

УДК 612.616-092.9:615.916'175:616-073.7

Шаталін Б.О., Костенко В.О.

## ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СПЕРМИ БІЛИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ СУКУПНОЇ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ НІТРАТУ НАТРІЮ ТА РЕНТГЕНІВСЬКОГО ОПРОМІНЕННЯ

ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія», Полтава

*У експерименті на 28 білих щурах досліджено показники спермограми за умов впливу рентгенівського опромінення на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію. Тварини отримували нітрат натрію протягом 30 діб у дозі 200 мг/кг маси тіла, а в останній тиждень зазнавали 3-разовий вплив рентгенівських променів у сумарній дозі 0,25 Гр. Сукупна дія нітратної інтоксикації та рентгенівського опромінення у цілому спричинила значніші зміни, ніж нітратна інтоксикація та рентгенівське опромінення окремо (відсоток нежиттєздатних та патологічних сперматозоїдів, акінезис). Величини інших показників спермограми співпадають зі значеннями, характерними для ізольованої дії чинників – нітрату натрію (гіпокінезис, акінезис) та рентгенівського опромінення (аномалії шийки та тіла, хвоста, змішані дефекти, дискінезис).*

Ключові слова: нітратна інтоксикація, рентгенівське опромінення, спермограма, кінезіограма.

Іонізуюча радіація та азотовмісні сполуки належать до пріоритетних забруднювачів навколишнього середовища.

Значна кількість робіт щодо стану репродуктивної системи людини присвячена дослідженню впливу іонізуючого опромінення в широкому спектрі доз на клітини спермогенного ряду в експерименті та в клініці, зокрема у осіб, які брали участь у ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС [8].

Зміни концентрації нітратів і нітритів також корелюють із розвитком багатьох патологічних процесів, зокрема астено- та тератозооспермії [2]. Вміст нітритів у сперматозоїдах позитивно корелює з розвитком астенозооспермії [4].

У той же час продукт метаболізму нітрат- та нітрит-йонів - оксид азоту (NO) - грає роль модулятора рухливості сперміїв, їхньої стійкості до змін умов середовища тощо [3]. Надходження розчину нітриту натрію в концентрації 0,03% як екзогенного донатора NO сприяє підсиленню сперматогенезу та зростанню активності нейронів аркуатного ядра гіпоталамуса [7].

У наших попередніх публікаціях [9] показано, що фракційне рентгенівське опромінення 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.

Проте функціональний стан сперми білих щурів за умов сукупної дії на організм нітрату натрію та рентгенівського опромінення раніше не досліджувався.

Мета цієї роботи – з'ясування змін показників спермограми щурів в умовах впливу рентгенівського опромінення на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію.

### Матеріали і методи

Досліди проведені на 28 щурах, розподілених на чотири групи по сім тварин у кожній: 1 група – інтактні тварини; 2 група – тварини, яким вводився нітрат натрію протягом 30 діб у щоденній дозі

200 мг/кг маси тіла; 3 група – тварини, що опромінювалися рентгенівськими променями із щоденною дозою 0,08 Гр тричі протягом тижня через день (сумарно 0,25 Гр); 4 група складалась із тварин, яких в останній тиждень 30-денної інтоксикації нітратом натрію піддавали рентгенівському опроміненню у зазначеному режимі.

Сперму отримували із придатків сім'яників [1]. Гомогенізовані придатки сім'яників розрізали, розмішували кожний з 2 мл 0,9% розчину натрію хлориду. Одержану суспензію використовували для підрахунку кількості і оцінки функціонального стану сперматозоїдів [1,6]. 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).

Життєздатність сперматозоїдів визначали за еозиновим тестом. На предметне скло наносили 1 краплю 1% розчину суспензії сперматозоїдів і 1 краплю 1% розчину еозину, перемішували, накривали покривним склом і негайно проводили мікроскопію. Відраховували 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 використанням імерсійного об'єктиву мікроскопу. Підрахунок проводили на 200 сперматозоїдах. Патологічними формами сперматозоїдів вважали ті, що мали аномалії голівки, тіла, хвоста [6].

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) (нормокіне-

зія, категорія А), повільним поступальним рухом (гіпокінезія, категорія В); коливальним невпорядкованим рухом (дискінезія, категорія С) та нерухомих (акінезія, категорія D) [5].

Статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Мана-Вітні. Статистичні розрахунки проводили з використанням програм «Microsoft Excel 2007» та «StatisticSoft 6.0».

### **Результати та їх обговорення**

Під впливом інтоксикації нітратом натрію у порівнянні з інтактною групою кількість сперматозоїдів знижується на 24% (див. табл.), а відсоток нежиттєздатних сперматозоїдів збільшується утричі, при цьому відсоток патологічних сперматозоїдів збільшується у 2,6 рази. Отримані дані узгоджуються з описаними в літературі [2].

Морфологічні ознаки дегенеративних сперматозоїдів при дії нітрату натрію змінювались таким чином: відсоток сперматозоїдів із патологією голівки збільшився у 1,4 рази; відсоток сперматозоїдів із патологією тіла та шийки зменшився у 3,2 рази; відсоток сперматозоїдів із патологією хвоста зменшився у 4,3 рази; відсоток сперматозоїдів із змішаною патологією зменшився у 2,3 рази.

Зміни показників кінезіограми під впливом інтоксикації нітратом натрію: відсоток сперматозоїдів із дискінезісом зменшився у 1,3 рази; відсоток сперматозоїдів із акінезісом збільшився у 2,4 рази.

Згідно з нашими попередніми дослідженнями, за цих умов у сім'яниках збільшилась продукція супероксидного аніон-радикала дихальним ланцюгом мітохондрій та вміст вторинних продуктів пероксидації, що вказує на окиснювальний стрес внаслідок дії сильного окиснювача, яким є нітрат-іон [9]. У результаті цього виникають порушення у сперматогенному епітелії, які виявляються у зниженні життєздатності сперматозоїдів, збільшенні кількості їхніх патологічних форм та зниженні рухливості.

Під впливом фракційного триразового рентгенівського опромінення у порівнянні з інтактною групою кількість сперматозоїдів знизилась на 28%, а відсоток нежиттєздатних сперматозоїдів збільшився у 3,6 рази, при цьому відсоток патологічних сперматозоїдів збільшився у 2,6 рази.

Морфологічні ознаки дегенеративних сперматозоїдів під впливом фракційного триразового рентгенівського опромінення змінилися таким чином: відсоток сперматозоїдів із патологією голівки збільшився у 1,5 рази; відсоток сперматозоїдів із патологією тіла та шийки зменшився у 6,4 рази; відсоток сперматозоїдів із патологією хвоста зменшився у 13 разів; відсоток нерозділених сперматозоїдів зменшився у 2,6 рази; відсоток сперматозоїдів із змішаною патологією зменшився у 2,7 рази.

Зміни показників кінезіограми під впливом фракційного триразового рентгенівського опро-

мінення у порівнянні з інтактною групою такі: відсоток сперматозоїдів із нормокінезісом зменшився у 1,6 рази; відсоток сперматозоїдів із гіпокінезісом збільшився у 2 рази; відсоток сперматозоїдів із акінезісом збільшився у 3,3 рази.

Рентгенівське опромінення діяло на останніх стадіях сперматогенезу та викликало посилення рівня неферментативного вільно-радикального пероксидного окиснення біополімерів у сім'яниках. Рентгенівське опромінення здатне ушкоджувати мітохондрії та акросоми, що зумовлює патологію голівки. Акінезіс може бути пов'язаний із порушенням як цитохромоксидази, так і АТФ-аз.

При сукупній дії нітратної інтоксикації та рентгенівського опромінення у порівнянні із даними інтактної групи кількість сперматозоїдів зменшилась на 35%.

За цих умов відсоток нежиттєздатних сперматозоїдів у порівнянні з інтактною групою збільшився в 4,3 рази, у порівнянні з нітратною інтоксикацією – збільшився в 1,4 рази, у порівнянні з опроміненою групою тварин – збільшився у 1,3 рази.

При сукупній дії нітратної інтоксикації та рентгенівського опромінення відсоток патологічних форм сперматозоїдів в порівнянні з інтактною групою збільшився в 3,2 рази, в порівнянні з нітратною інтоксикацією – збільшився в 1,25 рази, у порівнянні з опроміненою групою тварин – збільшився у 1,2 рази.

Морфологічні ознаки дегенеративних сперматозоїдів під впливом сукупної дії нітратної інтоксикації та рентгенівського опромінення у порівнянні з інтактною групою змінювались таким чином: відсоток сперматозоїдів із патологією голівки збільшився у 1,5 рази; відсоток сперматозоїдів із патологією тіла та шийки у порівнянні з інтактною групою зменшився у 4 рази, а при зіставленні з дією тільки рентгенівського опромінення – зменшився у 1,6 рази; у порівнянні з інтактною групою відсоток сперматозоїдів із патологією хвоста зменшився у 5,3 рази, а при зіставленні з дією тільки рентгенівського опромінення – збільшився у 2,4 рази; у порівнянні з інтактною групою відсоток нерозділених сперматозоїдів зменшився у 6,5 разів, а при порівнянні з дією тільки нітратної інтоксикації – зменшився у 3,8 разів, при впливі лише рентгенівського опромінення – зменшився у 2,5 рази; відсоток сперматозоїдів із змішаною патологією у порівнянні з інтактною групою збільшився у 1,9 разів, а при порівнянні з впливом лише рентгенівського опромінення – зменшився у 1,4 рази.

Зміни показників кінезіограми під впливом сукупної дії нітратної інтоксикації та рентгенівського опромінення у порівнянні з інтактною групою відбувається таким чином: відсоток сперматозоїдів із нормокінезісом зменшився у 1,6 рази; відсоток сперматозоїдів із гіпокінезісом збільшився у 2,3 рази, а при порівнянні з дією ізольованої нітратної інтоксикації – збільшився 1,8 разів; від-

соток сперматозоїдів із акінезисом збільшився у 3,3 рази; у порівнянні з інтактною групою відсоток сперматозоїдів із дискінезисом зменшився у 1,4 рази, а при зіставленні з впливом лише рентгенівського опромінення – зменшився у 1,5 рази; у порівнянні із інтактною групою відсоток спер-

матозоїдів із акінезисом збільшився у 3,6 рази, а при порівнянні з дією тільки нітратної інтоксикації збільшився 1,5 разів.

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

Показники	Інтактні	Нітрат натрію	Рентгенівське опромінення	Нітрат +рентген
Середнє число сперматозоїдів, $\times 10^6$ /мл	48,4±3,1	36,6±4,1 p1<0,05	34,7±3,6 p1<0,02	31,4± 4,1 p1<0,01
Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів, %	10,50±0,22	33,00±0,38 p1<0,001	35,50±0,40 p1<0,001	45,50±0,62 p1,2,3<0,001
Кількість патологічних форм сперматозоїдів, %	15,50±0,94 p1<0,001	40,00±1,99 p1<0,001	40,00±2,10 p1<0,001	50,00±3,22 p1<0,001 p2<0,02 p3<0,05
<b>Морфологічні ознаки дегенеративних форм сперматозоїдів</b>				
Аномалії голівки, %	58,06±2,44	80,00±3,59 p1<0,001	85,00±2,30 p1<0,001	86,00±4,18 p1<0,001
Аномалії, шийки та тіла, %	16,13±1,30	5,00±0,36 p1<0,001	2,50±0,36 p1<0,001	4,00±0,29 p1<0,001 p3<0,01
Аномалії хвоста, %	16,13±1,6	3,75±0,62 p1<0,001	1,25±0,44 p1<0,001	3,00±0,45 p1<0,001 p3<0,02
Нерозділені спермії, %	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
<b>Показники кінезіограми</b>				
Нормокінезис, %	72,6±4,2	63,4±6,4	46,7±5,3 p1<0,01	44,0±4,9 p1<0,001
Гіпокінезис, %	12,3± 0,8	15,7±2,1	25,1±1,7 p1<0,001 p2<0,01	28,4±1,8 p1<0,001 p2<0,02
Дискінезис, %	9,4±0,5	7,3±0,5 p1<0,02	10,1±0,8	6,9±0,4 p1<0,002 p3<0,01
Акінезис (нерухомі), %	5,7±0,4	13,6±1,5 p1<0,001	18,1±1,5 p1<0,001	20,7±2,9 p1<0,001 p2<0,05

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

*p2 – ймовірність похибки у порівнянні з даними другої серії; p3 – ймовірність похибки у порівнянні з даними третьої серії.*

Сукупна дія нітратної інтоксикації та рентгенівського опромінення у цілому спричинила значніші зміни, ніж нітратна інтоксикація та рентгенівське опромінення окремо (відсоток нежиттєздатних та патологічних сперматозоїдів, акінезис). Величини інших показників спермограми збігаються зі значеннями, характерними для ізолюваного впливу чинників – нітрату натрію (гіпокінезис, акінезис) та рентгенівського опромінення (патологія шийки та тіла, хвоста, змішана патологія, дискінезис). Це можна пов'язати з посиленням продукції супероксидного аніон-радикала НАДН-залежним електронно-транспортним ланцюгом, що призводить до неферментативного вільнорадикального пероксидного окиснення біополімерів, пригнічення активності цитохромоксидази та активації NO-синтази [9]. Ці чинники у сперматогенному епітелії сприяють пошкодженню сперматозоїдів.

## **Висновки**

Сукупна дія нітратної інтоксикації та рентгенівського опромінення викликає більш негативний вплив на сперматозоїди, ніж кожен чинник окремо.

## **Література**

1. 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.
2. 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.
3. Запорожан В.М. NO-залежні механізми стимуляції репродуктивної системи самців / В.М. Запорожан, А.І. Гоженко, І.В. Савицький. – Одеса : Одес. мед. ун-т, 2001. – 123 с.
4. Кочешкова Н.С. Ідентифікація та властивості іонотранспортувальних АТФ-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.

5. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / [ В.В. Долгов, С.А. Луговская, Н.Д. Фанченко, И.И. Миронова и др.]. – М. – Тверь : Триада, 2006. – 145 с.
6. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / под ред. М.А.Базарновой, В.Т.Морозовой. – К. : Вища школа, 1988. – 318 с.
7. 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 доктора мед. наук : спец. 14.03.04 "Патологічна фізіологія" / О.Л. Холодкова. – Одеса, 2010. – 36 с.
8. Цебржинский О.И. Прооксидантно-антиоксидантная система семенников и спермы : монография / О.И. Цебржинский, В.Ф. Почеряева, Н.А. Дмитренко. – Полтава : РВВ ПУСКУ, 2008. – 101 с.
9. Шаталин Б.О. Состояние окислительного метаболизма семенников на фоне действия нитратной интоксикации и рентгеновского облучения / Б.О. Шаталин, В.А. Костенко // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2014. – № 3. – С. 56-61.

### Реферат

ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СПЕРМЫ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ НИТРАТА НАТРИЯ И РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Шаталин Б.А., Костенко В.А.

Ключевые слова: нитратная интоксикация, рентгеновское облучение, спермограмма, кинезиограмма.

В эксперименте на 28 белых крысах исследованы показатели спермограммы при воздействии рентгеновского облучения на фоне хронической интоксикации нитратом натрия. Животные получали нитрат натрия в течение 30 суток в дозе 200 мг/кг массы тела, а в последнюю неделю испытывали 3-кратное воздействие рентгеновскими лучами в суммарной дозе 0,25 Гр. Сочетанное действие нитратной интоксикации и рентгеновского облучения вызывало более глубокие изменения, чем нитратная интоксикация и рентгеновское облучение отдельно (процент нежизнеспособных и патологических сперматозоидов, акинезис). Величины других показателей спермограммы соответствовали значениям, характерным для изолированного действия факторов – нитрата натрия (гипокинезис, акинезис) и рентгеновского облучения (аномалии шейки и тела, хвоста, смешанные дефекты, дискинезис).

### Summary

PARAMETERS OF FUNCTIONAL STATUS OF SPERM IN WHITE RATS UNDER COMBINED EFFECT PRODUCED BY SODIUM NITRATE AND X-RAY IRRADIATION ON THE BODY

Shatalin B.O., Kostenko V.O.

Key words: nitrate intoxication, X-ray irradiation, spermiogram, kinesiogram.

This experiment involved 28 white rats was designed to study their spermiogram parameters following the exposure to X-rays under the conditions of chronic intoxication with sodium nitrate. Animals were given sodium nitrate for 30 days in a dose of 200 mg/kg body weight, and in the last week were subjected to 3 exposures with X-rays in a total dose of 0.25 Gy. The combined effect produced by nitrate intoxication and X-ray irradiation caused more profound changes than nitrate intoxication and X-ray irradiation separately (percentage of non-viable and abnormal sperm, akinesis). The values of other parameters of spermiogram corresponded to values typical for the isolated action of such factors as sodium nitrate (hypokinesis, akinesis) and X-ray irradiation (abnormalities of the cervix and the body, tail, mixed defects, dyskinesis).