

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
Морфологічні ознаки дегенеративних форм сперматозоїдів				
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
Показники кінезіограми				
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. Барилляк І.Р. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин / І.Р. Барилляк, 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. Проксидантно-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).