активність NOS у сперматозоїдах – до 25,9±1,2 нмоль/хв×10⁶ (на 317,7%, P<0,001).

За умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію сумарна активність NOS у сперматозоїдах залишається збільшеною – до 20,7±1,6 нмоль/хв×10⁶ (на 233,9%, P<0,001).

Таблиця 3.7

Активність NOS у спермі щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=28)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
NOS, нмоль/хв×10 ⁶	6,2±0,2	10,9±0,54	25,9±1,2 p1<0,001	20,7±1,6 p1<0,001

Надлишкове утворення АФК у сперматозоїдах за умов експерименту закономірно позначається на концентрації вторинних продуктів ПОЛ.

За даними дослідження, у спермі інтактних щурів концентрація ТБК-активних сполук складає відповідно – $70,2 \pm 6,2$ пмоль/л $\times 10^6$ (таблиця 3.8).

Таблиця 3.8

Зміни концентрації ТБК-реактантів у спермі щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=28$)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
ТБК-реактанти, пмоль/л $\times 10^6$	$70,2 \pm 6,2$	$117,5 \pm 5,5$ $p1 < 0,001$	$123,9 \pm 8,6$ $p1 < 0,001$	$143,3 \pm 9,6$ $p1 < 0,001$ $p2 < 0,05$

На 30 добу інтоксикації нітратом натрію концентрація ТБК-реактантів збільшується – до $117,5 \pm 5,5$ пмоль/л $\times 10^6$ (на 67,4%, $P < 0,001$).

Фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр також підвищує концентрацію ТБК-активних сполук – до $123,9 \pm 8,6$ пмоль/л $\times 10^6$ (на 76,5%, $P < 0,001$).

За умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію концентрація ТБК-реактантів збільшується – до $143,3 \pm 9,6$ пмоль/л $\times 10^6$, що перевищує на 104,1% ($p < 0,001$) дані інтактної групи та на 22,0% ($p < 0,05$) – результат другої серії.

Порівняльна характеристика змін показників генерації САР, сумарної активності NOS та утворення ТБК-активних сполук в сперматозоїдах щурів за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 3.2.

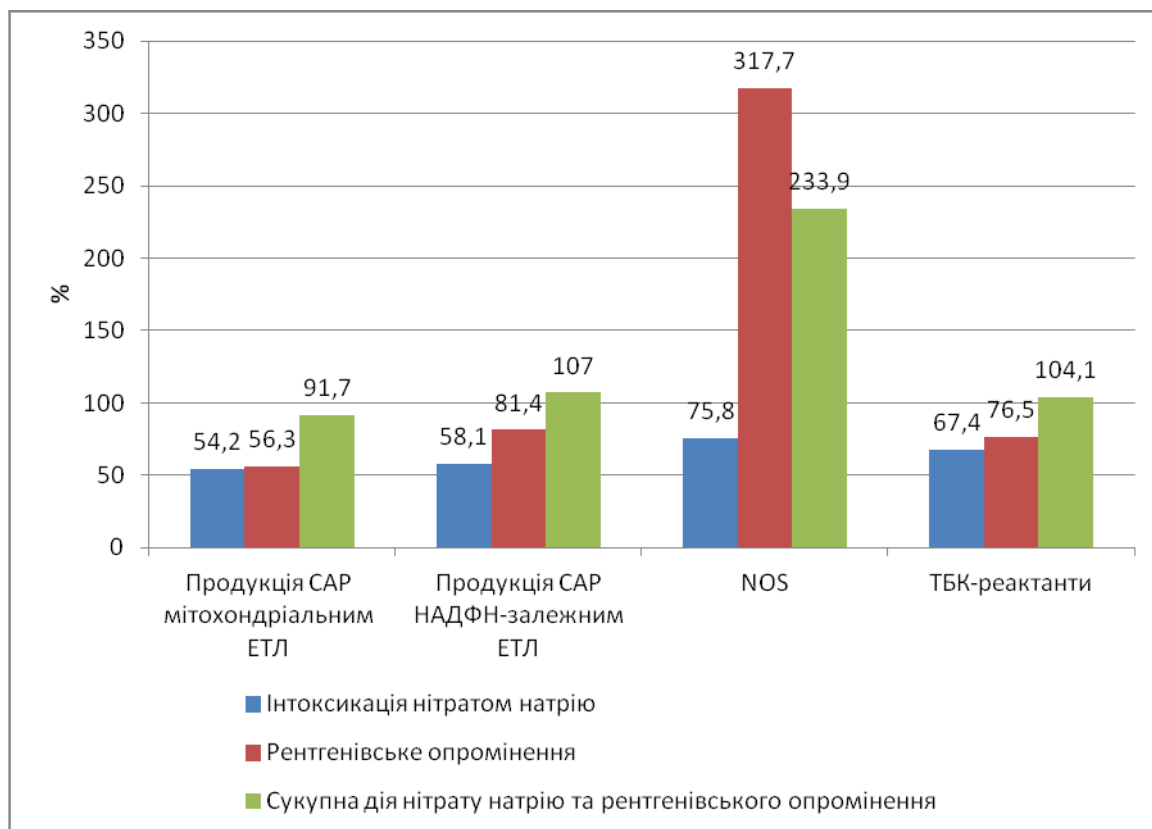


Рис. 3.3. Зміни показників продукції САР, сумарної активності NOS та утворення ТБК-активних сполук в сперматозоїдах щурів за умов ізолюваної та сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином,

1) 30-денна інтоксикація нітратом натрію супроводжується гіперпродукцією у сперматозоїдах щурів супероксидного аніон-радикала мітохондріальним і НАДФН-цитохром P_{450} і НАДФН-цитохром $B_{245(558)}$ -залежними електронно-транспортними ланцюгами, активацією в них пероксидного окиснення ліпідів;

2) фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр призводить до гіперпродукції у сперматозоїдах щурів супероксидного аніон-радикала мітохондріальним і НАДФН-цитохром P_{450} і НАДФН-цитохром $B_{245(558)}$ -залежними електронно-транспортними ланцюгами, активацією в них пероксидного окиснення ліпідів;

3) фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію потенціює у сперматозоїдах щурів гіперпродукцію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом, збільшує сумарну активність NO-синтаз та інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів.

Матеріали цього розділу оприлюдненні в статтях і тезах:

1. Шаталин Б.О. Состояние окислительного метаболизм семенников на фоне действия нитратной интоксикации и рентгеновского облучения / Б.О. Шаталин, В.А. Костенко // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2014. - № 3 (37). – С. 56-61.

2. Шаталин Б.О. Влияние нитратной интоксикации и рентгеновского облучения на окислительные процессы в семенниках / Б.О. Шаталин, В.А. Костенко // Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека: VI нац. науч.-практ. конф. с международ. участием (Смоленск, 25-29 мая, 2014). – Смоленск, 2014. - С. 101-103.

РОЗДІЛ 4
ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СПЕРМИ БІЛИХ ЩУРІВ
ЗА УМОВ СУКУПНОЇ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ
ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

4.1. Зміни кількісних і якісних показників сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

При дослідженні кількісних показників сперми інтактних щурів середнє число сперматозоїдів складає $(48,4 \pm 3,1) \times 10^6$, з яких $(10,5 \pm 0,22)\%$ є нежиттєздатними, а $(15,5 \pm 0,94)\%$ сперматозоїдів представлено патологічними формами (таблиця 4.1).

Таблиця 4.1

Кількісні показники сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=28$)

Показники	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
1	2	3	4	5
Середнє число сперматозоїдів, $\times 10^6$	$48,4 \pm 3,1$	$36,6 \pm 4,1$ $p1 < 0,05$	$34,7 \pm 3,6$ $p1 < 0,02$	$31,4 \pm 4,1$ $p1 < 0,01$

Продовження таблиці 4.1

1	2	3	4	5
Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів, %	10,5±0,22	33,0±0,38 p1<0,001	35,5±0,40 p1<0,001	45,5±0,62 p1<0,001 p2<0,001 p3<0,001
Кількість патологічних форм сперматозоїдів, %	15,5±0,94	40,0±1,99 p1<0,001	40,0±2,1 p1<0,001	50,0±3,22 p1<0,001 p2<0,02 p3<0,05

Примітки (у табл. 4.1-4.3):

- 1) p1 – ймовірність похибки у порівнянні з даними першої серії (інтактні щури);
- 2) p2 – ймовірність похибки у порівнянні з даними другої серії;
- 3) p3 – ймовірність похибки у порівнянні з даними третьої серії.

На 30 добу інтоксикації нітратом натрію середнє число сперматозоїдів зменшується до $(36,6 \pm 4,1) \times 10^6$ (на 24,4%, $p < 0,05$). Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів збільшується до $(33,0 \pm 0,38)\%$ (на 214,3%, $p < 0,001$). Число патологічних форм сперматозоїдів за цих умов складає $(40,0 \pm 1,99)\%$, що на 158,1% ($p < 0,001$) перевищує величину інтактної групи.

Серед патологічних форм сперматозоїдів, які утворюються за умов 30-денного введення нітрату натрію, спостерігається переважання клітин зі змінами голівки (набухання, зморщування, мікро- та макроголівки, вакуолізація акросоми тощо), а також змішаними дефектами (таблиця 4.2).

Число клітин з аномаліями голівки та змішаною патологією за цих умов складає відповідно $(80,0 \pm 3,59)\%$ та $(7,5 \pm 0,62)\%$, що на 37,8% ($p < 0,001$) та 132,2% ($p < 0,002$) перевищує дані першої серії.

У той же час відсоток сперматозоїдів з аномаліями шийки та середньої частини (набухання та зморщування) та хвоста (відсутність, подвоєння, зростання з голівкою) зменшується відповідно до $(5,00 \pm 0,36)\%$ та $(3,75 \pm 0,62)\%$, тобто на 69,0% ($p < 0,001$) та 76,8% ($p < 0,001$) поступається даним інтактної серії.

Таблиця 4.2

Розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=28$)

Морфологічні ознаки патологічних форм сперматозоїдів, %	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
1	2	3	4	5
Аномалії голівки	$58,06 \pm 2,44$	$80,00 \pm 3,59$ $p1 < 0,001$	$85,00 \pm 2,30$ $p1 < 0,001$	$86,00 \pm 4,18$ $p1 < 0,001$
Аномалії шийки та тіла	$16,13 \pm 1,30$	$5,00 \pm 0,36$ $p1 < 0,001$	$2,50 \pm 0,36$ $p1 < 0,001$	$4,00 \pm 0,29$ $p1 < 0,001$ $p3 < 0,01$
Аномалії хвоста	$16,13 \pm 1,60$	$3,75 \pm 0,62$ $p1 < 0,001$	$1,25 \pm 0,44$ $p1 < 0,001$	$3,00 \pm 0,45$ $p1 < 0,001$ $p3 < 0,02$

Продовження таблиці 4.2

1	2	3	4	5
Нерозділені сперматозоїди	6,45±1,60	3,75±0,56	2,50±0,44 p1<0,05	1,00±0,29 p1<0,01 p2<0,001 p3<0,02
Змішана патологія	3,23±0,92	7,50±0,62 p1<0,002	8,75±0,71 p1<0,001	6,00±0,49 p1<0,02 p3<0,01

За умов фракційного рентгенівського опромінення щурів у сумарній дозі 0,24 Гр середнє число сперматозоїдів (див. табл. 4.1) також зменшується - до $(34,7 \pm 3,6) \times 10^6$ (на 28,3%, $p < 0,02$). Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів збільшується до $(35,5 \pm 0,40)\%$ (на 238,1%, $p < 0,001$). Число патологічних форм сперматозоїдів за цих умов складає $(40,0 \pm 2,1)\%$, що на 158,1% ($p < 0,001$) перевищує величину інтактної групи.

При цьому серед патологічних форм сперматозоїдів також переважають клітини з аномаліями голівки та змішаними дефектами (див. табл. 4.2). Так, кількість сперматозоїдів з аномаліями голівки та змішаною патологією за цих умов складає відповідно $(85,0 \pm 2,3)\%$ та $(8,75 \pm 0,71)\%$, що на 46,4% ($p < 0,001$) та 170,9% ($p < 0,001$) перевищує дані першої серії.

Відсоток сперматозоїдів з аномаліями шийки та тіла зменшується до $(2,50 \pm 0,36)\%$, хвоста - до $(1,25 \pm 0,44)\%$, нерозділених сперматозоїдів - до $(2,50 \pm 0,44)\%$, що відповідно на 84,5% ($p < 0,001$), 92,3% ($p < 0,001$) та 61,2% ($p < 0,05$) поступається даним інтактної серії.

За умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію середнє число сперматозоїдів (див. табл. 4.1)

зменшується до $(31,4 \pm 4,1) \times 10^6$, що на 35,1% ($p < 0,01$) поступається результату інтактної групи, проте суттєво не відрізняється від даних другої та третьої серій.

Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів збільшується до $(45,5 \pm 0,62)\%$, що перевищує дані інтактної групи - на 333,3% ($p < 0,001$), другої та третьої серій – відповідно на 37,9% ($p < 0,001$) та 28,2% ($p < 0,001$).

Число патологічних форм сперматозоїдів також істотно підвищується - до $(50,0 \pm 3,22)\%$, що перевищує дані інтактної групи - на 222,6% ($p < 0,001$), другої та третьої серій – відповідно на 25,0% ($p < 0,02$) та 25,0% ($p < 0,05$).

Як і у серії з ізольованим фракційним рентгенівським опроміненням, у цьому випадку переважають клітини з аномаліями голівки та змішаною патологією (див. табл. 4.2), відсоток яких складає відповідно $(86,00 \pm 4,18)\%$ та $(6,00 \pm 0,49)\%$, що на 48,1% ($p < 0,001$) та 85,8% ($p < 0,02$) перевищує дані першої серії. Проте відсоток сперматозоїдів зі змішаною патологією на 31,4% ($p < 0,01$) поступається такому у третій серії.

При цьому у порівнянні з результатами третьої серії збільшується відсоток клітин з аномаліями шийки та тіла – на 60,0% ($p < 0,01$), хвоста – 140,0% ($p < 0,02$). Зустрічаються сперматозоїди зі "скрученою" шийкою, набуханням або зморщуванням середньої частини, відсутністю або подвоєнням хвоста. Рідше зустрічаються нерозділені сперматозоїди.

Переважання сперматозоїдів із патологією голівки свідчить, що головною причиною утворення патологічних форм клітин є зміни в сперматогенному епітелії сім'яників [55].

Порівняльна характеристика кількісних і якісних змін сперми білих щурів (у % від даних інтактної групи тварин), а також розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками за умов експерименту наведено відповідно на рис. 4.1 та 4.2.

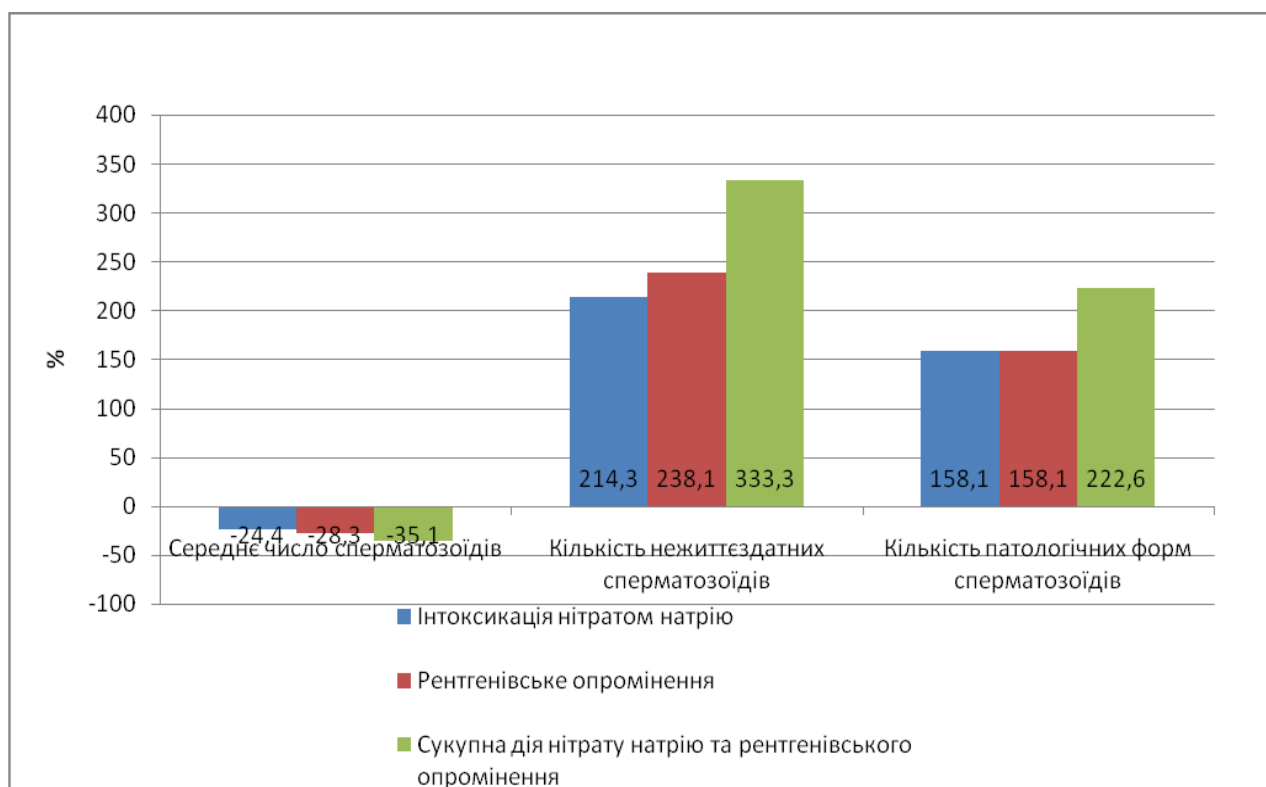


Рис. 4.1. Кількісні та якісні зміни сперми білих щурів за умов ізольованої та сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

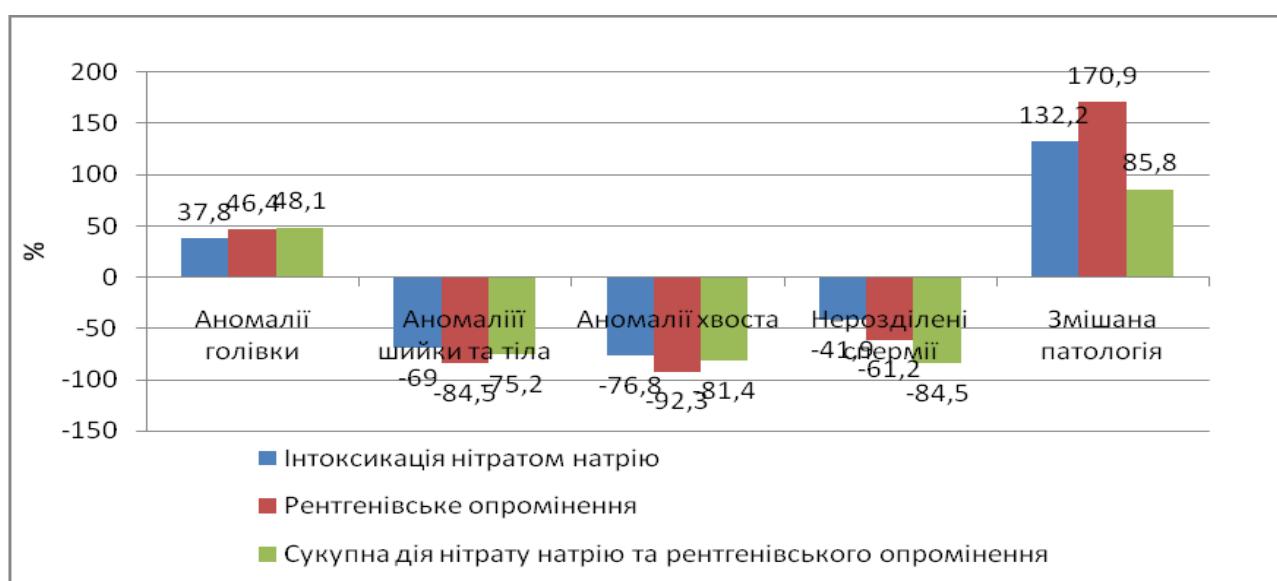


Рис. 4.2. Розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками за умов ізольованої та сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у %).

Таким чином,

1) 30-денна інтоксикація нітратом натрію та фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр супроводжується подібними змінами кількісних і якісних показників сперми білих щурів, що відбивається у зменшенні середнього числа сперматозоїдів, підвищенні кількості нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм (з переважанням сперматозоїдів з аномаліями голівки та змішаними дефектами);

2) фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію супроводжується достовірно більшим (у порівнянні з ізольованою дією чинників) зниженням середнього числа сперматозоїдів, підвищенням кількості нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм, серед яких переважають сперматозоїди з аномаліями голівки. У порівнянні з групою тварин, що зазнавали ізольований вплив рентгенівських променів, збільшується відсоток клітин з аномаліями шийки та тіла ("скрученою" шийкою, набуханням або зморщуванням середньої частини) та хвоста (його відсутністю або подвоєнням).

4.2. Показники рухливості сперматозоїдів білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

При дослідженні показників рухливості (таблиця 4.3) сперматозоїдів інтактних $(72,6 \pm 4,2)\%$ клітин виявляють належність до категорії А

(нормокінезис), $(12,3 \pm 0,8)\%$ - категорії В (гіпокінезис), $(9,4 \pm 0,5)\%$ - категорії С (дискінезис), $(5,7 \pm 0,4)\%$ - категорії D (акінезис)

Таблиця 4.3

Показники кінезіограми за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=28$)

Показники кінезіограми, %	Серії дослідів			
	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію (30 діб)	Рентгенівське опромінення	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення
Нормокінезис	$72,6 \pm 4,2$	$63,4 \pm 6,4$	$46,7 \pm 5,3$ $p1 < 0,01$	$44,0 \pm 4,9$ $p1 < 0,001$
Гіпокінезис	$12,3 \pm 0,8$	$15,7 \pm 2,1$	$25,1 \pm 1,7$ $p1 < 0,001$ $p2 < 0,01$	$28,4 \pm 1,8$ $p1 < 0,001$ $p2 < 0,02$
Дискінезис	$9,4 \pm 0,5$	$7,3 \pm 0,5$ $p1 < 0,02$	$10,1 \pm 0,8$	$6,9 \pm 0,4$ $p1 < 0,002$ $p3 < 0,01$
Акінезис (нерухомі)	$5,7 \pm 0,4$	$13,6 \pm 1,5$ $p1 < 0,001$	$18,1 \pm 1,5$ $p1 < 0,001$	$20,7 \pm 2,9$ $p1 < 0,001$ $p2 < 0,05$

На 30 добу інтоксикації нітратом натрію відмічається збільшення до $(13,6 \pm 1,5)\%$ (на $138,6\%$, $p < 0,001$) нерухомих сперматозоїдів (категорія D) при зменшенні (на $22,3\%$, $p < 0,02$) частки сперматозоїдів категорії С (дискінезис), який складає $(7,3 \pm 0,5)\%$.

За умов фракційного рентгенівського опромінення щурів у сумарній дозі 0,24 Гр істотно зменшується відсоток нормокінетичних форм сперматозоїдів (категорія А) - до $(46,7 \pm 5,3)\%$, тобто на 35,7% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними інтактної серії.

При цьому достовірно збільшується частка сперматозоїдів категорії В (гіпокінезис) – до $(25,1 \pm 1,7)\%$, що перевищує на 104,1% ($p < 0,001$) результат інтактної групи та на 59,9% ($p < 0,01$) дані другої серії.

Відсоток нерухомих сперматозоїдів (категорія D) також підвищується – до $(18,1 \pm 1,5)\%$, що на 217,5% ($p < 0,001$) перевищує результат інтактної групи.

За умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію відсоток нормокінетичних форм сперматозоїдів (категорія А) зменшується до $(44,0 \pm 4,9)\%$, тобто на 39,4% ($p < 0,01$) у порівнянні з результатом першої серії.

Значно збільшується частка сперматозоїдів категорій В (гіпокінезис) та D (акінезис).

Відсоток гіпокінетичних сперматозоїдів (категорія В) підвищується до $(28,4 \pm 1,8)\%$, що перевищує на 130,9% ($p < 0,001$) результат інтактної групи та на 80,9% ($p < 0,02$) дані другої серії.

Частка нерухомих сперматозоїдів (категорія D) підвищується до $(20,7 \pm 2,9)\%$, що на 263,2% ($p < 0,001$) перевищує результат інтактної групи та на 52,2% ($p < 0,05$) дані другої серії.

Одночасно з цим відсоток дискінетичних клітин (категорія С) зменшується до $(6,9 \pm 0,4)\%$, що відповідно на 26,6% ($p < 0,002$) та 31,7% ($p < 0,01$) поступається даним першої та третьої серії.

Примітно, що суттєві порушення рухливості сперматозоїдів виявляються при ізольованому рентгенівському опроміненні та його комбінуванні з дією токсичного чинника (нітрату натрію), оскільки за

цих умов число активно-рухливих клітин з поступальним рухом (категорія А) зменшується більше, ніж на 25%.

Порівняльна характеристика показників кінезіограми за умов експерименту наведено відповідно на рис. 4.3.

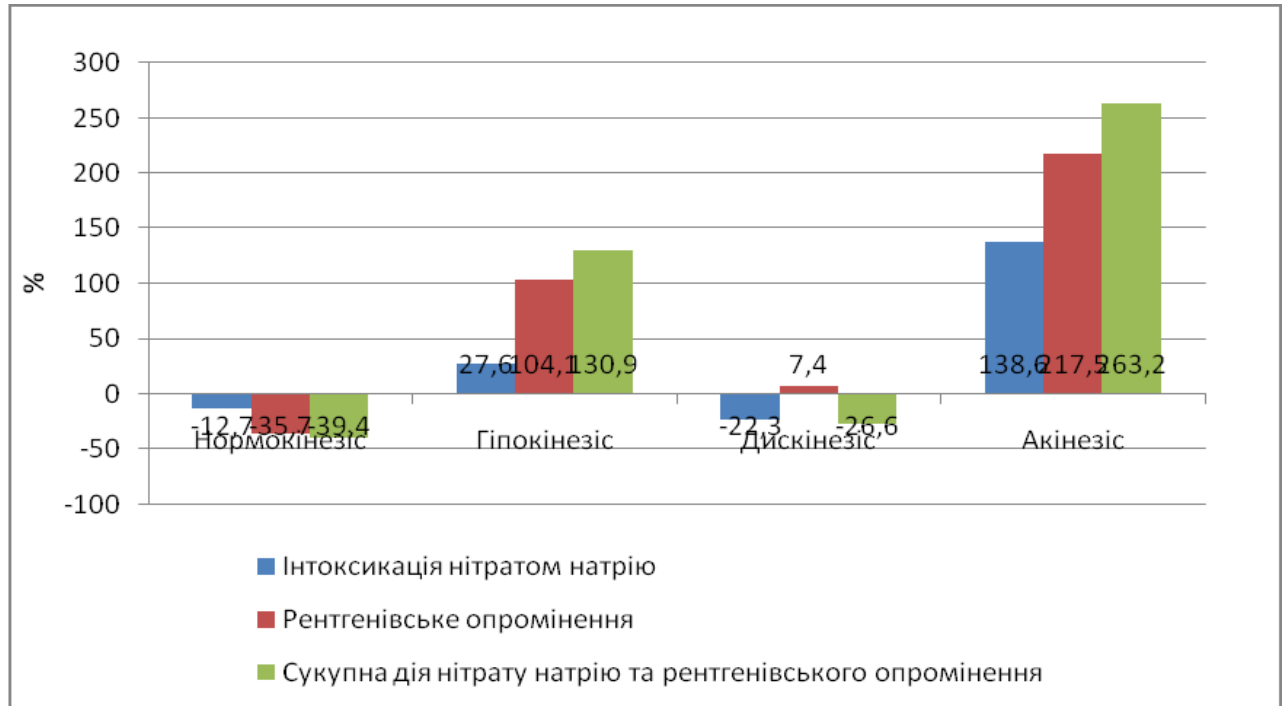


Рис. 4.3. Показники кінезіограми за умов ізольованої та сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у %).

Таким чином,

1) 30-денна інтоксикація нітратом натрію супроводжується порушеннями рухливості сперматозоїдів, що виявляється у збільшенні частки нерухомих сперматозоїдів (категорія D) при зменшенні відсотка дискінетичних сперматозоїдів;

2) фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр викликає зменшення активно-рухливих клітин з поступальним рухом (категорія А) при збільшенні відсотка гіпокінетичних (категорія В) та нерухомих (категорія D) сперматозоїдів;

3) фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію супроводжується зменшенням

активно-рухливих клітин з поступальним рухом (категорія А) та дискінетичних сперматозоїдів (категорія С) при прогресуючому підвищенні нерухомих сперматозоїдів (категорія D).

Матеріали цього розділу оприлюдненні в статтях і тезах:

1. Шаталін Б.О. Показники функціонального стану сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення / Б.О. Шаталін, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2016. – Т.16, – №3 – С. 192-195.

2. Шаталін Б.О. Сперматограма при сумісній хронічній дії на щурів нітрат-іону та рентгенівського опромінення / Б.О. Шаталін // Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм : VIII науково-практичної конференції : матеріали (Тернопіль, 1-2 жовтня 2015 р.). – Тернопіль, 2015. – С. 103.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА ОКИСНЮВАЛЬНИЙ МЕТАБОЛІЗМ В СІМ'ЯНИКАХ І СПЕРМІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СПЕРМИ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СУКУПНОЇ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

5.1. Вплив мелатоніну на утворення активних форм кисню та азоту в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Мелатонін – це гормон епіфізу, який продукується також і екстрапінеально, головним чином, клітинами шлунково-кишкового тракту, у меншій кількості - нейроендокринними клітинами дихальних шляхів, у корковому шарі нирок, надниркових залозах, печінці, парагангліях, передміхуровій залозі та ін. [3, 43, 65]. В епіфізі мелатонін синтезується в темряві, наслідком чого є суттєва варіабельність концентрації мелатоніну в день та вночі, що зумовлює біологічні ритми організму [1, 3].

Доведено, що мелатонін пригнічує в гіпоталамусі секрецію гонадоліберинів, у гіпофізі – гонадотропінів, що зменшує продукцію тестостерону сім'яниками [1]. Виявлено мембранні та ядерні (впливають на експресію генів) рецептори мелатоніну. Він є найважливішим ендогенним антиоксидантом, який прямо інактивує кисневі радикали або впливає на експресію антиоксидантних (глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, СОД, каталаза, глутатіонпероксидаза) та прооксидантних ферментів [37, 112].

Гіпомелатоніємія виявляє у щурів зниження концентрації дієнів, активності супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази,

антиоксидантного потенціалу сім'яників [36, 37, 112]. Це дає підстави сподіватися на певний вплив мелатоніну на продукцію АФК, зокрема, САР.

Введення мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію обмежує генерацію САР у тканинах сім'яників (таблиця 5.1) НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ до $20,4 \pm 1,2$ нмоль/г \times с, що поступається на 22,4% ($p < 0,01$) даним четвертої серії.

Таблиця 5.1

Вплив мелатоніну на утворення супероксидного аніон-радикала у тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення, нмоль/г \times с ($M \pm m$, $n=21$)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
Продукція САР мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	$18,6 \pm 1,2$	$26,3 \pm 1,2$ $p1 < 0,002$	$20,4 \pm 1,2$ $p2 < 0,01$
Продукція САР мікросомальним ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	$16,7 \pm 1,3$	$10,2 \pm 0,9$ $p1 < 0,002$	$12,1 \pm 1,5$ $p1 < 0,05$

Примітки (у табл. 5.1-5.11):

р1 – ймовірність похибки у порівнянні з даними першої серії (інтактні щури);

2) р2 – ймовірність похибки у порівнянні з даними четвертої серії.

У той же час призначення мелатоніну за умов поєданого впливу радіаційного та токсичного чинників суттєво не позначається на генерації САР у тканинах сім'яників НАДФН-залежними ЕТЛ.

Примітно, що мелатонін справляє позитивну дію на мітохондріальний ЕТЛ. Так, активність ЦХО при застосуванні мелатоніну за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (таблиця 5.2) збільшується до $1,41 \pm 0,20$ од.акт. , що на 147,4% ($p < 0,002$) перевищує результат четвертої серії.

Таблиця 5.2.

Вплив мелатоніну на активність цитохромоксидази у тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=21$)

Назва ферменту	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
ЦХО, од.акт.	$1,43 \pm 0,12$	$0,57 \pm 0,07$ $p1 < 0,05$	$1,41 \pm 0,20$ $p2 < 0,002$

Застосування мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію зменшує сумарну активність NOS у тканинах сім'яників (таблиця 5.3) – до $3,91 \pm 0,16$ мкмоль $\text{NO}_2^- / \text{г} \cdot \text{хв.}$, що на 45,7% ($p < 0,002$) поступається даним четвертої групи.

Таблиця 5.3

Вплив мелатоніну на утворення метаболітів системи оксиду азоту в тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=21$)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
NOS, мкмоль NO ₂ ⁻ /Г·хв.	4,71±0,15	7,20±0,26 p1<0,001	3,91±0,16 p2<0,001
Вміст NO ₂ ⁻ , мкмоль/Г	0,14±0,02	0,38±0,01 p1<0,001	0,28±0,02 p1<0,001 p2<0,001
Пероксинітрит, мкмоль/Г	0,68±0,02	1,22±0,04 p1<0,001	0,92±0,06 p1<0,01 p2<0,01

Відомо, що мелатонін здатний селективно пригнічувати iNOS [161, 165, 226].

За наведених вище умов концентрація нітрит-йонів також знижується - до 0,28±0,02 мкмоль/Г, що на 26,3% (p<0,001) поступається даним четвертої групи. Вміст пероксинітриту в тканинах сім'яників зменшується до 0,92±0,06 мкмоль/Г, що на 24,6% (p<0,01) поступається результату четвертої серії.

Порівняльна характеристика змін активності NOS, генерації CAP і пероксинітриту в сім'яниках щурів при введенні мелатоніну за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 5.1.

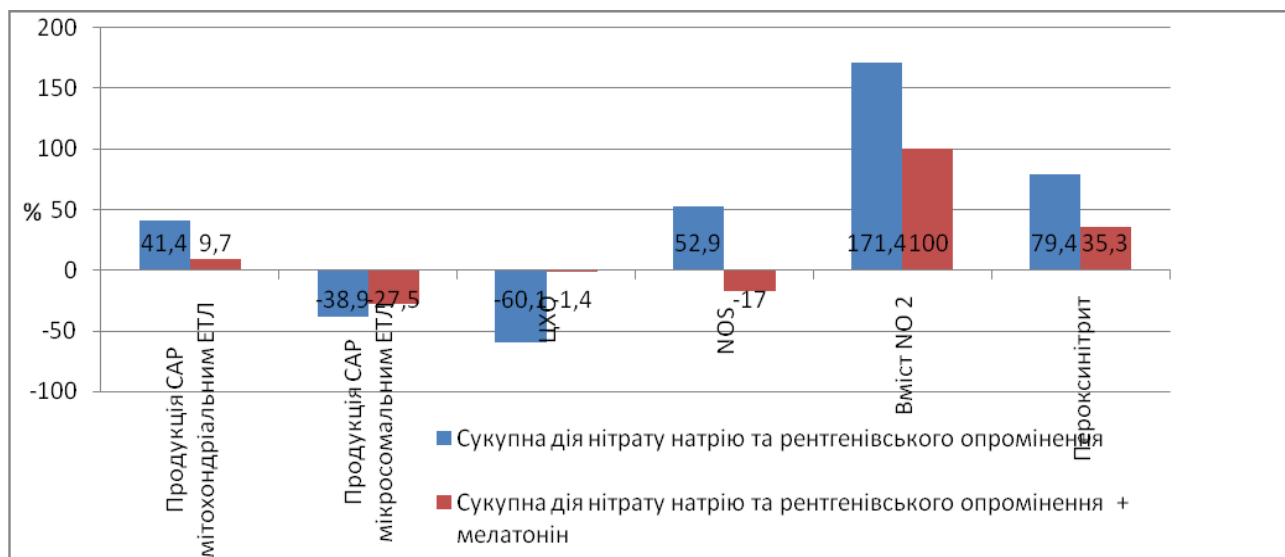


Рис. 5.1. Зміни продукції активності NOS, генерації САР і пероксинітриту в сім'яниках щурів при введенні мелатоніну за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином, введення мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг маси тіла протягом 30 діб за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує генерацію супероксидного аніон-радикала у тканинах сім'яників дихальним ланцюгом мітохондрій, підвищує в них активність цитохромоксидази, зменшує сумарну активність NO-синтаз, концентрацію нітрит-йонів і пероксинітриту.

5.2. Вплив мелатоніну на процеси пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантний захист в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Введення мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію зменшує концентрацію ТБК-реактантів до інкубації гомогенату (таблиця 5.4) - до $28,4 \pm 3,2$ мкмоль/кг, що поступається на 42,4% ($p < 0,001$) даним четвертої серії.

Приріст ТБК-активних сполук за час 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині складає $10,9 \pm 3,1$ мкмоль/кг, що поступається на 12,1% ($p < 0,05$) даним четвертої серії та свідчить про підвищення антиоксидантного потенціалу.

Таблиця 5.4.

Вплив мелатоніну на концентрацію ТБК-реактантів за умов інкубації гомогенату сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=21$)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
ТБК-реактанти до інкубації, мкмоль/кг	$19,3 \pm 3,2$	$49,3 \pm 2,7$ $p1 < 0,001$	$28,4 \pm 3,2$ $p1 < 0,05$ $p2 < 0,001$
ТБК-реактанти після інкубації, мкмоль/кг	$23,2 \pm 3,2$	$61,7 \pm 4,4$ $p1 < 0,001$	$39,3 \pm 2,8$ $p1 < 0,05$
Приріст ТБК-реактантів, мкмоль/кг	$3,9 \pm 1,7$	$12,4 \pm 3,0$ $p1 < 0,05$	$10,9 \pm 3,1$ $p1 < 0,05$ $p2 > 0,05$

Покращення АО системи при застосуванні мелатоніну за умов експерименту підтверджується також збільшенням активності АО ферментів (таблиця 5.5). Так, активність СОД підвищується до $3,7 \pm 0,3$ од. акт., що на 42,3% ($p < 0,01$) перевищує величину четвертої серії.

Активність GSH-пероксидаза збільшується до $88,4 \pm 5,2$ од. акт. Тобто на 35,8% ($p < 0,01$) перевищує результат четвертої серії.

Активність каталази підвищується до $0,70 \pm 0,06$ од. акт., що на 34,6% ($p < 0,002$) перевищує величину четвертої серії.

Таблиця 5.5.

Вплив мелатоніну на активність антиоксидантних ферментів у тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=21$)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
СОД, од. акт.	$3,8 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,1$ $p1 < 0,002$	$3,7 \pm 0,3$ $p2 < 0,01$
GSH-пероксидаза, од. акт	$82,9 \pm 7,4$	$65,1 \pm 5,6$	$88,4 \pm 5,2$ $p2 < 0,01$
Каталаза, од. акт.	$0,95 \pm 0,06$	$0,52 \pm 0,07$ $p1 < 0,002$	$0,70 \pm 0,06$ $p1 < 0,05$ $p2 < 0,002$

Порівняльна характеристика змін показників ПОЛ та АО в сім'яниках щурів при введенні мелатоніну за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 5.2.

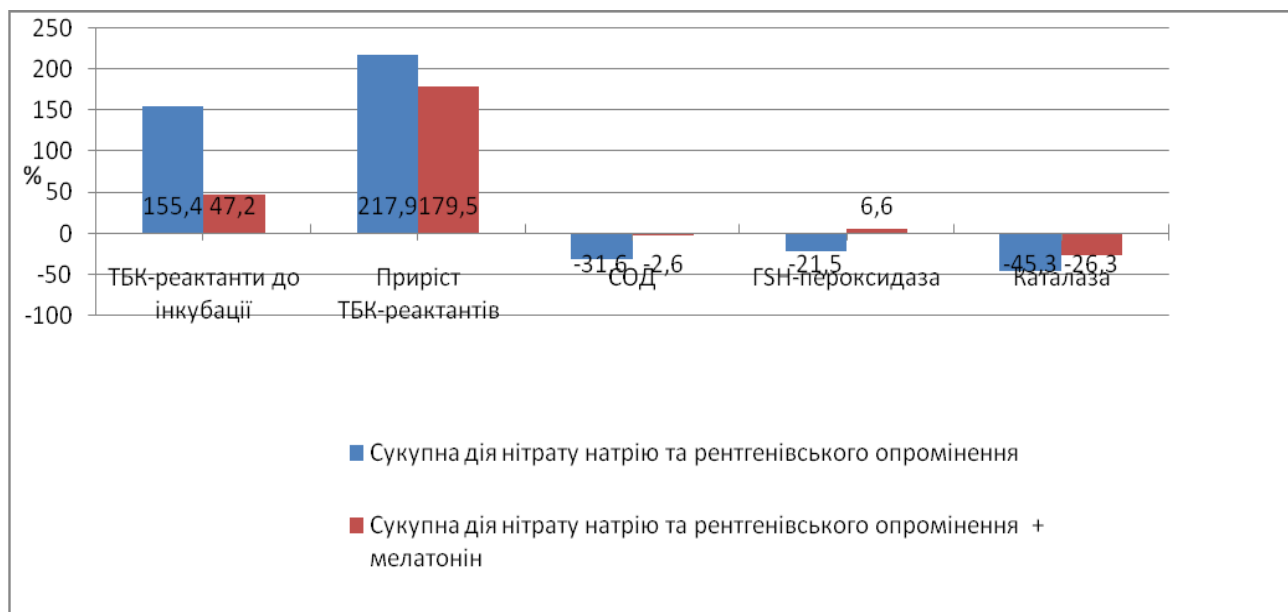


Рис. 5.2. Зміни показників ПОЛ та АО в сім'яниках щурів при введенні мелатоніну за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином, введення мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг маси тіла протягом 30 діб за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує пероксидне окиснення ліпідів у тканинах сім'яників, підвищує в них активність антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази.

5.3. Вплив мелатоніну на окиснювальний метаболізм у сперматозоїдах білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Введення мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію обмежує у спермі генерацію CAP

мітохондріальним (при стимуляції НАДН) і НАДФН-залежними ЕТЛ (НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎) - при стимуляції НАДФН) – відповідно до 7,1±0,3 пмоль/с×10⁶, та 5,7±0,6 пмоль/с×10⁶ (таблиця 5.6), що на 22,8% (p<0,001) та на 36,0% (p<0,01) поступається даним четвертої серії.

Таблиця 5.6

Вплив мелатоніну на утворення супероксидного аніон-радикала у спермі щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення, пмоль/с×10⁶ (M±m, n=21)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
Продукція САР мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	4,8±0,2	9,2±0,6 p1<0,001	7,1±0,3 p1<0,001 p2<0,001
Продукція САР НАДФН-цитохром P ₄₅₀ і НАДФН-цитохром B ₂₄₅₍₅₅₈₎ ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	4,3±0,2	8,9±0,6 p1<0,001	5,7±0,6 p1<0,05 p2<0,01

Застосування мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію зменшує у сперматозоїдах сумарну активність NOS (таблиця 5.7) – до 7,1±0,9 нмоль/хв×10⁶, що на 65,7% (p<0,001) поступається даним четвертої серії.

Таблиця 5.7

Вплив мелатоніну на активність NOS у спермі щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=21)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
NOS, нмоль/хв×10 ⁶	6,2±0,2	20,7±1,6 p1<0,001	7,1±0,9 p2<0,001

Введення мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію знижує концентрацію ТБК-активних сполук – до 111,4±5,7 пмоль/л ×10⁶, що на 22,3% (p<0,02) поступається даним четвертої серії (таблиця 5.8).

Таблиця 5.8

Вплив мелатоніну на концентрацію ТБК-реактивів у спермі щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M+m, n=21)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
ТБК-реактанти, пмоль/л ×10 ⁶	70,2±6,2	143,3±9,6 p1<0,001	111,4±5,7 p1<0,001 p2<0,02

Порівняльна характеристика змін показників генерації CAP, сумарної активності NOS та утворення ТБК-активних сполук в сперматозоїдах щурів при введенні мелатоніну за умов експерименту (у % від даних інтактною групи тварин) наведено на рис. 5.3.

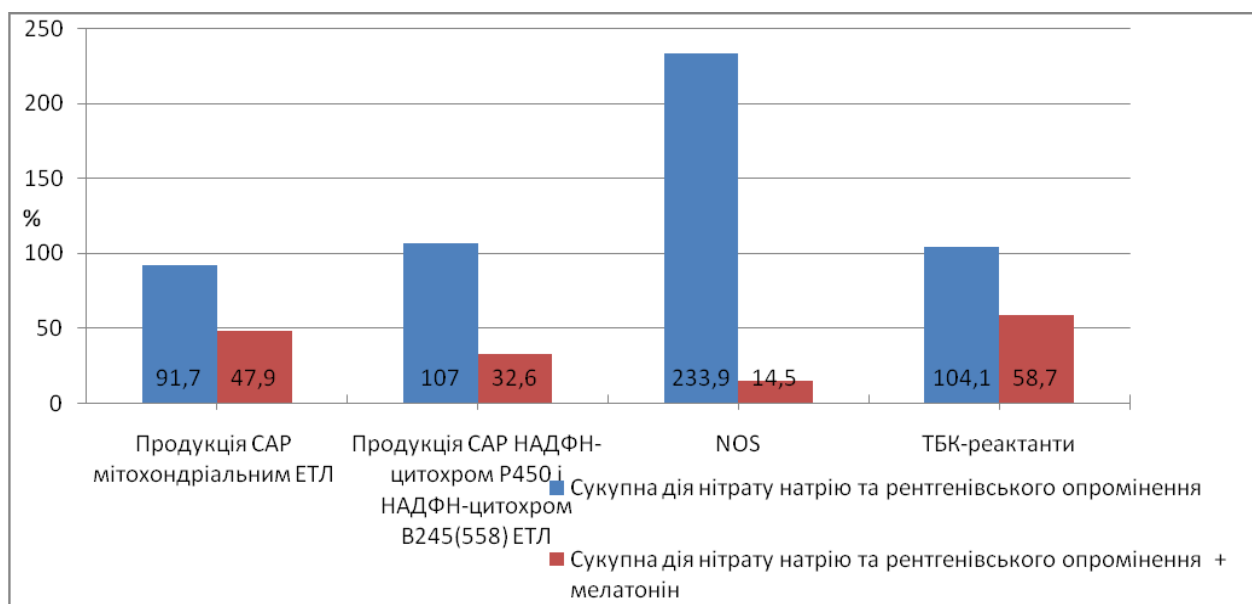


Рис. 5.3. Зміни показників продукції САР, сумарної активності NOS та утворення ТБК-активних сполук в сперматозоїдах щурів при введенні мелатоніну за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином, введення мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг маси тіла протягом 30 діб за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує генерацію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним і НАДФН-цитохром Р₄₅₀ і НАДФН-цитохром В₂₄₅₍₅₅₈₎-залежними електронно-транспортними ланцюгами сперматозоїдів щурів, зменшує сумарну активність NO-синтаз та утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів.

5.4. Вплив мелатоніну на кількісні та якісні показники сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Введення мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію суттєво не впливає на середнє число сперматозоїдів у порівнянні з даними четвертої серії (таблиця 5.9).

Таблиця 5.9

Вплив мелатоніну на кількісні показники сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення
($M \pm m$, $n=21$)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
Середнє число сперматозоїдів, $\times 10^6$	48,4 \pm 3,1	31,4 \pm 4,1 $p1 < 0,01$	35,0 \pm 4,9 $p1 < 0,05$
Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів, %	10,5 \pm 0,22	45,5 \pm 0,62 $p1 < 0,001$	27,5 \pm 1,02 $p1 < 0,001$ $p2 < 0,001$
Кількість патологічних форм сперматозоїдів, %	15,5 \pm 0,94	50,0 \pm 3,22 $p1 < 0,001$	30,0 \pm 1,92 $p1 < 0,001$ $p2 < 0,001$

У той же час істотно зменшується кількість нежиттєздатних сперматозоїдів - до (27,5 \pm 1,02)%, що на 39,6% ($p < 0,001$) поступається даним четвертої серії.

Число патологічних форм сперматозоїдів за цих умов знижується - до (30,0 \pm 1,92)%, що на 40,0% ($p < 0,001$) поступається величині четвертої групи.

Серед патологічних форм сперматозоїдів, які утворюються за цих умов, відсутні клітини зі складними дефектами (змішані аномалії та нерозділені сперматозоїди), відповідно збільшився відсоток клітин з

аномаліями шийки та середньої частини (набухання та зморщування) та хвоста (відсутність, подвоєння) у порівнянні з даними четвертої серії (таблиця 5.10).

Таблиця 5.10

Вплив мелатоніну на розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=21)

Морфологічні ознаки патологічних форм сперматозоїдів, %	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
Аномалії голівки	58,06±2,44	86,00±4,18 p1<0,001	75,0±4,76 p1<0,02
Аномалії шийки та тіла	16,13±1,30	4,00±0,29 p1<0,001	15,00±1,07 p2<0,001
Аномалії хвоста	16,13±1,60	3,00±0,45 p1<0,001	10,00±0,82 p1<0,01 p2<0,001
Нерозділені сперматозоїди	6,45±1,60	1,00±0,29 p1<0,01	0
Змішана патологія	3,23±0,92	6,00±0,49 p1<0,02	0

Порівняльна характеристика кількісних і якісних змін сперми білих щурів, а також розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками при введенні мелатоніну за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 5.4 та 5.5.

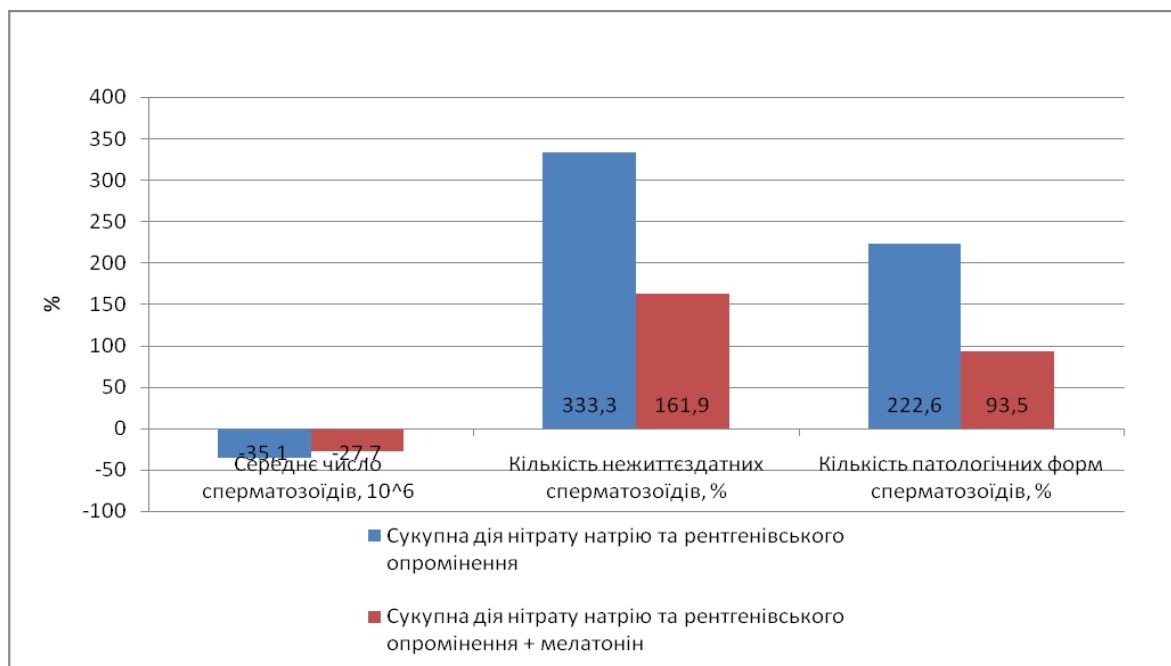


Рис. 5.4. Зміни кількісних і якісних показників сперми білих щурів при введенні мелатоніну за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

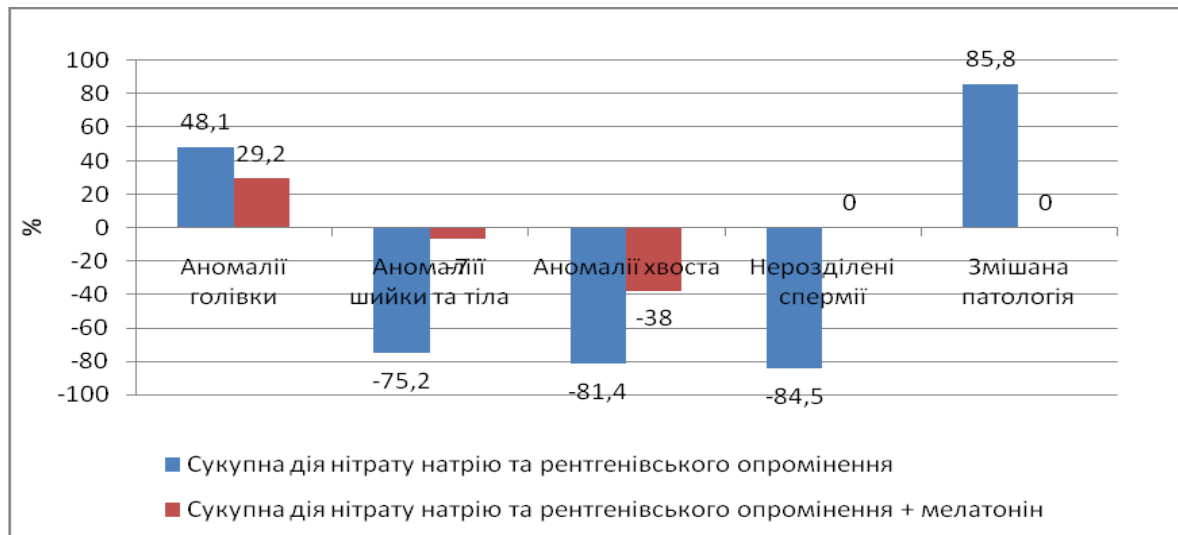


Рис. 5.5. Розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками при введенні мелатоніну за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином, введення мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг маси тіла протягом 30 діб за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників впливає на кількісні та якісні показники сперми білих щурів, що відбивається у зменшенні відсотка нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм, відсутності сперматозоїдів зі складними дефектами (нерозділених, зі змішаними аномаліями).

5.5. Вплив мелатоніну на показники рухливості сперматозоїдів білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Введення мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію суттєво впливає на показники кінезіограми (таблиця 5.11).

Таблиця 5.11

Вплив мелатоніну на показники кінезіограми за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M \pm m, n=21)

Показники кінезіограми, %	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ мелатонін
1	2	3	4
Нормокінезис	72,6 \pm 4,2	44,0 \pm 4,9 p1<0,001	67,1 \pm 6,8 p2<0,02

Продовження таблиці 5.11

1	2	3	4
Гіпокінезис	12,3±0,8	28,4±1,8 p1<0,001	20,6±1,8 p1<0,001 p2<0,01
Дискінезис	9,4±0,5	6,9±0,4 p1<0,002	5,4±0,7 p1<0,001
Акінезис (нерухомі)	5,7±0,4	20,7±2,9 p1<0,001	6,9±0,5 p2<0,001

Так, за цих умов збільшується відсоток сперматозоїдів із швидким поступальним рухом (50 мкм/с) (нормокінезія, категорія А) – до (67,1±6,8)%, що на 52,5% (p<0,02) перевищує результат четвертої групи.

Зменшується число клітин з повільним поступальним рухом (гіпокінезія, категорія В) – до (20,6±1,8)% та нерухомих сперматозоїдів (акінезія, категорія D) – до (6,9±0,5)%, що відповідно на 27,5% (p<0,01) та 66,7% (p<0,001) поступається даним четвертої групи.

Порівняльна характеристика показників кінезіограми при введенні мелатоніну за умов експерименту наведено на рис. 5.6.

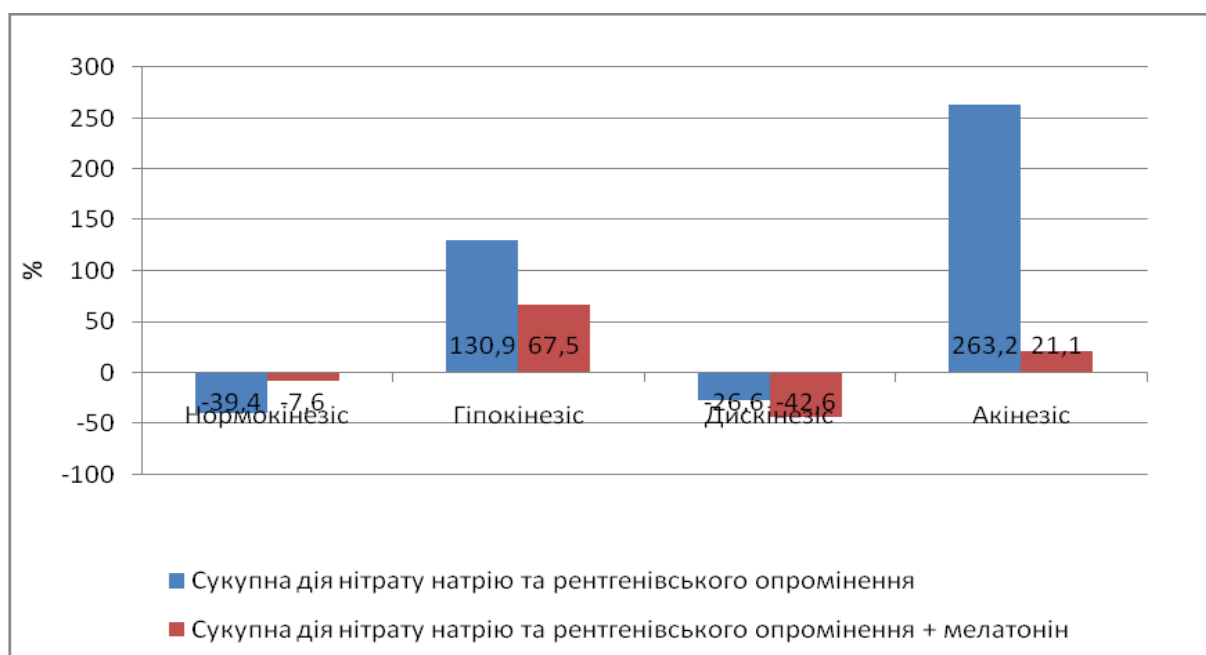


Рис. 5.6. Показники кінезіограми при введенні мелатоніну за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у %).

Таким чином, введення мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг маси тіла протягом 30 діб за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників істотно впливає на рухливість сперматозоїдів білих щурів, що відбивається у збільшенні клітин із швидким поступальним рухом (нормокінезія, категорія А) та зменшенні сперматозоїдів з повільним поступальним рухом (гіпокінезія, категорія В) та нерухомих (акінезія, категорія D).

Матеріали цього розділу оприлюдненні в статтях і тезах:

1. Шаталин Б.О. Влияние мелатонина на окислительный метаболизм семенников на фоне действия нитратной интоксикации и рентгеновского облучения / Б.О. Шаталин, В.А. Костенко // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. – №3 (47). – С. 42-44.

2. Шаталин Б.О. Коррекция мелатонином изменений прооксидантно-антиоксидантной системы семенников, вызванных нитратами и рентгеновским облучением / Б.О. Шаталин // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье : VII Всерос. мед.-биол. конф. молодых исследователей (с международным участием) : тезисы. – СПб. : Изд-во СПбГУ, 2014. – С. 509-510. [Фундам. наука клин. мед. - 2014. - Т. 13. - С. 182-183].

РОЗДІЛ 6

ВПЛИВ ІНГІБІТОРА АКТИВАЦІЇ NF-κB НА ОКИСНЮВАЛЬНИЙ МЕТАБОЛІЗМ В СІМ'ЯНИКАХ І СПЕРМИ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН СПЕРМИ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СУКУПНОЇ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

6.1. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на утворення активних форм кисню та азоту в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Транскрипційний нуклеарний фактор κB (NF-κB) є родиною, що складається з п'яти білків: NF-κB1 (або p50), NF-κB2 (або p52), RelA (або p65), RelB і c-Rel, що утворюють 15 комбінацій димерів [181, 222, 257]. Для всіх білків родини притаманна наявність домена гомології Rel, який забезпечує утворення білкових димерів, зв'язування NF-κB з ДНК і з цитозольним інгібіторним білком IκB. Фактор NF-κB проявляє активність тільки в димерній формі. Найбільш розповсюдженими у тканинах сім'яників компонентами є субодиниці p50 та p65 [159]. У цитоплазмі клітини NF-κB знаходиться в неактивному стані в комплексі з IκB. Стимулюючі агенти (агоністи рецепторів RANK, IL-1R, TNFR та ін., іонізуюча радіація, ультрафіолетове опромінення, АФК, АФН, форболові ефіри, мікроорганізми та продукти їхньої життєдіяльності, гормони, цитокіни, фактори росту, циклічні нуклеотиди тощо) призводять до того, що IκB фосфорилюється під дією кінази IKK (IκB-кіназа), що призводить до деградації IκB унаслідок дії протеасоми 26S [181, 222, 257]. При цьому NF-κB вивільняється від інгібувального

комплексу, транслокується в ядро й активує транскрипцію підконтрольованих генів, число яких, за різними джерелами, складає від 150 до 300 [250, 257].

Серед NF-κB-залежних прозапальних, про- та антиоксидантних і проліферативних білків слід зазначити iNOS, інтерлейкіни 1β, -6, -8, TNF-α, MCP-1, інтерферон-γ, циклооксигеназу-2, СОД і церулоплазмін, молекули клітинної адгезії (ICAM-1, VCAM, ELAM-1, E-селектин), циклін-D1, bcl-2, bcl-xL, p53 та ін. [200, 222, 257].

Як інгібітор активації NF-κB ми використовували 4-метил-N-(3-фенілпропіл)бензол-1,2-діамін (JSH-23), який порушує процес транслокації NF-κB у ядро клітини [199].

Введення JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію суттєво обмежує генерацію САР у тканинах сім'яників (таблиця 6.1) НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ до $17,1 \pm 1,1$ нмоль/г×с, що поступається на 35,0% ($p < 0,001$) даним четвертої серії.

Таблиця 6.1

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на утворення супероксидного аніон-радикала у тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення, нмоль/г×с
($M \pm m$, n=21)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
1	2	3	4
Продукція САР мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	$18,6 \pm 1,2$	$26,3 \pm 1,2$ $p1 < 0,002$	$17,1 \pm 1,1$ $p2 < 0,001$

Продовження таблиці 6.1

1	2	3	4
Продукція САР мікросомальним ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	16,7 ±1,3	10,2±0,9 p1<0,002	13,4±1,2

Примітки (у табл. 6.1-6.11):

p1 – ймовірність похибки у порівнянні з даними першої серії (інтактні щури);

p2 – ймовірність похибки у порівнянні з даними четвертої серії.

При цьому призначення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов поєданого впливу радіаційного та токсичного чинників суттєво не позначається на генерації САР НАДФН-залежними ЕТЛ у тканинах сім'яників.

Застосування JSH-23 за умов експерименту збільшує активність ЦХО - до 1,16±0,08 од. акт., що на 103,5% (p<0,001) перевищує результат четвертої серії (таблиця 6.2).

Таблиця 6.2.

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на активність цитохромоксидази у тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=21)

Назва ферменту	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
ЦХО, од. акт.	1,43±0,12	0,57±0,07 p1<0,05	1,16±0,08 p2<0,001

Введення JSH-23 за умов рентгенівського опромінення щурів під час 30-денного введення нітрату натрію зменшує сумарну активність NOS у тканинах сім'яників – до $5,29 \pm 0,22$ мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв.}$, що на 26,5% ($p < 0,001$) поступається даним четвертої групи (таблиця 6.3).

Таблиця 6.3

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на утворення метаболітів системи оксиду азоту в тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення
($M \pm m, n=21$)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
1	2	3	4
NOS, мкмоль $\text{NO}_2^-/\text{г} \cdot \text{хв.}$	$4,71 \pm 0,15$	$7,20 \pm 0,26$ $p1 < 0,001$	$5,29 \pm 0,22$ $p2 < 0,001$
Вміст NO_2^- , мкмоль/г	$0,14 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,01$ $p1 < 0,001$	$0,24 \pm 0,02$ $p1 < 0,01$ $p2 < 0,001$
Пероксинітрит, мкмоль/г	$0,68 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,04$ $p1 < 0,001$	$0,86 \pm 0,05$ $p1 < 0,01$ $p2 < 0,001$

Відомо, що NF-κB контролює експресію iNOS [263].

За наведених вище умов концентрація нітрит-йонів також знижується - до $0,24 \pm 0,02$ мкмоль/г, що на 36,8% ($p < 0,001$) поступається даним четвертої групи. Вміст пероксинітритру в тканинах сім'яників

зменшується до $0,86 \pm 0,05$ мкмоль/г, що на 29,5% ($p < 0,001$) поступається результату четвертої серії.

Порівняльна характеристика змін активності NOS, генерації CAP і пероксинітриту в сім'яниках щурів при введенні інгібітора активації NF- κ B JSH-23 за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 6.1.

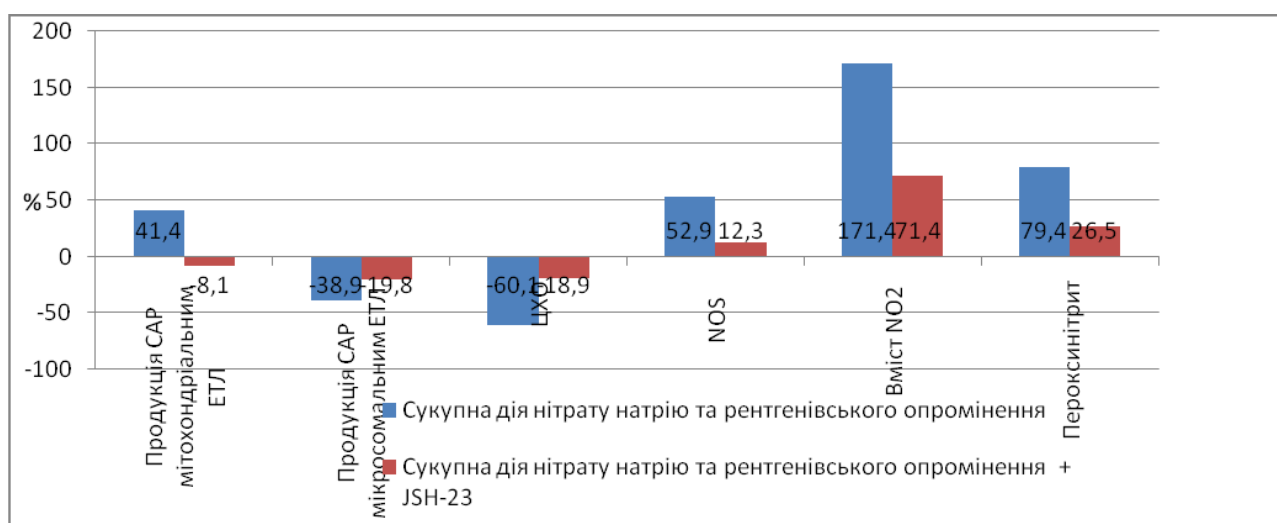


Рис. 6.1. Зміни продукції активності NOS, генерації CAP і пероксинітриту в сім'яниках щурів при введенні інгібітора активації NF- κ B JSH-23 за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином, введення інгібітора активації NF- κ B JSH-23 за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує у тканинах сім'яників генерацію супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій, підвищує в них активність цитохромоксидази, зменшує сумарну активність NO-синтаз, концентрацію нітрит-йонів і пероксинітриту.

6.2. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на процеси пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантний захист в сім'яниках білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію зменшує концентрацію ТБК-реактантів до та після інкубації гомогенату сім'яників (таблиця 6.4) – відповідно до $25,4 \pm 2,2$ мкмоль/кг та $27,5 \pm 1,8$ мкмоль/кг, що поступається на 48,5% ($p < 0,001$) та 55,4% ($p < 0,001$) даним четвертої серії.

Таблиця 6.4.

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на концентрацію ТБК-реактантів за умов інкубації гомогенату сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення
($M \pm m$, $n=21$)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
ТБК-реактанти до інкубації, мкмоль/кг	$19,3 \pm 2,2$	$49,3 \pm 2,7$ $p1 < 0,001$	$25,4 \pm 2,2$ $p2 < 0,001$
ТБК-реактанти після інкубації, мкмоль/кг	$23,2 \pm 3,2$	$61,7 \pm 4,4$ $p1 < 0,001$	$27,5 \pm 1,8$ $p2 < 0,001$
Приріст ТБК-реактантів, мкмоль/кг	$3,9 \pm 1,7$	$12,4 \pm 3,0$ $p1 < 0,05$	$2,1 \pm 0,8$ $p2 < 0,05$

Приріст ТБК-активних сполук за час 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині зменшується до $2,1 \pm 0,8$

мкмоль/кг, що поступається на 83,1% ($p < 0,05$) даним четвертої серії та свідчить про збільшення антиоксидантного потенціалу

На покращення АО системи при застосуванні інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов експерименту вказує також збільшення активності АО ферментів (таблиця 6.5). Так, активність СОД підвищується до $4,5 \pm 0,2$ од. акт., що на 73,1% ($p < 0,001$) перевищує величину четвертої серії.

Таблиця 6.5

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на активність антиоксидантних ферментів у тканинах сім'яників білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=21$)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
СОД, од. акт.	$3,8 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,1$ $p1 < 0,002$	$4,5 \pm 0,2$ $p2 < 0,001$
ГSH-пероксидаза, од. акт	$82,9 \pm 7,4$	$65,1 \pm 5,6$	$76,4 \pm 5,3$
Каталаза, од. акт.	$0,95 \pm 0,06$	$0,52 \pm 0,07$ $p1 < 0,002$	$0,84 \pm 0,09$ $p2 < 0,02$

Активність каталази підвищується до $0,84 \pm 0,09$ од. акт., що на 61,5% ($p < 0,02$) перевищує величину четвертої серії.

Проте активність ГSH-пероксидаза не виявляє суттєвих змін.

Порівняльна характеристика змін показників ПОЛ та АО в сім'яниках щурів при введенні інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 6.2.

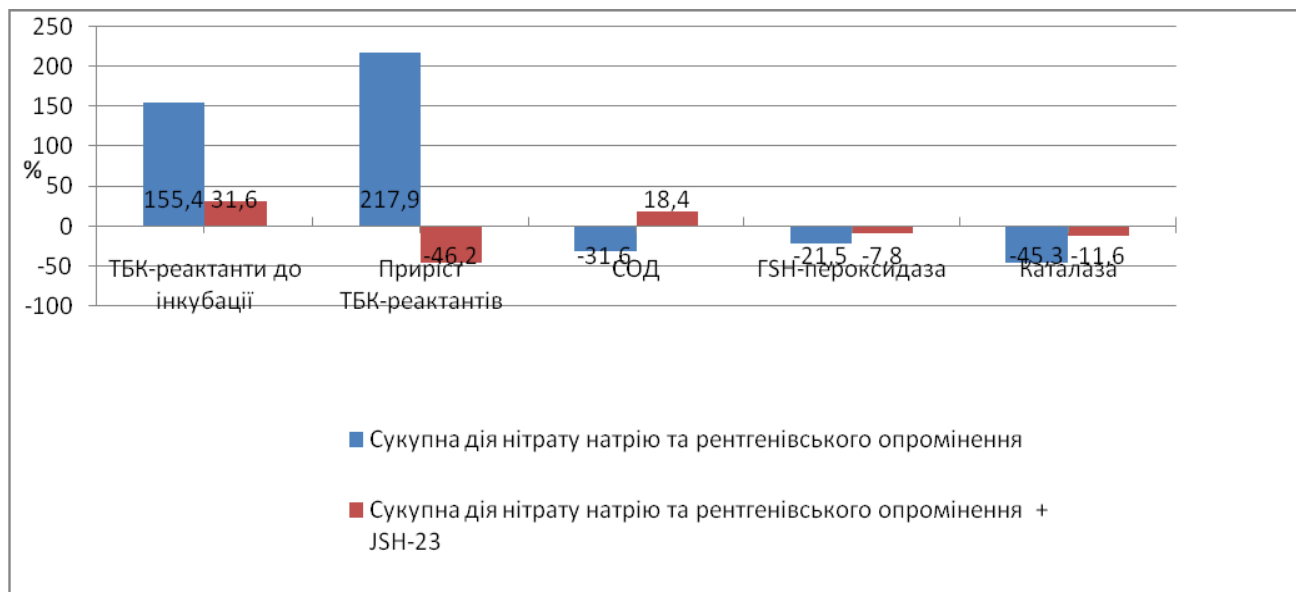


Рис. 6.2. Зміни показників ПОЛ та АО в сім'яниках щурів при введенні інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином, введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує пероксидне окиснення ліпідів у тканинах сім'яників, підвищує в них антиоксидантний потенціал, активність антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази та каталази.

6.3. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на окиснювальний метаболізм в сперматозоїдах білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Введення JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію обмежує у спермі генерацію CAP

мітохондріальним (при стимуляції НАДН) і НАДФН-залежними ЕТЛ (НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎) - при стимуляції НАДФН) – відповідно до 4,4±0,5 пмоль/с×10⁶, та 4,4±0,2 пмоль/с×10⁶ (таблиця 6.6), що на 52,2% (p<0,001) та на 50,6% (p<0,001) поступається даним четвертої серії.

Таблиця 6.6

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на утворення супероксидного аніон-радикала у спермі щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення, пмоль/с×10⁶ (M±m, n=21)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
Продукція САР мітохондріальним ЕТЛ (стимуляція НАДН)	4,8±0,2	9,2±0,6 p1<0,001	4,4±0,5 p2<0,001
Продукція САР НАДФН-цитохром P ₄₅₀ і НАДФН-цитохром B ₂₄₅₍₅₅₈₎ ЕТЛ (стимуляція НАДФН)	4,3±0,2	8,9±0,6 p1<0,001	4,4±0,2 p2<0,001

Застосування JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію зменшує у сперматозоїдах сумарну активність NOS (таблиця 6.7) – до 9,7±1,0 нмоль/хв×10⁶, що на 53,1% (p<0,001) поступається даним четвертої серії.

Таблиця 6.7

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на активність NOS у спермі щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=21)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
NOS, нмоль/хв×10 ⁶	6,2±0,2	20,7±1,6 p1<0,001	9,7±1,0 p1<0,001 p2<0,001

Введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію знижує концентрацію ТБК-активних сполук – до 82,3±7,3 пмоль/л ×10⁶, що на 42,6% (p<0,001) поступається даним четвертої серії (таблиця 6.8).

Таблиця 6.8

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на концентрацію ТБК-реактантів у спермі щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=21)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
ТБК-реактанти, пмоль/л ×10 ⁶	70,2±6,2	143,3±9,6 p1<0,001	82,3±7,3 p2 <0,001

Порівняльна характеристика змін показників генерації CAP, сумарної активності NOS та утворення ТБК-активних сполук в сперматозоїдах щурів при введенні інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов експерименту (у % від даних інтактною групи тварин) наведено на рис. 6.3.

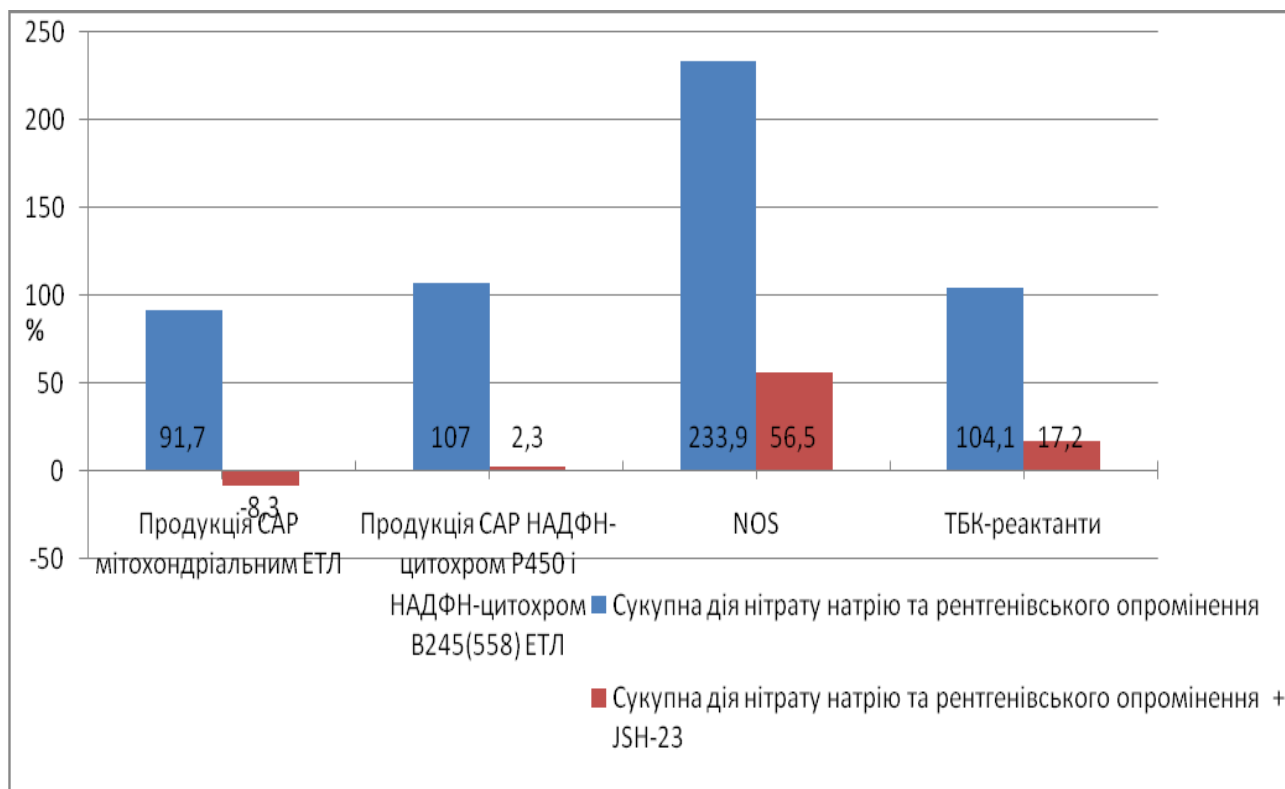


Рис. 6.3. Зміни показників продукції CAP, сумарної активності NOS та утворення ТБК-активних сполук в сперматозоїдах щурів при введенні інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином, введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує генерацію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним і НАДФН-цитохром Р₄₅₀ і НАДФН-цитохром В₂₄₅₍₅₅₈₎-залежними електронно-транспортними ланцюгами сперматозоїдів щурів, зменшує сумарну активність NO-синтаз та утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів.

6.4. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на кількісні та якісні показники сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію суттєво не впливає на середнє число сперматозоїдів у порівнянні з даними четвертої серії (таблиця 6.9).

Таблиця 6.9

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на кількісні показники сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (M±m, n=21)

Показники	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
Середнє число сперматозоїдів, $\times 10^6$	48,4±3,1	31,4± 4,1 p1<0,01	41,3 ±2,5
Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів, %	10,5±0,22	45,5±0,62 p1<0,001	24,5±1,34 p1<0,001 p2<0,001
Кількість патологічних форм сперматозоїдів, %	15,5±0,94	50,0±3,22 p1<0,001	25,0±1,89 p1<0,001 p2 <0,001

Проте за цих умов істотно зменшується кількість нежиттєздатних сперматозоїдів - до (24,5±1,34)%, що на 46,2% (p<0,001) поступається даним четвертої серії.

Число патологічних форм сперматозоїдів за цих умов знижується - до $(25,0 \pm 1,89)\%$, що на $50,0$ ($p < 0,001$) поступається величині четвертої групи.

Серед патологічних форм сперматозоїдів, які утворюються за цих умов, достовірно зменшується відсоток сперматозоїдів з аномаліями голівки – до $(64,0 \pm 5,55)\%$, що на $25,6\%$ ($p < 0,01$) поступається даним четвертої серії.

Відповідно збільшився відсоток клітин з аномаліями шийки та середньої частини (набухання та зморщування), та хвоста (відсутність, подвоєння), нерозділених сперматозоїдів у порівнянні з даними четвертої серії (таблиця 6.10).

Таблиця 6.10

Вплив інгібітора активації NF-кВ JSH-23 на розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=21$)

Морфологічні ознаки патологічних форм сперматозоїдів, %	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
1	2	3	4
Аномалії голівки	$58,06 \pm 2,44$	$86,00 \pm 4,18$ $p1 < 0,001$	$64,0 \pm 5,55$ $p2 < 0,01$
Аномалії шийки та тіла	$16,13 \pm 1,30$	$4,00 \pm 0,29$ $p1 < 0,001$	$12,00 \pm 0,99$ $p1 < 0,05$ $p2 < 0,001$
Аномалії хвоста	$16,13 \pm 1,60$	$3,00 \pm 0,45$ $p1 < 0,001$	$10,00 \pm 0,99$ $p1 < 0,01$ $p2 < 0,001$

Продовження таблиці 6.10

1	2	3	4
Нерозділені сперматозоїди	6,45±1,60	1,00±0,29 p1<0,01	6,0±0,57 p2<0,001
Змішана патологія	3,23±0,92	6,00±0,49 p1<0,02	8,0±1,2 p1<0,01

Порівняльна характеристика кількісних і якісних змін сперми білих щурів, а також розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками при введенні інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов експерименту (у % від даних інтактної групи тварин) наведено на рис. 6.4 та 6.5.

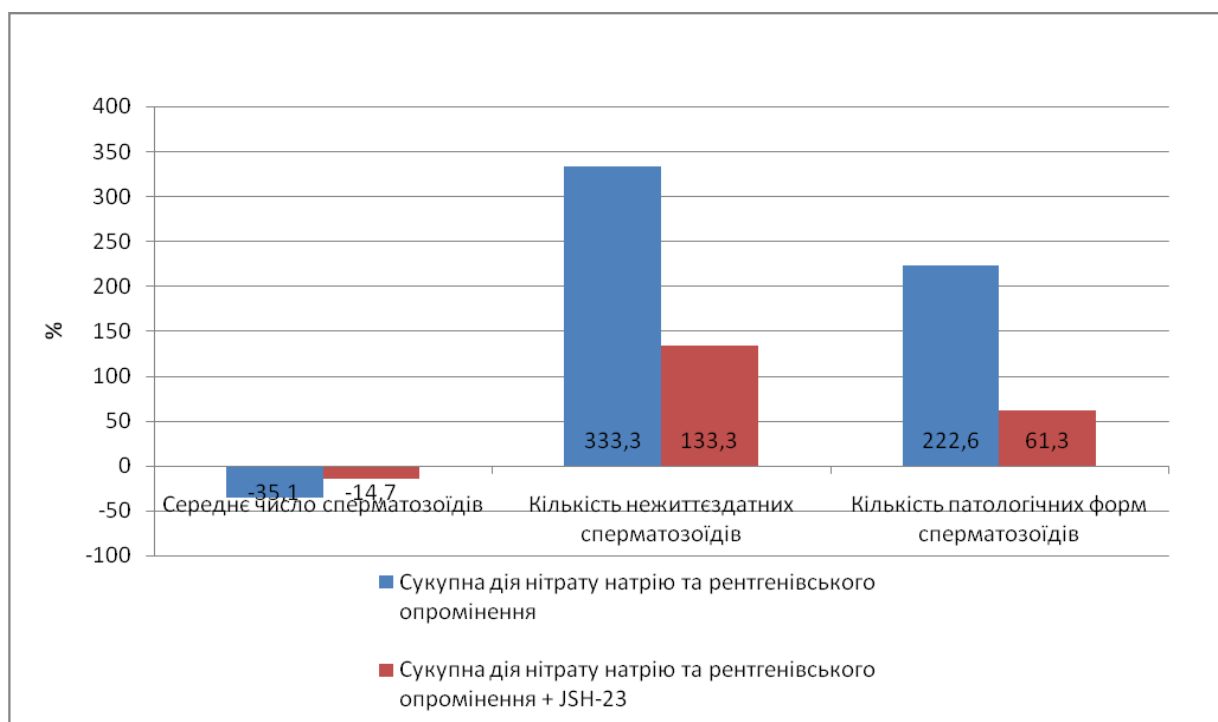


Рис. 6.4. Зміни кількісних і якісних показників сперми білих щурів при введенні інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

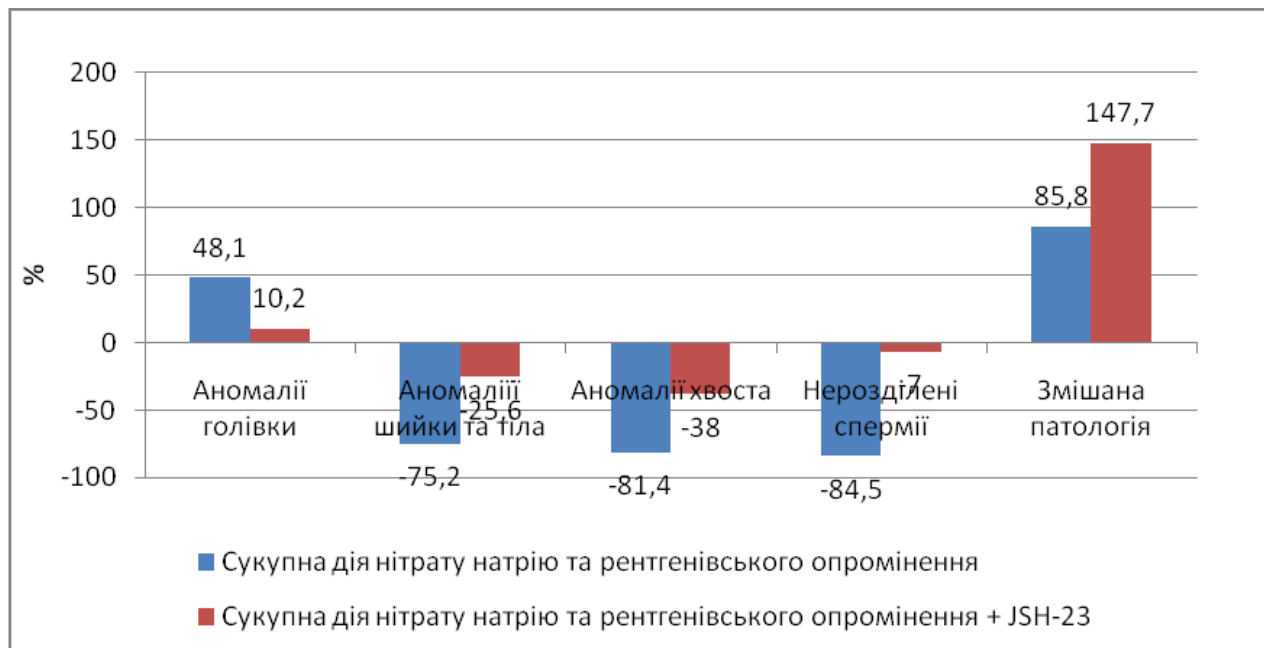


Рис. 6.5. Розподіл патологічних форм сперматозоїдів за морфологічними ознаками при введенні інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у % від даних інтактної групи тварин).

Таким чином, введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників істотно впливає на кількісні та якісні показники сперми білих щурів, що відбивається у зменшенні відсотка нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм (з аномаліями голівки).

6.5. Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на показники рухливості сперматозоїдів білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення

Введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію суттєво впливає на показники кінезіограми (таблиця 6.11).

Таблиця 6.11

Вплив інгібітора активації NF-κB JSH-23 на показники кінезіограми за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення ($M \pm m$, $n=21$)

Показники кінезіограми, %	Інтактні тварини	Введення нітрату натрію + рентгенівське опромінення	
		Контроль	+ JSH-23
Нормокінезис	72,6 \pm 4,2	44,0 \pm 4,9 $p_1 < 0,001$	70,6 \pm 6,5 $p_2 < 0,01$
Гіпокінезис	12,3 \pm 0,8	28,4 \pm 1,8 $p_1 < 0,001$	12,4 \pm 1,3 $p_2 < 0,001$
Дискінезис	9,4 \pm 0,5	6,9 \pm 0,4 $p_1 < 0,002$	9,7 \pm 0,8 $p_2 < 0,01$
Акінезис (нерухомі)	5,7 \pm 0,4	20,7 \pm 2,9 $p_1 < 0,001$	7,3 \pm 0,7 $p_2 < 0,001$

Так, за наведених умов збільшується відсоток сперматозоїдів із швидким поступальним рухом (нормокінезія, категорія А) – до (70,6 \pm 6,5)%, що на 60,5% ($p < 0,01$) перевищує результат четвертої групи.

Зменшується число клітин з повільним поступальним рухом (гіпокінезія, категорія В) – до (12,4 \pm 1,3)% та нерухомих сперматозоїдів (акінезія, категорія D) – до (7,3 \pm 0,7)%, що відповідно на 56,3% ($p < 0,001$) та 64,7% ($p < 0,001$) поступається даним четвертої серії.

Число сперматозоїдів з коливальним невпорядкованим рухом (дискінезія, категорія С) – збільшується до (9,7 \pm 0,8)%, що на 40,6%

($p < 0,01$) перевищує результат четвертої групи, але достовірно не відрізняється від величини інтактних тварин.

Порівняльна характеристика показників кінезіограми при введенні інгібітора активації NF- κ B JSH-23 за умов експерименту наведено на рис. 6.6.

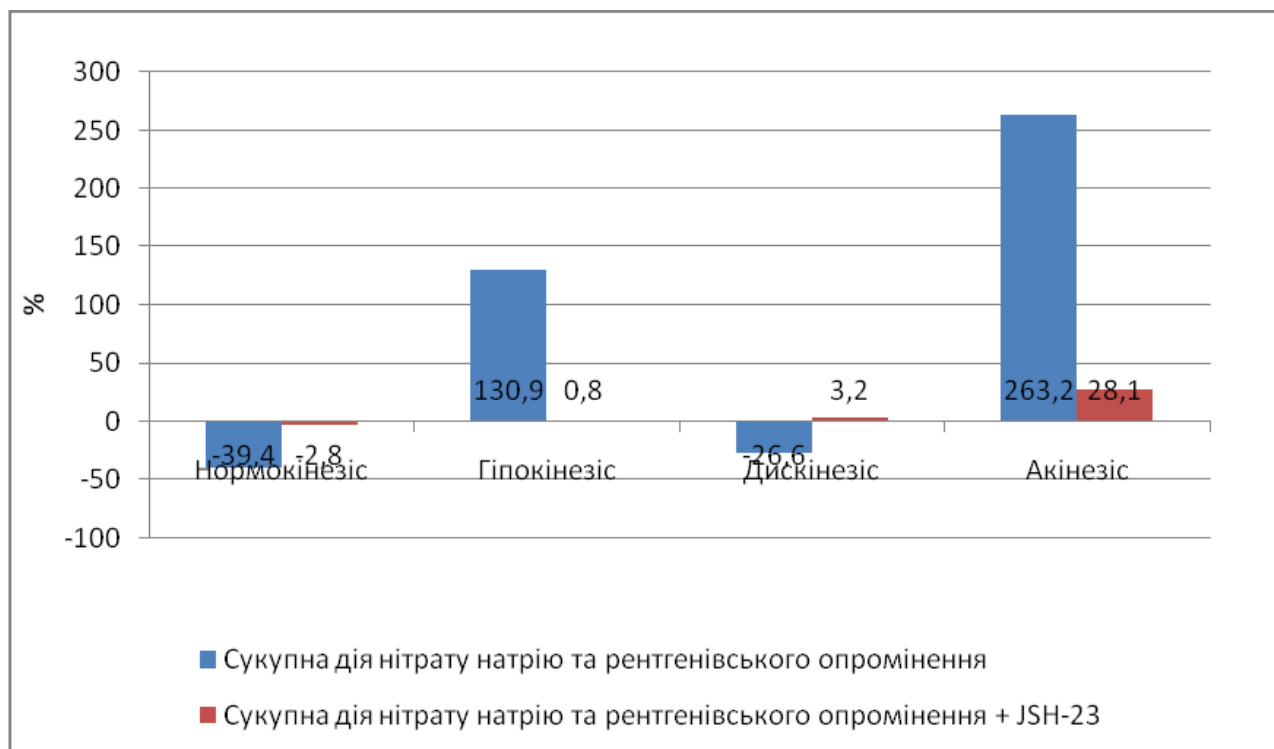


Рис. 6.6. Показники кінезіограми при введенні інгібітора активації NF- κ B JSH-23 за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення (у %).

Таким чином, введення інгібітора активації NF- κ B JSH-23 за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр) та токсичного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників істотно впливає на рухливість сперматозоїдів білих щурів, що відбивається у збільшенні клітин із швидким поступальним рухом (нормокінезія, категорія А), а також сперматозоїдів з коливальним невпорядкованим рухом (дискінезія, категорія С), зменшенні клітин з

повільним поступальним рухом (гіпокінезія, категорія В) та нерухомих сперматозоїдів (акінезія, категорія D).

Матеріали цього розділу оприлюдненні в статтях і тезах:

1. Шаталін Б.О. Вплив інгібітора активації ядерного фактора κВ на функціональний стан сперми щурів за умов поєднаної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення / Б.О. Шаталін, В.О. Костенко // Світ мед. та біол. – 2016. – №3. – С. 158-161.

2. Шаталін Б.О. Вплив інгібітора активації ядерного фактора κВ на окисний метаболізм у сім'яниках щурів за умов поєднаної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення / Б.О. Шаталін, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2016. – Т.16, №4 (ч. 3). – С.

3. NF-κB-опосередковані ефекти NO-синтаз у патогенезі метаболічних розладів при надлишковому утворенні оксиду азоту / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, Т.Г. Діхтенко, О.А. Левченко, Л.І. Ляшенко, Б.В. Сорокін, О.А. Стасюк, Б.О. Шаталін / Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів : мат. наук.-практ. конф. (Тернопіль, 10–11 листопада 2011 р.) // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2012. – №1. – С. 186–187.

4. Роль NF-κB-опосередкованих ефектов NO в механізмах метаболіческих расстройств при избыточном образовании оксида азота / Н.В. Соловьева, Л.И. Ляшенко, В.В. Талаш, А.Н. Елинская, Б.О. Шаталин // Актуальные проблемы патофизиологии: XVIII межгор. конф. мол. ученых. – СПб., 2012. – С. 114–116.

5. NF-κB- та NO-залежні механізми метаболічних розладів при надмірному утворенні в організмі оксиду азоту / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, Л.І. Ляшенко, В.В. Талаш, А.М. Єлінська, Б.В. Сорокін, Д.О. Хміль, Б.О. Шаталін // VI конгрес патофізіологів України : мат. // Таврический медико-биол. вестн. – 2012. – Т.15, №3. – Ч.2. - С.342-343.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведені дослідження показали, що 30-денна інтоксикація нітратом натрію супроводжується суттєвими порушеннями окисного метаболізму в тканинах сім'яників щурів.

Перш за все, спостерігається збільшення продукції АФК, зокрема, супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій при зменшенні його генерації НАДФН-залежним (мікросомальним) ЕТЛ.

На розлади мітохондріального ЕТЛ вказує також зниженням активності термінального ферменту останнього – цитохромоксидази.

Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників. Так, раніше було показано, що через 1 місяць від початку введення білим щурам токсичної дози нітрату натрію порушується ресинтез макроергів у тканинах сім'яників щурів, що виявляється у зниженні концентрації АТФ і енергетичного потенціалу, зростанням вмісту неорганічного фосфату [29, 32]. При проведенні полярографічного дослідження за цих умов зменшується швидкість фосфорилуючого дихання (в метаболічному стані мітохондрій 3 за Чансом) та зниженням дихального контролю, що свідчить про роз'єднання процесів тканинного дихання і фосфорилування АДФ [30].

На кафедрі патофізіології Вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія” було виявлено, що після 30-денного введення нітрату натрію в дозі 200 мг/кг у ліофільно висушених зразках сім'яників зростає сигнал ЕПР (фактор $g=2,007$), який реєструється при взаємодії оксиду азоту з гемовим і негемовим залізом [47]. При цьому спостерігається зворотна кореляційна залежність між рівнем залізонітрозильних комплексів і

величинами швидкості фосфорилуючого дихання і дихального контролю, що підтверджує безпосередню участь NO в пригніченні дихального ланцюга і роз'єднанні процесів мітохондріального окислення і фосфорилування [29].

За нашими даними, введення нітрату натрію протягом 30 діб істотно не позначається на сумарній активності NOS у тканинах сім'яників. Проте концентрація нітрит-йонів збільшується, що вказує на перебіг у організмі щурів нітратредуктазних реакцій. Одночасне підвищення рівня NO та супероксидного аніон-радикала спричиняє передумови для утворення високотоксичного пероксинітриту [153, 233], вміст якого в тканинах сім'яників, за нашими даними, дійсно підвищується.

Наявність потужних прооксидантних чинників (CAR, пероксинітрит) закономірно призводить до активації ПОЛ. Так, за нашими даними, на 30 добу інтоксикації нітратом натрію спостерігається підвищення концентрації ТБК-реактантів у гомогенаті сім'яників. Проте приріст цих сполук за час інкубації суттєво не відрізняється від даних інтактної групи, що свідчить про компенсований характер ПОЛ. Цей висновок підтверджує також підвищення активності АО ферменту СОД. У той же час активність каталази зменшується, а активність GSH-пероксидаза – істотно не змінюється.

Відомо, що синтез СОД індукується субстратом [75], вироблення якого, згідно з нашими даними, суттєво збільшується.

Порушення окисних процесів при 30-денному нітратному навантаженні виявляється не тільки у тканинах сім'яників, але і у спермі щурів. За цих умов генерація CAR мітохондріальним ЕТЛ (при стимуляції НАДН) і НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎ ЕТЛ (при стимуляції НАДФН), а також утворення ТБК-реактантів істотно збільшується.

Наслідком ізольованого 30-денного введення нітрату натрію є зменшення середнього числа сперматозоїдів, збільшення кількості нежиттєздатних та патологічних форм сперматозоїдів. Серед патологічних форм сперматозоїдів, які утворюються за цих умов, спостерігається переважання клітин зі змінами голівки (набухання, зморщування, мікро- та макроголівки, вакуолізація акросоми тощо), а також змішаними дефектами, що відповідає даним літератури [34].

Розвиток тяжких порушень окисного метаболізму в тканинах сім'яників і у спермі є закономірним наслідком дії середніх доз іонізуючої радіації [112]. Наші результати також підтверджують збільшення у тканинах сім'яників щурів за умов фракційного рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр продукції супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій, зниження активності цитохромоксидази, збільшення сумарної активності NO-синтаз, концентрації нітрит-йонів і пероксинітриту, наслідком чого є декомпенсоване пероксидне окиснення ліпідів.

За цих умов виявляються також зміни показників окисного метаболізму в спермі щурів: гіперпродукція у сперматозоїдах супероксидного аніон-радикала мітохондріальним і НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎-залежними ЕТЛ, активація в них ПОЛ. Закономірно відмічаються характерні для окисного стресу зміни кількісних і якісних показників сперми [5, 12, 16, 97, 112]. Примітно, що 30-денна інтоксикація нітратом натрію та фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр супроводжується подібними змінами показників сперми, що відбивається у зменшенні середнього числа сперматозоїдів, підвищенні кількості нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм (з переважанням сперматозоїдів з аномаліями голівки та змішаними дефектами).

Фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію, за нашими даними, потенціює зменшення у тканинах сім'яників щурів активності цитохромоксидази та утворення пероксинітриту (незважаючи на меншу активність NOS, ніж за умов рентгенівського опромінення без призначення нітрату натрію). Останнє, вочевидь, пов'язано з переважним використанням NO у реакції утворення пероксинітриту, а не на реалізацію NO / цГМФ-сигнального шляху.

Наслідком цього може бути виявлене нами потенціювання за умов фракційного рентгенівського опромінення на тлі введення нітрату натрію розвитку у тканинах сім'яників щурів декомпенсованого пероксидного окиснення ліпідів з пригніченням антиоксидантних ферментів - супероксиддисмутази та каталази.

Відомою є здатність пероксинітриту пригнічувати НАДН-дегідрогеназу, сукцинатдегідрогеназу, цитохром с редуктазу ділянки дихального ланцюга, АТФ-синтазний комплекс, ушкоджувати FeS кластери [146, 229, 234]. Нітрування цією активною сполукою тирозинового залишку СОД, зміна валентності купруму активного центру останньої під час взаємодії з пероксинітритом значно зменшують АО активність цього ферменту [215, 272].

Примітно, що у сперматозоїдах фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію потенціює гіперпродукцію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним ЕТЛ, збільшує сумарну активність NOS та ПОЛ.

В останні роки показано, що у сперматозоїдах ссавців містяться усі ізоформи NOS (eNOS, nNOS, iNOS) [136, 207, 270]. Одночасне збільшення активності NOS, вироблення CAP та показників ПОЛ характерно для активації транскрипційного ядерного чинника κB [200, 222, 257], що потребувало з'ясування у ході нашого дослідження.

Результатом бінарної гонадотоксичної дії радіаційного та токсичного чинників є достовірне зниження (у порівнянні з їхньою ізольованою дією) середнього числа сперматозоїдів, підвищення кількості нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм, серед яких переважають сперматозоїди з аномаліями голівки. У порівнянні з групою тварин, що зазнавали ізольований вплив рентгенівських променів, збільшується відсоток клітин з аномаліями шийки та тіла ("скрученою" шийкою, набуханням або зморщуванням середньої частини) та хвоста (його відсутністю або подвоєнням).

Наведена в літературі дія мелатоніну дозволяє сподіватися на його ефективність як коректора окисного метаболізму та гонадопротектора при дії іонізуючої радіації та надлишковому надходженні в організм неорганічних нітросполук. У цьому плані на себе звертають увагу такі ефекти мелатоніну:

- 1) потужна пряма АО активність [54, 95, 214, 269];
- 2) непряма АО дія шляхом стимуляції синтезу АО ферментів (СОД, каталази, глутатіонпероксидази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, глутатіон-редуктази) [37, 112];
- 3) здатність зменшувати експресію гена іNOS [161, 165, 226].
- 4) здатність легко перетинати гематотестикулярний бар'єр [1];
- 5) синхронізація циркадних ритмів репродуктивної системи [3, 65].

Дійсно, за нашими даними, введення мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію обмежує генерацію САР у тканинах сім'яників НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ. При цьому збільшується активність термінального ферменту дихального ланцюга – ЦХО. Це, вочевидь, запобігає скиданню електронів на інших ділянках мітохондріального ЕТЛ з подальшим одно- та двохелектронним відновленням кисню та утворенням АФК [25].

Застосування мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію зменшує сумарну активність NOS у тканинах сім'яників, що узгоджується з даними літератури щодо здатності мелатоніну селективно пригнічувати iNOS [161, 165, 226].

За цих умов у тканинах сім'яників також зменшується концентрація нітрит-йонів та високотоксичного прооксиданту пероксинітриту. При цьому ми виявили закономірне зниження концентрації ТБК-реактивних речовин та їхнього приросту за час 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, що свідчить про підвищення антиоксидантного потенціалу.

Покращення АО системи при застосуванні мелатоніну за умов експерименту, за нашими даними, підтверджується також збільшенням активності АО ферментів (СОД, ГSH-пероксидази та каталази).

Введення мелатоніну за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію, згідно з отриманими нами результатами, суттєво впливає на показники окислювального метаболізму в сперматозоїдах білих щурів. Так, мелатонін обмежує у спермі генерацію САР мітохондріальним (при стимуляції НАДН) і НАДФН-залежними ЕТЛ (НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎ - при стимуляції НАДФН), зменшує у сперматозоїдах сумарну активність NOS, знижує концентрацію вторинних продуктів ПОЛ - ТБК-активних сполук.

При цьому, за нашими спостереженнями, зменшується відсоток нежиттєздатних сперматозоїдів та їх патологічних форм. Звертає на себе увагу відсутність сперматозоїдів зі складними дефектами (нерозділених, зі змішаними аномаліями).

Введення мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг маси тіла протягом 30 діб за умов сукупної дії радіаційного та токсичного чинників істотно впливає також на рухливість сперматозоїдів білих щурів, що є закономірним за

умов обмеження окисно-нітративного стресу та покращення біоенергетичних процесів у елементах гермінативного епітелію та сперматозоїдах [29, 112, 96]. Так, за нашими даними, збільшується кількість клітин із швидким поступальним рухом (нормокінезія, категорія А) та зменшується число сперматозоїдів з повільним поступальним рухом (гіпокінезія, категорія В) та нерухомих (акінезія, категорія D).

Нещодавно було підтверджено зв'язок між розвитком окисно-нітративного стресу та активацією нуклеарного фактора κВ [200, 222, 257]. Примітно, що дефіцит продукції мелатоніну викликає розлади окисного метаболізму через активацію NF-κВ та утворення пероксинітриду. Введення інгібітора ядерної транслокації NF-κВ JSH-23 та скевенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну обмежує у великих півкулях продукцію САР та рівень ПОЛ, підвищує антиоксидантний захист та енергетичний потенціал [105, 106].

За нашими даними, введення JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію суттєво обмежує генерацію САР у тканинах сім'яників НАДН-залежним (мітохондріальним) ЕТЛ. При цьому також збільшується активність ЦХО, що свідчить про оптимізацію переносу електронів по дихальному ланцюгу мітохондрій.

Введення JSH-23 за умов рентгенівського опромінення щурів під час 30-денного введення нітрату натрію зменшує також сумарну активність NOS у тканинах сім'яників. Відомо, що експресія гена іNOS контролюється NF-κВ [200, 222, 257].

Це створює передумови для виявленого нами зменшення концентрації нітрит-йонів і пероксинітриду.

Наслідком введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов сукупної дії радіаційного та токсичного чинників є обмеження ПОЛ у тканинах сім'яників, підвищення в них антиоксидантного потенціалу.

Введення JSH-23 за умов рентгенівського опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію, згідно з отриманими нами результатами, впливає також на показники окисного метаболізму в сперматозоїдах білих щурів. Так, спостерігається обмеження у спермі генерації САР мітохондріальним і НАДФН-залежними ЕТЛ (НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎), зменшення сумарної активності NO-синтаз та утворення вторинних продуктів ПОЛ.

При цьому, за нашими спостереженнями, зменшується відсоток нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм (з аномаліями голівки), підвищується рухливість сперматозоїдів: збільшується число клітин із швидким поступальним рухом (нормокінезія, категорія А), а також сперматозоїдів з коливальним невпорядкованим рухом (дискінезія, категорія С), зменшується кількість клітин з повільним поступальним рухом (гіпокінезія, категорія В) та нерухомих сперматозоїдів (акінезія, категорія D).

Очевидно, зміни рухливості можна пов'язати з порушенням енергетичного обміну та утворення макроергічних сполук у сперматозоїдах, активацією ПОЛ та пошкодженням мембран цих клітин за умов окисно-нітративного стресу, розвиток якого пов'язаний як з утворенням АФК внаслідок дії іонізуючої радіації, утворенням прооксидантних сполук при відновленні нітрат- та нітрит-йонів, активації NF-κB та iNOS, утворенні пероксинітриду тощо.

Клінічні дослідження також виявляють при чоловічій інфертильності наявність кореляційної залежності між інтенсивністю ПОЛ мембран сперматозоїдів та зниженням їхньої концентрації та

рухливості, збільшенням кількості патологічних форм і порушенням структури [19].

Схематично механізми ушкодження сім'яників і сперматозоїдів при поєднаній дії на організм рентгенівського опромінення та нітрату натрію за результатами нашого дослідження та даними літератури наведений на рисунку 7.1.

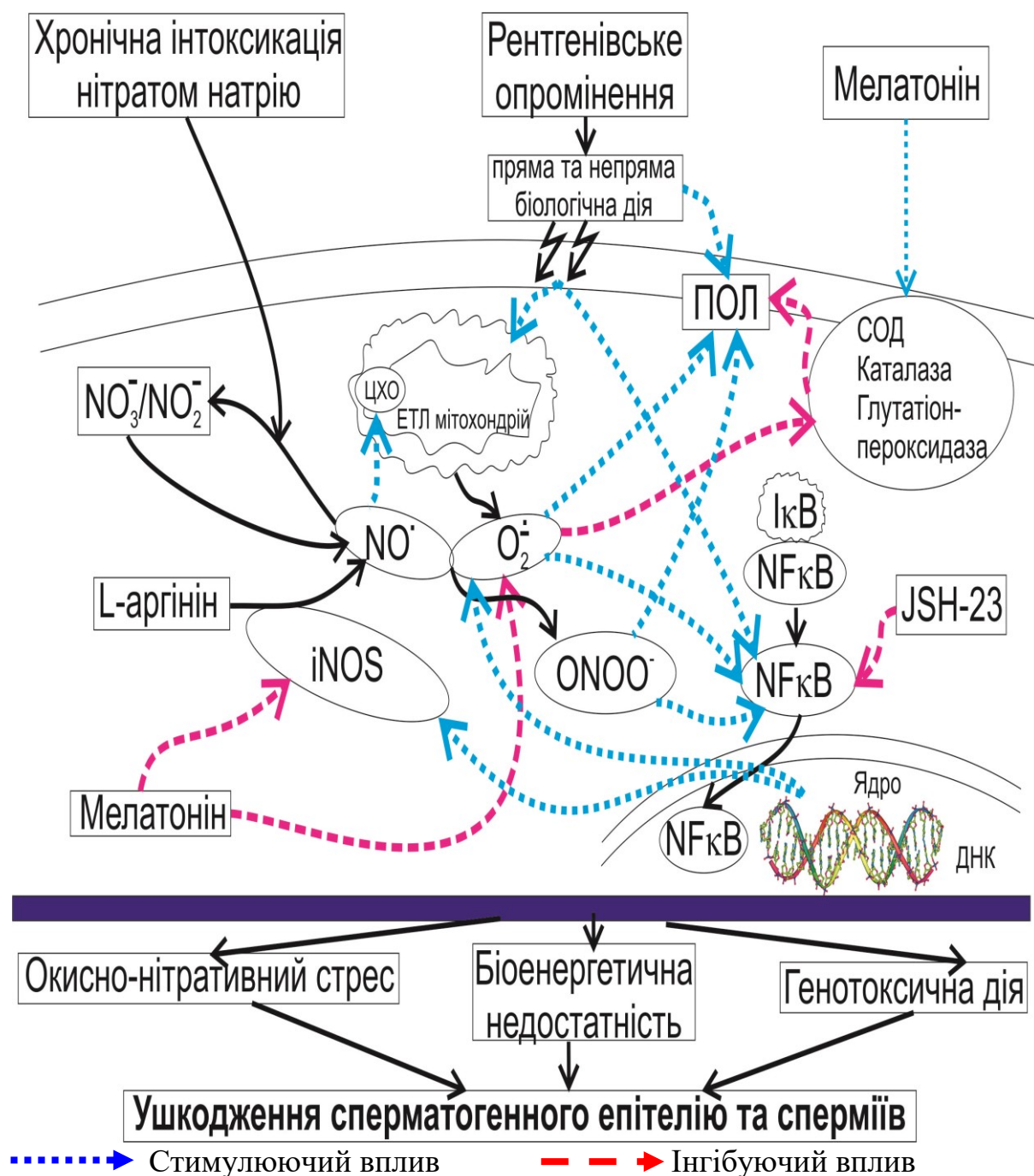


Рис. 7.1. Концептуальна схема механізмів ушкодження сім'яників і сперматозоїдів при поєднаній дії на організм рентгенівського опромінення та нітрату натрію

Таким чином, підбиваючи підсумки дослідження ролі активних форм кисню та азоту в механізмах ушкодження сім'яників і сперматозоїдів при поєднаній дії на організм рентгенівського опромінення та нітрату натрію нами виявлено здатність обох чинників, що досліджувалися, викликати гіперпродукцію у тканинах сім'яників супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій та пероксинітриду, що супроводжується прогресуючим зменшення активності цитохромоксидази, декомпенсованим пероксидним окисненням ліпідів та пригніченням антиоксидантних ферментів - супероксиддисмутази та каталази. Фракційне рентгенівське опромінення під час 30-денного введення нітрату натрію призводить до утворення активних форм кисню та азоту в сперматозоїдах щурів: потенціює гіперпродукцію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом, збільшує сумарну активність NO-синтази, що супроводжується активацією в спермі щурів пероксидного окиснення ліпідів та низкою її кількісних і якісних змін. Показана ефективність корекції наведених порушень окисних процесів у сім'яниках і спермі із застосуванням мелатоніну та інгібітора ядерної транслокації NF-κB - JSH-23.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведене теоретичне узагальнення і розв'язання наукової задачі, що полягає у з'ясуванні механізмів розвитку окисно-нітративного стресу у сім'яниках і сперматозоїдах та порушень функціонального стану останніх при поєднаній дії на організм рентгенівського опромінення та нітрату натрію.

1. 30-денна інтоксикація нітратом натрію та фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр виявляють спільні ланки патогенезу щодо надлишкової продукції у тканинах сім'яників щурів активних форм кисню й азоту - супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій (відповідно на 22,0%, $P < 0,02$, та на 30,6%, $p < 0,02$), нітрит-йонів (на 121,4%, $p < 0,001$, та на 28,6%, $p < 0,001$) і пероксинітриту (на 55,9%, $p < 0,001$, та на 44,1%, $p < 0,001$), що супроводжується метаболічними розладами - зниженням активності цитохромоксидази (на 53,1%, $p < 0,02$, та на 34,3%, $p < 0,05$), активацією пероксидного окиснення ліпідів.

2. 30-денна інтоксикація нітратом натрію та фракційне рентгенівське опромінення в сумарній дозі 0,24 Гр мають спільні закономірності у розвитку окисно-нітративного стресу в спермі щурів: гіперпродукцію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним (на 54,2%, $p < 0,001$) і НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎-залежними (на 58,1%, $p < 0,001$) електронно-транспортними ланцюгами сперматозоїдів, активацією в них пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжується подібними змінами кількісних і якісних показників сперми: зменшенням середнього числа сперматозоїдів (відповідно на 24,4%, $p < 0,05$, та на 28,3%, $p < 0,02$), підвищенням кількості нежиттєздатних клітин (на 214,3%, $p < 0,001$, та на 238,1%, $p < 0,001$), їх

патологічних форм (переважання сперматозоїдів з аномаліями голівки та змішаними дефектами), порушенням рухливості сперматозоїдів.

3. Поєднана дія радіаційного (фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр) та хімічного (30-денне введення нітрату натрію) чинників потенціює негативні ефекти у сім'яниках (утворення пероксинітриту, розвиток декомпенсованого пероксидного окиснення ліпідів, зменшує активність цитохромоксидази) та сперматозоїдах щурів (збільшує гіперпродукцію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом, сумарну активність NO-синтаз та пероксидне окиснення ліпідів).

4. Фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр під час 30-денного введення нітрату натрію супроводжується більш суттєвим (у порівнянні з ізольованою дією чинників) зниженням середнього числа сперматозоїдів, підвищенням кількості нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм (серед яких переважають сперматозоїди з аномаліями голівки), зменшенням активно-рухливих клітин з поступальним рухом (категорія А) та дискінетичних сперматозоїдів (категорія С) при прогресуючому підвищенні нерухомих сперматозоїдів (категорія D).

5. Введення мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг маси тіла протягом 30 діб за умов поєднаної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр) та хімічного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує генерацію супероксидного аніон-радикала у тканинах сім'яників дихальним ланцюгом мітохондрій (на 22,4%, $p < 0,01$), підвищує в них активність цитохромоксидази (на 147,4%, $p < 0,002$), зменшує сумарну активність NO-синтаз (на 45,7%, $p < 0,002$), концентрацію пероксинітриту (на 24,6%, $p < 0,01$), що супроводжується зменшенням утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням у них активності

антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (на 42,3%, $p < 0,01$), каталази (на 34,6%, $p < 0,002$), глутатіонпероксидази (на 35,8%, $p < 0,01$).

6. Введення мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг маси тіла протягом 30 діб за умов сукупної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр) та хімічного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує генерацію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним (на 22,8%, $p < 0,001$) і НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎-залежними (на 36,0%, $p < 0,01$) електронно-транспортними ланцюгами сперматозоїдів щурів, зменшує сумарну активність NO-синтаз (на 22,3%, $p < 0,02$) та утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів, що супроводжується зменшенням відсотка нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм, відсутністю сперматозоїдів зі складними дефектами (нерозділених, зі змішаними аномаліями), збільшенням клітин із швидким поступальним рухом.

7. Введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов поєднаної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі 0,24 Гр) та хімічного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує у тканинах сім'яників генерацію супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій (на 35,0%, $p < 0,001$), зменшує в них сумарну активність NO-синтаз (на 26,5%, $p < 0,001$), концентрацію пероксинітриду (на 29,5%, $p < 0,001$), підвищує активність цитохромоксидази (на 103,5%, $p < 0,001$), знижує концентрацію вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів – ТБК активних сполук (на 48,5%, $p < 0,001$), підвищує антиоксидантний потенціал та активність супероксиддисмутази (на 73,1%, $p < 0,001$) та каталази (на 61,5%, $p < 0,02$).

8. Введення інгібітора активації NF-κB JSH-23 за умов поєднаної дії радіаційного (фракційне рентгенівське опроміненні в сумарній дозі

0,24 Гр) та хімічного (30-денна інтоксикація нітратом натрію) чинників обмежує генерацію супероксидного аніон-радикала мітохондріальним (на 52,2%, $p < 0,001$) і НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎-залежними (на 50,6%, $p < 0,001$) електронно-транспортними ланцюгами сперматозоїдів щурів, зменшує сумарну активність NO-синтаз (на 53,1%, $p < 0,001$) та утворення вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів – ТБК активних сполук (на 42,6%, $p < 0,001$), знижує відсоток нежиттєздатних клітин та їх патологічних форм, збільшує число сперматозоїдів із швидким поступальним рухом.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Чоловікам репродуктивного віку, які зазнають надмірний ятрогенний або промисловий вплив рентгенівського опромінення та тривале надходження до організму неорганічних нітросполук, доцільно рекомендувати щорічне сперміологічне дослідження, що включає визначення кількості, функціонального стану та життєздатності сперматозоїдів, а також показників окисно-нітративного стресу сперматозоїдів (оцінка утворення АФК, пероксинітриту, продуктів пероксидного окиснення ліпідів).

2. Проведені дослідження дозволяють вважати за доцільне подальше вивчення впливу мелатоніну та інгібіторів активації NF- κ B як потенційних гонадопротекторів у чоловіків, які зазнають вплив іонізуючого опромінення та токсичних чинників.

3. На підставі проведених досліджень доцільно рекомендувати перегляд нормативної документації щодо встановлення рівня безпеки малих і середніх доз іонізуючого опромінення у залежності від поєднаної дії хімічних чинників.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абсатарова Ю.С. Мелатонин в репродукции человека / Ю.С. Абсатарова, Е.Н. Андреева, Е.В. Шереметьева, О.Р. Григорян // Пробл. репрод. – 2016. – №1. – С.8-11.
2. Адамчик Ж.Г. Об опасности лучевых повреждений семенников пациентов при лучевой терапии // Космическая биология и авиакосмическая медицина : тез. докл. – М., 1982. – Ч. 2. – С. 111–112.
3. Арушанян Э.Б. Мелатонин как лечебное средство: состояние вопроса сегодня и грядущие перспективы / Э.Б. Арушанян // Эксперим. и клин. фармакол. – 2014. – №6. – С.39-44.
4. Атлас морфологических форм сперматозоидов / [Н.П. Гончаров, А.Д. Добрачева, М.В. Корякин и др.] – М. : МИА, 2006. – 91 с.
5. Андрусишина І.М. Морфологічні та біохімічні зміни чоловічих гамет (сперматозоїдів) при поєднаній дії іонізуючого опромінення і важких металів (експериментальне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 14.02.01 “Гігієна” / І.М. Андрусишина. – К., 2002. – 19 с.
6. Байбаков В.М. Кореляційний аналіз патогенезу чоловічого безпліддя / В.М. Байбаков // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. - Т. 14, № 2. - С. 124-129.
7. Балтрунас Ю. Природна радіоактивність / Ю. Балтрунас, І. Даньків // Охорона праці. – 2001. – № 8. – С.49-50.
8. Барабой В.А. Перекисное окисление и радиация / В.А. Барабой, В.Э. Орел, И.М. Карнаух. – К. : Наукова думка, 1991. - 252 с.
9. Бариляк І.Р. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин / І.Р. Бариляк, Л.В. Неумержицька, Т.Ф. Бишовець, В.С. Даниленко // Доклінічні

дослідження лікарських засобів : [методичні рекомендації]; за ред. О.В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 139-152.

10. Брусов О.С. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина / О.С. Брусов, А.М. Герасимов, Л.Ф. Панченко // Бюл. эксперим. биол. мед. – 1976. – №1. – С.33-35.

11. Блюм Я.Б. Нітрування тирозину як регуляторна посттрансляційна модифікація протеїнів / Я.Б. Блюм, Ю.А. Красиленко, А.І. Ємець // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 5. – С. 5–15.

12. Божедомов В.А. Активные формы кислорода и репродуктивная функция мужчин: Фундаментальные и клинические аспекты / В.А. Божедомов, М.В. Торопцева, И.В. Ушакова, Е.А. Спориш, Н.А. Ловыгина, Н.А. Липатова // Андрология и генитальная хирургия. – 2011. – №3. – С.10-16.

13. Божедомов В.А. Причины оксидативного стресса сперматозоидов / В.А. Божедомов, Д.С. Громенко, И.В. Ушакова [и др.] // Пробл. репродукции. – 2008. – №6. – С. 67-73.

14. Бурлакова Е.В. Система окислительно-восстановительного гомеостаза при радиационно-индуцируемой нестабильности генома / Е.В. Бурлакова, В.Ф. Михайлов, В.К. Мазурик // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2001. - Т.41, №5. - С. 489-499.

15. Быкова М.В. Интенсивность перекисных процессов в сперматозоидах мужчин / М.В. Быкова, Е.В. Маркова, А.В. Светлаков [и др.] // Вестн. Красноярского гос. ун-та. Сер. Естественные науки. – 2005. – №5. – С.264-267.

16. Быкова М.В. Про-/антиоксидантный статус в сперматозоидах и семенной плазме мужчин при патоспермии / М.В. Быкова, Н.М. Титова, Е.В. Маркова [и др.] // Пробл. репродукции. – 2008. – №3. – С.63-67.

17. Верещако Г.Г. Влияние внешнего облучения и иммобилизационного стресса на репродуктивную систему крыс-самцов /

Г.Г. Верещако, Н.В. Чуешова, Г.А. Горох, И.Г. Козлов, А.Д. Наумов // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2016. – №1. – С.56-63.

18. Витязева И.И. Влияние ожирения на индекс фрагментации ДНК сперматозоидов и исходы программ ЭКО / И.И. Витязева, М.В. Алташина, Т.В. Мун, Е.А. Трошина // Проблемы эндокринологии. – 2015. – №5. – С.48-55.

19. Воробець Д.З. Кореляція між станом антиоксидантної системи та рухливістю сперматозоїдів при екскреторно-токсичній формі чоловічої неплідності / Д.З. Воробець // Медична хімія. – 2004. – № 3. – С. 58-61.

20. Воробець Д.З. Регуляція функціональної активності сперматозоїдів у чоловіків при олігозооспермії за участі глутатіонової антиоксидантної системи / Д.З. Воробець // Буковинський мед. вісн. – 2003. – Т. 7, № 1-2. – С. 19-21.

21. Воробьева Н.В. NADPH-оксидаза нейтрофилов и заболевания, связанные с ее дисфункцией / Н.В. Воробьева // Иммунология. – 2013. – №4. – С. 227-232.

22. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. з англ. / Стентон Гланц – М. : Практика, 1999. – 459 с.

23. Глодан О.Я. Гісто- та ультраструктурні зміни у звивистих сім'яних трубочках в умовах рентгенівського опромінення / О.Я. Глодан // Світ мед. та біол. – 2014. – №4. – С. 101-104.

24. Гофман Дж. Чернобыльская авария: Радиационные последствия для настоящего и будущего поколений. / Дж. Гофман – Минск: Выш. шк., 1994. – 574 с.

25. Гривенникова В. Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями / В.Г. Гривенникова, А.Д. Виноградов // Усп. биол. хим. – 2013. – Т 53. – С. 245-296.

26. Грицуляк В.Б. Ультраструктурні зміни в яечку в умовах рентгенівського опромінення / В.Б. Грицуляк, І.Й. Івасюк, А.М. Спаська, О.Я. Глодан // Вісн. Прикарпат. нац. ун-ту ім. Василя Стефаника. Сер. Біологія. - 2008. – Вип. XI. - С. 50-53.

27. Грицуляк Б.В. Характер структурних змін в яечку в умовах рентгенівського опромінення / Б.В. Грицуляк, О.Я. Глодан, Г.І. Пташник // Вісн. Прикарпат. нац. ун-ту ім. Василя Стефаника. Сер. Біологія. - 2008. – Вип. XI. - С. 42-44.

28. Громенко Д.С. Особенности патогенеза идиопатической патозооспермии при мужской инфертильности : автореф. дис. на соискание ученой степени доктора мед. наук : спец. 14.00.16 “Патологическая физиология” / Д.С. Громенко. – СПб., 2009. – 42 с.

29. Денисенко С.В. Зміни окиснювального метаболізму та сперматогенної функції сім'яників щурів при хронічній інтоксикації нітратом натрію : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.04 “Патологічна фізіологія” / С.В. Денисенко. – К., 2003. – 20 с.

30. Денисенко С.В. Изменения митохондриального окисления и фосфорилирования в семенниках белых крыс в условиях избыточного поступления в их организм нитрата натрия / С.В. Денисенко, В.А. Костенко // Укр. биохим. журн. – 2003. – Т.75, №1. – С.95-97.

31. Денисенко С.В. Изменения продукции активных форм кислорода в семенниках белых крыс в условиях хронической интоксикации нитратом натрия / С.В. Денисенко, В.А. Костенко // Совр. пробл. токсикол. – 2002. – №4. – С.44-46.

32. Денисенко С.В. Изменения содержания и соотношения адениннуклеотидов в семенниках белых крыс в условиях избыточного поступления в организм нитрата натрия / С.В. Денисенко // Актуальні

проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стоматол. акад. – 2002. – Т.2, №1. – С.16-17.

33. Денисенко С.В. Опосередкованість порушень ембріо- та фетогенезу нітратною інтоксикацією самців і коригувальний вплив мексидолу на ці процеси / С.В. Денисенко // Вісн. Сумськ. держ. ун-ту : Серія Медицина. – 2005. – №3(75). – С. 37–39.

34. Денисенко С.В. Особливості спермограми при хронічній інтоксикації нітратом натрію / С.В. Денисенко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2002. – №7-8. – С.38-41.

35. Денисенко С.В. Пошкодження сперматогенного епітелію сім'яників, зумовлені хронічною нітратною інтоксикацією / С.В. Денисенко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2002. – №6. – С.76-80.

36. Дмитренко Н.А. Вплив мелатоніну на функцію сім'яників щурів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.13 “Фізіологія людини і тварин” / Н.А. Дмитренко. – Сімферополь, 2009. – 20 с.

37. Дмитренко Н.А. Стан чоловічої статевої системи щурів при нестачі та надлишку мелатоніну / Н.А. Дмитренко, О.І. Цебржинський // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2011. – №4. – С. 53-55.

38. Дозовые зависимости нестохастических эффектов, основные концепции и величины, используемые в МКРЗ // Публ. МКРЗ № 41, 42. – М. : Энергоатомиздат, 1987. – 83 с.

39. Єфремова У.П. Роль NO-синтазної системи в організмі людини при розвитку патологічних процесів / У.П. Єфремова, Н.Е. Личковська, Р.В. Фафула, З.Д. Воробець // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2012. – № 1. – С. 68–73.

40. Заглада Н.В. Державна програма "Репродуктивне здоров'я нації" на період до 2015 року – пріоритетне питання уряду України у

2011 р. / Н.В. Заглада, Ю.Ю. Габорець // Україна. Здоров'я нації. - 2012. - № 2-3. - С. 51-59.

41. Запорожан В.М. NO-залежні механізми стимуляції репродуктивної системи самців : [монографія] / В.М. Запорожан, А.І. Гоженко, І.В. Савицький. - Одеса : ОДМУ, 2001. - 123 с.

42. Чеснокова Н.П. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы и патологии / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Активация липопероксидации как ведущий патогенетический фактор развития типовых патологических процессов и заболеваний различной этиологии : [монография] [Электронный ресурс]. – Саратов : Изд-во Сарат. мед. ун-та, 2012. – Режим доступа : <http://www.monographies.ru/ru/book/section?id=5536>

43. Кветной И.М. Экстрапинеальный мелатонин: роль в хронобиологии и хрономедицине / И.М. Кветной // Вестн. РУДН. Сер. Медицина. – 2012. – № 7. – С. 126-127.

44. Кеирим-Маркус И.Б. Регламентация облучения для XXI века / И.Б. Кеирим-Маркус // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2000. – № 1. – С.6-12.

45. Кидун К.А. Нарушение сперматогенеза при окислительном стрессе / К.А. Кидун // Кислород и свободные радикалы : республ. науч.-практ. конф. : мат. / под ред. В.В. Зинчука. – Гродно : ГрГМУ, 2014. – С. 89-91.

46. Костенко В.О. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, О.В. Коваленко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т.11, №3. – С. 150-154.

47. Костенко В.О. Механізми порушення окисних процесів у тканинах при надлишковому утворенні оксиду азоту з екзогенних попередників / В.О. Костенко, А.Г. Костенко, С.В. Денисенко [та ін.] // Клін. та експ. патол. – 2004. – Т.3, № 2 (Ч.1). – С. 202-204.

48. Костенко В.А. Не только концентрация, но и происхождение оксида определяет его патогенетическую или саногенетическую роль / В.А. Костенко, И.В. Батухина, А.А. Левков [и др.] // Патологія. – 2008. – Т. 5, № 2. – С. 58-58.

49. Костенко В.О. Продукція супероксидного аніон-радикала та оксиду азоту у тканині нирок після хірургічного втручання / В.О. Костенко, О.І. Цебржинський // Фізіол. журн. – 2000. – Т.46, №5. – С.56-62.

50. Костенко В.А. NO- и пероксинитрит-зависимые изменения продукции супероксидного анион-радикала в органах крыс при экспериментальном метаболическом синдроме / В.А. Костенко, А.Н. Елинская, Л.И. Ляшенко [и др.] // Журн. Гродненского гос. мед. ун-та. – 2014. – № 2. – С. 74–77.

51. Котеров А.Н. Биологические и медицинские эффекты излучения с низкой ЛПЭ для различных диапазонов доз / А.Н. Котеров, А.А. Вайнсон // Мед. радиол. и радиац. безопасн. – 2015. – Т. 60, № 3. – С. 5-31.

52. Кочешкова Н.С. Ідентифікація та властивості іонтранспортувальних АТР-гідролаз сперматозоїдів чоловіків за умов олігозооспермії : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.04 “Біохімія” / Н.С. Кочешкова. – Львів, 2007. – 14 с.

53. Кудряшов Ю.Б. Основные принципы в радиобиологии / Ю.Б. Кудряшов // Радиационная биология. Радиоэкология. - 2001. - Т.41, №5. – С.531-547.

54. Кузнецова Т.Ю. Моделирование взаимодействия гормона мелатонина со свободными радикалами в биоорганических и медицинских системах / Т.Ю.Кузнецова, Н.В. Соловьева // Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ–2012 : мат. VIII міжнар. наук.-техн. конф. (м. Севастополь, 23–27 квітня 2012 р.). – Севастополь, 2012. - С. 182-184.

55. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / [В.В. Долгов, С.А. Луговская, Н.Д. Фанченко, И.И. Миронова и др.] – М.–Тверь : Триада, 2006. – 145 с.

56. Лепехин Н.П. Последствия для внутриутробного развития потомства облученных половых клеток самцов на разных стадиях сперматогенеза / Н.П. Лепехин, Г.Ф. Палыга // Радиобиология. – 1994. – Т. 34, Вып. 4–5. – С. 645–649.

57. Литвинова Л.Б. Фертильність щурів, яких опромінювали на різних стадіях сперматогенезу та ембріогенез їх нащадків / Л.Б. Литвинова, Т.В. Федорченко // УРЖ. – Харків, 1994. – Т.2, Вип. 2. – С. 112–114.

58. Логинов П.В. Селен в коррекции репродуктивной функции при стрессе : [учебно-методическое пособие] / П.В. Логинов, А.А. Николаев – Астрахань : Изд-во «ГБОУ ВПО Астраханский ГМУ», 2015. – 80 с.

59. Лось И.П. Ограничение облучения человека техногенно – усиленными источниками природного происхождения / И.П. Лось, Т.О. Павленко // Довкілля та здоров'я. – 2003. – № 1 (24). – С.49-54.

60. Ляшенко Л.І. NF-κB-опосередкований вплив NO-синтаз на вільнорадикальні процеси у тканинах пародонта за умов експериментального метаболічного синдрому / Л.І. Ляшенко, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т. 14, № 2. – С. 140-143.

61. Макутина В.А. Экспериментальная оценка сочетанного действия стресса и металлов (кадмия и алюминия) на репродуктивную функцию самцов крыс / В.А. Макутина, С.Л. Балезин, Т.В. Слышкина, И.А. Пашнина, Е.И. Лихачева // Мед. труда и пром. экол. – 2014. – №6. – С.30-34.

62. Маньковська І.М. Роль кисневих радикалів у фізіології та патології сперми людини / І.М. Маньковська, З.О. Серебровська // Фізіол. журн. – 1998. – Т. 44, № 5-6. – С. 118-125.

63. Маргітич В.М. Ушкоджуюча дія вільних радикалів на ліпиди сперми за пониженого фертильного потенціалу / В.М. Маргітич, Н.М. Гула, М.І. Бойко [та ін.] // Сексологія и андрологія. – 2000. – Вып. 5. – С.69-72.

64. Маргітич В.М. Ушкодження ліпідів сперматозоїдів як важливий фактор патогенезу неплідності чоловіків з олігозооспермією / В.М. Маргітич, Н.М. Гула, І.І. Горпинченко [та ін.] // Урологія. – 2001. – Т.5, №1. – С.44-50.

65. Мелатонин в норме и патологии / под ред. Ф.И. Комарова, С.И. Комарова, С.И. Рапопорта и др. - М. : ИД Медпрактика, 2004. – 307 с.

66. Меньщикова Е.Б. Свойства и функции НАДФН-оксидаз клеток млекопитающих / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков // Успехи соврем. биологии. – 2006. – Т. 126, Вып. 1. – С. 97–112.

67. Методы исследования в профпатологии / под ред. О.Г. Архиповой. – М. : Медицина, 1988. – 208 с.

68. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / [Л.В. Беркало, О.В. Бобович, Н.О. Боброва та ін.]; за ред. І.П.Кайдашева. – Полтава, 2003. – 320 с.

69. Мінцер О.П. Оброблення клінічних і експериментальних даних у медицині / О.П. Мінцер, Ю.В. Вороненко, В.В. Власов – К. : Вища школа, 2003. – 350 с.

70. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия ионизирующих излучений / Ю.И. Москалев. – М. : Медицина, 1991. – 474 с.

71. Норми радіаційної безпеки України (НРБУ–97): Державні гігієнічні нормативи. ДГН 6.6.1. – 6.5.001 – 98. – К., 1998. – 135 с.

72. Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др.] – М. : Слово, 2006. – 556 с.

73. Основні санітарні правила забезпечення радіаційної безпеки України. Затверджено наказом МОЗ України від 02.02.2005 №54. Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 20 травня 2005 р. за №552/10831 // Офіційний вісник України. – 2005. – №23. – С.197-279.

74. Петин В.Г. Радиационный гормезис при действии малых доз ионизирующего излучения : [учебное пособие по курсу «Экологическая биофизика»] / В.Г. Петин, М.Д. Пронкевич. – Обнинск : ИАТЭ НИЯУ МИФИ, 2012. – 73 с.

75. Поберезкина Н.Б. Биологическая роль супероксиддисмутазы / Н.Б. Поберезкина, Л.Ф. Осинская // Укр. биохим. журн. – 1989. – Т.61, №2. – С.14-23.

76. Постригач Н.О. Вплив нелетальних доз іонізуючої радіації і спіруліни на біохімічні та ультраструктурні показники стану сперматозоїдів та органів регуляції сперматогенезу щурів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.01 “Радіобіологія” / Н.О. Постригач. – К., 2002. –15 с.

77. Почерняева В.Ф. Експериментальне обґрунтування застосування антиоксидантів як гонадопротекторів : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук : спец. 14.03.05 “Фармакологія” / В.Ф. Почерняева. – К., 1997. – 40 с.

78. Проблема оксида азота в биологии и медицине и принцип цикличности: Ретроспективный анализ идей, принципов и концепций /

[В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, Н.С. Косицын, В.Е. Охотин]. – М. : Едиториал УРСС, 2003. – 96 с.

79. Радиация. Дозы, эффекты, риск / пер. с англ. Ю.А. Банникова. – М. : Мир, 1988. – С. 57–73.

80. Реутов В.П. Механизм антирадикальной защиты клеток и организма в целом заложен в циклической организации тех метаболических процессов, которые сопряжены с образованием свободных радикалов / В.П. Реутов // Патолофізіологія і фармація: шляхи інтеграції : тези доповідей VII Національного конгресу патолофізіологів України з міжнародною участю (5-7 жовтня 2016 р.). – Х. : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 191.

81. Реутов В.П. Нарушение фундаментальных механизмов, связанных с дыханием, биоэнергетикой и циклами оксида азота и супероксидного анион-радикала, лежат в основе многих известных патологий, в том числе сердечно-сосудистых и онкозаболеваний / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина // Патолофізіологія і фармація: шляхи інтеграції : тези доповідей VII Національного конгресу патолофізіологів України з міжнародною участю (5-7 жовтня 2016 р.). – Х. : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 193.

82. Реутов В.П. Нитраты и нитриты способны влиять на социально-значимые заболевания и среднюю продолжительность жизни / В.П. Реутов // Патолофізіологія і фармація: шляхи інтеграції : тези доповідей VII Національного конгресу патолофізіологів України з міжнародною участю (5-7 жовтня 2016 р.). – Х. : Вид-во НФаУ, 2016. – С. 190.

83. Реутов В.П. Цикл оксида азота как механизм стабилизации содержания NO и продуктов его превращения в организме млекопитающих / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, А.И. Гоженко [и др.] // Актуал. пробл. трансп. мед. – 2008. – № 1 (11). – С. 22-28.

84. Романенко О.Г. Роль метаболітів оксиду азоту в патогенезі запальних захворювань тканин порожнини рота і шлунково-кишкового тракту / О.Г. Романенко, І.В. Ковач, О.І. Руденко, І.А. Кленіна // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2010. – № 3. – С. 37-41.

85. Романюк А.М. Зміни мікроелементного статусу сім'яників щурів в умовах підвищеного надходження солей важких металів / А.М. Романюк, С.В. Сауляк, Р.А. Москаленко [та ін.] // Морфологія. – 2011. – Т. V, № 2. – С. 55-60.

86. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / под ред. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой. – К. : Вища школа, 1988. – 318 с.

87. Сабадашка М.В. Вплив препарату поліфенольного комплексу з червоного виноградного вина на показники системи L-аргінін/NO у крові щурів за малих доз іонізуючого опромінення / М.В. Сабадашка, А.Р. Гнатуш, Л.О. Дацюк [та ін.] // Ukrainian Biochemical Journal. - 2014. - Т. 86, №1. - С. 117-123.

88. Сабадашка М.В. Дія концентрату поліфенольного комплексу з виноградного вина за радіоіндукованого оксидативно-нітративного стресу : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.04 “Біохімія ” / М.В. Сабадашка. - Львів, 2014. - 20 с.

89. Сафонова В.Ю. Биологическое влияние малых доз радиации, аспекты безопасности / В.Ю. Сафонова, В.А. Сафонова // Изв. Оренбургского гос. аграрн. ун-та. – 2011. – № 3. - С. 308-310.

90. Сердюк А.М. Норми радіаційної безпеки України (НРБУ – 97): концептуальні основи та особливості / А.М. Сердюк, І.П. Лось, О.В. Лапушенко // НРБУ – 97. Відповіді на запитання практики: тлумачний та методичний посібник. – К. : Фірма «Деркул», 2004. – С. 9-37.

91. Сердюк А.М. Проблеми сьогодення та шляхи їх подолання / А.М. Сердюк, І.П. Лось // Гігієнічна наука та практика на рубежі століть:

Матеріали XIV з'їзду гігієністів України (19–21 травня 2004 р.). – Дніпропетровськ, 2004. – Т. II. – С.303-305.

92. Серебровська З.О. Особливості вільнорадикальних процесів у спермі і крові людини при зміні морфофункціональних характеристик сперми : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.13 “Фізіологія людини і тварин” / З.О. Серебровська. – К., 2000. – 20 с.

93. Скрипніков М.С. Вплив нітратів на розлади репродуктивної діяльності тварин в експерименті / М.С. Скрипніков, М.В. Денисенко, С.В. Денисенко // Вісн. Полтав. держ. агр. акад. – 2003. – № 6. – С. 57-58.

94. Смоляр В.І. Нітрати, нітроти та нітрузоаміни у харчових продуктах і раціонах [Електронний ресурс] / В.І. Смоляр, О.І. Циганенко, Г.І. Петрашенко // Проблеми харчування. – 2007. – №3. – Режим доступу до журн. : http://www.medved.kiev.ua/arh_nutr/art_2007/n07_3_5.htm.

95. Соловйова Н.В. Антиоксидантна активність мелатоніну і глутатіону на основі порівняльного аналізу результатів квантовохімічних та електрохімічних досліджень / Н.В. Соловйова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2015. – Т.15, №1. – С.190-194.

96. Соловйова Н.В. Зміни вільнорадикальних окиснювальних процесів у тканинах сім'яників білих щурів при дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2010. – Т.10, №1. – С. 77-81.

97. Соловйова Н.В. Зміни окиснювального метаболізму в сперматозоїдах білих щурів при тривалій дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2010. – №1. – С. 177-179.

98. Соловйова Н.В. Зміни продукції активних форм кисню при дії на організм відпрацьованого моторного масла у сім'яниках білих щурів / Н.В. Соловйова // Світ мед. та біол. - 2015. - №2. – С.131-134.

99. Соловйова Н.В. Репродуктивна здатність білих щурів-самців за умов тривалого введення відпрацьованого автомобільного масла / Н.В. Соловйова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2009 – Т.9, №2. – С. 124-126.

100. Соловйова Н.В. Фізико-хімічна оцінка можливості використання оксиду азоту у якості ефективного регулятора багатьох патологій в організмі людини / Н.В. Соловйова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2014. – Т.14, №4. – С. 223-228.

101. Стояновський В.Г. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у плазмі та спермі кнурців української степової білої породи [Електронний ресурс] / В.Г. Стояновський, А.М. Шостя, С.О. Усенко // Науково-технічний бюлетень. – 2015. – № 113. – С. 309-318. – Режим доступу: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ntb_2015_113_54

102. Тойчуев Р.М. Распространенность бесплодия у мужчин, проживающих в условиях загрязнения окружающей среды хлорорганическими пестицидами / Р.М. Тойчуев, Д.С. Мирзакулов, Т.Р. Пайзилдаев // Гигиена и санитария. – 2015. – №6. – С.97-99.

103. Тюзиков И.А. Мужское бесплодие и инсулинорезистентность: есть ли патогенетические связи, и кто, когда и как должен диагностировать и лечить? / И.А. Тюзиков, С.Ю. Калинченко, Л.О. Ворслов, Ю.А. Титова // Эксперим. и клин. урол. – 2014. – №2. – С.68-75.

104. Фесенко О.Г. Характеристика нітратного забруднення поверхневих і підземних вод Полтавського регіону / О.Г. Фесенко //

Вісн. Полтавської державної аграрної академії. – 2014. – № 1. – С. 121-124.

105. Френкель Ю.Д. Вплив скевенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну на окиснювальний метаболізм у тканині головного мозку за умов хронічної експериментальної гіпомелатоніемії / Ю.Д. Френкель // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2013. – Т.8, №3. – С. 86-90.

106. Френкель Ю.Д. Роль транскрипційного ядерного фактора κВ в механізмах порушень окислювального метаболізму в головному мозку крыс при хронічній гіпомелатоніемії / Ю.Д. Френкель, В.С. Черно // Georgian Medical News. – 2014. – №7-8. – С. 99-102.

107. Френкель Ю.Д. NO-залежні механізми розладів окиснювального метаболізму головного мозку щурів при порушенні утворення мелатоніну : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.04 “Патологічна фізіологія” / Ю.Д. Френкель. - Харків, 2015. - 21 с.

108. Холодкова Е.Л. Морфо-функціональне состояние сперматогенного епітелія в циклі сперматогенеза у мишей / Е.Л. Холодкова, Д.М. Пыхтеев, А.Л. Щербатюк // Вісн. морфології. – 2005. – Т. 11, № 2. – С. 216-218.

109. Холодкова О.Л. Особливості патогенезу порушень морфофункціонального стану репродуктивної системи самців та самок експериментальних тварин та їх корекція за допомогою регенеративних технологій : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : спец. 14.03.04 “Патологічна фізіологія” / О.Л. Холодкова. – Одеса, 2010. – 36 с.

110. Цебржинський О.І. Оксидативна активність у сперматозоїдах / О.І. Цебржинський // Фізіол. журн. – 2000. – Т.46, № 4. – С.71-75.

111. Цебржинский О.И. Продукция супероксида нейтрофилами от биоактивных веществ / О.И. Цебржинский // Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека : VI нац. науч.-практ. конф. с международ. участием (Смоленск, 25-29 мая 2014 г.). – Смоленск, 2014. - С. 213-215.

112. Цебржинский О.И. Прооксидантно-антиоксидантная система семенников и спермы : [монография] / О.И. Цебржинский, В.Ф. Почерняева, Н.А. Дмитренко. – Полтава : РВВ ПУСКУ, 2008. – 101 с.

113. Цебржинский О.И. Прооксидантно-антиоксидантный гомеостаз животных в норме и при различных воздействиях : автореф. дис. на соискание ученой степени доктора биол. наук : спец. 03.00.13 “Физиология”, 03.00.04 “Биохимия” / О.И. Цебржинский. – Белгород, 2001. – 33 с.

114. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих / [В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина, В.Е. Охотин, Н.С. Косицын]. – М. : Наука, 1998. – 159 с.

115. Чеботар Л.Д. Ефекти хронічної гіпермелатоніемії / Л.Д. Чеботар, О.І. Цебржинський // Вісн. Луганського нац. пед. ун-ту ім. Т. Шевченка : Біологічні науки. – 2006. – № 13. – С. 139-144.

116. Чистяков Р.Б. Антиоксидантная терапия в комплексном лечении вторичных нарушений репродуктивной функции у мужчин / Р.Б. Чистяков // Здоровье мужчины. – 2005. – № 1. – С. 174-178.

117. Шиш Н.В. Влияние препаратов антиоксидантов на биохимические и морфо-функциональные показатели репродуктивной системы крыс-самцов при длительном поступлении ацетата свинца / Н.В. Шиш, В.Н. Бобырев // Світ мед. та біол. – 2006. – №2. – С. 60-65.

118. Шиш Н.В. Влияние препаратов антиоксидантов на биохимические и морфофункциональные показатели репродуктивной

системы крыс-самцов при длительном поступлении клопиралида / Н.В. Шиш, В.Н. Бобырев // Одеськ. мед. журн. – 2006. – №2. – С 33-36.

119. Шостя А.М. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у плазмі та спермі кнурців у період становлення статевої функції / А.М. Шостя // Свинарство. – 2014. – Вип. 64. – С. 124-132.

120. Шостя А.М. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у спермі кнурців миргородської породи у період становлення статевої функції [Електронний ресурс] / А.М. Шостя // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Гжицького. – 2014. – Т.16, №2. – С. 227-234. – Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnu_2014_16_2\(3\)_36](http://nbuv.gov.ua/UJRN/nvlnu_2014_16_2(3)_36)

121. Шостя А.М. Роль активних форм кисню в регуляції сперматогенезу та заплідненні у ссавців / А.М. Шостя // Укр. біохім. журн. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 14-22.

122. Шрайбман Г.Н. Спектрофотометрические методики определения пероксинитрита и нитрита / Г.Н. Шрайбман, Е.П. Дягилева, А.В. Скибина // Вестн. КемГУ. – 2011. – №1. – С. 200-206.

123. Эндогенные механизмы кардиопротекции как основа патогенетической терапии заболеваний сердца / Под ред. А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко, А.Н. Пархоменко. – К. : Наукова думка, 2008. – 520 с.

124. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных / С.П. Ярмоненко, А.А. Вайсон. – М. : Высшая школа, 2004. – 549 с.

125. Agarwal A. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility / A. Agarwal, R.K. Sharma, K.P. Nallella [et al.] // Fertil. Steril. – 2006. – V. 86, № 4. – P. 878–885.

126. Aitken R.J. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line / R.J. Aitken, G.N. De Iuliis, R.I. McLachlan // Int. J. Androl. – 2009. – V.32, №1. – P. 46-56.

127. Aitken R.J. Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health / R.J. Aitken, K.T. Jones, S.A. Robertson. // *J. Androl.* – 2012. - V.33, №6. - P. 1096-1106.

128. Aitken R.J. Oxidative stress and male reproductive biology / R.J. Aitken, M.A. Baker // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2004. – V.16, №5. – P. 581-588.

129. Aitken R.J. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk / R.J. Aitken, H. Fisher // *Bioessays.* – 1994. – V. 16, №4. – P. 259-267.

130. Aitken R.J. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma / R.J. Aitken, M.A. Baker // *Int. J. Androl.* – 2002. - V.25, №4. – P. 191-194.

131. Aitken R.J. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? / R.J. Aitken, H.W. Baker // *Hum. Reprod.* – 1995. – V. 10, №7. – P. 1736-1739.

132. Aitken R.J. Oxidative stress and male reproductive health / R.J. Aitken, T.B. Smith, M.S. Jobling, M.A. Baker, G.N. De Iuliis // *Asian J. Androl.* 2014. – V.16, №1. - P.31-38.

133. Aksoy Y. Seminal plasma nitric oxide concentration in oligo- and / or asthenozoospermic subjects with/without varicocele / Y. Aksoy, I. Ozbey, H. Aksoy [et al.] // *Arch. Androl.* – 2002. – V. 48, №3. – P. 181-185.

134. Altavilla D. Molecular pathways involved in the early and late damage induced by testis ischemia: evidence for a rational pharmacological modulation / D. Altavilla, C. Romeo, F. Squadrito [et al.] // *Curr. Med. Chem.* - 2012. - V.19, №8. – P.1219-1224.

135. 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 [et al.] // *DARU.* – 2006. – V. 14, №4. – P. 197-202.

136. Aquila S. Nitric oxide involvement in the acrosome reaction triggered by leptin in pig sperm / S. Aquila, F. Giordano, C. Guido [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2011. – V.9. – P. 133.

137. Arias-Salvatierra D. Role of nitric oxide produced by iNOS through NF- κ B pathway in migration of cerebellar granule neurons induced by Lipopolysaccharide / D. Arias-Salvatierra, E.K. Silbergeld, L.C. Acosta-Saavedra, E.S. Calderon-Aranda // *Cell Signal.* – 2011. – V.23, №2. – P. 425-435.

138. Asgharzade S. Aloe vera toxic effects: expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in testis of Wistar rat / S. Asgharzade, M. Rafieian-Kopaei, A. Mirzaeian [et al.] // *Iran J. Basic Med. Sci.* – 2015. – V.18, №10. – P. 967-973.

139. Awad H. Melatonin hormone profile in infertile males / H. Awad, F. Halawa, T. Mostafa, H. Atta // *Int. J. Androl.* - 2006. - V. 29, №3. – P.409-413.

140. Aydemir B. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men / B. Aydemir, I. Onaran, A.R. Kiziler [et al.] // *J. Androl.* – 2008. – V.29, №1. – P. 41-46.

141. Babicova A. Early changes in L-arginine-nitric oxide metabolic pathways in response to the whole-body gamma irradiation of rats / A. Babicova, Z. Havlinova, J. Pejchal [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* - 2011. - V.87, №10. – P.1067-1073.

142. Bae Y.S. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling / Y.S. Bae, H. Oh, S.G. Rhee, Y.D. Yoo // *Mol Cells.* – 2011. – V.32, №6. – P. 491-509.

143. Balercia G. Role of nitric oxide concentration on human sperm motility / G. Balercia, S. Moretti, A. Vignini [et al.] // *J. Androl.* – 2004. – V.25, №2. – P. 245-249.

144. Barone M.C. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase by peroxynitrite proceeds through ascorbate-dependent generation of nitric oxide / M.C. Barone, V.M. Darley-Usmar, P.S. Brookes // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V.278, №30. – P.27520-27524.

145. Brody S.A. Мужское бесплодие и окислительный стресс: роль диеты, образа жизни и пищевых добавок / S.A. Brody // *Андрология и генитальная хирургия.* – 2014. – №3. – С.33-41.

146. Brown G.C. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols / G.C. Brown, V. Borutaite // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – V. 1658. – P. 44-49.

147. Budde L.M. Regulation of IkappaBbeta expression in testis / L.M. Budde, C. Wu, C. Tilman [et al.] // *Mol Biol Cell.* - 2002. - V.13, №12. – P.4179-4194.

148. Burnett A.L. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat / A.L. Burnett, D.D. Ricker, S.L. Chamness [et al.] // *Biol. Reprod.* – 1995. – V. 52. – P. 1-7.

149. Bykova M. Association of classical semen parameters with superoxide dismutase and catalase activities in human semen / M. Bykova, N. Titova, R. Sharma [et al.] // *Fertil. Ster.* – 2007. – V. 88, Sup. 1. – P.302-303.

150. Bykova M. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in sperm and seminal plasma from infertile men semen / M. Bykova, N. Titova, R. Sharma [et al.] // *Fertil. Ster.* – 2007. – V. 88, Sup. 1. – P.366-367.

151. Bykova M. Malondialdehyde and diene conjugate levels in sperm and seminal plasma of infertile and normozoospermic men semen / M. Bykova, N. Titova, R. Sharma [et al.] // *Fertil. Ster.* – 2007. – V. 88, Sup. 1. – P.303-304.

152. Byung Pal Yu. Cellular defences against reactive oxygen species / Pal Yu Byung // *Physiol. Rev.* – 1994. – V.74, № 1. – P. 139-161.

153. Calcerrada P. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications / P. Calcerrada, G. Peluffo, R. Radi // *Curr Pharm Des.* – 2011. – V.17, №35. – P. 3905-3932.

154. Castello P.R. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes / P.R. Castello, P.S. David, T. McClure [et al.] // *Cell Metab.* – 2006. – V.3, №4. – P. 277-287.

155. Castiglione N. Nitrite and nitrite reductases: from molecular mechanisms to significance in human health and disease / N. Castiglione, S. Rinaldo, G. Giardina [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – V.17, №4. – P.684-716.

156. Chaturvedi M.M. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all' / M.M. Chaturvedi, B. Sung, V.R. Yadav [et al.] // *Oncogene.* – 2011. – V.30, №14. – P. 1615-1630.

157. de Lamirande E. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases / E. de Lamirande, C. O'Flaherty // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V.1784, №1. – P. 106-115.

158. Delfino F.J. NF-kappaB and TNF-alpha stimulate androgen receptor expression in Sertoli cells / F.J. Delfino, J.N. Boustead, C. Fix, W.H. Walker // *Mol Cell Endocrinol.* – 2003. - V.201, №1-2. - P1-12.

159. Delfino F. Stage-specific nuclear expression of NF-kappaB in mammalian testis / F. Delfino, W.H. Walker // *Mol. Endocrinol.* – 1998. – V.12, №11. – P. 1696-1707.

160. De Iuliis G.N. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress / G.N. De Iuliis, L.K. Thomson, L.A. Mitchell [et al.] // *Biol. Reprod.* - 2009. – V.81, №3. – P. 517-524.

161. Dong W.G. Effects of melatonin on the expression of iNOS and COX-2 in rat models of colitis / W.G. Dong, Q. Mei, J.P. Yu [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2003. – V.9, № 6. – P. 1307-1311.

162. Doshi S.B. Role of reactive nitrogen species in male infertility / S.B. Doshi, K. Khullar, R.K. Sharma, A. Agarwal // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2012. – V.10. – P. 109-120.

163. Duncan C. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate / C. Duncan, H. Dougall, P. Johnston [et al.] // *Nat Med.* – 1995. – V.1. – P.546-551.

164. Elezaj S. Treatment of infertility in men with post-traumatic stress disorder (PTSD) with the method of intrauterine insemination / S. Elezaj, Z. Gashi, A. Zeqiraj [et al.] // *Med. Arch.* – 2015. – V.69, №4. – P. 256-259.

165. Escames G. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice / G. Escames, L.C. López, V. Tapias [et al.] // *J Pineal Res.* - 2006. – V. 40, №1. - P.71-78.

166. Eskiocak S. Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality / S. Eskiocak, A.S. Gozen, A. Taskiran [et al.] // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2006. – V.39, №5. – P. 581-588.

167. Fan A. Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity / A. Fan, V.E. Steinberg // *J. Regul. Toxicol. Pharmacol.* - 1996. - V.23. - №1, P.1. - P.35-43.

168. Fang L.S. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation / L.S. Fang, A.B. Malik // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* – 2006. – V. 290. – P. L622–L645.

169. Ford W.C. Regulation of sperm function by reactive oxygen species / W.C. Ford // *Hum. Reprod. Update.* – 2004. – V.10, №5. – P. 387-399.

170. Francavilla F. Nitric oxide synthase inhibition in human sperm affects sperm-oocyte fusion but not zona pellucida binding / F. Francavilla, R. Santucci, B. Macerola [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2000. – V. 63. – P. 425-429.

171. Fritsch P. Les nitrates et les nitrites apports alimentaires et leur devenir / P. Fritsch, G. De Saint Blanquat // *Sci Ail.* – 1992. – V.12. – P. 563-578.

172. Garg V. Role of nitric oxide in male infertility / V. Garg, S.P. Garg // *J. Indian. Acad. Forensic Med.* – 2011. – V. 33, №1. – P. 65-68.

173. Gavella M. Antioxidative effect of human spermatozoa / M. Gavella, V. Lipovac // *Androl.* – 2000. – V.44, № 1. – P.23-27.

174. Geoffrey L. Radiation: Doses, Effects, Risks / L. Geoffrey – Ed. United Nations Environment Programme, 1985. – 68 p.

175. Georgellis A. Generation of superoxide anion and lipid peroxidation in different cell types and subcellular fractions from rat testis / A. Georgellis, M. Tsigotis, J. Rydström // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1988. – V.94, №3. – P.362-373.

176. Gholami M. Melatonin improves spermatogonial stem cells transplantation efficiency in azoospermic mice / M. Gholami, G. Saki, M. Hemadi [et al.] // *Iran J. Basic Med. Sci.* - 2014. - V.17, №2. - P.93-99.

177. Gisone P. The Role of Nitric Oxide in the Radiation-induced Effects in the Developing Brain / P. Gisone, D. Dubner, D. L. Rosario [et al.] // *In vivo.* – 2004. – V. 18, № 3. – P. 281-292.

178. Gladwin M.T. Haldane, hot dogs, halitosis, and hypoxic vasodilation: the emerging biology of the nitrite anion / M.T. Gladwin // *J Clin Invest.* – 2004. – V.113, №1. – P.19-21.

179. Gorbunov N. Activation of the nitric oxide synthase 2 pathway in the response of bone marrow stromal cells to high doses of ionizing radiation

/ N. Gorbunov, L. Pogue-Geile, M. W. Epperly [et al.] // *Radiat. Res.* – 2000. – V. 154, № 1. – P. 73-86.

180. Hall E. J. *Radiobiology for the Radiologist.* / E.J. Hall, A.J. Giaccia [6th ed.] – Philadelphia, Baltimore, N.Y. : Lippincott Williams & Wilkins, 2006. – 546 p.

181. Hayden M.S. Shared principles in NF-kappaB signaling / M.S. Hayden, S. Ghosh // *Cell.* – 2008. – V. 132, № 3. – P. 344-362.

182. Hellstrom W.J. Effect of sodium nitroprosside on sperm motility, viability and lipid peroxidation / W.J. Hellstrom, M. Bell, R. Wang, S.C. Sikka // *J. Fertil. Steril.* – 1994. – V.61, №6. – P. 1117-1122.

183. Herrero M. B. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro / M.B. Herrero, E.D. Lamirande, C. Gagnon // *Biol. Reprod.* – 1999. – V.61. – P. 575-581.

184. Hevel J.M. Purification of the inducible murene macrophage nitric oxide synthase / J.M. Hevel // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266, № 34. – P. 22789-22791.

185. Huang Z. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control / Z. Huang, S. Shiva, D.B. Kim-Shapiro [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2005. – V.115, №8. – P.2099-2107.

186. Hughes C.M. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity / C.M. Hughes, S.E. Lewis, V.J. McKelvey-Martin [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1998. – V. 13, №5. – P. 1240–1247.

187. IAEA Conference on the Safety of Radioactive Waste Disposal KONTEC 2005. Third International Symposium, Chronic Radiation Exposure: Biological and Health Effects // *Radiol. Prot.* – 2005. - V. 25, № 4. – P. 503-506.

188. Izumi Y. Molecular changes induced by bisphenol-A in rat Sertoli cell culture / Y. Izumi, K. Yamaguchi, T. Ishikawa [et al.] // Syst. Biol. Reprod. Med. - 2011. – V.57, №5. – P.228-232.

189. Jones C. Overview of programmes for the assessment of risks to the environment from ionising radiation and hazardous chemicals / C. Jones // Radiol. Prot. – 2004. - V. 24, № 4A. – P. A157-A177.

190. Ji J. Nitric oxide and nitric oxide synthase related to male reproduction / J.Ji, Y.Zhao, G.Chen // Wei Sheng Yan Jiu. – 2007. – V.36, №5. – P. 636-639.

191. Kandola K. Oxidative stress - a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics / K. Kandola, A. Bowman, M.A. Birch-Machin // Int. J. Cosmet. Sci. – 2015. - V.37, Suppl 2. – P. 1-8.

192. Kessopoulou E. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? / E. Kessopoulou, M.J. Tomlinson, C.L. Barratt. [et al.] // J. Reprod. Fertil. – 1992. – V. 94, №2. – P. 463-470.

193. Khalil W.K. Protective effect of melatonin against zonisamide-induced reproductive disorders in male rats / W.K. Khalil, F. Abdu // Arch. Med. Sci. - 2015. – V.11, №3. – P.660-669.

194. Kierszenbaum A.L. Cell-cycle regulation and mammalian gametogenesis: a lesson from the unexpected / A.L. Kierszenbaum // Mol. Reprod. Dev. – 2006. – V. 73, №8. – P. 939-942.

195. Kim Y.S. Superoxide reactivates nitric oxide-inhibited catalase / Y.S. Kim, S. Han // Biol Chem. – 2000. – V. 381, № 12. – P.1269-1271.

196. Koppers A.J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa / A.J. Koppers, G.N. De Iuliis, J.M. Finnie [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2008. – V.93, №8. – P. 3199-3207.

197. Kozlov A.V. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria / A.V. Kozlov, K. Staniek, H. Nohl // FEBS Lett. – 1999. – V.454, №1-2. – P.127-130.

198. Kratz E.M. Decreased melatonin levels and increased levels of advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility / E.M. Kratz, A. Piwowar, M. Zeman [et al.] // Reprod. Fertil. Dev. 2016. - V28, №4. - P.507-515.

199. Kumar A. JSH-23 targets nuclear factor-kappa B and reverses various deficits in experimental diabetic neuropathy: effect on neuroinflammation and antioxidant defence / A. Kumar, G. Negi, S.S. Sharma // Diabetes Obes. Metab. – 2011. – V. 13, № 8. – P.750-758.

200. Lawrens T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation / T. Lawrens // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2009. – V. 1, № 6. – Publ. a001651.

201. Lee N.P. Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis / N.P. Lee, C.Y. Cheng // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2008. – V.1, №1. – P. 25-32.

202. Lee N.P. Nitric oxide/nitric oxide synthase, spermatogenesis, and tight junction dynamics. / N.P. Lee, C.Y. Cheng // Biol Reprod. 2004. – V.70, P.267-276.

203. Lee N.P. Nitric oxide and cyclic nucleotides: their roles in junction dynamics and spermatogenesis / N.P. Lee, C.Y. Cheng // Adv. Exp. Med. Biol. 2008. – V.636. - P.172-285.

204. Levrant S. Peroxynitrite is a potent inhibitor of NF-kappa B activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines / S. Levrant, B. Pesse, F. Feihl [et al.] // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280, № 41. – P. 34878-34887.

205. Li J. Progress in leukocytospermia research / J. Li, R.Z. Liu // Zhonghua Nan Ke Xue. – 2006. – V.12, №8. – P. 730-732, 736.

206. Lilienbaum A. NF-kappa B is developmentally regulated during spermatogenesis in mice / A. Lilienbaum, J. Sage, S. Mémet, M. Rassoulzadegan // *Dev Dyn.* - 2000. - V.219, №3. – P.333-340.

207. Liman N. Region-specific localization of NOS isoforms and NADPH-diaphorase activity in the intratesticular and excurrent duct systems of adult domestic cats (*Felis catus*) / N. Liman, E. Alan // *Microsc. Res. Tech.* – 2016. – V.79, №3. – P. 192-208.

208. Li T. Up-regulation of NDRG2 through nuclear factor-kappa B is required for Leydig cell apoptosis in both human and murine infertile testes / T. Li, J. Hu, G.H. He [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2012. - V.1822, №2. – P. 301-313.

209. Lundberg J.O. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics / J.O. Lundberg, M.T. Gladwin, S. Shiva [et al.] // *Nature chem biol.* – 2009. – V. 5, № 12. – P. 865-869.

210. Lundberg J.O. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics / J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M.T. Gladwin // *Nature reviews.* – 2008. – V. 7. – P. 156-167.

211. Luzin V.I. Morphofunctional state testes of mature rats on the background of drug use aspartat of arginine / V.I. Luzin // *Український морфологічний альманах.* – 2012. – Т. 10, №4. – С. 152-154.

212. Lysiak J.J. Activation of the nuclear factor kappa B pathway following ischemia-reperfusion of the murine testis / J.J. Lysiak, H.J. Bang, Q.A. Nguyen, T.T. Turner // *J. Androl.* – 2005. – V.26. – P. 129-135

213. Mahfouz R. Simultaneous evaluation of intracellular superoxide and hydrogen peroxide in different sperm fractions / R. Mahfouz, N. Aziz, R. Sharma [et al.] // *Fertil. Ster.* – 2007. – V. 88, Sup. 1. – P.363-364.

214. Manchester L.C. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable / L.C. Manchester, A. Coto-Montes, J.A. Boga [et al.] // *J Pineal Res.* - 2015. - V.59, №4. - P. 403-419.

215. MacMillan-Crow L.A. Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite / L.A. MacMillan-Crow, J.A. Thompson // Arch. Biochem. Biophys. – 1999. – V. 366. – P. 82-88.

216. McKinney L.C. Ionizing radiation potentiates the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma and/or lipopolysaccharide in murine macrophage lines. Role of tumor necrosis factor alpha / L.C. McKinney, E. M. Aquilla, D. Coffin [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2000. – V. 899. – P. 61-68.

217. Mehraban D. Comparison of nitric oxide concentration in seminal fluid between infertile patients with or without varicose and normal fertile men / D. Mehraban, M. Ansari, H. Keyhan [et al.] // J. Urol. – 2005. – V.2, №2. – P. 106-110.

218. Mills G.C. The purification of glutathione peroxidase of erythrocytes / G.C. Mills // J. Biol. Chem. - 1954. - V.234, №3. - P.502-506.

219. Mizuno K. Activation of NF-kappaB associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model / K. Mizuno, Y. Hayashi, Y. Kojima [et al.] // Urology. - 2009. - V.73, №2. - P.389-393.

220. Mupfiga C. The relationship between seminal leukocytes, oxidative status in the ejaculate, and apoptotic markers in human spermatozoa / C. Mupfiga, D. Fisher, T. Kruger, R. Henkel // Syst Biol Reprod Med. - 2013. - V. 59, №6. – P.304-311.

221. Møller A.P. Are Organisms Adapting to Ionizing Radiation at Chernobyl? / A.P. Møller, T.A. Mousseau // Trends Ecol. Evol. - 2016. – V. 31, №4. - P281-289.

222. Napetschnig J. Molecular basis of NF-κB signaling / J. Napetschnig, H. Wu // Ann Rev Biophys. – 2013. – V. 42. – P. 443-468.

223. Nitrate : WHO Food Additives Series 35 [Electronic resource] // Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations : International Programme on Chemical Safety (IPCS). – First draft prepared by Laboratory for Toxicology, National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Netherlands. – Access mode : <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je14.htm>.

224. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology / L.J. Ignarro ed. – [2nd ed.]. – N.Y. : Science Press, 2009. – 845 p.

225. Nohl H. The existence and significance of a mitochondrial nitrite reductase / H. Nohl, K. Staniek, A.V. Kozlov // Redox Rep. – 2005. – V.10, №6. – P.281-286.

226. Oktem G. Evaluation of the relationship between inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity and effects of melatonin in experimental osteoporosis in the rat / G. Oktem, S. Uslu, S.H. Vatansever [et al.] // Surg. Radiol. Anat. – 2006. – V. 28. – P. 157-162.

227. Omar S.A. A comparison of organic and inorganic nitrates/nitrites / S.A. Omar, E. Artime, A.J. Webb // Nitric Oxide. - 2012. - V.26, №4. – P. 229-240.

228. Oyeyipo I.P. Nitric oxide synthase inhibition ameliorates nicotine-induced sperm function decline in male rats / I.P. Oyeyipo, Y. Raji, A.F. Bolarinwa // As. Pac. J. Reprod. – 2015. – V.4, №3. – P. 212-216.

229. Pearce L.L. Nitrosative stress results in irreversible inhibition of purified mitochondrial complexes I and III without modification of cofactors / L.L. Pearce, A.J. Kanai, M.W. Epperly, J. Peterson // Nitric Oxide. – 2005. – V. 13. – P. 254-263.

230. Pentikäinen V. Nuclear factor-kappa B activation in human testicular apoptosis / V. Pentikäinen, L. Suomalainen, K. Erkkilä [et al.] // Am. J. Pathol. - 2002. - V.160, №1. - P.205-218.

231. Pineau G. Assessment of testicular function after acute and chronic irradiation: further evidence for an influence of late spermatids of Sertoli cell function in the adult rats / G. Pineau, C. Veller, L. Pinon, B. Jegou // *Endocrinology*. – 1989. – V. 124, №6. – P. 2720–2728.

232. Qu X.-W. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B / X.-W. Qu, H. Wang, I.G. de Plaen [et al.] // *FASEB*. – 2001. – V. 15. – P. 439-446

233. Radi R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant / R. Radi // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V.288, №37. – P. 26464–26472.

234. Radi R. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria / R. Radi, A. Cassina, R. Hodara [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 33. – P. 1451-1464.

235. Rahman A. Blocking NF- κ B: an inflammatory issue / A. Rahman, F. Fazal // *Proc. Am. Thorac. Soc.* – 2011. – V. 8, № 6. – P. 497-503.

236. Rao A.V. Role of glutathione S-transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis / A.V. Rao, C. Shaha // *Free Rad. Biol. Med.* – 2000. – V. 29, № 10. – P. 1015–1027.

237. Rasoulpour R.J. NF-kappaB is activated in the rat testis following exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate / R.J. Rasoulpour, K. Boekelheide // *Biol Reprod.* – 2005. - V.72, № 2. – P.479-86.

238. Rasoulpour R.J. NF-kappaB activation elicited by ionizing radiation is proapoptotic in testis / R.J. Rasoulpour, K. Boekelheide // *Biol. Reprod.* – 2007. – V.76, №2. – P. 279-285.

239. Rosselli M. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction / M. Rosselli, P.J. Keller, R.K. Dubey // *Hum. Repr. Update.* – 1998. – V. 4, №1. – P. 3-24.

240. Roy S.C. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*)

spermatozoa / S.C. Roy, S.K. Atreja // *Anim. Reprod. Sci.* – 2008. – V.107, №1-2. – P. 68-84.

241. Sabeti P. Etiologies of sperm oxidative stress / P. Sabeti, S. Pourmasumi, T. Rahiminia [et al.] // *Int. J. Reprod. Biomed. (Yazd)*. – 2016. – V.14, №4. – P. 231-240.

242. Sanz A. Mitochondrial reactive oxygen species: Do they extend or shorten animal lifespan? / A. Sanz // *Biochim Biophys Acta.* - 2016. – V.1857, №8. – P. 1116-1126.

243. Unexplained Infertility: Pathophysiology, Evaluation and Treatment / G.L. Schattman, S. Esteves, A. Agarwal eds. – [5th ed.]. – Springer, 2015. – 358 p.

244. Shalet S.M. Effect of irradiation treatment on gonadal function in men treated for germ cell cancer / S.M. Shalet // *Eur. Urol.* – 1993. – V. 23, №1. – P. 148–152.

245. Shiva S. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite / S. Shiva // *Nitric Oxide.* – 2010. – V.22, №2. – P. 64-74.

246. Sikka S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function / S.C. Sikka // *Front. Biosci.* – 1996. – №1. – P.e78–86.

247. Simile M.M. Chemopreventive N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (fenretinide) targets deregulated NF- κ B and Mat1A genes in the early stages of rat liver carcinogenesis / M.M. Simile, G. Pagnan, F. Pastorino [et al.] // *Carcinogenesis.* – 2005. – V. 26, № 2. – P. 417-427.

248. Simsek A. Potential role of p38-mitogene-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B expression in testicular dysfunction associated with varicocele: an experimental study / A. Simsek, E. Ozbek, Y.O. Ilbey, M. Cekmen, A. Somay, A.I. Tasci // *Andrologia.* 2012 May;44 Suppl 1:94-101.

249. Singh A.K. High oxidative stress adversely affects NF κ B mediated induction of inducible nitric oxide synthase in human neutrophils: Implications in chronic myeloid leukemia / A.K. Singh, D. Awasthi, M. Dubey [et al.] // Nitric Oxide. – 2016. – V.58. – P. 28-41.

250. Siomek A. NF- κ B signaling pathway and free radical impact / A. Siomek // Acta Biochim. Pol. – 2012. – V. 59, № 3. – P. 323-331.

251. Sobko T. Gastrointestinal bacteria generate nitric oxide from nitrate and nitrite / T. Sobko, C.I. Reinders, E. Jansson [et al.] // Nitric Oxide. – 2005. – V. 13, №4. – P. 272-278.

252. Stanislavov R. Sperm quality in men is improved by supplementation with a combination of L-arginine, L-citrullin, roburins and Pycnogenol / R. Stanislavov, P. Rohdewald // Minerva Urol. Nefrol. – 2014. – V.66, №4. – P. 217-223.

253. Straus W. Colorimetric microdetermination of cytochrom oxydase / W. Straus // J. Biol. Chem. - 1954. - V.207, №2. - P.733-743.

254. Suzuki K. Low-dose Radiation Exposure and Carcinogenesis / K. Suzuki, Sh. Yamashita // Jpn. J. Clin. Oncol. – 2012. – V. 42, № 7. – 563-568.

255. Tavailani H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters / H. Tavailani, M. Doosti, H. Saeidi // Clin. Chim. Acta. – 2005. – V. 356, № 1–2. – P. 199–203.

256. Togashi H. Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression / H. Togashi, M. Sasaki, E. Frohman [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 1997. –V. 94, № 6. – P. 2676-2680.

257. Tornatore L. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation / L. Tornatore, A.K. Thotakura, J. Bennett [et al.] // Trends Cell Biol. – 2012. – V. 22, № 11. – P. 557-566.

258. Turker K. The potential role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity in the testicular dysfunction associated with varicocele: an experimental study / K. Turker, T. Erdoğan, H. Gülkesen [et al.] // *Int. Urol. Nephrol.* - 2004. - V.36. - P.67-72.

259. UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation). Report: Biological mechanisms of radiation actions at low doses : A white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work. – N.Y. : United Nations, 2012. – 35 p.

260. UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation). Report to the General Assembly, E.00.IX.4. – N.Y. : United Nations, 2000. – 423 p.

261. Vinogradov A.D. Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I / A.D. Vinogradov, V.G. Grivennikova // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2016. – V. 1857, №7. - P. 863-871.

262. Vorobets D.Z. Effect of vitamin E and ascorbic acid supplementation on human semen quality and lipid peroxidation in oligoasthenozoospermic men / D.Z. Vorobets // *Annal. Univ. Mariae Curie-Sklodowska (Lublin).* – 2004. – V.17, № 2. – P. 315-318.

263. Vos T.A. Expression of inducible nitric oxide synthase in endotoxemic rat hepatocytes is dependent on the cellular glutathione status / T.A. Vos, H. Van Goor, L. Tuyt [et al.] // *Hepatology.* – 1999. – V. 29, № 2. – P. 421-426.

264. Williams A.C. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function / A.C. Williams, W.C. Ford // *Fertil. Steril.* – 2005. – V.83, №4. – P. 929-936.

265. Yang G. Low-dose radiation may be a novel approach to enhance the effectiveness of cancer therapeutics / G. Yang, W. Li, H. Jiang [et al.] // *Int. J. Cancer.* – 2016. – V.139, №10. – P. 2157-2168.

266. Yan H.H. Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors. / H.H. Yan, C.Y. Cheng // Proc. Natl Acad. Sci USA. – 2005. – V.102. – P. 11722-11727.

267. Yang J.Z. The role of inducible nitric oxide synthase in gamete interaction and fertilization: a comparative study on knockout mice of three NOS isoforms / J.Z. Yang, L.C. Ajonuma, D.K. Rowlands [et al.] // Cell Biol. Int. – 2005. – V.29, №9. – P. 785-791.

268. Yao P.L. TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to Sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2 / P.L. Yao, Y.C. Lin, J.H. Richburg // Biol. Reprod. – 2009. - V. 80, №3. - P581-589.

269. Zhang H.M. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions / H.M. Zhang, Y. Zhang // J. Pineal. Res. - 2014. - V.57, №2. – P.131-146.

270. Zhang M.H. Changes in Levels of Seminal Nitric Oxide Synthase, Macrophage Migration Inhibitory Factor, Sperm DNA Integrity and Caspase-3 in Fertile Men after Scrotal Heat Stress / M.H. Zhang, A.D. Zhang, Z.D. Shi [et al.] // PLoS One. – 2015. - V.10, №10. – Art. e0141320.

271. Zhang S. Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response / S. Zhang, C. Jiang, H. Liu [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2013. - V.271, №2. - P.206-215.

272. Zhang X. Peroxynitrite mediated oxidation damage and cytotoxicity in biological systems / X. Zhang, D. Li // Life Sci J. – 2006. – V. 3, № 3. – P. 41-44.