

УДК 616.13-004.6:615.225

КП

№ ДР 0108U010079

Інв. №

Міністерство охорони здоров'я України
Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія»
36024, м. Полтава, вул. Шевченка, 23; тел. (0532) 60-20-51, факс 60-20-51

“ЗАТВЕРДЖУЮ”
Ректор ВДНЗУ “УМСА”
д.мед.н., професор

Ждан В.М.
2010.02.12

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція
фізіологічно активними речовинами
(проміжний)

Керівник НДР
д.мед.н., професор
2010.02.12

Костенко В.О.

Рукопис закінчено 1 грудня 2010 р.
Результати цієї роботи розглянуто Вченою Радою ВДНЗУ “УМСА”
протокол від _____ № _____

Робота виконана згідно з планом за темою «Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція фізіологічно активними речовинами», номер держреєстрації 0108U010079, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія».

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ

Керівник теми

Завідувач кафедри патофізіології,
доктор медичних наук, професор

1.12.2010 р.

Костенко В.О.
(реферат, вступ, висновки)

Відповідальний виконавець -
Викладач кафедри патофізіології

1.12.2010 р.

Левков А.А.
(розділ 1, висновки 1-4)

Асистент каф. хірургічної стоматології,
заочний аспірант кафедри патофізіології

1.12.2010 р.

Должкова К.П.
(розділ 2, висновки 5-8)

Викладач кафедри патофізіології

Соловйова Н.В.
(розділ 3, висновки 9-12)

РЕФЕРАТ

Досліджено кисень- та NO-залежні механізми ушкодження тонкої кишки за умов гострої тонкокишкової непрохідності (ГТКН), кісток нижньої щелепи за умов надмірного надходження в організм нітрату натрію, сперматогенезу та репродуктивної функції при дії на організм відпрацьованого моторного масла.

Показано, що активність NO-синтаз істотно впливає на продукцію супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у тканинах тонкої кишки щурів за умов ГТКН. Показано, що ефекти nNOS залежать від часу розвитку ГТКН: за умов короткотермінової ГТКН (протягом 6 годин) функціонування nNOS обмежує деполімерізацію фукоглікопротеїнів, а за умов тривалої ГТКН (протягом 18 годин) сприяє деполімерізації фуко- та сіалоглікопротеїнів сполучної тканини тонкої кишки. Селективне пригнічення iNOS обмежує порушення бар'єрної функції тонкої кишки та зменшує ризик транслокації мікроорганізмів і продуктів їхнього розпаду за межі кишки. Виявлено, що застосування перед відтворенням ГТКН L-аргініну та сквенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну обмежує у тканинах тонкої кишки продукцію O_2^- , активацію пероксидного окиснення ліпідів, зниження антиоксидантного потенціалу, падіння енергетичного потенціалу, покращує стан кишкового бар'єра. Введення L-аргініну у складі хірургічного шовного матеріалу прискорює процес загоєння паравульнарних тканин в зоні тонкокишкового анастомозу.

Виявлено, пригнічення NO-синтаз за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію вірогідно зменшує вміст фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової кислоти на ранні строки репаративного процесу. Введення неселективного інгібітора NOS збільшує деполімерізацію глікозаміногліканів на ранніх етапах репаративного остеогенезу, введення селективного інгібітора iNOS – обмежує цей процес як на ранніх, так і на пізніх строках репаративної регенерації. Введення L-аргініну обмежує процес деполімерізацію глікозаміногліканів (зменшує рівень гексуранових кислот) у кістковій тканині нижньої щелепи та істотно не впливає на катаболізм фуко- та сіалоглікопротеїнів. Утворення пероксинітриту впливає на перебіг репаративної регенерації кісткової тканини нижньої щелепи. Використання сквенджеру пероксинітриту (L-селенометіоніну) вірогідно обмежує дезорганізацію сполучної тканини кісток нижньої щелепи на ранніх строках репаративного остеогенезу. У пізній термін після моделювання перелому пероксинітрит-залежна дезорганізація сполучної тканини пов'язана, головним чином, з деполімерізацією глікозаміногліканів.

У динаміці тривалого впливу ВММ у дозі 500 мг/кг на організм білих щурів відмічається прогресуюче збільшення продукції O_2^- НАДН-залежними мітохондріальними електронно-транспортними ланцюгами клітин сім'яників та сперматозоїдів, а також НАДФН-залежними ланцюгами сперматозоїдів – цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎. Продукція O_2^- НАДФН-оксидазою лейкоцитів у тканинах сім'яників білих щурів за умов введення відпрацьованого моторного масла виявляє певну фазність: на 14-30 добу – істотно збільшується, на 90 добу – зменшується. Виявлено, що тривале введення відпрацьованого моторного масла викликає фазні зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах сім'яників білих щурів. Встановлено, що при тривалому введенні щурам-самцям ВММ у сім'яниках розвиваються прогресуючі порушення сперматогенезу, дисконфлексія, дезорієнтація, а з часом і десквамація сперматогенного епітелію.

Ключові слова: оксид азоту, супероксидного аніон-радикал, NO-синтази, пероксинітрит, L-аргінін, окиснювальний метаболізм, гостра тонкокишкова непрохідність, перелом нижньої щелепи, сім'яники, сперма, репродуктивна функція, відпрацьоване моторне масло.

ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОНАВЦІВ.....	2
РЕФЕРАТ.....	3
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	5
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. Роль NO-синтаз і пероксинітриту у патогенезі розладів окиснювального метаболізму та бар'єрної функції тонкої кишки щурів за умов її гострої непрохідності.....	8
РОЗДІЛ 2. NO-залежні механізми регенерації кісток нижньої щелепи за умов надмірного надходження в організм нітрату натрію.....	14
РОЗДІЛ 3. Роль порушень окиснювального метаболізму та сперматогенезу у патогенезі розладів репродуктивної функції при дії на організм відпрацьованого моторного масла.....	20
ВИСНОВКИ.....	26
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	28

ОСНОВНА ЧАСТИНА

ВСТУП

Відома роль активних форм кисню (АФК) та, зокрема, оксиду азоту (NO) як важливих фізіологічних регуляторів функцій організму та метаболізму клітин. Поряд з цим ці сполуки є потужними агентами, що ушкоджують, виявляють прооксидантні та апоптогенні властивості, пригнічують біоенергетичні та репаративні процеси. Розвиток патогенних ефектів АФК та NO справедливо пов'язують із збільшенням їх концентрації в тканинах, можливістю утворення більш токсичних похідних (пероксинітриду та ін.)

Нами досліджено кисень- та NO-залежні механізми ушкодження тонкої кишки за умов гострої тонкокишкової непрохідності (ГТКН), кісток нижньої щелепи за умов надмірного надходження в організм нітрату натрію, сперматогенезу та репродуктивної функції при дії на організм відпрацьованого моторного масла.

Гостра тонкокишкова непрохідність (ГТКН) все ще вважається невирішеною проблемою абдомінальної хірургії. Незважаючи на прогрес, який був досягнутий протягом останніх років, результати лікування цього захворювання не можуть задовольнити клініцистів, оскільки післяопераційна летальність залишається високою і сягає 13-17% і не має тенденції до зменшення (Жданов С.М., 2008). Відома здатність оксиду азоту (NO) впливати на широкий спектр фізіологічних і патологічних процесів у кишечнику, зокрема, на моторну функцію, кишкову секрецію й абсорбцію, механізми репарації тканин, інфекційний процес (Dijkstra G. et al., 2004; Friebe A. et al., 2007; Takeuchi K. et al., 2007; Сорокман Т.В. та співавт., 2009). У той же час повідомляється про роль NO у кишечнику як потужної цитотоксичної речовини (Sartor R., 2006; Склярів О.Я. та співавт., 2009). Одним із механізмів такої дії є утворення в реакції з супероксидним аніон-радикалом пероксинітриду (Szabó S. et al., 2007).

Дані літератури по відношенню до протективної або ж агресивної дії NO на кишечник є вкрай суперечливими. Незначна кількість публікацій присвячена ролі NO різного походження у механізмах змін рухливості кишки та бактеріальної транслокації за умов кишкової непрохідності (Samel S. et al., 2003; Palasthy Z. et al., 2005-2006). Обговорюється участь у патогенезі останньої оксиду азоту як нейрогенного походження (від гальмівних мотонейронів), так і того, що продукується макрофагами та моноцитами через індукцію індубельної NO-синтази (iNOS) (Bauer A.J. et al., 2002), а також пероксинітриду (Mirza M.H. et al., 1999). Проте не існує єдиної думки щодо участі різних ланок системи NO у механізмах розвитку ГТКН. При цьому практично відсутні дослідження про роль функціональної активності NO-синтаз та утворення пероксинітриду у патогенезі порушень слизового бар'єру кишечника, стану біоенергетичних і вільнорадикальних процесів у тканинах тонкої кишки за умов ГТКН. Відомо, що гіпоксичний і вільнорадикальний некробіоз вважаються головними механізмами патогенезу ГТКН (Шанин В.Ю., 1998; Чернов В.Н., Белик Б.М., 2008; Чуприс В.Г., 2009). Недостатньо з'ясованими також залишаються шляхи запобігання розвитку післяопераційних ускладнень, які розвиваються після резекції кишки та пов'язані, головним чином, з неспроможністю швів анастомозу. Летальність у таких випадках є високою та складає 18,2% (Дмитрук О.М., 2008). Пошук нових методів стимуляції відновлення зони тонкокишкового анастомозу з урахуванням стану системи NO може поповнити арсенал заходів, спрямованих на попередження та усунення ускладнень після формування тонкокишкового анастомозу.

Відомо, що оксид азоту є одним із продуктів метаболізму нітратів та нітритів (Ажипа, 1990; Ванін, 1995). При надлишковому надходженні, NO порушує функціональну активність залізо-мідьвмісних біополімерів, утворює в реакції з активними формами кисню потужний прооксидант пероксинітрид. Накопичення NO впливає на активацію перекисного окислення, пригнічує енергетичний обмін, обумовлює розвиток гемічної гіпоксії.

NO має неоднозначну дію на функціонування кісток. Високий рівень NO інгібує кісткову резорбцію, а також може призвести до пригнічення обміну речовин у кістковій тканині при запаленні. В той же час, як низькі концентрації NO потенціюють цитокін-індуковану резорбцію та мають важливий вплив на функціонування остеобластів. Ріст та диференціювання остеобластів пригнічуються високими концентраціями NO, який частково призупиняє дію прозапальних цитокінів на формування кісток. Також відомо, що фармакологічні донатори оксиду азоту збільшують кісткову масу в експериментальних тварин. Ендотеліальна ізоформа NO-синтази постійно представлена у кістковій тканині, тоді як індубельна NO-синтаза виявляється переважно після дії на організм флогенних факторів. Між тим, мало вивчений вплив індукції та пригнічення NO-синтаз, а також пероксинітриду (який утворюється при взаємодії NO з супероксидним аніон-радикалом) на перебіг репаративної регенерації кісткової тканини. Невідомими залишаються зміни репаративних процесів у кістковій тканині нижньої щелепи після її перелому за умов надмірного надходження нітрату натрію. Недостатньо з'ясованою залишається

роль NO-синтаз та пероксинітриту в процесі репаративної регенерації кісткової тканини нижньої щелепи.

Репродуктивна функція людини вважається однією з найбільш вразливих та найменш захищених, а її порушення залишаються в числі ключових соціальних і медичних проблем як в Україні, так і за кордоном (Іванюта Л.І., Іванюта С.О., 2005; Carlsen E. et al., 2005, Fathalla M.F. et al., 2006). Звертає на себе увагу тенденція до зростання питомої ваги чоловічого фактора у патогенезі неплідності. За останні 20 років вона змінилася з 30 до 50% і продовжує зростати (Jouannet P. et al., 2001; Павлова Л.П. та співавт., 2002).

Більшість авторів пов'язують погіршення показників репродуктивного здоров'я чоловіків з антропогенним забрудненням навколишнього середовища (Имшинецкая Л.П., Сапсай В.И., Сапсай А.В., 2005; Aitken R.J. et al., 2006; Swan S.H., 2006). Сперматогенез чутливий до дії таких патогенних агентів, як травма та ішемія, підвищена температура навколишнього середовища, недостатній світловий режим, вплив електромагнітного опромінення, хімічних речовин. Недостатньо у плані можливості гонадотоксичної дії досліджені нафтові масла. Найбільша частка у загальному споживанні останніх в Україні припадає на моторні (74,1%) та індустріальні (21,4%) оливи (Чайка О.Г. та співавт., 2009). За час експлуатації вони зазнають глибоких хімічних перетворень з утворенням пероксидів, фенолів, спиртів, альдегідів, ароматичних вуглеводнів і смолистих речовин (Каменчук Я.А., 2007). У літературі є дані про розвиток дисбалансу статевих гормонів при дії відпрацьованих моторних масел (ВММ) на організм (Lu F.C., 1991; Ssempebwa J. et al., 2004). Виявлена гонадотоксичність низки речовин, які у складі присадок додаються до автомобільних масел (цинк, свинець, кадмій, молібден) (Трахтенберг И.М., Андрусишина И.Н., 2000; Pandey R. et al., 2002; Шиш Н.В., Бобырев В.Н., 2006; Akinloye O. et al., 2006; Khan A.T. et al., 2007; Martynowicz H. et al., 2005).

Проте відомо, що ізольована дія токсикантів може значно відрізнятися від сукупного ефекту їх комплексу у складі певного продукту (Калетина Н.И., Калетин Г.И., 2007; Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А., 2008). З цієї точки зору, механізми токсичної дії ВММ на репродуктивну функцію вивчені недостатньо. Відсутні дані щодо змін вільнорадикального окиснення біополімерів та енергетичного обміну у сім'яниках і спермі при тривалому надходженні ВММ в організм. Відомо, що стан окиснювальних процесів значною мірою визначає інтенсивність сперматогенезу та функціональний стан спермій, що утворилися (Aitken R.J. et al., 1998-2008; Цебржинский О.И. та співавт., 2008; de Lamirande E., O'Flaherty C., 2008; Шоста А.М., 2009).

Мета і задачі дослідження. Метою дослідження є розкриття кисень- та NO-залежних механізмів, що обумовлюють патологічні зміни тонкої кишки за умов гострої тонкокишкової непрохідності (ГТКН), порушення репаративної регенерації кісток нижньої щелепи за умов надмірного надходження в організм нітрату натрію, сперматогенезу та репродуктивної функції при дії на організм відпрацьованого моторного масла.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі задачі дослідження:

1. Дослідити стан вільнорадикальних процесів (продукцію активних форм кисню, пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ), антиоксидантної (АО) системи) у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов введення неселективного та селективних інгібіторів NO-синтаз, субстрату NO-синтазної реакції (L-аргініну) та скевенджеру пероксинітриту. Дослідити стан біоенергетичних процесів (вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів, енергетичного потенціалу) у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов введення неселективного та селективних інгібіторів NO-синтаз, субстрату NO-синтазної реакції (L-аргініну) та скевенджеру пероксинітриту. Дослідити біохімічний стан сполучної тканини та бар'єрну функцію тонкої кишки білих щурів за умов введення неселективного та селективних інгібіторів NO-синтаз, субстрату NO-синтазної реакції (L-аргініну) та скевенджеру пероксинітриту.

2. Дослідити репаративні процеси у зоні тонкокишкового анастомозу у динаміці післяопераційного періоду після резекції тонкої кишки з модельованою непрохідністю за умов введення L-аргініну у складі хірургічного шовного матеріалу (ХШМ).

3. Дослідити біохімічний стан кісткової тканини нижньої щелепи, її тензометричні властивості та стан показників сполучної тканини сироватки крові щурів за умов 60-денної інтоксикації нітратом натрію. ослідити біохімічний стан кісткової тканини нижньої щелепи, її тензометричні властивості, морфологічні зміни та стан показників сполучної тканини сироватки крові щурів за умов моделювання перелому на тлі хронічної нітратної інтоксикації та без неї. ослідити біохімічний стан кісткової тканини нижньої щелепи, її тензометричні властивості та стан показників сполучної тканини сироватки крові білих щурів за умов моделювання перелому на тлі хронічної нітратної інтоксикації за умов введення неселективного та селективних інгібіторів NO-синтаз, субстрату NO-синтазної реакції (L-аргініну) та скевенджеру пероксинітриту.

4. Дослідити рівень продукції супероксидного аніон-радикала мітохондріальним і мікосомальним електронно-транспортними ланцюгами та НАДФН-оксидазою лейкоцитів, стан

пероксидного окиснення ліпідів і зміни антиоксидантного захисту в сім'яниках білих щурів за умов дії на організм відпрацьованого автомобільного масла. Дослідити вміст та співвідношення аденіннуклеотидів у сім'яниках білих щурів за умов дії на організм відпрацьованого моторного масла. Дослідити рівень продукції супероксидного аніон-радикала електронно-транспортними ланцюгами сперматозоїдів і стан у них біоенергетичних процесів за умов дії на організм відпрацьованого моторного масла;

5. Встановити характер морфологічних змін у сім'яниках білих щурів за умов дії на організм відпрацьованого моторного масла. Вивчити зміни функціонального стану сперми білих щурів та показники їх репродуктивної діяльності за умов дії на організм відпрацьованого моторного масла.

Наукова новизна роботи. Вперше виявлено, що активність NO-синтаз істотно впливає на продукцію супероксидного аніон-радикала (O_2^-) у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов ГТКН. Показано, що продукція O_2^- мітохондріальним ЕТЛ при короткочасній (протягом 6 годин) ГТКН пов'язана з функціонуванням iNOS, при тривалій (протягом 18 годин) – iNOS та нейрональної NO-синтази (nNOS). Вперше виявлено, що за умов короткочасної (6 годин) ГТКН зниження концентрації макроергічних сполук та енергетичного потенціалу в тканинах тонкої кишки пов'язано з активністю iNOS, а при тривалій (18 годин) – iNOS та nNOS.

Вперше виявлено, що за умов ГТКН (протягом 6 та 18 годин) функціонування iNOS викликає дезорганізацію сполучної тканини тонкої кишки; селективне пригнічення iNOS аміногуанідином супроводжується зменшенням концентрації мономерів глікопротеїнів та глікозаміногліканів сполучної тканини тонкої кишки, покращує стан кишкового бар'єра та знижують рівень летальності тварин (протягом 18 годин після відтворення ГТКН). Показано, що ефекти nNOS залежать від часу розвитку ГТКН: за умов короткотермівової ГТКН (протягом 6 годин) функціонування nNOS обмежує деполімерізацію фукоглікопротеїнів, а за умов тривалої ГТКН (протягом 18 годин) сприяє деполімерізації фуко- та сіалоглікопротеїнів сполучної тканини тонкої кишки. Селективне пригнічення iNOS обмежує порушення бар'єрної функції тонкої кишки та зменшує ризик транслокації мікроорганізмів і продуктів їхнього розпаду за межі кишки.

Вперше виявлено, що застосування перед відтворенням ГТКН L-аргініну та скевенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну обмежує у тканинах тонкої кишки продукцію O_2^- , активацію ПОЛ, зниження антиоксидантного потенціалу та активності АО ферментів (супероксиддисмутази та каталази), падіння енергетичного потенціалу, покращує стан кишкового бар'єра. Введення L-аргініну у складі хірургічного шовного матеріалу прискорює процес загоєння паравульнарних тканин в зоні тонкокишкового анастомозу, прискорює перехід ранового запалення на моноцитарно-макрофагальну та фібробластичну стадії.

Вперше виявлено, що хронічна інтоксикація нітратом натрію призводить до вірогідного підвищення рівнів фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової кислоти та гексуринових кислот у кістковій тканині нижньої щелепи, при сталих показниках мінерального компоненту, що свідчить про більшу чутливість органічного матриксу та деполімерізацію фуко- та сіалоглікопротеїнів та глікозаміногліканів. Виявлено, що хронічна нітратна інтоксикація супроводжується вивільненням продуктів дезорганізації глікозаміногліканів із кісткової тканини у кров, (збільшення рівня сироваткових хондроїтинсульфатів при сталих показниках глікопротеїнів), викликає системні порушення сполучної тканини щурів (підвищується рівень загальних глікозаміногліканів, їхньої 3-ї фракції (гепарансульфату) та зменшується рівень хондроїтин-4-сульфату сироватки крові).

Вперше виявлено, відтворення перелому нижньої щелепи на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію потенціює дезорганізацію сполучної тканини, що супроводжується збільшенням концентрації складових біополімерів сполучнотканинних структур нижньощелепних кісток. Мінеральний компонент майже не зазнає вірогідних змін. Хронічна нітратна інтоксикація при відтворенні експериментального перелому нижньої щелепи щурів уповільнює процес репаративної регенерації, затримує динаміку диференціювання остеобластів і клітинних елементів мікроциркуляторного русла у ділянці кісткового мозолу, що формується, порушує формування первинних кісткових балок.

Вперше виявлено, що пригнічення NO-синтаз вірогідно зменшує вміст фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової кислоти на ранні строки репаративного процесу. Введення неселективного інгібітора NOS збільшує деполімерізацію глікозаміногліканів на ранніх етапах репаративного остеогенезу, введення селективного інгібітора iNOS – обмежує цей процес як на ранніх, так і на пізніх строках репаративної регенерації. Введення L-аргініну обмежує процес деполімерізацію глікозаміногліканів (зменшує рівень гексуринових кислот) у кістковій тканині нижньої щелепи та істотно не впливає на катаболізм фуко- та сіалоглікопротеїнів. Утворення пероксинітриду впливає на перебіг репаративної регенерації кісткової тканини нижньої щелепи. Використання скевенджеру пероксинітриду (L-селенометіоніну) вірогідно обмежує дезорганізацію сполучної тканини кісток нижньої щелепи

(зменшує рівень хондроїтинсульфатів, фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової кислоти та гексуронових кислот) на ранніх строках репаративного остеогенезу. У пізній термін після моделювання перелому пероксинітрит-залежна дезорганізація сполучної тканини пов'язана, головним чином, з деполімеризацією глікозаміногліканів.

Вперше виявлено, що у динаміці тривалого впливу ВММ на організм білих щурів відмічається прогресуюче збільшення продукції O_2^- НАДН-залежними мітохондріальними електронно-транспортними ланцюгами клітин сім'яників та сперматозоїдів, а також НАДФН-залежними ланцюгами сперматозоїдів – цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎. Продукція O_2^- НАДФН-оксидазою лейкоцитів у тканинах сім'яників білих щурів за умов введення відпрацьованого моторного масла виявляє певну фазність: на 14-30 добу – істотно збільшується, на 90 добу – зменшується.

Вперше виявлено, що тривале введення ВММ викликає фазні зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах сім'яників білих щурів: на 14 добу експеримента – підсилюється ресинтез макроергів, у подальшому – істотне пригнічення біоенергетичних процесів з прогресуючим зниженням енергетичного потенціалу у сім'яниках, зменшення концентрація АТФ та підвищення вмісту фруктози у сперміях, що свідчить про пригнічення фруктолізу.

Вперше виявлено, що при тривалому введенні шурам-самцям ВММ у сім'яниках розвиваються прогресуючі порушення сперматогенезу, дисконкомплексція, дезорієнтація, а з часом і десквамація сперматогенного епітелію. Кількісні та якісні порушення сперматозоїдів починають формуватися на 30 добу: підвищується число нежиттєздатних та патологічних форм гамет, збільшується кількість клітин з аномаліями голівки, шийки та зі змішаними дефектами, збільшується кількість акінетичних сперматозоїдів, на 90 добу у тварин розвивається стан астенозооспермії.

Вперше виявлено, що тривале надходження ВММ до організму самців (протягом 12 тижнів) призводить до суттєвих змін їхньої здатності до запліднення, що виявляється у порушенні репродуктивної функції спарених із ними інтактних самок, збільшенні загальної та постімплантаційної летальності, істотному зниженні індексів фертильності та плідності.

Практичне значення роботи. Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів корекції процесів вільнорадикального та гіпоксичного некробіозу тканин тонкої кишки за умов ГТКН засобами, що впливають на активність ізоформ NOS, L-аргініном та скевенджерами пероксинітриту. Розроблений спосіб одержання резорбтивного біологічно активного шовного матеріалу (пат. 39088) з введенням L-аргініну у структуру хірургічної нитки може бути рекомендований для доклінічних та клінічних випробувань з подальшим застосуванням модифікованого ХШМ у практиці абдомінальної хірургії.

Одержані результати можуть використовуватися як експериментальна база для розробки патогенетично обґрунтованих методів корекції функціонально-метаболічних розладів органів чоловічої репродуктивної системи за умов дії нафтових масел на організм людини та тварин. Результати роботи впроваджено в лікувально-профілактичну діяльність профілактично-оздоровчого центру Полтавського відділення бурових робіт БУ «Укрбургаз» ДК «Укргазвидобування» та медичної частини Полтавського відділення технологічного транспорту і спецтехніки БУ «Укрбургаз» ДК «Укргазвидобування».

РОЗДІЛ 1.

Роль NO-синтаз і пероксинітриту у патогенезі розладів окиснювального метаболізму та бар'єрної функції тонкої кишки щурів за умов її гострої непрохідності.

1.1. Матеріали та методи дослідження

Експерименти виконані на 165 білих щурах лінії Вістар масою 180-240 г. При роботі з тваринами дотримувалися вимог “Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях” (Страсбург, 20.09.1985 р.). Комісією з питань біоетики Вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія” (протокол № 78 від 19 січня 2010 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Проведено десять серій дослідів: у першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварини (контрольна); у другій – відтворювали ГТКН (контрольна); у третій, четвертій та п'ятій серіях – тваринам з модельованою ГТКН вводили відповідно неселективний інгібітор NO-синтаз (NOS) – метиловий ефір нітро-L-аргініну (L-NAME) виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 5 мг/кг (Laude K. et al., 2003), селективний інгібітор нейрональної NO-синтази (nNOS) – 7-нітроіндазол (7-NI) виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 30 мг/кг (Laude K. et al., 2003) та селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 20 мг/кг (Takeuchi K. et al., 2007); у

шостій і сьомій серіях – щурам з ГТКН вводили відповідно субстрат NOS – L-аргінін (L-Arg) виробництва “Kyowa Hakko Kogyo Co LTD” (Японія) в дозі 500 мг/кг (Дробінська О. та співавт., 2004) та скевенджер пероксинітриду – L-селенометіонін (L-Sem) виробництва “Sigma-Aldrich, Inc.” (США) в дозі 3 мг/кг (Laude K. et al., 2003); у восьмій серії – інтактним щурам виконували несправжню операцію (операція обмежувалася введенням тварин у наркоз та розрізом та зшиванням шкіри, без травмування тонкої кишки та імплантації ХШМ) (контрольна); у дев'ятій серії – щурам після відтворення ГТКН виконували операцію формування тонкокишкового анастомозу із застосуванням немодифікованого ХШМ (контрольна); у десятій серії – щурам після відтворення ГТКН виконували операцію формування тонкокишкового анастомозу анастомозу із застосуванням ХШМ, модифікованого L-Arg.

У серіях дослідів № 3-7 наведені сполуки вводили внутрішньоочеревино за 20 хв до початку відтворення ГТКН.

Евтаназію тварин проводили методом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом.

Для експериментального моделювання ГТКН у лабораторних щурів під тіопенталовим наркозом (40 мг на 1 кг маси тіла) виконували лапаротомію, в рану виводили петлю тонкої кишки, знаходили і перев'язували одну з магістральних вен брижі. Кишку складали за типом “двостволки” (Лігоненко О.В. та співавт., 2007).

Резекцію кишки проводили під тіопенталовим наркозом (40 мг на 1 кг маси тіла), формували тонкокишковий анастомоз за типом „бік у бік”.

L-Arg виробництва “Kyowa Hakko Kogyo Co LTD” (Японія) іммобілізували на хірургічних нитках (кетгуті зі свинячої сировини виробництва НВП “Медар”, м. Полтава) електролізним методом згідно з патентом України № 39088, підготовленим з нашою участю. Цей спосіб іммобілізації L-Arg на кетгут дозволяє отримати концентрацію препарату $0,050 \pm 0,005$ г/м нитки.

Біохімічні методи дослідження. Утворення супероксидного аніон-радикалу (O_2^-) оцінювали шляхом проведення тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ) (Цебржинский О.И., 2002). При цьому оцінювали продукцію O_2^- мікосомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) та НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів в гомогенаті тканин тонкої кишки за умов введення відповідних індукторів (НАДН, НАДФН, пірогенал).

Рівень пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканинах оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметінового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації у залізо-аскорбатному буферному розчині (Кайдашев І.П. та співавт., 2003).

Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час півторагодинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) (Брусков О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф., 1976) та каталази (Архипова О.Г., 1988).

Вміст аденозинтрифосфату (АТФ) визначали за методом E. Beutler (1975), в основі якого знаходиться вимірювання оптичної густини реагуючих речовин, яка пропорційна вмісту АТФ у пробі. Вміст аденозинди- та монофосфату (АДФ і АМФ) визначали за методом D. Jaworeck et al. (1974) в одній пробі за допомогою сполучених реакцій. На основі одержаних результатів обчислювали значення енергетичного потенціалу (ЕП) за формулою D.E. Atkinson (1968).

Стан біополімерів сполучної тканини органів травлення визначали шляхом оцінки вмісту фукоглікопротеїнів - за концентрацією фукози, незв'язаної з білками (Шараев П.Н. та співавт., 1997), а також продуктів деградації сіалоглікопротеїнів - за концентрацією N-ацетилнейрамінової кислоти – NANA (Кайдашев І.П. та співавт., 2003) та глікозаміногліканів - за концентрацією гексуранових кислот (Шараев П.Н. и др., 1987).

Методи дослідження бар'єрної функції тонкої кишки. Для оцінки бар'єрної функції тонкої кишки щурам інтрагастрально вводили 0,5 мл 1% розчину метиленового синього і 0,01 г тетрацикліну гідрохлориду, розчиненого у 1 мл 0,5 % гідрокарбонату натрію (Лігоненко О.В. та співавт., 2007).

Морфологічні методи дослідження. Для оглядової мікроскопії застосовували фарбування гематоксилином і еозином і пікрофуксином за Ван-Гізона. Дослідження зрізів проводили на цифровому мікроскопі фірми Olympus "BX 41". Морфометричний аналіз було здійснено на зрізах шляхом підрахунку клітин різних класів методом стандартних площ (Автандилов Г.Г., 1990). Для проведення підрахунку клітин з кожної серії зрізів методом випадкових чисел було відібрано по 5. У кожному з них визначалася кількість нейтрофілів, макрофагів, лімфоцитів, плазматичних клітин і клітин фібробластичного ряду у 5 полях зору біокулярного мікроскопа (x900).

Отримані дані піддавали статистичній обробці (Гланц С., 1999; Реброва О.Ю., 2002). 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. Для аналізу відмінностей частот у незалежних групах досліджень для перевірки нульової статистичної гіпотези про пропорційність частот застосовували розрахунок точного критерію Фішера, Статистичні розрахунки проводили з використанням програм "Microsoft Excel 2007" та "StatisticSoft 6.0".

1.2. Зміни окиснювальних процесів у тканинах тонкої кишки за умов її непрохідності та змін функціонування системи оксиду азоту

Через 6 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки відмічається суттєве збільшення продукції O_2^- мікосомальним і мітохондріальним ЕТЛ відповідно на 46.4% ($p < 0,001$) та 45.0% ($p < 0,001$), а також НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів – на 46.3% ($p < 0,01$).

Нами виявлено, що на продукцію O_2^- у тканинах тонкої кишки у значній мірі впливає функціональна активність NOS. Так, введення L-NAME перед відтворенням 6-годинної ГТКН обмежує підвищення вироблення O_2^- мікосомальним ЕТЛ у тканинах тонкої кишки – на 18.2 % ($p < 0,001$), проте збільшує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ – на 12.3% ($p < 0,02$). Введення 7-NI обмежує зростання вироблення O_2^- мікосомальним ЕТЛ – на 22.5% ($p < 0,001$) та істотно не позначається на продукції O_2^- мітохондріями та лейкоцитами. Введення аміногуанідину попереджає збільшення продукції O_2^- у тканинах тонкої кишки за умов ГТКН. При цьому вироблення O_2^- мікосомальним і мітохондріальним ЕТЛ відповідно на 35.7% ($p < 0,001$) та 17.4% ($p < 0,001$) поступається даним другої серії (з відтворенням ГТКН).

Збільшення продукції O_2^- мітохондріальним ЕТЛ при неселективному пригніченні NOS, очевидно, пов'язано із здатністю NO, що продукується конституційними NOS, викликати ефекти протилежні таким, що викликаються NO, джерелом якого є iNOS.

Примітно, що введення білим щурам L-Arg перед моделюванням 6-годинної ГТКН також не тільки не сприяє збільшенню продукції O_2^- , але й обмежує цей процес. Так, вироблення O_2^- мікосомальним ЕТЛ за цих умов зменшується – на 16.0% ($p < 0,01$), мітохондріальним ЕТЛ – на 15.7% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

L-Sem за умов 6-годинної ГТКН неоднозначно впливає на продукцію O_2^- різними джерелами у тканинах тонкої кишки: достовірно не позначається на виробленні O_2^- мікосомальним ЕТЛ, обмежує його продукцію мітохондріальним ЕТЛ (на 13.4%, $p < 0,02$), збільшує вироблення O_2^- НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів (на 19.6%, $p < 0,05$) у порівнянні з даними другої серії.

У динаміці ГТКН продукція O_2^- у тканинах тонкої кишки збільшується. Через 18 годин після відтворення ГТКН вироблення O_2^- мікосомальним, мітохондріальним ЕТЛ та НАДФН-оксидазою лейкоцитів у тканинах тонкої кишки – відповідно на 80.2% ($p < 0,001$), 84.7% ($p < 0,001$) та 68.5% ($p < 0,01$) перевищує дані інтактної серії.

Введення L-NAME перед відтворенням моделі 18-годинної ГТКН обмежує підвищення продукції O_2^- у тканинах тонкої кишки мікосомальним і мітохондріальним ЕТЛ – відповідно на 34.7% ($p < 0,001$) та 12.1% ($p < 0,01$). При введення 7-NI результати дослідження подібні до даних попередньої серії: вироблення O_2^- у тканинах тонкої кишки мікосомальним і мітохондріальним ЕТЛ відповідно на 35.5% ($p < 0,001$) та 12.8% ($p < 0,001$) поступається даним другої серії (з відтворенням ГТКН). Введення аміногуанідину перед відтворенням моделі 18-годинної ГТКН попереджає збільшення продукції O_2^- у тканинах тонкої кишки мікосомальним ЕТЛ – на 39.7% ($p < 0,001$), мітохондріальним ЕТЛ – на 17.0% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

При введенні L-Arg перед відтворенням 18-годинної ГТКН, як і за умов 6-годинної ГТКН, виявляється обмеження продукції O_2^- мікосомальним і мітохондріальним ЕТЛ – відповідно на 9.5% ($p < 0,02$) та 9.2% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

Введення L-Sem за умов 18-годинної ГТКН достовірно не впливає на продукцію O_2^- мікосомальним ЕТЛ – на 13.0% ($p < 0,02$) та НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів у тканинах тонкої кишки, проте обмежує вироблення O_2^- мітохондріальним ЕТЛ (на 19.9%, $p < 0,001$). Таким чином, збільшується кількість O_2^- , вироблення якого пов'язано з участю пероксинітриду.

Через 6 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки відмічається вірогідне зростання концентрації ТБК-реактивів до інкубації – на 38.0% ($p < 0,001$) – та після 1,5-годинної інкубації тканин в залізоаскорбатному буферному розчині – на 36.2% ($p < 0,05$); спостерігається суттєве підвищення приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації – на 31.9% ($p < 0,05$), що вказує на розвиток антиоксидантної недостатності у тканинах тонкої кишки.

Введення L-NAME та 7-NI перед відтворенням 6-годинної ГТКН збільшує концентрацію ТБК-реактивів (до інкубації) – відповідно на 9.5% ($p < 0,02$) та 16.7% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними другої серії (з відтворенням ГТКН). Це вказує на здатність конститутивних NOS чинити протективну дію щодо активації ПОЛ.

У той же час введення аміногуанідину обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів (до інкубації), яка на 17.4% ($p < 0,001$) поступається даним другої серії. Введення щуром L-Arg також достовірно обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів (до інкубації), яка на 17.8% ($p < 0,001$) поступається даним другої серії.

Примітно, що L-Sem, введений перед відтворенням 6-годинної ГТКН, достовірно не позначається на величині концентрації ТБК-реактивів у порівнянні з результатом другої серії.

Через 18 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки прогресує утворення вторинних продуктів пероксидації: у порівнянні з даними першої серії концентрація ТБК-реактивів до інкубації зростає – на 56.9% ($p < 0,001$), після 1,5-годинної інкубації тканин в залізоаскорбатному буферному розчині – на 62.0% ($p < 0,001$), приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації – на 74.8% ($p < 0,001$), що вказує на розвиток декомпенсованої антиоксидантної недостатності у тканинах тонкої кишки.

Введення L-NAME та 7-NI перед відтворенням 18-годинної ГТКН достовірно не позначаються на концентрації ТБК-реактивів. Введення аміногуанідину істотно обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів (до інкубації) та приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації, які відповідно на 16.8% ($p < 0,01$) та 19.5% ($p < 0,05$) поступаються даним другої серії. Введення L-Arg достовірно обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів до інкубації – на 18.3% ($p < 0,01$), концентрації ТБК-реактивів після інкубації – на 19.7% ($p < 0,05$), а також приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації – на 22.9% ($p < 0,02$) у порівнянні з відповідними результатами другої серії. Введення L-Sem також достовірно обмежує підвищення концентрації ТБК-реактивів до інкубації – на 18.9% ($p < 0,01$), концентрації ТБК-реактивів після інкубації – на 20.5% ($p < 0,02$), а також приросту концентрації ТБК-реактивів за час інкубації – на 24.2% ($p < 0,01$) у порівнянні з відповідними результатами другої серії.

Через 6 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки вірогідно зростає активність АО ферментів: СОД – на 20.7% ($p < 0,01$), каталази – на 28.7% ($p < 0,01$).

Введення L-NAME та аміногуанідину перед відтворенням 6-годинної ГТКН збільшує активність СОД у тканинах тонкої кишки – відповідно на 25.7% ($p < 0,01$) та 27.1% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними другої серії. Введення аміногуанідину збільшує активність каталази у тканинах тонкої кишки – на 31.3% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії (з відтворенням ГТКН). У той же час введення 7-NI перед відтворенням 6-годинної ГТКН достовірно не позначається на активності СОД і каталази.

Введення щуром L-Arg та L-Sem перед моделюванням 6-годинної ГТКН достовірно не впливає на активність СОД і каталази у порівнянні з даними другої серії.

Через 18 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки активність АО ферментів на відміну від даних серії з моделюванням 6-годинної ГТКН вірогідно зменшується: СОД – на 41.4% ($p < 0,001$), каталази – на 37.8% ($p < 0,001$).

Введення L-NAME та селективних інгібіторів nNOS (7-NI) та iNOS (аміногуанідину) перед відтворенням 18-годинної ГТКН збільшує активність СОД у тканинах тонкої кишки – відповідно на 41.2% ($p < 0,001$), 48.5% ($p < 0,01$) (майже до величини інтактної серії) та 44.1% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними другої серії (з відтворенням ГТКН). Введення L-NAME та аміногуанідину збільшує активність каталази у тканинах тонкої кишки до величини, що достовірно не відрізняється від даних інтактної серії, та на 39.2% ($p < 0,02$) і 53.9% ($p < 0,02$) перевищує відповідний результат другої серії.

Введення щуром L-Arg перед моделюванням 18-годинної ГТКН підвищує активність СОД у тканинах тонкої кишки – на 55.9% ($p < 0,01$), тобто до величини, що достовірно не відрізняється від даних інтактної серії. Введення щуром L-Sem за цих умов підвищує активність СОД та каталази у тканинах тонкої кишки – відповідно на 30.9% ($p < 0,05$) та 49.0% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними другої серії (з відтворенням ГТКН).

Через 6 годин після відтворення ГТКН у тканинах стандартної ділянки тонкої кишки відмічаються істотні порушення енергетичного обміну. Вміст АТФ і АДФ знижується відповідно на 19.5% ($p < 0,001$) та 15.5% ($p < 0,05$); АМФ підвищується в 3,7 рази ($p < 0,001$). Енергетичний потенціал достовірно знижується (на 20.9%, $p < 0,001$). Все це свідчить про значне зниження ресинтезу макроергічних сполук.

Нами виявлено, що вміст та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах тонкої кишки у значній мірі залежать від функціональної активності NOS. Так, введення L-NAME перед відтворенням 6-годинної ГТКН призводить до достовірного підвищення концентрації АТФ і АДФ відповідно на 11.4% ($p < 0,01$) та 15.0% ($p < 0,05$), енергетичного потенціалу на 13.2% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними серії з відтворенням ГТКН. Вміст АМФ знижується на 38.8% ($p < 0,001$).

Основний внесок у продукцію NO у тканинах тонкої кишки перед відтворенням 6-годинної ГТКН, очевидно, має iNOS. Це підтверджує той факт, що саме її інгібування шляхом введення аміногуанідину збільшує вміст АТФ на 11.4% ($p < 0,05$), енергетичний потенціал – на 12.8% ($p < 0,001$). Вміст АМФ знижується на 34.3% ($p < 0,001$). Введення 7-NI за цих умов не викликає статистично достовірних відмінностей величин концентрації аденіннуклеотидів у тканинах тонкої кишки у порівнянні з контрольною серією з відтворенням відповідного терміну ГТКН.

Проте введення білим щурам L-Arg перед моделюванням 6-годинної ГТКН збільшує концентрацію АТФ на 16.7% ($p < 0,02$), енергетичний потенціал – на 16.4% ($p < 0,001$). Вміст АМФ знижується на 44.8% ($p < 0,001$).

Вплив L-Sem за умов 6-годинної ГТКН збільшує концентрацію АТФ на 19.7% ($p < 0,01$), енергетичний потенціал – на 19.6% ($p < 0,001$). Вміст АМФ знижується на 53.7% ($p < 0,001$). Це підтверджує участь пероксинітриду у розвитку біоенергетичної недостатності у ранньому періоді ГТКН.

У динаміці ГТКН відмічається прогресуюче пригнічення енергетичного обміну у тканинах тонкої кишки. Через 18 годин після відтворення ГТКН концентрації АТФ і АДФ знижуються відповідно на 52.4% ($p < 0,001$) та 26.8% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними інтактною серії. Вміст АМФ підвищується у 4,9 рази ($p < 0,001$). Енергетичний потенціал зменшується на 39.6% ($p < 0,001$).

Введення L-NAME перед відтворенням моделі 18-годинної ГТКН також призводить до достовірного підвищення концентрації АТФ на 76.9% ($p < 0,001$), енергетичного потенціалу на 40.1% ($p < 0,001$) у порівнянні з даними серії з відтворенням ГТКН. Вміст АМФ знижується на 37.5% ($p < 0,001$).

Проте суттєвий внесок у продукцію NO у тканинах тонкої кишки перед відтворенням 18-годинної ГТКН, має не тільки iNOS, але і nNOS. Так, при введенні аміногуанідину перед відтворенням ГТКН вміст АТФ на 82.1% ($p < 0,001$), енергетичний потенціал – на 46.2% ($p < 0,001$) перевищують дані серії з відтворенням ГТКН. Вміст АМФ поступається останній на 46.6% ($p < 0,001$). При введенні 7-NI – концентрація АТФ на 83.3% ($p < 0,001$), а енергетичний потенціал на 47.9% ($p < 0,001$) перевищують дані серії з відтворенням ГТКН. Вміст АМФ знижується на 47.7% ($p < 0,001$).

У той же час, при введенні L-Arg перед відтворенням 18-годинної ГТКН достовірних відмінностей величин концентрації аденіннуклеотидів у тканинах тонкої кишки у порівнянні з серією з моделюванням відповідного терміну ГТКН не виявлено. Тобто L-Arg у дозі 500 мг/кг виявляє здатність підвищувати біоенергетичні процеси у тканинах тонкої кишки за умов її непрохідності тільки у ранній період розвитку цієї патології (протягом 6 годин розвитку).

При введенні L-Sem за умов 18-годинної ГТКН вміст АТФ на 56.4% ($p < 0,01$), енергетичний потенціал – на 25.8% ($p < 0,001$) перевищують дані серії з відтворенням ГТКН.

Це вказує на те, що на 18 годину розвитку ГТКН також виявляється роль пероксинітриду у пригніченні енергетичного обміну у тканинах тонкої кишки, проте природи показників концентрації АТФ і енергетичного потенціалу при введенні L-Sem в цей термін істотно поступаються таким при неселективному та селективному інгібуванні NOS. Це, очевидно, вказує на значний внесок власне NO у розвиток біоенергетичної недостатності тканин кишки за умов ГТКН.

1.3. Стан бар'єрної функції тонкої кишки за умов її непрохідності та змін функціонування системи оксиду азоту

Через 6 годин після відтворення ГТКН відмічаються істотні зміни вмісту мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки. Вміст фукози, NANA та гексуранових кислот підвищується відповідно на 39.1% ($p < 0,01$), 45.8% ($p < 0,02$) та 46.9% ($p < 0,001$). Все це свідчить про дезорганізацією сполучної тканини тонкої кишки внаслідок деполімеризації глікопротеїнів і протеогліканів.

Нами виявлено, що вміст мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки за умов ГТКН у значній мірі залежать від функціональної активності певних ізоформ NOS. Так, якщо введення 7-NI перед відтворенням 6-годинної ГТКН достовірно підвищує концентрацію фукози (на 18.7%, $p < 0,02$), то введення аміногуанідину знижує вміст фукози, NANA та гексуранових кислот відповідно на 18.8% ($p < 0,02$), 26.7% ($p < 0,05$) та 21.5% ($p < 0,01$). Таким чином, nNOS у цей період формування ГТКН виконує протективну функцію щодо стану фукоглікопротеїнів.

Введення L-NAME перед відтворенням 6-годинної ГТКН достовірно знижує концентрацію NANA та гексуранових кислот відповідно на 26.7% ($p < 0,05$) та 22.9% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другою серії. Введення білим щурам L-Arg знижує вміст фукози та NANA відповідно на 21.9% ($p < 0,05$)

та 30.2% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії. Вплив L-Sem за цих умов істотно зменшує концентрацію усіх мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки, що досліджувалися. Так, вміст фукози знижується – на 28.1% ($p < 0,01$), NANA – на 31.4% ($p < 0,01$) та гексуринових кислот – на 25.0% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії.

У динаміці ГТКН відмічається, що процес деполімеризації глікопротеїнів і протеогліканів зростає, про що свідчить прогресуюче збільшення мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки. Через 18 годин після відтворення ГТКН концентрації фукози, NANA та гексуринових кислот підвищуються відповідно в 3.3 рази ($p < 0,001$), 2.1 рази ($p < 0,001$) та 1.7 рази ($p < 0,001$) у порівнянні з даними першої серії.

Введення L-NAME перед відтворенням моделі 18-годинної ГТКН також достовірно зменшує концентрацію фукози та NANA – відповідно на 26.3% ($p < 0,01$) та 29.4% ($p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії. Звертає на себе увагу, що за цих умов введення 7-NI не тільки не збільшує вміст фукози у тканинах тонкої кишки, але й достовірно його знижує (на 18.4%, $p < 0,01$) у порівнянні з даними другої серії. Введення 7-NI також достовірно зменшує концентрацію NANA – на 27.0% ($p < 0,01$). Введення аміногуанідину знижує концентрацію усіх мономерів сполучнотканинних структур тонкої кишки, що досліджувалися, – фукози – на 31.6% ($p < 0,001$), NANA – на 35.7% ($p < 0,01$), гексуринових кислот – на 18.6% ($p < 0,02$).

Введення L-Arg перед відтворенням 18-годинної ГТКН, як і за умов моделювання 6-годинної непрохідності, достовірно знижує вміст фукози та NANA – відповідно на 15.8% ($p < 0,02$) та 23.8% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними другої серії. Виявлена нами в указаний термін ГТКН відсутність достовірної протекторної дії NOS на вміст мономерів глікопротеїнів і протеогліканів підтверджує думку, що цей ефект L-Arg не є пов'язаним з NO-синтазним механізмом.

Як і за умов 6-годинної ГТКН, L-Sem при відтворенні 18-годинної непрохідності зменшує концентрацію фукози, NANA та гексуринових кислот – відповідно на 35.5% ($p < 0,01$), 33.3% ($p < 0,02$) та 22.8% ($p < 0,05$) у порівнянні з даними другої серії, що підтверджує стійкий характер пероксинітрид-залежної дезорганізації сполучної тканини тонкої кишки за умов ГТКН.

Вивчення бар'єрної функції кишки, з порушенням якої пов'язані терміни та шляхи інфікування черевної порожнини через транслокацію мікрофлори з тонкої кишки, виконували шляхом інтрагастрального введення 0,5 мл 1% розчину метиленового синього і 0,01 г тетрацикліну гідрохлориду, розчиненого у 1 мл 0,5 % гідрокарбонату натрію (Лігоненко О.В. та співавт., 2007; Жданов С.М., 2008). Вказані сполуки не проникають через кишкову стінку в черевну порожнину в нормі (в усіх інтактних тварин забарвлення і люмінесценція були відсутні), проте проникають при порушенні бар'єрної функції.

При оцінці проб як з 1% розчином метиленового синього, так і з введенням тетрацикліну гідрохлориду, та за результатами розрахунку точного критерію Фішера виявлено, що введення перед відтворенням ГТКН аміногуанідину, L-Sem, а також L-Arg достовірно знижує частоту порушень бар'єрної функції тонкої кишки на 18-годину цього патологічного процесу.

При спостереженні за щурами з відтвореною ГТКН протягом 18 годин у всіх тварин стан був тяжкий, виражена тахікардія, тахіпноє. Летальність тварин у другій серії дослідів складає 56.0%. Причиною загибелі, за даними патоморфологічного дослідження, був перитоніт.

Введення перед відтворенням ГТКН NAME та 7-NI достовірно не впливає на рівень летальності, яка складає відповідно 33.3% та 26.7%. Введення аміногуанідину достовірно знижує летальність тварин протягом 18-годинного терміну до 20.0%. Тобто надлишкова продукція NO іNOS призводить до істотного збільшення летальності білих щурів за умов експериментальної ГТКН. Ураховуючи цей факт, при застосуванні NAME можна було б також очікувати зменшення летальності тварин, проте цей факт не був виявлений у нашому дослідженні, що може бути пов'язано з наявністю протективних властивостей NO, що утворюється конституційними NOS (Beck P.L. et al., 2004; Aoi Y. et al., 2008).

Ця думка у певній мірі підтверджується достовірним зменшенням летальності тварин при введенні перед відтворенням ГТКН L-Arg (до 20.0%). Проте введення перед відтворенням ГТКН L-Sem достовірно не позначається на показнику летальності щурів.

1.4. Патоморфологічні та морфометричні зміни зони тонкокишкового анастомозу за умов введення L-аргініну, іммобілізованого на хірургічному шовному матеріалі

Для оцінки стану відновлювальних процесів у зоні тонкокишкового анастомозу, операція формування якого проводилася за умов відтворення 18 годинної ГТКН, нами проведено морфологічні дослідження зразків паравульнарних тканин, з'єднаних немодифікованим та модифікованим L-Arg ХШМ. Використання лікарських засобів у складі ХШМ забезпечує цілеспрямоване їх введення у locus morbi, дозволяє створити у ньому необхідну концентрацію препарату безпосередньо під час

оперативного втручання, уникнути небажаних системних ефектів (Костенко В.О. та співавт., 2008; Лігоненко О.В. та співавт., 2007).

При використанні ХШМ, модифікованого L-Arg, на 7 добу післяоперативного втручання в області у зоні тонкокишкового анастомозу визначаються ділянки некрозу, які поширюються на всі оболонки стінки тонкої кишки. У зоні некрозу у всіх спостереженнях визначаються фрагменти ХШМ, які мало чим відрізняються від таких при використанні немодифікованої хірургічної нитки.

По периферії некротизованої тканини визначається зона запальної інфільтрації, в якій переважають поліморфноядерні лейкоцити. За даними морфометричного дослідження, кількість останніх (2.0 ± 0.1) на 58.3% ($p < 0.001$) менше, ніж при використанні немодифікованого кетгуту. Число лімфоцитів – 5.1 ± 0.4 , плазматичних клітин – 2.4 ± 0.2 . Кількість макрофагів (8.8 ± 0.8) – в 2,3 рази ($p < 0.001$), а клітинних елементів фібробластичного ряду (18.6 ± 2.8) – в 2,1 рази ($p < 0.05$) перевищує відповідні дані серії із застосуванням немодифікованого ХШМ.

Навколо запального інфільтрату розташовується зона, що має морфологічні ознаки дозріваючої грануляційної тканини. Для останньої притаманним, в першу чергу, є густе розташування тонкостінних кровоносних мікросудин і клітинних елементів фібробластичного ряду, а також нечисленних лімфоцитів. Слід зазначити, що в цій зоні щільність розташування кровоносних мікросудин вище, ніж у такій при використанні немодифікованого шовного матеріалу.

Після використання ХШМ, модифікованого L-Arg, на 14 добу після оперативного втручання, також як і при використанні немодифікованої нитки, в зоні тонкокишкового анастомозу визначаються фрагменти шовного матеріалу, що мають вид дрібних, слабо забарвлених, еозинофільних структур. По периферії останніх, на відміну даних на 7 добу післяопераційного періоду, зона некрозу практично не визначається. Безпосередньо залишки шовного матеріалу оточені зоною, для якої характерна добре виражена клітинна інфільтрація і значна кількість кровоносних мікросудин. У порівнянні з результатами дослідження із застосуванням немодифікованого ХШМ, серед клітинних елементів спостерігається істотне збільшення клітин фібробластичного ряду, їх кількість зростає – до 32.6 ± 2.6 , що на 45.5% ($p < 0.01$) перевищує дані контрольної серії та на 96.4% ($p < 0.001$) серії з використанням немодифікованого кетгуту.

Зменшується кількість макрофагів – до 4.8 ± 0.2 , що на 61.9% ($p < 0.001$) поступається результатам серії з використанням немодифікованого кетгуту. Кількість лімфоцитів (6.8 ± 0.2) – також поступається результатам серії з використанням немодифікованого кетгуту (на 33.3%, $p < 0.001$).

Описані нами вище гігантські клітини чужорідних тіл зустрічаються лише в поодиноких спостереженнях. У той же час, серед клітин фібробластичного ряду виявляється деяке збільшення зрілих клітинних форм і більш інтенсивне утворення колагенових волокон, у порівнянні з даними з використанням немодифікованого ХШМ.

По периферії зони тонкокишкового анастомозу, зміни, що спостерігаються в слизовій, м'язовій та серозній оболонках тонкої кишки, практично не відрізняються від таких у серії з використанням немодифікованого ХШМ.

Таким чином, наведена вище морфологічна картина свідчить, що застосування ХШМ, модифікованого L-Arg, прискорює процес загоєння тканин в зоні тонкокишкового анастомозу. Так, при застосуванні L-Arg, на 7 добу в паравульнарних тканинах достовірно збільшується кількість лімфоцитів та фібробластів, а на 14 добу істотно збільшується кількість клітинних елементів фібробластичного ряду. Така динаміка клітинних реакцій свідчить про прискорення переходу ранового запалення на моноцитарно-макрофагальну та фібробластичну стадії відповідно.

РОЗДІЛ 2.

НО-залежні механізми регенерації кісток нижньої щелепи за умов надмірного надходження в організм нітрату натрію

3.1. Матеріали та методи дослідження. Експерименти виконані на 90 білих щурах лінії Вістар масою 140-190 г. При роботі з тваринами дотримувалися вимог “Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях” (Страсбург, 20.09.1985 р.). Комісією з питань біоетики Вищого державного навчального закладу України “Українська медична стоматологічна академія” (протокол № 68 від 20 січня 2009 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Проведено вісім серій дослідів: у першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварини (контрольна); у другій – тваринам вводили нітрат натрію у дозі 200 мг/кг інтрагастрально протягом 60 діб (контрольна); у третій – відтворювали перелом нижньої щелепи (контрольна), у четвертій серії – тваринам моделювали перелом нижньої щелепи на тлі 60-денного введення нітрату натрію, у п'ятій, шостій, сьомій та восьмій серіях – перед моделюванням перелому нижньої щелепи на тлі 60-денного

введення нітрату натрію тваринам вводили відповідно неселективний інгібітор NO-синтаз (NOS) – метиловий ефір нітро-L-аргініну (L-NAME) виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 20 мг/кг (Laude K. et al., 2003), селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин виробництва "Sigma Chemical Co" (США) в дозі 25 мг/кг (Takeuchi K. et al., 2007), субстрат NOS – L-аргінін (L-Arg) виробництва "Kyowa Hakko Kogyo Co LTD" (Японія) в дозі 100 мг/кг (Дробінська О. та співавт., 2004) та скевенджер пероксинітриду – L-селенометіонін (L-Sem) виробництва "Sigma-Aldrich, Inc." (США) в дозі 3 мг/кг (Laude K. et al., 2003).

Евтаназію тварин проводили методом декапітації під тіопенталовим наркозом (для серій №3-4 на 14, 21, 28 та 35 добу, а для серій №5-8 на 14 та 28 добу після моделювання перелому нижньої щелепи).

Перелом нижньої щелепи у щурів проводили у типовому місці для експериментальних досліджень. Для цього під тіопенталовим наркозом надсікали м'які тканини ясен з букального боку, дистальніше лівого різця нижньої щелепи. Потім заводили інструмент під м'які тканини, притискали до оголеного окістя та надламуванням, скусуванням з качаючими рухами (10-15°) у сагітальній площині викликали візуальний діастаз до 1 мм. М'які тканини не ушивали, вони спонтанно зрощувалися впродовж однієї доби (Бармин В.В., 2006).

Біохімічні методи дослідження. Стан біополімерів кісткової тканини нижньої щелепи визначали шляхом оцінки вмісту фукоглікопротеїнів - за концентрацією фукози, незв'язаної з білками (Шараев П.Н. та співавт., 1997), а також продуктів деградації сіалоглікопротеїнів - за концентрацією N-ацетилнейрамінової кислоти – NANA (Кайдашев І.П. та співавт., 2003) та глікозаміногліканів - за концентрацією хондроїтинсульфатів (Слущкий Л.І., 1969) та гексуронових кислот (Шараев П.Н. и др., 1987). Мінеральний компонент кісткової тканини визначали шляхом оцінки вмісту кальцію (Леонт'єв В.К. и др., 1976), неорганічного фосфору (Камышников В.С., 2000) та щільності кісткової тканини (Ступаков Г.П. и др., 1989). У сироватці крові оцінювали вміст глікопротеїнів (Штейнберг О.П., Доценко Я.Н., 1962) хондроїтинсульфатів (Слущкий Л.І., 1969) та фракційний склад глікозаміногліканів (Штерн М.П. та ін., 1982).

Морфологічні та морфометричні методи дослідження. Перед виготовленням мікропрепаратів проводили фіксацію фрагментів регенерату у 10% розчині нейтрального формаліну протягом 48 годин. Декальцинацію проводили у 4% розчині трилону Б (етилендіамінтетраацетату) протягом 10 діб та знову дофіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Для оглядової мікроскопії застосовували фарбування гематоксилином і еозином і пікрофуксином за Ван-Гізон. Морфометричне дослідження було проведено у відповідності з принципами системного кількісного аналізу. На мікрофотографіях, виповнених при загальному збільшенні 120°, визначали густину клітинних елементів за методом стандартних площин, відносну кількість остеобластів серед усіх клітинних елементів регенерату та сумарну площу кровоносних судин методом рівновіддалених точок на мікрофотографіях.

Дані експериментів обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програми "StatisticSoft 6.0", яка дозволила провести розрахунки для груп середніх арифметичних з визначенням середнього квадратичного відхилення та похибок середніх арифметичних, а також за допомогою програмного забезпечення "Microsoft Excel 2007". Для порівняння та оцінки вірогідності отриманих результатів використовували розрахунок критерію вірогідності Ст'юдента (t-тест).

2.2. Зміни мономерів біополімерів сполучної тканини та мінерального компоненту нижньої щелепи щурів та сироватки крові за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію.

За умов 60-денної інтоксикації нітратом натрію вміст показників таких вуглеводних похідних глікопротеїнів неколагенових груп білків кісткової тканини, як фукоза, незв'язана з білками, та N-ацетилнейрамінова кислота у нижній щелепі щурів підвищився на 19,4% та 13,8 % (p<0,05) відповідно відносно інтактної групи. При аналізі компонентів протеогліканів, встановили, що 60-денна інтоксикація нітратом натрію не призводить до вірогідних змін вмісту хондроїтинсульфатів у кістковій тканині нижньої щелепи, але показник гексуронових кислот збільшився на 41,7% (p<0,05). Це свідчить, що 60-денна нітратна інтоксикація призводить до дезорганізації органічного матриксу, а саме глікопротеїнів та протеогліканів у кістковій тканині нижньої щелепи білих щурів. Мінеральний компонент не зазнавав вірогідних змін.

60-денна нітратна інтоксикація не призвела до вірогідних змін концентрації глікопротеїнів у сироватці крові щурів, але спостерігали збільшення вмісту хондроїтинсульфатів на 15,0% (p<0,05). Це свідчить про загальне ураження сполучної тканини організму тварин, тобто підвищений розпад даного компоненту та вихід його у сироватку крові. Було характерно збільшення загальної кількості ГАГ на 11,0% (p<0,05), при цьому, доля 1-ї фракції ГАГ (хондроїтин-6-сульфат) достовірно не змінилася, 2-ї фракції (хондроїтин-4-сульфат, наявний у кістковій тканині) зменшилася на 28,5%(p<0,05), що, можливо, вказує на зменшення синтезу даної фракції глікозаміногліканів у сполучній тканині, а 3-ї фракції (гепарансульфат, що відсутній у кістковій тканині, і вважається специфічним для встановлення функції

печінки) достовірно збільшилася на 96,2% ($p < 0,05$). Це вірогідно свідчить про ураження паренхіми печінки, що підтверджується також даними літератури (Кібкало Д.В., 2004).

2.3. Зміни мономерів біополімерів сполучної тканини та мінерального компоненту нижньої щелепи щурів та сироватки крові за моделювання перелому нижньої щелепи на тлі 60-денної інтоксикації нітратом натрію.

На 14-у добу після моделювання перелому нижньої щелепи відмічали вірогідне зменшення рівня N-ацетилнейрамінової кислоти відносно інтактної групи на 16,7%. На той же термін репаративного остеогенезу на тлі хронічної нітратної інтоксикації спостерігали вірогідне збільшення фукози, незв'язаної з білками на 37,5%, 15,1% та 26,9% ($p < 0,05$) відносно інтактної групи, тварин з 60-денною інтоксикацією нітратом натрію та аналогічного терміну репаративного процесу в контролі відповідно. Аналогічно відзначали збільшення N-ацетилнейрамінової кислоти на 29,6%, 13,4% та 55,6% ($p < 0,05$), хондроїтинсульфатів – на 23,8%, 16,4% та 38,3% ($p < 0,05$), гексуронових кислот – на 69,7%, 19,8% та 47,4% ($p < 0,05$) відповідно.

На 21 добу репаративного остеогенезу спостерігали вірогідне зменшення рівня фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової та гексуронових кислот на 23,6%, 25,1% та 23,5% ($p < 0,05$) відповідно. На ту ж добу репаративного остеогенезу за умов 60-денної інтоксикації нітратом натрію спостерігали вірогідне збільшення рівня фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової та гексуронових кислот на 52,7%, 40,8% та 103,1% ($p < 0,05$) відносно того ж терміну репаративного процесу в контролі. Рівень гексуронових кислот вірогідно збільшився на 56,1% ($p < 0,05$) і відносно інтактної групи щурів.

На 28-у добу репаративного остеогенезу відмічали вірогідне зменшення рівнів фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової та гексуронових кислот відносно інтактної групи на 22,2%, 23,6% та 29,5% ($p < 0,05$) відповідно.

Для репаративного процесу на тлі 60-денної інтоксикації нітратом натрію на 28-у добу було характерне вірогідне зменшення рівнів фукози, незв'язаної з білками та N-ацетилнейрамінової відносно тварин з власне нітратною інтоксикацією на 9,3% та 18,5% ($p < 0,05$). Відносно того ж терміну репаративної регенерації спостерігали вірогідне збільшення рівнів N-ацетилнейрамінової та гексуронових кислот на 21,9% та 114,0% ($p < 0,05$) відповідно. Відносно інтактних тварин вірогідного збільшення на 50,8% ($p < 0,05$) зазнав лише показник гексуронових кислот.

На 35-у добу репаративного процесу досліджувані показники сягали нормальних значень, лише рівень N-ацетилнейрамінової кислоти був вірогідно меншим відносно інтактної групи на 17,7% ($p < 0,05$).

Рівень хондроїтинсульфатів та N-ацетилнейрамінової кислоти сягав нормальних значень на 35-у добу репаративного остеогенезу на тлі хронічної нітратної інтоксикації. А вміст фукози, незв'язаної з білками був вірогідно меншим відносно показника групи тварин з власне нітратною інтоксикацією на 19,2% ($p < 0,05$). Рівень гексуронових кислот характеризувався вірогідним збільшенням на 114,0% ($p < 0,05$) відносно інтактних тварин та на 68,8% ($p < 0,05$) відносно аналогічного терміну репаративної регенерації у контролі.

Це свідчить, що за хронічної інтоксикації нітратом натрію відбувалося уповільнення репаративних процесів у кістковій тканині нижньої щелепи, що пов'язано з дезорганізацією сполучної тканини, що супроводжувалося збільшенням мономерів сполучнотканинних структур нижньощелепних кісток. Найбільш стійким до впливу хронічної інтоксикації нітратом натрію виявився хондроїтинсульфат, а більш виразні зміни спостерігалися з боку гексуронових кислот у кістковій тканині нижньої щелепи.

При дослідженні мінерального компоненту кісткової тканини нижньої щелепи спостерігали лише вірогідне зменшення співвідношення Ca/P на 7,9% ($p < 0,05$) на 14-у добу після моделювання перелому за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію відносно групи інтактних тварин. Це свідчить про відносне зменшення вмісту кальцію у даній групі тварин, що може бути викликано впливом оксиду азоту на гормональний фон.

Отже, найбільш чутливим до дії хронічної інтоксикації нітратом натрію за експериментального перелому нижньої щелепи був органічний матрикс, а мінеральний склад майже не зазнавав вірогідних змін, що підтверджується даними літератури (Білець М. В., 2008).

У сироватці крові відмічали збільшення рівня глікопротеїнів на 28 добу після перелому на 12,7% ($p < 0,05$). А за умов попередньої 60-денної інтоксикації нітратом натрію – вірогідне збільшення даного показника на 14 добу відносно інтактної групи, тварин з власне нітратною інтоксикацією та аналогічного терміну репаративного остеогенезу в контролі на 22,5%, 17,6% та 14,5% ($p < 0,05$), на 21 добу – відносно інтактних та тварин з хронічною інтоксикацією на 26,8% та 18,4% ($p < 0,05$) відповідно, на 28 добу – відносно інтактної групи на 14,1% ($p < 0,05$). Це свідчить, що нітратна інтоксикація при моделюванні

перелому нижньої щелепи призвела до збільшення рівня глікопротеїнів у сироватці крові на ранніх строках репаративної регенерації, чого вже не відмічалось на 35-у добу після репаративного остеогенезу.

Вміст сироваткових хондроїтинсульфатів зменшився на 28 добу після моделювання перелому на 17,5% ($p < 0,05$). За умов хронічної нітратної інтоксикації спостерігали вірогідне збільшення даного показника на 14 добу після моделювання перелому відносно інтактної групи та аналогічного терміну репаративного процесу у контролі на 17,5% та 23,7% ($p < 0,05$), на 28 добу – відповідно зменшення відносно власне інтоксикації та того ж терміну репаративного остеогенезу в контролі на 17,4% та 15,2% ($p < 0,05$) відповідно. Це свідчить, що зміни вмісту сироваткових хондроїтинсульфатів у динаміці репаративного остеогенезу корелюють із показниками глікопротеїнів.

Серед фракційного складу глікозаміногліканів сироватки крові найбільших змін зазнали показники 2-ї та 3-ї фракцій ГАГ, тобто переважно хондроїтин-4-сульфат та гепарансульфат. Зменшення 2-ї фракції ГАГ, яка наявна у кістковій тканині (збільшення якої у сироватці крові характерно для остеодистрофії) певною мірою може характеризувати посилення процесів кісткоутворення.

2.4. Патоморфологічні та морфометричні зміни ділянки перелому нижньої щелепи.

На 14-у добу після відтворення експериментального перелому при мікроскопічному дослідженні ділянка перелому була заповнена сполучною тканиною, у складі якої були наявні клітинні елементи та фібрилярний компонент. Останній був представлений відносно тонкими колагеновими волокнами з неоднорідною орієнтацією. Так, у безпосередній близькості від протистоячих кісткових уламків колагенові волокна мали переважно продольне розташування, в той час, як у центральній частині регенерату, разом з продольно орієнтованими волокнами були наявні волокна із поперечним розташуванням. Характер та щільність розташування описаних клітинних елементів у ділянці регенерату мали неоднорідний характер. Найбільша щільність їх розташування спостерігалася поблизу кісткових уламків, більшість клітин розташовувалась у відповідності з направленістю колагенових фібрил. Значна щільність розташування клітинних елементів спостерігалася і навколо кісткових уламків, де вони приймали участь у формуванні, так званого, зовнішнього кісткового мозолу. У цілому середня щільність розташування даних клітинних елементів в ділянці формуючого кісткового мозолу сягала $48,75 \pm 1,463$ в $\mu\text{м}^2$, а кількість остеобластів складала $17,80 \pm 0,430$ від усіх клітин кісткового мозолу. У сполучній тканині, яка заповнювала ділянку перелому спостерігалася також значна кількість новоутворених тонкостінних мікросудин, у просвіті яких практично постійно були наявні форменні елементи крові. У цілому, відносна сумарна щільність новоутворених судин, яка визначалася методом рівновіддалених точок на мікрофотографіях, сягала в середньому 2-3%.

У кісткових уламках, по периферії від місця відтвореного перелому періодично були наявні явища остеокластичної резорбції кісткових балок, на певній відстані (0,5-1,0 мм) від ділянки травми кісткова тканина нижньої щелепи зберігала свою типову будову, в якій чітко диференціювалися кісткові балки, у проміжках між якими розташовувався червоний кістковий мозок.

На 21-у добу після моделювання перелому мікроскопічно у складі регенерату, як і раніше визначали фібрилярний та волокнистий компонент. Колагенові волокна, усюди мали переважно продольну орієнтацію та однакову товщину. Між волокнами розташовувалися клітинні елементи, які у більшості випадків, також мали продольну орієнтацію. Середня питома щільність розташованих клітинних елементів вірогідно збільшилася на 22,1% ($p < 0,05$). Серед клітин регенерату спостерігали ознаки диференціювання клітинних елементів остеогенного ряду (остеобласти), в цілому їх кількість була у 1,34 ($p < 0,05$) рази вірогідно більше за попередній термін репаративного остеогенезу. Кровоносні мікросудини кісткового мозолу мали переважно відносно широкий просвіт, у якому всюди були виявлені форменні елементи крові у значній кількості. Суттєво збільшилася і загальна кількість мікросудин, їх відносна сумарна площа складала 4,5-5,0% ($p < 0,05$).

На 28-у добу після відтворення експериментального перелому мікроскопічно у ділянці регенерату спостерігали формування первинних кісткових балок, даний процес мав вогнищевий характер. Вздовж кісткових балок розташовувалися колагенові волокна, які, у більшості випадків, були продольно орієнтовані відносно них. В ділянці регенерату виявляли значну кількість кровоносних мікросудин. Порівняно з попереднім етапом репаративної регенерації, разом із тонкостінними мікросудинами з відносно широким просвітом, зустрічалися і мікросудини з відносно товстою стінкою, що свідчить про процес диференціювання судин мікроциркуляторного русла, який відбувається на даному етапі, переважна більшість кровоносних мікросудин мала продольне направлення. Порівняно з 21-ю добою репаративного остеогенезу не відбувалося вірогідного збільшення загальної кількості клітинних елементів, але спостерігали якісні зміни клітин регенерату (вірогідне збільшення кількості остеобластів на 20,4% ($p < 0,05$)).

Через 35 дів після моделювання експериментального перелому нижньої щелепи у ділянці регенерату мікроскопічно спостерігали збільшення кількості первинних кісткових балок. При цьому суттєвих змін у будові кровоносного мікросудинного русла регенерату не відмічали. Спостерігали незначне зменшення кількості колагенових волокон та подальше дозрівання клітинних елементів, при цьому кількість остеобластів вірогідно не збільшилася відносно попереднього строку репаративного процесу. Загальна щільність клітинних елементів у ділянці кісткового мозолу вірогідно збільшилася на 16,0% ($p < 0,05$) відносно попереднього етапу.

Таким чином, в ділянці кісткового мозолу поступово вірогідно збільшувалася щільність клітинних елементів та відносна кількість остеобластів, також мало місце формування мікроциркуляторного русла. Закономірності формування кісткової тканини на місці перелому нижньої щелепи у контрольній групі тварин не відрізнялися від відомих у літературі механізмів загоєння переломів інших локалізацій.

На 14-у добу після відтворення перелому нижньої щелепи на тлі 60-денної інтоксикації нітратом натрію мікроскопічно в ділянці експериментального перелому регенерат був представлений молодою сполучною тканиною з великою кількістю кровоносних мікросудин та помірною кількістю фібрилярних структур. Серед клітинних елементів регенерату переважали малодиференційовані фіброласти. Також спостерігали малочисельні лімфоцити, макрофаги, маловогнищеві крововиливи. У цілому середня щільність розташування даних клітинних елементів у ділянці формуючого кісткового мозолу була вірогідно меншою від аналогічного терміну репаративної регенерації у контрольній групі на 25,6% ($p < 0,05$), а кількість остеобластів – на 23,6% ($p < 0,05$) відповідно.

Фібрилярний компонент регенерату був представлений нечисельними тонкими, хаотично розташованими колагеновими волокнами, які фарбувалися пікрофуксином у світло-рожевий колір. Новоутворені кровоносні мікросудини характеризувалися відносно тонкою стінкою та наявністю у їх просвіті формених елементів крові. У цілому, відносна сумарна площа новоутворених мікросудин, яка визначалася методом рівновіддалених точок на мікрофотографіях, складала в середньому 2,0-2,5%. Як і в контрольній групі у периваскулярних зонах періодично зустрічалися перичити з явищами проліферації.

Через 21-у добу після відтворення експериментального перелому нижньої щелепи на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію порівняно з раніше описаним етапом у регенераті відбувалося збільшення кількості фібрилярних структур, які були представлені пучками різнокаліберних колагенових волокон. Щільність клітинних елементів порівняно із попереднім етапом регенераторного процесу суттєво не змінилася, а відносно контролю вірогідно зменшилася на 36,1% ($p < 0,05$).

При проведенні морфометричних досліджень стало очевидним, що відносна кількість остеобластів на 19,2% ($p < 0,05$) вірогідно менша, ніж на відповідному етапі репаративної регенерації у контрольній групі тварин. У той же час, порівняно з раніше описаним етапом, даний показник вірогідно збільшився 1,48 разів ($p < 0,05$), а також серед клітинних елементів практично не зустрічалися лімфоцити та макрофаги. Кількість кровоносних судин, порівняно з попереднім етапом репаративного процесу, зросла, відносна сумарна площа яких становила 5%. Періодично на мікропрепаратах визначали явища ангіоматозу, які заключалися у відносно компактному розташуванні мікросудин із виразним повнокрів'ям.

Через 28 дів після відтворення експериментального перелому нижньої щелепи на тлі попередньої 60-денної нітратної інтоксикації мікроскопічно регенерат відрізнявся поліморфізмом та був представлений сполучною волокнистою та кістковою тканинами. Щільність клітинних елементів у ділянці кісткового мозолу вірогідно зросла на 13,7% ($p < 0,05$) відносно 21-ї доби репаративного остеогенезу, але відносно контролю залишалася вірогідно меншою на 30,0% ($p < 0,05$). Серед клітинних елементів регенерату найбільша кількість припадала на остеобласти (на 15,6% ($p < 0,05$) вірогідно більше ніж на попередньому етапі репаративного процесу), відносна кількість яких була все ж вірогідно менша на 22,4% ($p < 0,05$), ніж на відповідному етапі репаративної регенерації кісткової тканини нижньої щелепи у контрольній групі щурів. Порівняно з більш раннім етапом регенераторного процесу в даний період збільшилася кількість кровоносних мікросудин, сумарна площа яких складала в середньому 5,0-6,0%. Більшість мікросудин мала відносно широкий просвіт та тонку стінку, у ряді випадків мала місце тенденція до формування продольно орієнтованих судинних петель.

На 35-у добу після моделювання перелому нижньощелепної кістки у щурів на тлі попередньої хронічної нітратної інтоксикації у формуючому кістковому мозолі продовжувала зростати кількість остеобластів (на 12,8% ($p < 0,05$)), однак, їх все ж було вірогідно менше, ніж у контрольній групі тварин (на 17,4% ($p < 0,05$)). Щільність клітинних елементів аналогічно вірогідно збільшувалася на 29,2% ($p < 0,05$) відносно попереднього терміну репаративного процесу, але була вірогідно меншою за контроль на 22,1% ($p < 0,05$). Порівняно з попередньо описаним етапом значно збільшувалася кількість колагенових волокон із правильною продольною орієнтацією. Дещо збільшувалася, порівняно з попереднім етапом кількість кісткових балок. Однак процес їх утворення у експериментальній групі тварин виражений значно

слабше, порівняно з контрольною. Не спостерігали суттєвих змін у кількісній та якісній характеристиці кровоносного мікроциркуляторного русла, сумарна площа мікросудин складала близько 6%.

Це свідчить, що попередня 60-денна інтоксикація нітратом натрію при відтворенні експериментального перелому нижньої щелепи щурів уповільнює перебіг регенераторного процесу. Що характеризується більш повільною динамікою диференціювання клітинних елементів у ділянці формуючого кісткового мозолу навіть на більш пізніх строках процесу репаративної регенерації кісткової тканини нижньої щелепи спостерігаються хаотично розташовані різнокаліберні колагенові волокна. Мало місце також певне уповільнення процесу диференціювання мікросудинного русла кісткового мозолу та затримка формування первинних кісткових балок.

2.5. Зміни мономерів біополімерів сполучної тканини нижньої щелепи щурів за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію при змінах функціонування NO-синтаз, введення L-аргініну та L-селенометіоніну.

Введення неселективного інгібітора NOS L-NAME призвело до вірогідного зниження показника фукози, незв'язаної з білками та N-ацетилнейрамінової кислоти на 14 добу після перелому на 14,6% та 14,8% ($p < 0,05$). Але вміст гексуранових кислот зазнав вірогідного збільшення на 14,3% ($p < 0,05$), що може вказувати на деяку протективну дію оксиду азоту ендogenousного походження на ранніх строках репаративного процесу. При відсутності вірогідних змін на 28 добу репаративного остеогенезу.

При введенні селективного інгібітора iNOS аміногуанідину на ранніх строках репаративного остеогенезу спостерігали вірогідне зменшення вмісту фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової та гексуранових кислот 15,7%, 20,9% та 31,7% ($p < 0,05$). А на більш пізніх строках репаративної регенерації – лише вірогідне зменшення рівня гексуранових кислот на 38,7%. При сталих показниках хондроїтинсульфатів.

Введення тваринам субстрату NO-синтазної реакції L-аргініну супроводжувалося вірогідним зменшенням вмісту гексуранових кислот на 14-у та 28-у добу репаративного процесу на 25,0% та 18,6% ($p < 0,05$) відповідно при відносно незмінних інших біохімічних показниках.

Отже, пригнічення NO-синтаз призводило до зменшення вмісту фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової кислоти на 14-у добу репаративного процесу, при відносно сталих рівнях на 28-у добу. Щодо гексуранових кислот, то введення неселективного інгібітора NOS призвело до вірогідного збільшення їх рівня на 14-у добу репаративного остеогенезу, а введення селективного інгібітора iNOS – до зменшення цього показника на обидва досліджувані терміни. Тобто, оксид азоту ендogenousного походження на ранніх етапах репаративного процесу мав деяку протективну дію. А введення L-аргініну (субстрату NO-синтазної реакції) призвело лише до вірогідного зменшення рівня гексуранових кислот у кістковій тканині нижньої щелепи на усіх досліджуваних термінах репаративного процесу, при сталих інших показниках білкового складу кісткової тканини нижньої щелепи.

При дослідженні впливу сквенджеру пероксинітриду L-селенометіоніну на біохімічні показники кісткової тканини нижньої щелепи щурів у динаміці репаративного остеогенезу встановлено вірогідне зменшення усіх досліджуваних показників на 14 добу після моделювання перелому (хондроїтинсульфатів – на 17,4% ($p < 0,05$), фукози, незв'язаної з білками – на 18,2% ($p < 0,05$), N-ацетилнейрамінової кислоти – на 28,5% ($p < 0,05$), гексуранових кислот - 36,2% ($p < 0,05$)) та зменшення рівня гексуранових кислот на 28 добу на 43,7% ($p < 0,05$).

Це свідчить про їх більшу дезорганізацію при наявності надлишкової кількості оксиду азоту в організмі та утворенні його похідного пероксинітриду.

Таким чином, на основі вищевказаного можна вважати, хронічна інтоксикація нітратом натрію уповільнює перебіг репаративного остеогенезу, викликаючи більшу деполімерізацію мономерів біополімерів сполучної тканини особливо на ранніх строках після моделювання перелому нижньої щелепи.

Активність NO-синтаз істотно впливає на процес репаративної регенерації кісткової тканини нижньої щелепи при моделюванні її перелому в щурів. Введення субстрату NO-синтазної реакції L-аргініну частково обмежує процес деполімерізації глікозаміногліканів (зменшує рівень гексуранових кислот) у кістковій тканині нижньої щелепи та істотно не впливає на катаболізм фуко- та сіалоглікопротеїнів.

Утворення пероксинітриду впливає на перебіг репаративної регенерації кісткової тканини нижньої щелепи, оскільки використання L-селенометіоніну (сквенджеру пероксинітриду) вірогідно обмежує дезорганізацію фуко- та сіалоглікопротеїнів та глікозаміногліканів сполучної тканини кісток нижньої щелепи (зменшує рівень усіх досліджуваних показників) на ранніх строках репаративного остеогенезу. А більш пізніх термінах після моделювання перелому пероксинітрид-залежна дезорганізація сполучної тканини пов'язана, головним чином, з деполімерізацією глікозаміногліканів.

РОЗДІЛ 3.

Роль порушень окиснювального метаболізму та сперматогенезу у патогенезі розладів репродуктивної функції при дії на організм відпрацьованого моторного масла

3.1. Матеріали та методи дослідження.

Експерименти виконані на 75 білих щурах-самцях та 40 самках (останні для дослідження репродуктивної здатності тварин) лінії Вістар масою 160-250 г. При роботі з тваринами дотримувались вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 20.09.85). Комісією з питань біоетики Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» (протокол № 80 від 16 березня 2010 р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Всі тварини були розподілені на 6 груп: 1-ша – інтактна; 2-га, 3-тя, 4-та та 5-та – дослідні (введення відпрацьованого моторного масла протягом відповідно 14, 30, 60 та 90 діб); 6-та – дослідна (введення самцям відпрацьованого моторного масла протягом 12 тижнів з подальшим спарюванням з інтактними самками).

ВММ вводили внутрішньошлунково у дозі 500 мг/кг маси тіла 1 раз на добу (Батухіна І.В., 2008). Використовували суміш автомобільного масла, що міститься у 1000 відпрацьованих фільтрів (надано ВАТ «НДІ Емальхімаш і НТ Колан», м. Полтава). Методом атомно-абсорбційного аналізу виявлено, що вказана суміш ВММ містить: свинцю – 150 мкг/л, кадмію – 14 мкг/л.

Евтаназію щурів проводили шляхом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом, після чого виконували лапаротомію та видаляли сім'яники. Сперму отримували із придатка сім'яника.

Біохімічні методи дослідження сім'яників. Утворення супероксидного аніон-радикала (O_2^-) оцінювали шляхом проведення тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ) (Цебржинский О.И., 2002). При цьому оцінювали продукцію O_2^- мікросомальним і мітохондріальним електронно-транспортними ланцюгами (ЕТЛ) та НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів у гомогенаті тканин сім'яників за умов введення відповідних індукторів (НАДН, НАДФН, пірогенал).

Рівень ПОЛ у тканинах сім'яників оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметинового комплексу до і після 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині (Кайдашев І.П. та співавт., 2003).

Активність антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних продуктів за час 1,5-годинної інкубації у залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю антиоксидантних ферментів – СОД (Брусов О.С., Герасимов А.М., Панченко Л.Ф., 1976) та каталази (Архипова О.Г., 1988).

Для визначення концентрації аденіннуклеотидів готували тканинні екстракти (Bermeyer H.V, 1974). Вміст аденозинтрифосфату (АТФ) визначали за методом E.Beutler (1975), в основі якого знаходиться вимірювання на спектрофотометрі СФ-46 оптичної густини реагуючих речовин, яка пропорційна вмісту АТФ у пробі. Вміст аденозинди- та монофосфату (АДФ і АМФ) визначали за методом D. Jaworeck et al. (1974) в одній пробі за допомогою сполучених реакцій. На основі одержаних результатів обчислювали значення енергетичного потенціалу (ЕП) за формулою D.E. Atkinson (1968). Вміст неорганічного фосфату (Фн) визначали за методом П.П. Мешкової і С.Є. Северина (1950).

Біохімічні методи дослідження сперми. Утворення O_2^- сперматозоїдами оцінювали шляхом проведення тесту з НСТ (Цебржинський О.І., 2000). При цьому оцінювали продукцію O_2^- НАДФН-залежними ЕТЛ (НАДФН-цитохром Р-450 і НАДФН-цитохром В₂₄₅₍₅₅₈₎) та мітохондріальним ЕТЛ у зразках сперми за умов введення індукторів (НАДФН і НАДН). Вміст АТФ у сперміях визначали фотометрично по неорганічному фосфору за методом Лоурі і Лошицу (Болдырев А.А., 1977). Визначення концентрації фруктози проводили тіобарбітуровим методом (Карпова Е.А., 1987).

Морфологічні та функціональні методи дослідження. Напівтонкі зрізи готували на ультрамікротомі УМТП-7, розташовували на предметному склі та фарбували 1% розчином метиленового синього. Морфологічну оцінку стану сперматогенного епітелію, гемомікроциркуляторного русла та інтерстиційної сполучної тканини проводили за допомогою світлового мікроскопу «Carl Zeiss», підрахунок структурних компонентів сім'яників проводився за допомогою окуляр-мікромметра МОВ-1-15^х. Мікрофотографування здійснювали на мікроскопі фірми «Olympus» С 3040-ADU з адаптованими до відповідних досліджень програмами. Морфологічну оцінку стану сім'яродного епітелію проводили згідно з методичними рекомендаціями Державного фармакологічного центру МОЗ України (Барияк І.Р.

та співавт., 2001), показник ступеня диференціації сперматид (ПСДС) розраховували за методом В.П. Яценка та співавт. (2001).

Кількість і функціональний стан сперматозоїдів визначали за М.А. Базарною та співавт. (1988) та методичними рекомендаціями Державного фармакологічного центру МОЗ України (Бариліак І.Р. та співавт., 2001). 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 неупорядкованим рухом (дискінезія, категорія С) та нерухомих (акінезія, категорія D) (Долгов В.В. та співавт., 2006). Життєздатність сперматозоїдів визначали в умовах еозинового тесту.

Вивчення репродуктивної здатності щурів проводили згідно з методичними рекомендаціями Державного фармакологічного центру МОЗ України (Бариліак І.Р. та співавт., 2001). У відібраних інтактних самок з нормальним циклом визначали еструс та кожного самця парували з двома самками. Самцям попередньо вводили з водою ВММ щодня протягом 12 тижнів. Самок виводили з досліду на 20-й день вагітності. При дослідженні матки реєстрували для кожної самки: загальну кількість жовтих тіл у яєчниках; кількість місць імплантації; кількість мертвих плодів; кількість живих плодів; розраховували загибель ембріонів до та після імплантації, загальну ембріональну смертність (Бишовець Т.Ф. та співавт., 2001). Частину вагітних самок залишали на пологи, щодня спостерігаючи за ними. Фіксували дату пологів, кількість щурят у приплоді, обчислювали індекс фертильності = (число вагітних самок/загальне число самок) x 100; індекс гестації = (число самок, що родили/число вагітних самок) x 100; індекс плідності = число новонароджених щурят/число самок, що народили (Громенко Д.С., 2009).

Отримані дані піддавалися статистичній обробці. 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".

3.2. Зміни окиснювального метаболізму в сім'яниках білих щурів при дії на організм відпрацьованого моторного масла.

Через 14 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ загальний фон продукції $\cdot O_2^-$ та його вироблення мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ не відрізняється від даних контрольної серії. Проте, у цей термін спостерігається зростання на 48.4% ($P < 0,01$) продукції $\cdot O_2^-$ НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів – до 0.92 ± 0.07 нмоль/мг \times с (у контрольній групі – 0.62 ± 0.03 нмоль/мг \times с).

На 30 добу після початку введення ВММ відмічається підвищення продукції $\cdot O_2^-$ як НАДФН-оксидазою лейкоцитів – до 0.82 ± 0.06 нмоль/мг \times с (на 32.3%, $P < 0,02$), так і мітохондріальним ЕТЛ – до 22.67 ± 0.99 нмоль/мг \times с (на 34.6%, $P < 0,01$; у контрольній групі – 16.84 ± 0.98 нмоль/мг \times с).

Через 60 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ підвищується загальний фон продукції $\cdot O_2^-$ – до 1.14 ± 0.08 нмоль/мг \times с (на 46.2%, $P < 0,01$; у контрольній групі – 0.78 ± 0.06 нмоль/мг \times с), а також його вироблення мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ – відповідно до 20.23 ± 0.92 нмоль/мг \times с (на 35.1%, $P < 0,01$; у контрольній групі – 14.97 ± 0.88 нмоль/мг \times с) та 21.69 ± 1.02 нмоль/мг \times с (на 28.8%, $P < 0,01$). Продукція $\cdot O_2^-$ НАДФН-оксидазною системою лейкоцитів у цей термін не відрізняється від даних контрольної серії.

На 90 добу після початку введення ВММ відмічається збільшення загального фону продукції $\cdot O_2^-$ – до 0.98 ± 0.06 нмоль/мг \times с (на 25.6%, $P < 0,05$) та його вироблення мітохондріальним ЕТЛ – до 24.44 ± 1.06 нмоль/мг \times с (на 45.1%, $P < 0,001$). Вироблення $\cdot O_2^-$ мікросомальним ЕТЛ не відрізняється від даних контрольної серії. Продукції $\cdot O_2^-$ НАДФН-оксидазою лейкоцитів у цей термін (на відміну від попередніх спостережень) знижується – до 0.50 ± 0.04 нмоль/мг \times с (на 19.4%, $P < 0,05$).

Неоднозначні зміни вмісту $\cdot O_2^-$ у динаміці тривалого впливу ВММ, очевидно, пояснюються утворенням в організмі певної концентрації тих чи інших компонентів ВММ, деякі з яких знаходяться у антагоністичних відносинах (Авцын А.П. та співавт., 1991; Калетина Н.И., Калетин Г.И., 2007; Некрасов В.И., Скальный А.В., 2006).

Через 14 днів після початку введення в організм білих щурів ВММ утворення ТБК-реактивів збільшується – до 96.2 ± 5.7 мкмоль/кг (на 22.5%, $P < 0,05$; у контрольній групі – 78.5 ± 4.8 мкмоль/кг).

Проте, приріст ТБК-реактивів за час 1,5-годинної інкубації в залізоаскорбатному буферному розчині не відрізняється від даних контрольної серії, що свідчить про компенсований характер пероксидації. Цей висновок підтверджує також підвищення активності СОД – до 2.55 ± 0.16 од. акт. (на 28.8%, $P < 0.05$; у контрольній групі – 1.98 ± 0.18 од. акт.) і каталази – до 2.32 ± 0.26 од. акт. (на 32.8%, $P < 0.05$; у контрольній групі – 2.32 ± 0.26 од. акт.). Активация ПОЛ у тканинах сім'яників у цей термін за умов відсутності істотного збільшення продукції активних форм кисню, зокрема O_2^- , очевидно пов'язана з нахождением у організм великої кількості прооксидантів у складі ВММ.

У подальшому концентрація ТБК-реактивів до та після інкубації збільшується: на 30 добу – відповідно до 104.2 ± 6.2 мкмоль/кг (на 32.7%, $P < 0.01$) та 140.7 ± 13.3 мкмоль/кг (на 35.7%, $P < 0.05$; у контрольній групі – 103.7 ± 7.3 мкмоль/кг); на 60 добу – відповідно до 103.8 ± 4.3 мкмоль/кг (на 32.2%, $P < 0.01$) та 138.4 ± 12.9 мкмоль/кг (на 33.5%, $P < 0.05$); на 90 добу – відповідно до 102.2 ± 7.8 мкмоль/кг (на 30.2%, $P < 0.05$) та 140.7 ± 11.5 мкмоль/кг (на 35.7%, $P < 0.02$).

Такий же характер носять зміни величин приросту ТБК-реактивів за час 1,5-годинної інкубації в залізоаскорбатному буферному розчині, які перевищують дані інтактної групи тварин на 30 добу – на 44.8% ($P < 0.02$); на 60 добу – на 37.3% ($P < 0.05$); на 90 добу – на 52.8% ($P < 0.01$). Це свідчить про розвиток декомпенсованого процесу ПОЛ у тканинах сім'яників. Цьому сприяє, зокрема, і відсутність підвищення у зазначений термін активності СОД і каталази.

На 14 добу після початку введення в організм білих щурів ВММ активності СОД і каталази збільшуються відповідно – до 2.55 ± 0.16 од. акт. (на 28.8%, $P < 0.05$) та 3.08 ± 0.18 ум. од. (на 32.8%, $P < 0.05$). Відомо, що синтез СОД індукується на рівні трансляції субстратом (тобто O_2^-) (Поберезкина Н.Б., Осинская Л.Ф., 1989), продукція якого у цей період, як відмічалось вище, суттєво зростає. Активності СОД і каталази знаходяться у взаємозв'язку, тому що СОД забезпечує каталазу субстратом (пероксидом водню), який індукує її синтез. Проте, у більш пізні терміни впливу ВММ, незважаючи на збільшення продукції супероксиду, активність СОД не тільки не підвищується, але й достовірно зменшується на 90 добу спостереження – до 1.5 ± 0.11 од. акт. (на 24.2%, $P < 0.05$). Це, очевидно, пов'язано з антагоністичними стосунками між певними компонентами ВММ (молібденом, сульфатною сіркою тощо) та іонами міді, що входять у активний центр СОД (Батухіна І.В., 2008). Закономірною за цих обставин є і відсутність підвищення у тканинах сім'яників активності каталази.

Стан біоенергетичних процесів значною мірою визначає інтенсивність сперматогенезу та функціональний стан спермій, що утворилися (Bourgeron T., 2000; Денисенко С.В., Костенко В.А., 2003; Boussouar F., Benahmed M., 2004). Так, через 14 днів після початку введення в організм білих щурів ВММ відмічається збільшення вмісту АТФ у тканинах сім'яників – до 3.17 ± 0.13 мкмоль/г (на 14.0%, $P < 0.05$; у контрольній групі – 2.78 ± 0.11 мкмоль/г). Концентрація АМФ та Фн зменшується відповідно – до 0.13 ± 0.01 мкмоль/г (на 31.6%, $P < 0.01$; у контрольній групі – 0.19 ± 0.01 мкмоль/г) та 4.5 ± 0.54 мкмоль/г (на 31.9%, $P < 0.05$; у контрольній групі – 6.61 ± 0.61 мкмоль/г), що свідчить про підсилення у цей термін процесу ресинтезу АТФ. ЕП збільшується – до 0.826 ± 0.011 (на 4.0%, $P < 0.05$; у контрольній групі – 0.794 ± 0.008). На 30 добу після початку введення ВММ концентрація АМФ у тканинах сім'яників достовірно збільшується – до 0.32 ± 0.04 (на 68.4%, $P < 0.01$).

Тривале введення в організм ВММ істотно знижує концентрацію у тканинах сім'яників АТФ, призводить до падіння ЕП. Так, через 60 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ концентрація АТФ у тканинах сім'яників зменшується – до 2.35 ± 0.12 (на 15.5%, $P < 0.05$). Вміст АМФ і Фн збільшується відповідно – до 0.37 ± 0.04 мкмоль/г (на 94.7%, $P < 0.001$) та 8.37 ± 0.47 мкмоль/г (на 26.6%, $P < 0.05$), що свідчить про порушення процесу ресинтезу АТФ. ЕП зменшується – до 0.743 ± 0.019 (на 6.4%, $P < 0.05$). На 90 добу після початку введення ВММ прогресують зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів. Концентрація АТФ у тканинах сім'яників зменшується – до 2.32 ± 0.08 (на 16.5%, $P < 0.01$), АДФ – до 1.06 ± 0.11 (на 25.9%, $P < 0.05$). Вміст АМФ і Фн збільшується відповідно – до 0.63 ± 0.06 мкмоль/г (у 3.3 рази, $P < 0.001$) та 9.04 ± 0.36 мкмоль/г (на 36.8%, $P < 0.01$). ЕП зменшується – до 0.709 ± 0.016 (на 10.7%, $P < 0.001$).

3.3. Зміни окиснювального метаболізму в сперматозоїдах білих щурів при дії на організм відпрацьованого моторного масла

Через 14 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ загальний фон продукції сперміями O_2^- та його вироблення НАДФН-цитохром P_{450} і НАДФН-цитохром $B_{245(558)}$ ЕТЛ, а також мітохондріальним ЕТЛ не відрізняється від даних контрольної серії. На 30 добу після початку введення ВММ збільшується загальний фон продукції O_2^- сперміями – до 0.127 ± 0.002 од. екст. (на 5.0%, $P < 0.02$; у контрольній групі – 0.121 ± 0.001 од. екст.), а також вироблення O_2^- НАДФН-цитохром P_{450} і НАДФН-

цитохром $B_{245(558)}$ ЕТЛ – до 0.226 ± 0.006 од. екст. (на 11.9%, $P < 0,05$; у контрольній групі – 0.202 ± 0.008 од. екст.) і мітохондріальним ЕТЛ – до 0.276 ± 0.006 од. екст. (на 9.5%, $P < 0,05$; у контрольній групі – 0.252 ± 0.008 од. екст.)

При подальшому введенні тваринам ВММ указані зміни прогресують. Так, через 60 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ підвищується загальний фон продукції O_2^- сперміями – до 0.128 ± 0.003 од. екст. (на 5.8%, $P < 0,05$), збільшується генерація O_2^- НАДФН-цитохром P_{450} і НАДФН-цитохром $B_{245(558)}$ ЕТЛ – до 0.236 ± 0.011 од. екст. (на 16.8%, $P < 0,05$), а також мітохондріальним ЕТЛ – до 0.282 ± 0.010 од. екст. (на 11.9%, $P < 0,05$). Через 90 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ загальний фон продукції O_2^- сперміями підвищується – до 0.126 ± 0.001 (на 4.1%, $P < 0,01$), генерація O_2^- НАДФН-цитохром P_{450} і НАДФН-цитохром $B_{245(558)}$ ЕТЛ збільшується – до 0.234 ± 0.010 од. екст. (на 15.8%, $P < 0,05$), а мітохондріальним ЕТЛ – до 0.293 ± 0.012 од. екст. (на 16.3%, $P < 0,02$).

Через 14 і 30 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ концентрація АТФ в сперматозоїдах білих щурів не відрізняється від даних контрольної серії. На 60 добу після початку введення ВММ концентрація АТФ в сперматозоїдах білих щурів істотно зменшується – до 26.34 ± 3.03 мкмоль $\Phi_H/10^6$ кл. (на 34.7%, $P < 0,05$; у контрольній групі – 40.36 ± 4.63 мкмоль $\Phi_H/10^6$ кл.). Через 90 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ концентрація АТФ в сперматозоїдах білих щурів залишається на зниженому рівні та складає 23.03 ± 3.01 мкмоль $\Phi_H/10^6$ кл., що на 42.9% ($P < 0,01$) поступається даним контрольної серії.

Через 14, 30 та 60 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ концентрація фруктози в сперматозоїдах білих щурів суттєво не відрізняється від даних контрольної серії. Через 90 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ концентрація фруктози в сперматозоїдах білих щурів достовірно збільшується – до 4.39 ± 0.41 мкмоль/ 10^6 кл. (на 57.9%, $P < 0,05$; у контрольній групі – 2.78 ± 0.61 мкмоль/ 10^6 кл.). Зростання рівня вмісту фруктози в клітинах свідчить про пригнічення процесу фруктолізу в них (Ford W.C., 1981; Nascimento J.M. et al., 2008).

3.4. Порушення сперматогенної функції сім'яників і функціонального стану сперматозоїдів білих щурів-самців за умов введення відпрацьованого моторного масла

При вивченні гістологічних препаратів сім'яників щурів через 30 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ, нами було встановлено, збільшення товщини інтерстиції сім'яника за рахунок накопичення міжклітинної рідини. На мікропрепаратах виявлялись малі та великі вакуолі в інтерстиції яєчка. У компонентах мікроциркуляторного русла виявлялося звуження артеріол та розширення венул, просвіти яких були заповнені еритроцитами. Спостерігалось маргінація лейкоцитів у судинах мікроциркуляторного русла. У структурі звивистих сім'яних каналців виявляється збільшення висоти сперматогенного шару. Ядра клітин Сертолі були збільшеними, але кількість суспендоцитів вірогідно не відрізнялася у порівнянні з контрольною групою тварин і становила 48.43 ± 1.55 . Форма ядер була трикутною, а подекуди і неправильної. При вивченні діаметру звивистих сім'яних каналців було встановлено їх вірогідне ($p < 0,02$) зменшення у порівнянні з попередніми термінами експерименту. Величина цього показника складає 202.8 ± 2.08 ; в інтактній групі – 210.6 ± 1.84 . Ці зміни відбувалися не за рахунок збільшення кількості клітин сперматогенного ряду, а за рахунок набрякання (вакуолізації) та дископлексації клітин. Кількість суспендоцитів у дослідних тварин не змінювалася та складала 47.87 ± 2.18 ; в контролі 48.43 ± 1.55 . Проте об'єм ядер цих клітин збільшувався на 5.5% ($p < 0,05$) та складав 91.23 ± 1.12 мкм³; в контролі 86.46 ± 1.42 мкм³.

У цей час індекс сперматогенезу знаходився на рівні контрольних величин та складав 3.22 ± 0.12 ; в інтактній групі – 3.28 ± 0.08 . Кількість нормальних сперматогоній в VI стадії сперматогенезу в дослідних тварин не змінювалася і складала 69.8 ± 6.4 ; в контролі – 70.2 ± 4.6 . Не було достовірних розбіжностей у дослідній і контрольній серіях у величинах кількості каналців з 12-ю стадією мейозу (3.9 ± 0.6 ; контроль – 3.7 ± 0.6). У зазначений термін у каналцях сім'яників відмічалось злушення сперматогенних клітин, на що вказувало підвищення в 2,6 рази ($p < 0,05$) числа каналців зі злущеним епітелієм (5.2 ± 1.2 ; контроль – 2.0 ± 0.8). Проте відсотки каналців з 3-ма шарами епітелію (65.8 ± 4.8 ; контроль – 57.4 ± 3.6) та 4-ма шарами (36.8 ± 4.2 ; контроль – 38.2 ± 3.2) не відрізнялися від даних інтактної серії. Зниження у цей термін на 29.7% ($p < 0,05$) ПСДС (становить 0.64 ± 0.06 , у контролі – 0.91 ± 0.10), вказує на порушення завершального етапу сперматогенезу – періоду формування, що пов'язано з пригніченням процесу диференціації сперматид.

Через 60 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ на гістологічних препаратах було встановлено наростаюче збільшення товщини інтерстицію сім'яника у порівнянні з попереднім терміном експерименту, що відбувалося за рахунок накопичення міжклітинної рідини. Унаслідок

набряку відбувалось роз'єднання каналців, зменшення вмісту їх в одиниці площі та зміни форми на овальну або сплюснену. В зазначений термін виявлялося достовірне зменшення ($p < 0,02$) діаметру звивистих каналців, який складав 200.1 ± 3.42 мкм (у контролі – 210.6 ± 1.84 мкм). Висота сперматогенного епітелію складала 52.98 ± 1.54 мкм, що на 10.8% ($p < 0,01$) поступається даним інтактної серії (59.39 ± 1.36 мкм). Кількість суспендоцитів у дослідних тварин не змінювалася і складала 48.98 ± 1.85 ; в контролі 48.43 ± 1.55 . У цей час спостерігалось зменшення об'єму ядер цих клітин на 4.8% ($p < 0,05$) до 82.28 ± 1.24 мкм³ у порівняння з даними інтактної групи тварин (86.46 ± 1.42 мкм³). У більшості звивистих сім'яних каналців спочатку відбувалася дисконкомплексація та дезорієнтація, а надалі – десквамація сперматид. Зменшувався об'єм цитоплазми у порів'янні з попереднім терміном спостереження. В ядрах відмічали гіпохромію та пікноз. Відбувалася також дезорієнтація, дисконкомплексація сперматоцитів II, потім I порядку, а подекуди й їхня десквамація. За рахунок повного або часткового злушення клітин сперматогенного шару від базальної мембрани в просвіті звивистого каналця утворювалися "сім'яні кулі".

На 60 добу після початку введення ВММ відмічалось достовірне зниження індексу сперматогенезу (на 11.9%, $p < 0,05$), що, вочевидь, пов'язано з відсутністю у багатьох каналцях пізніх сперматид. За цих умов, на 22.2% ($p < 0,02$) зменшувалося число нормальних сперматогоній (контроль – 70.2 ± 4.6 ; дослід – 54.6 ± 3.2). Кількість каналців зі злушенням епітелієм збільшувалася в 2.75 рази ($p < 0,05$) (контроль – $2.0 \pm 0.8\%$; дослід – $5.5 \pm 1.2\%$), а з 12-ю стадією мейозу зменшується на 58.9% ($p < 0,02$) (контроль – 3.7 ± 0.6 ; дослід 1.5 ± 0.4). Число каналців з 3-ма шарами епітелію достовірно підвищувалося (на 26.8%, контроль – $57.4 \pm 3.6\%$; дослід – $72.8 \pm 3.8\%$, $p < 0,02$), а з 4-ма шарами, навпаки, зменшувалося (на 24.1%, контроль – $38.2 \pm 3.2\%$; дослід – $29.0 \pm 2.7\%$, $p < 0,05$). Величина ПСДС істотно знижувалася (на 30.8%, з 0.91 ± 0.10 – у контрольній групі до 0.63 ± 0.07 – у дослідній групі, $p < 0,05$).

Вивчення напівтонких зрізів звивистих сім'яних каналців сім'яників шурів через 90 діб від початку експерименту дало змогу встановити, що внаслідок структурних порушень сім'яників у інтерстиційній тканині спочатку збільшувалася, а потім зменшувалася осередкова інфільтрація її лейкоцитами та макрофагами. Надалі набряк зменшувався порівняно з 30-ю та 60-ю добами експерименту, в інтерстиційній тканині з'являлися ділянки периваскулярного, а потім перитубулярного фіброзу, найбільш вираженого біля судин зі зміненою стінкою. Поступово утворювалися волокна сполучної тканини. З'являлися вогнища колагенуотворення. Кількість клітин Лейдіга зменшувалася, вони також зменшувалися в розмірах у порів'янні з контрольною групою тварин. Власна оболонка звивистих сім'яних каналців мала фестончаті контури, ставала звивистою. Відбувалося поглиблення інвагінацій мембрани в середину каналців. У просвіті каналців поступово зменшувалася кількість зрілих сперматозоїдів, з'являлися десквамовані клітини сперматогенезу з прогресуючими процесами некроїзації, фрагментовані сперматозоїди зі змішаною патологією (голівки, шийки, хвоста), у порів'янні з попередніми термінами експерименту.

У більшості звивистих сім'яних каналців у рядах сперматогенного епітелію спочатку відбувалася дисконкомплексація та дезорієнтація, а надалі – повна десквамація сперматид. У їхній цитоплазмі – гіпотрофія, у ядрах – гіпохромія і пікноз. Відбувалася також дезорієнтація, дисконкомплексація сперматоцитів II, потім I порядку, а подекуди і їхня десквамація. В окремих сперматоцитах відбувалася вакуолізація цитоплазми, гіпохромія, пікноз і лізис ядер. Завдяки цьому висота сперматогенного епітелію прогресивно падала (порівняно з попередніми термінами експерименту) і становила 48.69 ± 1.65 мкм, що на 18.0% ($p < 0,001$) поступається даним інтактної серії. У зазначений термін діаметр звивистих каналців становив 196.9 ± 1.68 мкм (у контролі – 210.6 ± 1.84 мкм), тобто залишався зменшеним та на 6.5% поступався даним інтактної серії ($p < 0,001$). Поступово підсилювалася гіпоплазія клітин, але навіть у каналцях, де відсутні всі клітини сперматогенезу, зберігалися клітини Сертолі. Ці зміни свідчать про розвиток незворотніх порушень у сім'яних каналцях.

На 90 добу після початку введення ВММ відмічалось прогресуюче зменшення індексу сперматогенезу, який на 14.0% ($p < 0,01$) поступається величині інтактної групи. Число нормальних сперматогоній також прогресивно зменшується та на 24.9% ($p < 0,02$) поступається даним контрольної серії (контроль – 70.2 ± 4.6 ; дослід 52.7 ± 3.5). Кількість каналців зі злушенням епітелієм збільшувалася в 2.9 рази ($p < 0,01$) (контроль – $2.0 \pm 0.8\%$; дослід – $5.8 \pm 0.8\%$), число каналців з 12 стадією мейозу зменшувалося на 61.4% (контроль – $3.7 \pm 0.6\%$; дослід – $1.4 \pm 0.7\%$, $p < 0,05$). Звертає на себе увагу, що у цей термін зменшувалося число каналців як з 4-ма шарами епітелію (на 35.9%, контроль – $38.2 \pm 3.2\%$; дослід – $24.5 \pm 3.0\%$, $p < 0,01$), так і з 3-ма шарами (на 20.7%, контроль – $57.4 \pm 3.6\%$; дослід – $45.5 \pm 3.4\%$, $p < 0,05$). Величина ПСДС також була суттєво зниженою – на 36.3% ($p < 0,02$) поступається даним інтактної групи (контроль – 0.91 ± 0.10 ; дослід – 0.58 ± 0.07).

Дослідження кількісних показників сперми білих шурів за умов 14-денного надходження до організму ВММ не викликає істотних змін середнього числа сперматозоїдів, абсолютної кількості їх

нежиттєздатних і патологічних форм. На 30 добу після початку введення ВММ достовірні зміни середнього числа сперматозоїдів не відмічаються, проте на 52.3% ($P < 0,05$) підвищується кількість нежиттєздатних сперматозоїдів, яка складала $4.4 \pm 0.7 \times 10^6$ – у контролі та $6.7 \pm 0.6 \times 10^6$ – у досліді. Кількість патологічних форм сперматозоїдів у цей термін збільшується на 40.7% ($P < 0,02$) і складає $8.6 \pm 0.8 \times 10^6$ – у контролі та $12.1 \pm 1.0 \times 10^6$ – у досліді. Через 60 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ середнє число сперматозоїдів зменшується на 23.6% ($P < 0,02$) і складає $39.4 \pm 2.2 \times 10^6$ – у контролі та $30.1 \pm 2.4 \times 10^6$ – у досліді. Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів прогресивно збільшується та складає $8.2 \pm 0.6 \times 10^6$, що на 86.4% ($P < 0,01$) перевищує величину контрольної серії. Кількість патологічних форм сперматозоїдів у цей термін складає $12.8 \pm 0.8 \times 10^6$, що на 48.8% ($P < 0,01$) перевищує дані контрольної групи. На 90 добу після початку введення ВММ середнє число сперматозоїдів також прогресивно зменшується та складає $26.9 \pm 1.6 \times 10^6$, що на 31.7% ($P < 0,001$) поступається даним контрольної групи. Кількість нежиттєздатних сперматозоїдів підвищується до $9.7 \pm 1.1 \times 10^6$, що у 2.2 рази ($P < 0,01$) перевищує величину інтактної групи. Кількість патологічних форм сперматозоїдів у цей термін прогресивно збільшується до $14.7 \pm 1.4 \times 10^6$, що на 70.9% ($P < 0,01$) перевищує дані контрольної групи.

Серед патологічних форм спермій, які утворюються за умов тривалого надходження до організму ВММ, відмічається переважання клітин з аномаліями голівки та тіла, а також змішаними дефектами. Число клітин з аномаліями голівки прогресивно підвищується протягом часу введення в організм білих щурів ВММ і складає у контролі – $6.0 \pm 0.4 \times 10^6$, через 30 діб після початку введення ВММ – $10.0 \pm 0.6 \times 10^6$, тобто на 66.7% ($P < 0,001$) перевищує дані контрольної серії. Через 60 діб кількість клітин з дефектами голівки збільшується до $10.2 \pm 0.5 \times 10^6$, а через 90 діб – до $12.2 \pm 0.7 \times 10^6$, що відповідно на 70.0% ($P < 0,001$) та 103.0% ($P < 0,001$) перевищує дані контрольної групи. Дефекти голівки представлені мікро- та макроголівками, голівками з вакуолізованою акросомою та маленькою акросомальною ділянкою. Зустрічаються клітини з подвійними, рідше множинними, голівками.

Число клітин з аномаліями шийки та середньої частини достовірно збільшується на 30 добу після початку введення ВММ (на 63.6%, $P < 0,05$) і складає $1.1 \pm 0.1 \times 10^6$ – у контролі та $1.8 \pm 0.3 \times 10^6$ – у досліді. Зустрічаються клітини із "скрученою" шийкою, стовщеною або нерівномірною середньою частиною. Примітно, що на 30-90 добу після початку введення ВММ зменшується клітин із патологією хвоста. У контролі величина цього показника складає – $1.4 \pm 0.1 \times 10^6$, на 30 добу зменшується до $0.7 \pm 0.1 \times 10^6$ (на 50.0%, $P < 0,001$), на 60 та 90 добу – до $0.6 \pm 0.1 \times 10^6$ (на 57.1%, $P < 0,001$). Водночас, у ці терміни збільшується число сперматозоїдів зі змішаними дефектами. Так, у контролі їхня кількість складає – $0.1 \pm 0.02 \times 10^6$, на 30 добу підвищується до $0.3 \pm 0.04 \times 10^6$ (у 3 рази, $P < 0,001$), на 60 добу – до $0.3 \pm 0.03 \times 10^6$ (у 3 рази, $P < 0,001$), на 90 добу – до $0.4 \pm 0.05 \times 10^6$ (у 4 рази, $P < 0,001$). Тобто, у динаміці дії на організм тварин ВММ істотно збільшується множинність аномалій сперматозоїдів. Перевага патологічних сперматозоїдів із дефектом голівки вказує, що основною причиною порушень є зміни в сперматогенному епітелії сім'яників (Долгов В.В. та співавт., 2006).

Дослідження показників рухливості сперматозоїдів білих щурів за умов 14-денного надходження до організму ВММ не виявляє істотних змін у порівнянні з даними контрольної серії. На 30 добу після початку введення ВММ відмічається збільшення на 79.1% ($P < 0,05$) нерухомих сперматозоїдів (категорія D), число яких складає 8.6±1.0 % – у контролі та 15.4±2.4 % – у досліді. Через 60 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ частка нормокінетичних форм сперматозоїдів (категорія А) зменшується до 25.4±2.4 % (на 58.1%, $p < 0,001$) порівняно з контролем (60.6±6.2 %). Одночасно з цим кількість дискінетичних клітин (категорія С) збільшується до 20.6±3.2 % (у 2,4 рази, $p < 0,05$) у порівнянні з даними контрольної серії (10.0±2.4 %), а акінетичних сперматозоїдів (категорія D) – до 21.6±3.0 (у 2,5 рази, $p < 0,01$) у порівнянні з контролем (8.6±1.0 %).

Через 90 діб після початку введення в організм білих щурів ВММ частка нормокінетичних форм сперматозоїдів (категорія А) продовжує зменшуватися до 20.5±1.8 %, тобто на 66.2% ($p < 0,001$) поступається даним контрольної групи (60.6±6.2 %). Число дискінетичних клітин (категорія С) у цей термін збільшується до 26.1±2.4 % (у 2,8 рази, $p < 0,015$) у порівнянні з даними контрольної серії (10.0±2.4 %), а акінетичних сперматозоїдів (категорія D) – до 28.2±3.8 (у 3 рази, $p < 0,001$) у порівнянні з контролем (8.6±1.0 %).

Слід зазначити, що істотні порушення рухливості сперматозоїдів виявляються тільки на 90 добу після початку введення в організм білих щурів ВММ, оскільки тільки у цей термін число активно-рухливих клітин з поступальним рухом (категорія А) зменшується більше, ніж на 25%, а також кількість сперматозоїдів з поступальним рухом (категорії А+В) зменшується більше, ніж на 50%, що є загальноприйнятими критеріями розвитку астенозооспермії (Долгов В.В. та співавт., 2006).

Введення ВММ самцям щурів істотно впливає на ембріональну летальність. Зокрема, кількість місць імплантації зменшується на 29,8% ($p < 0,01$), жовтих тіл вагітності – на 27,0% ($p < 0,01$), кількість

мертвих плодів підвищується в 2,3 рази ($p < 0,02$) порівняно з контролем. Кількість живих плодів поступається контрольній серії на 57,7% ($p < 0,01$). Розрахунок загибелі ембріонів до імплантації не виявив достовірних відмінностей від даних контрольної групи, проте істотно збільшилися величини загибелі ембріонів після імплантації (в 5,2 разів) та загальної ембріональної смертності (в 3,1 рази).

За умов експерименту значно змінюються величини індексів фертильності та плідності. Індекс фертильності складає 50, що у 2 рази менше, ніж у контрольній групі. Показник індексу гестації, що несе інформацію переважно про здатність до виношування вагітності, перетерплює менші зміни. Індекс гестації складає 80 (на 11,1% поступається даним контрольної групи). Індекс плідності складає 5,2, тобто у 1,6 рази менше, ніж у контрольній групі.

ВИСНОВКИ

1. NO-синтазний механізм утворення оксиду азоту суттєво впливає на перебіг вільнорадикальних процесів у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов моделювання її гострої непрохідності. Застосування неселективного інгібітору NO-синтаз (L-NAME), селективних інгібіторів iNOS (аміногуанідину) та nNOS (7-нітроіндазолу) обмежує збільшення продукції супероксидного аніон-радикала мікросомами. Надлишкова продукція супероксидного аніон-радикала мітохондріальним ЕТЛ при короткочасній (протягом 6 годин) ГТКН пов'язана з функціонуванням iNOS, при тривалій (протягом 18 годин) – iNOS та nNOS. За умов ГТКН активація пероксидного окиснення ліпідів у тканинах тонкої кишки пов'язана з активністю iNOS та супроводжується (при 18-годинній непрохідності) зниженням антиоксидантного потенціалу, активності супероксиддисмутази та каталази. Застосування селективного інгібітору iNOS аміногуанідину обмежує ці порушення. За умов короткочасної ГТКН (протягом 6 годин) функціонування nNOS справляє протективну дію щодо активації пероксидного окиснення ліпідів у тканинах тонкої кишки. Застосування неселективного інгібітору NO-синтаз L-NAME та селективного інгібітору nNOS 7-нітроіндазолу сприяє активації цього процесу. За умов короткочасної (6 годин) ГТКН зниження концентрації макроергічних сполук та енергетичного потенціалу в тканинах тонкої кишки пов'язано з активністю iNOS, а при тривалішій (18 годин) – iNOS та nNOS. Застосування неселективного інгібітору NOS L-NAME, селективних інгібіторів iNOS аміногуанідину та nNOS 7-нітроіндазолу попереджує істотне зменшення концентрації АТФ та енергетичного потенціалу.

2. За умов ГТКН (протягом 6 та 18 годин) функціонування iNOS викликає дезорганізацію сполучної тканини тонкої кишки; селективне пригнічення iNOS аміногуанідином супроводжується зменшенням концентрації мономерів глікопротеїнів та глікозаміногліканів сполучної тканини тонкої кишки, покращує стан кишкового бар'єра та знижують рівень летальності тварин (протягом 18 годин після відтворення ГТКН). Ефекти nNOS залежать від часу розвитку ГТКН: за умов короткотермінової ГТКН (протягом 6 годин) функціонування nNOS обмежує деполімерізацію фукоглікопротеїнів, а за умов тривалої ГТКН (протягом 18 годин) сприяє деполімерізації фуко- та сіалоглікопротеїнів сполучної тканини тонкої кишки. Селективне пригнічення iNOS обмежує порушення бар'єрної функції тонкої кишки та зменшує ризик транслокації мікроорганізмів і продуктів їх розпаду за межі кишки.

3. Застосування перед відтворенням ГТКН L-аргініну обмежує у тканинах тонкої кишки продукцію супероксидного аніон-радикала мікросомальним і мітохондріальним ЕТЛ, активацію ПОЛ, зниження антиоксидантного потенціалу та активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази та каталази), зменшення концентрації АТФ та енергетичного потенціалу, покращує стан кишкового бар'єра та знижує рівень летальності тварин (протягом 18 годин після відтворення ГТКН). Введення L-аргініну у складі хірургічного шовного матеріалу прискорює процес загоєння паравульнарних тканин в зоні тонкокишкового анастомозу, прискорює перехід ранового запалення на моноцитарно-макрофагальну та фібробластичну стадії.

4. Утворення пероксинітриту неоднозначно впливає на генерацію супероксидного аніон-радикала різними ЕТЛ у тканинах тонкої кишки білих щурів за умов моделювання її гострої непрохідності. Застосування скевенджеру пероксинітриту (L-селенометіоніну) обмежує продукцію цієї речовини мітохондріями (за умов 6- та 18-годинного процесу) та збільшує вироблення супероксиду НАДФН-оксидазою лейкоцитів (за умов 6-годинної непрохідності). Застосування L-селенометіоніну обмежує у тканинах тонкої кишки активацію ПОЛ, зниження антиоксидантного потенціалу, активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази та каталази), зниження концентрації АТФ та енергетичного потенціалу, покращує стан кишкового бар'єра.

5. Хронічна інтоксикація нітратом натрію призводить до вірогідного підвищення рівнів фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової кислоти та гексуронових кислот у кістковій тканині нижньої щелепи, при сталих показниках мінерального компоненту, що свідчить про більшу чутливість органічного матриксу та деполімерізацію фуко- та сіалоглікопротеїнів та глікозаміногліканів. Хронічна нітратна інтоксикація супроводжується вивільненням продуктів дезорганізації глікозаміногліканів із

кісткової тканини у кров (збільшення рівня сироваткових хондроїтинсульфатів при сталих показниках глікопротеїнів), викликає системні порушення сполучної тканини щурів (підвищується рівень загальних глікозаміногліканів, їхньої 3-ї фракції (гепарансульфату) та зменшується рівень хондроїтин-4-сульфату сироватки крові).

6. Відтворення перелому нижньої щелепи на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію потенціє дезорганізацію сполучної тканини, що супроводжується збільшенням концентрації складових біополімерів сполучнотканинних структур нижньощелепних кісток. Мінеральний компонент майже не зазнає вірогідних змін. Хронічна нітратна інтоксикація при відтворенні експериментального перелому нижньої щелепи щурів уповільнює процес репаративної регенерації, затримує динаміку диференціювання остеобластів і клітинних елементів мікроциркуляторного русла у ділянці кісткового мозолу, що формується, порушує формування первинних кісткових балок.

7. Пригнічення NO-синтаз вірогідно зменшує вміст фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової кислоти на ранні строки репаративного процесу. Введення неселективного інгібітора NOS збільшує деполімеризацію глікозаміногліканів на ранніх етапах репаративного остеогенезу, введення селективного інгібітора iNOS – обмежує цей процес як на ранніх, так і на пізніх строках репаративної регенерації. Введення L-аргініну обмежує процес деполімеризацію глікозаміногліканів (зменшує рівень гексуронових кислот) у кістковій тканині нижньої щелепи та істотно не впливає на катаболізм фуко- та сіалоглікопротеїнів.

8. Утворення пероксинітриту впливає на перебіг репаративної регенерації кісткової тканини нижньої щелепи. Використання сквенджеру пероксинітриту (L-селенометіоніну) вірогідно обмежує дезорганізацію сполучної тканини кісток нижньої щелепи (зменшує рівень хондроїтинсульфатів, фукози, незв'язаної з білками, N-ацетилнейрамінової кислоти та гексуронових кислот) на ранніх строках репаративного остеогенезу. У пізній термін після моделювання перелому пероксинітрит-залежна дезорганізація сполучної тканини пов'язана, головним чином, з деполімеризацією глікозаміногліканів.

9. У динаміці дії відпрацьованого моторного масла на організм білих щурів у тканинах сім'яників відмічається прогресуюче збільшення продукції супероксидного аніон-радикала мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (на 30 добу – на 34.6%, на 60 добу – на 28.8%, на 90 добу – на 45.1%). Підвищення вироблення супероксиду мікросомальним електронно-транспортним ланцюгом у сім'яниках (на 35.1%) обмежено чітким часовим проміжком і відмічається на 60 добу після початку введення білим щурам відпрацьованого моторного масла. Продукція супероксидного аніон-радикала НАДФН-оксидазою лейкоцитів у тканинах сім'яників білих щурів за умов введення відпрацьованого моторного масла виявляє певну фазність: на 14-30 добу – істотно збільшується (відповідно на 48.4% та 32.3%), на 90 добу – зменшується (на 19.4%). Тривалий вплив відпрацьованого моторного масла викликає активацію процесів вільнорадикального пероксидного окиснення ліпідів у тканинах сім'яників уже на 14 добу після початку його введення (концентрація ТБК-реактивів збільшується на 22.5%). Подальше надходження у організм щурів відпрацьованого моторного масла сприяє виснаженню антиоксидантного потенціалу, зниженню активності супероксиддисмутази (на 90 добу – на 24.2%), що призводить до декомпенсованого характеру пероксидного окиснення ліпідів у тканинах сім'яників. Введення відпрацьованого моторного масла викликає фазні зміни вмісту та співвідношення аденіннуклеотидів у тканинах сім'яників білих щурів: на 14 добу експеримента – підсилюється ресинтез макроергів, на що вказує збільшення концентрації АТФ (на 14.0%), зменшення вмісту АМФ (на 31.6%) та неорганічного фосфату (на 31.9%), підвищення енергетичного потенціалу; у подальшому – істотне пригнічення біоенергетичних процесів, що супроводжується прогресуючим зниженням енергетичного потенціалу та концентрації АТФ (на 60 добу – на 15.5%, на 90 добу – на 16.5%).

10. У динаміці дії відпрацьованого моторного масла на організм білих щурів у сперміях (починаючи з 30 доби експерименту) істотно збільшується продукція супероксидного аніон-радикала як НАДН-залежним мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (на 30 добу – на 9.5%, на 60 добу – на 11.9%, на 90 добу – на 16.3%), так і НАДФН-залежними ланцюгами – НАДФН-цитохром P₄₅₀ і НАДФН-цитохром B₂₄₅₍₅₅₈₎ (на 30 добу – на 11.9%, на 60 добу – на 16.8%, на 90 добу – на 15.8%). У динаміці впливу відпрацьованого моторного масла на організм білих щурів у сперміях (починаючи з 60 доби експерименту) істотно зменшується концентрація АТФ (на 60 добу – на 34.7%, на 90 добу – на 42.9%), а на 90 добу – підвищується вміст фруктози (на 57.9%), що свідчить про пригнічення фруктолізу.

11. При введенні щурам-самцям відпрацьованого моторного масла (500 мг/кг) протягом 90 діб у сім'яниках розвиваються істотні морфофункціональні порушення. На 30-ту добу після початку введення в організм білих щурів ВММ структурні зміни виявляються у вигляді потовщення інтерстиції сім'яника, зменшення діаметру звивистих сім'яних каналців, розладів мікроциркуляторного русла, а також пригнічення процесу диференціації сперматид, що порушує завершальний етап сперматогенезу – період формування. У подальшому має розвиток прогресуючих порушень сперматогенезу, дисконфлексія, дезорієнтація, а з часом і десквамація сперматогенного епітелію. Кількісні та якісні порушення

сперматозоїдів починають формуватися на 30 добу після початку введення білим щурам відпрацьованої моторної оливи, що виявляється у підвищенні числа нежиттєздатних та патологічних форм гамет, збільшенні кількості клітин з аномаліями голівки, шийки та зі змішаними дефектами, збільшенні кількості акінетичних сперматозоїдів. У подальшому рівень ушкоджень прогресивно збільшується, на 60 добу знижується абсолютна кількість сперматозоїдів, число їх нормокінетичних форм, підвищується кількість сперматозоїдів з дискінетичним рухом. На 90 добу число активно-рухливих клітин з поступальним рухом зменшується більше ніж на 25%, а кількість сперматозоїдів з поступальним рухом – більше ніж на 50%, що свідчить про розвиток астенозооспермії.

12. Надходження відпрацьованого моторного моторного масла до організму самців щурів протягом 12 тижнів призводить до суттєвих змін їхньої здатності до запліднення, що виявляється у порушенні репродуктивної функції спарених із ними інтактних самок, збільшенні загальної та постімплантаційної летальності, істотному зниженні індексів фертильності та плідності.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия : руководство / Автандилов Г.Г. – М. : Медицина, 1990. – 384 с.
2. Ажипа Я.И. Нитритная гипоксия. Механизмы и следствия / Я.И. Ажипа, В.П. Реутов, Л.П. Каюшин, Е.Г. Сорокина // Образование канцерогенных N-нитрозосоединений в экосистемах : II всесоюз. конф. по экологической онкологии : тезисы докл. – К., 1990. – С.35-36.
3. Ажипа Я.И. Экологические и медико-биологические проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами / Я.И. Ажипа, В.П. Реутов, Л.П. Каюшин // Физиология человека. – 1990. – Т.16, №3. – С.131-149.
4. А.с. 960626 СССР, М. Кл 3. G 0,1 № 33148. Способ определения гликозаминогликанов в сыворотке крови / М.П. Штерн, О.П. Тимошенко, Ф.С. Леонтьева, Г.Ф. Ключева (СССР). - № 2998857128 – 13; Заявлено 23.10.80; Оpubл. 23.09.82. Бюл №35. – 2 с.
5. 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.
6. Батухіна І.В. Зміни білків сполучної тканини органів травлення щурів при дії відпрацьованого моторного масла на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / І.В. Батухіна // Світ медицини та біології. – 2009. – №2. – Ч.2. – С.78-81.
7. Батухіна І.В. Пероксидне окиснення ліпідів та антиоксидантний захист у тканинах органів травлення щурів при дії відпрацьованого моторного масла на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / І.В. Батухіна // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2008. – Т.8, №4. – Ч.2. – С.74-77.
8. Батухіна І.В. Продукція супероксидного аніон-радикалу в тканинах органів травлення щурів при дії відпрацьованого моторного масла на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / І.В. Батухіна // Світ медицини та біології. – 2008. – №4. – С.39-42.
9. Бишовець Т.Ф. Експериментальне вивчення ембріотоксичної дії лікарських засобів / Т.Ф. Бишовець, В.С. Даниленко, А.В. Матвієнко [та ін.] // Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 115-138.
10. Болдырев А.А. Транспортные аденозинтрифосфатазы. Современ-ные методы исследования / Болдырев А.А. – М. : Наука, 1977. – С. 179-180.
11. 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.
12. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах / А.Ф. Ванин // Биохимия. – 1998. – Т. 63, Вып. 7. – С. 924-928.
13. Ванин А.Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А.Ф. Ванин // Вестн. РАМН. – 2000. – №4. – С.3-5.
14. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. з англ. / Стентон Гланц. – М. : Практика, 1999. – 459 с.
15. Громенко Д.С. Особенности патогенеза идиопатической патозо-оспермии при мужской инфертильности : автореф. дис. на соискание уче-ной степени доктора мед. наук : спец. 14.00.16 “Патологическая физиология” / Д.С. Громенко. – СПб., 2009. – 42 с.
16. Громенко Д.С. Роль активных форм кислорода в формировании мужской инфертильности / Д.С. Громенко, Ш.Н. Галимов, Д.В. Шемагонов, Р.Р. Фархутдинов // Казанский мед. журн. – 2007. – Т.88, №4, Прил. – С. 23-24.
17. Денисенко С.В. Изменения митохондриального окисления и фосфорилирования в семенниках белых крыс в условиях избыточного поступления в их организм нитрата натрия / Денисенко С.В., Костенко В.А. // Укр. биохим. журн. – 2003. – Т.75, №1. – С.95-97.

18. Денисенко С.В. Изменения содержания и соотношения адениннуклеотидов в семенниках белых крыс в условиях избыточного поступления в организм нитрата натрия / Денисенко С.В. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Укр. мед. стоматол. акад. – 2002. – Т.2, №1. – С.16-17.
19. Денисенко С.В. Опосередкованість порушень ембріо- та фетогенезу нітратною інтоксикацією самців і коригувальний вплив мексидолу на ці процеси / Денисенко С.В. // Вісн. Сумськ. держ. ун-ту : Серія Медицина. – 2005. – №3(75). – С. 37–39.
20. Денисенко С.В. Особливості спермограми при хронічній інтоксикації нітратом натрію / Денисенко С.В. // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2002. – №7-8. – С.38-41.
21. Дмитрук О.М. Комплексне лікування та профілактика неспроможності швів анастомозів у хворих з гострою тонкокишковою непрохідністю (клініко-експериментальне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.03 “Хірургія” / О.М. Дмитрук. – К., 2008. – 20 с.
22. Должкова К. П. Вплив хронічної інтоксикації нітратом натрію на репаративну регенерацію нижньої щелепи / К. П. Должкова // Актуальні проблеми сучасної медицини : Вісник Укр. мед. стомат. академії. – 2009. – Т. 9, вип. 2 (26). – С. 44–45.
23. Должкова К. П. Біохімічні показники сироватки крові щурів як ознаки репаративної регенерації кісток нижньої щелепи на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / К. П. Должкова // Актуальні проблеми сучасної медицини : Вісник Укр. мед. стомат. академії. – 2009. – Т. 10, вип. 1 (29). – С. 32–35.
24. Должкова К. П. Вплив пригнічення та індукції NO-синтаз на біохімічний склад кісткової тканини нижньої щелепи при відтворенні її перелому на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / К. П. Должкова, В. О. Костенко // Проблеми екології та медицини. – 2010. – Т. 14, № 1–2. – С. 35–38.
25. Должкова К. П. Вплив хронічної інтоксикації нітратом натрію на процеси репаративної регенерації нижньощелепної кістки у щурів / К. П. Должкова // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2010. – Т. 5, № 3. – С. 51–55.
26. Дробінська О. Вплив L-аргініну на ураження в слизовій оболонці шлунка, спричинені серотоніном / О. Дробінська, Л. Остапченко, О. Цирюк [та ін.] // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2004. – Вип. 38. – С. 201-204.
27. Жданов С.М. Комплексне лікування гострої тонкокишкової непрохідності з використанням ранньої ентеральної терапії (клініко-експериментальне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.03 “Хірургія” / С.М. Жданов. – К., 2008. – 21 с.
28. Іванюта Л.І. Неплідність у шлюбі. Здобутки та перспективи / Л.І. Іванюта, С.О. Іванюта. – К. : Задруга, 2005. – 339 с.
29. Калетина Н.И. Микроэлементы – биологические регуляторы / Калетина Н.И., Калетин Г.И. // Наука в России. – 2007. – № 1. – С. 50-57.
30. Каменчук Я.А. Отработанные нефтяные масла и их регенерация (на примере трансформаторных и промышленных масел) : автореф. дис. на соискание ученой степени канд. хим. наук : спец. 02.00.13 “Нефтехимия” / Я.А. Каменчук. – Томск, 2007. – 23 с.
31. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь. – Т.1. – 495 с.
32. Карпова Е.А. Разработка оптимальных условий определения фруктозы тиобарбитуровым методом / Карпова Е.А. // Лаб. дело. – 1987. – №2. – С. 26-28.
33. Катрушов О.В. Патогенна дія відпрацьованих моторних масел: недооцінена небезпека / О.В. Катрушов, В.О. Костенко, І.В. Батухіна, Н.В. Соловійова, В.Л. Філатова // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. - 2009. – Т.9, №3. – С.188-193.
34. Кібкало Д.В. Інформативність біохімічних показників сполучної тканини в диференційній діагностиці гепатодистрофії і цирозу печінки у корів: дис. канд.вет.наук: 16.00.01 / Д.В. Кібкало – Харків. – 2004. – 182 с.
35. Костенко В.А. Антигипоксанты метаболического действия – перспективные средства коррекции окислительных и репаративных процессов в тканях / В.А. Костенко, Л.Ю. Глебова, Н.Н. Мельник [и др.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2003. – Т.3, №1. – С. 4-8.
36. Костенко В.А. Влияние рассасывающихся шовных материалов на процессы внутриклеточной регенерации в эксперименте / В.А. Костенко // Клін. хірургія. - 1997. - №9-10. - С.74-75.
37. Костенко В.А. Влияние модифицированной этонием хирургической нити из биофила на пластический метаболизм в почках белых крыс / В.А. Костенко // Клін. хірургія. - 1997. - №11-12.- С.71-73.
38. Костенко В.А. Местное или системное действие антигипоксантов, иммобилизованных на хирургических нитях, определяет их фармакологические эффекты? / В.А. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. - 2001. – Т.1, №1-2. - С.30-33.
39. Костенко В.А. Новые подходы к разработке и применению шовных материалов в абдоминальной хирургии / В.А. Костенко, А.В. Лигоненко, Н.Н. Гвоздяк [и др.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2008. – Т.8, №1-2. – С.97-99.
40. Костенко В.А. Роль окислительного метаболизма в патогенезе раневого процесса / В.А. Костенко, Н.В. Крышталь, А.В. Мищенко [и др.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2003. – Т.3, №2. – С.119-122.
41. Костенко В.А. Хирургический шовный материал будущего: конструктивные взаимоотношения нити и паравульнарных тканей / В.А. Костенко, Н.С. Скрипников, А.В. Лигоненко [и др.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2006. – Т.6, №1-2. – С.259-261.

42. Костенко В.А. Перспективы создания и применения новых метаболитотропных хирургических шовных материалов / В.А. Костенко, С.В. Гончар, Е.Н. Пронина [и др.] // Таврический медико-биол. вестн. – 2008. – Т.11, №3. – Ч.2. – С.37-39.
43. Костенко В.О. Зміни енергетичного метаболізму в нирках білих щурів у динаміці гострої інтоксикації нітратом натрію // Фізіол. журн. - 1995. - Т.41, N.5-6. - С.91-96.
44. 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.
45. 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.
46. Костенко В.О. Фармакологічна регуляція окиснювальних і репаративних процесів в оперованих органах антигіпоксантами, іммобілізованими на хірургічних нитках : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : спец. 14.03.05 „Фармакологія” / В.О. Костенко. – К., 2002. – 32 с.
47. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / [В.В. Долгов, С.А. Луговская, Н.Д. Фанченко, И.И. Миронова и др.]. – М. – Тверь : Триада, 2006. – 145 с.
48. Левков А. А. Енергетичний обмін у тканинах тонкої кишки за умов її гострої непрохідності та зміни функціональної активності NO-синтаз / А. А. Левков // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2009. – Т.9, №2. – С. 86-90.
49. Левков А. А. NO-залежні зміни продукції супероксидного аніон-радикала в тканинах тонкої кишки за умов її гострої непрохідності / А. А. Левков, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2010. – Т.10, №1. – С. 43-48.
50. Левков А. А. NO-залежні зміни метаболізму біополімерів сполучної тканини в тканинах тонкої кишки за умов гострої тонкокишкової непрохідності / А. А. Левков, В. О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія – 2010. – Т.5, № 3. – С.65-70.
51. Леонтьев В.К. Биохимические методы исследования в экспериментальной и клинической стоматологии / В.К. Леонтьев, Ю.А. Петрович. – Омск. – 1976. – С. 49-93.
52. Лігоненко О.В. Мексидол – ефективний засіб антигіпоксичного захисту зони анастомозу при виникненні гострої непрохідності тонкого кишечника / О.В.Лігоненко, В.О. Костенко, І.О.Чорна [та ін.] // Клін. хірургія. – 2007. – №5-6.- С.29-30.
53. Методы исследования в профпатологии / под ред. О.Г.Архиповой. – М. : Медицина, 1988. – 208 с.
54. 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.
55. Мешкова П.П. Практикум по биохимии животных / Мешкова П.П., Северин С.Е. – М. : Советская наука, 1950. – 290 с.
56. Мищенко А.В. Изменение содержания макроэргов в тканях тонкого кишечника белых крыс в ранний период острой фтористой интоксикации / Мищенко А.В., Костенко А.Г. // Проблеми екології та медицини — 1999. - №5. - С. 31 -32.
57. Мищенко А.В. Вплив гострої фтористої інтоксикації на зміну активності антиоксидантного захисту і процесів перекисного окислення ліпідів у тканинах тонкого кишечника білих щурів / Мищенко А.В., Костенко А.Г. // Вісник Вінницького державного медичного університету. — 2000. – Т.4, №2. - С. 409-410.
58. Мищенко А.В. Изменение процессов тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в тканях тонкого кишечника и печени белых крыс при фтористой интоксикации / Мищенко А.В., Костенко А.Г. // Проблеми екології та медицини. - 2000. - №2. - С. 10-12.
59. Міщенко А.В. Вплив гіпербаричної оксигенації на вміст аденіннуклеотидів у тканинах тонкої кишки білих щурів при гострій фтористій інтоксикації / Міщенко А.В., Глебова Л.Ю. // Буковинський медичний вісник.-2000.-№4.- С. 172-175.
60. Міщенко А.В. Енергетичний метаболізм тонкого кишечника при гострій інтоксикації фторидом натрію і застосуванні гіпербаричної оксигенації: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.04 «Патофізіологія» / А.В.Міщенко - К., 2001. - 20 с.
61. Міщенко А.В. Зміни вмісту аденіннуклеотидів у тканинах тонкого кишечника та печінки білих щурів при фтористій інтоксикації та впливу іонізуючої радіації / Міщенко А.В., Костенко А.Г., Глебова Л.Ю. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. - 2001. - Т. 1., вип.1-2.- С. 34-35.
62. Оберлис Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у чело-века и животных / Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. – СПб. : Наука, 2008. – 544 с.
63. Павлова Л.П. Про закономірності чоловічої неплідності в Україні / Павлова Л.П., Сайдакова Н.О., Царенко В.Л., Павлов М.О. // Сексологія і андрологія. – 2002. – Вып. 6. – С. 201-205.
64. Пат. 21676 А Україна, МПК А61В 17/00, А61В 17/12. Спосіб моделювання гострої тонкокишкової непрохідності / Лігоненко О.В., Жданов С.М., Дмитрук О.М., Чорна І.О. – № u200611924 ; заявл. 13.11.2006 ; опубл. 15.03.2007, Бюл. № 3
65. Пат. 21677 А Україна, МПК А61В17/12. Спосіб інтраопераційної діагностики порушення бар'єрної функції кишечника при гострій тонкокишкової непрохідності / Лігоненко О.В., Жданов С.М., Дмитрук О.М., Чорна І.О. – № u200611927 ; заявл. 13.11.2006 ; опубл. 15.03.2007, Бюл. № 3

66. Пат. №35451A UA, МПК 6 G01 №33/48. Спосіб оцінки порушень сперматогенезу / Яценко В.П., Анісімова І.Г., Запривода Л.П.; НМУ імені О.О. Богомольця (UA). – Заявка №99105629; Заявл. 14.10.1999; Опубл. 15.03.2001, Бюл. №2.
67. Пат. 39088 Україна, МПК А61 L17/00. Спосіб одержання резорбтивного біологічно активного шовного матеріалу / Гончар С.В., Проніна О.М., Костенко В.О., Скотнікова Л.В., Левков А.А.; № u 2008 06857; заявл. 19.05.2008, опубл. 10.02.2009, Бюл. №3
68. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
69. Руководство к практическим занятиям по клинической лабора-торной диагностике / под ред. М.А. Базарновой, В.Т. Морозовой. – К.: Вища школа, 1988. – 318 с.
70. Скляров О.Я. Роль NOS-синтазної системи та процесів ліпопероксидації в цитопротекторних механізмах за умов ульцерогенного коліту / О.Я. Скляров, Н.Б. Панасюк, О.Р. Джура // Експерим. та клін. фізіол. і біохім. – 2009. – № 1. – С. 38-44.
71. Скрипніков М.С. Вплив різних розсмоктувальних шовних матеріалів на вміст макроергічних сполук в оперованих нирках собак / М.С. Скрипніков, В.О. Костенко, О.М. Проніна // Одеський мед. журн. – 2000. – №1. – С.18-19.
72. Скрипніков М.С. Хірургічні шовні матеріали з фармакотерапевтичною дією: перспективи розробки та застосування / М.С. Скрипніков, В.О. Костенко, О.М. Дубровіна [та ін.] // Ліки. – 1998. – № 6. – С.48-55.
73. Скрипніков Н.С. Методологические подходы к разработке новых хирургических рассасывающихся шовных материалов / Н.С. Скрипніков, Е.Н. Проніна, А.С. Ставничий, В.А. Костенко // Вісн. пробл. біології і медицини. – 2005. – Вип. 2. – С. 7-10.
74. Скрипніков Н.С. Морфологические и метаболические изменения в тканях при имплантации хирургических шовных материалов / Скрипніков Н.С., Костенко В.А., Проніна Е.Н., Романцев А.Ю. // Клін. хірургія. - 1997. - №11-12. - С.78-81.
75. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани / Л.И. Слуцкий. – Л.: Медицина. – 1969. – 375 с.
76. Соловійова Н.В. Зміни вільнорадикальних окиснювальних процесів у тканинах сім'яників білих щурів при дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловійова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2010. – Т.10, №1. – С. 77-81.
77. Соловійова Н.В. Зміни окиснювального метаболізму в сперматозоїдах білих щурів при тривалій дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловійова, В.О. Костенко // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2010. – №1. – С. 177-179.
78. Соловійова Н.В. Зміни функціональних показників сперми білих щурів за умов тривалої дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловійова, В.О. Костенко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2008. – Т. 3, №4. – С. 34-39.
79. Соловійова Н.В. Морфологічні та морфометричні зміни в сім'яниках щурів за умов тривалої дії на організм відпрацьованого моторного масла / Н.В. Соловійова, Є.В. Стецук // Світ медицини та біології. – 2010. - №1. – С. 49-54.
80. Соловійова Н.В. Репродуктивна здатність білих щурів-самців за умов тривалого введення відпрацьованого автомобільного масла / Н.В. Соловійова, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2009 – Т.9, №2. – С. 124-126.
81. Сорокман Т.В. Роль монооксиду нітрогену в розвитку гастроуденальної патології / Т.В. Сорокман, Д.Р. Андрійчук, С.В. Сокольник, О.В. Макарова // Буковинськ. мед. вісн. – 2009. – Т. 13, №1. – С. 136-139.
82. Ступаков Г.П. Костная система и невесомость / Г.П. Ступаков, А.И. Воложин. – М.: Наука. – 1989. – 184 с. – (Проблемы космической биологии; т. 63).
83. Трахтенберг И.М. К проблеме сочетанного гонадотоксического действия тяжелых металлов (свинца и кадмия) и ионизирующего излучения / Трахтенберг И.М., Андрусихина И.Н. // Гигиена труда. – К., 2000. -Вип. 31. – С.101-110.
84. Шараев П.Н. Метод определения гликозаминогликанов в биологических жидкостях / П.Н. Шараев, В.Н. Пишков, Н.И. Соловьёва [и др.] // Лаб. дело. – 1987. – №5.- С.330-332.
85. Шараев П.Н. Метод определения фукозы, не связанной с белками / П.Н. Шараев, Н.С. Стрелков, Р.Р. Кильдиярова [и др.] // Клин. лаб. диагностика. – 1997. – №4. – С. 17-18.
86. Штейнберг О.П. Определение гликопротеидов в сыворотке крови / О.П. Штейнберг, Я.Н. Доценко // Врачебное дело. – 1962. - №12. – С. 43-45.
87. Цебржинский О.И. Дифференцированное спектрофотометрическое определение продукции супероксида в тканях НСТ-тестом / Цебржинский О.И. // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2002. – Т.2, №1. – С.96-97.
88. 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.
89. Цебржинський О.І. Оксидативна активність у сперматозоїдах / Цебржинський О.І. // Фізіол. журн. – 2000. – Т.46, № 4. – С.71-75.

90. Чайка О.Г. Моніторинг утворення відпрацьованих олив в Україні / О.Г. Чайка, О.З. Ковальчук, Ю.А. Чайка // Вісн. Нац. ун-ту "Львівська політехніка". Сер. Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2009. – № 644. – С. 221-224.
91. Шиш Н.В. Влияние препаратов антиоксидантов на биохимические и морфофункциональные показатели ре-продуктивной системы крыс-самцов при длительном по-ступлении клопиралаида / Шиш Н.В., Бобырев В.Н. // Одеськ. мед. журн. – 2006. – №2. – С 33-36.
92. Шиш Н.В. Влияние препаратов антиоксидантов на биохимичес-кие и морфо-функциональные показатели репродуктивной системы крыс-самцов при длительном поступлении ацетата свинца / Шиш Н.В., Бобырев В.Н. // Світ медицини та біології. – 2006. – №2. – С. 60-65.
93. 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.
94. Яценко В.П. Новый метод морфометрического исследования закономерностей сперматогенеза / Яценко В.П., Анисимова И.Г., Запривода Л.П. // Вісн. морфології. – 1999. – №2. – С. 224-226.
95. Aitken R.J. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line / Aitken R.J., De Iulius G.N., McLachlan R.I. // Int. J. Androl. – 2009. – V.32, №1. – P. 46-56.
96. Aitken R.J. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt : Founders' Lecture / Aitken R.J. // *Reprod. Fertil. Dev.* – 2004. – V.16, №7. – P. 655-664.
97. Aitken R.J. Male reproductive health and the environment / Aitken R.J., Skakkebaek N.E., Roman S.D. // *Med. J. Aust.* – 2006. – V.185, №8. – P. 414-415.
98. Aitken R.J. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic in-tegrity of human spermatozoa / Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D. [et al.] // *Biol. Reprod.* – 1998. – V.59, №5. – P. 1037-1046.
99. Aoi Y. Roles of nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of dextran sulfate sodium-induced rat colitis / Y. Aoi, S. Terashima, M. Ogura [et al.] // *J Physiol Pharmacol.* – 2008. – V. 59, № 2. – P. 315-336.
100. Atkinson D.E. The energy charge of the adenylate pools as a regulatory parameter: Interaction with feedback modifiers / D.E. Atkinson // *Biochemistry.* – 1968. – V.7, №11. – P.4030-4034.
101. Bauer A.J. Pleus in critical illness: mechanisms and management / A.J. Bauer, N.T. Schwarz, B.A. Moore [et al.] // *Curr Opin Crit Care.* – 2002. – V.8, №2. – P. 152-157.
102. Beck P.L. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury / P.L.Beck, R.Xavier, J.Wong [et al.] // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* – 2004. – V.286. – G137-G147.
103. Bourgeron T. Mitochondrial function and male infertility / Bourgeron T. // *Results Probl. Cell. Differ.* – 2000. – V. 28. – P. 187-210.
104. Boussouar F. Lactate and energy metabolism in male germ cells / Boussouar F., Benahmed M. // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2004. – V. 15, №7. – P. 345-350.
105. Carlsen E. Longitudinal changes in semen parameters in young Dan-ish men from the Copenhagen area / Carlsen E., Swan S.H., Petersen J.H., Skakkebaek N.E. // *Hum. Reprod.* – 2005. – V.20, №4. – P. 942-949.
106. Dijkstra G. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease / G. Dijkstra, H. Moshage, H.M. van Dullemen [et al.] // *J Pathol.* – 1998. – V.186. – P.416-421.
107. Dijkstra G. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract / G. Dijkstra, H. van Goor, P.L. Jansen, H. Moshage // *Curr Opin Investig Drugs.* – 2004. – V.5, №5. – P. 529-536.
108. Fathalla M.F. Sexual and reproductive health for all: a call for action / Fathalla M.F., Sinding S.W., Rosenfield A., Fathalla M.M. // *Lancet.* – 2006. – V. 368, №9552. – P. 2095-2100.
109. Friebe A. Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase / A. Friebe, E. Mergia, O. Dangel [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – V. 104, №18. – P. 7699-7704.
110. Jaworeck D. Adenosin-5'-diphosphat und adenosin-5'-monophosphat / D. Jaworeck, W. Gruber, H.V. Bermeyer // *Methoden der enzymatischen analyse.* – Bd.II. – Weinheim : Verlag – Chemie, 1974. – S. 2147-2151.
111. Jouannet P. Semen quality and male reproductive health: the contro-versy about human sperm concentration decline / Jouannet P., Wang C., Eus-tache F. // *APMIS.* – 2001. – V. 109, №5. – P. 333-344.
112. Khan A.T. A two-generational reproductive toxicity study of zinc in rats / Khan A.T., Graham T.C., Ogden L. [et al.] // *J. Environ. Sci Health B.* – 2007. – V.42, №4. – P. 403-415.
113. de Lamirande E. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases / de Lamirande E., O'Flaherty C. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V.1784, №1. – P. 106-115.
114. Laude K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J.Favre, C. Thuillez [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2003. – V.284, №6. – P. H2053-H2060.
115. Martynowicz H. The influence of lead on testis function / Mar-tynowicz H., Andrzejak R., Medraś M. // *Med. Pr.* – 2005. – V.56, №6. – P. 495-500.
116. Methods of enzymatic analysis ; ed. E. Beutler. – N.Y., 1975. – V.1. – 565 p.
117. Mirza M.H. Detection and comparison of nitric oxide in clinically normal horses and those with naturally acquired small intestinal strangulation obstruction / M.H. Mirza, J.L. Oliver, T.L. Seahorn [et al.] // *Can J Vet Res.* – 1999. – V.63, №4. – P. 230-240.
118. Palasthy Z. Dual effects of nitric oxide in acute colon obstruction / Z. Palasthy, J. Kaszaki, S. Nagy [et al.] // *Magy Seb.* – 2005. – V.58, №1. – P. 47-55.

119. Palasthy Z. Intestinal nitric oxide synthase activity changes during experimental colon obstruction / Z. Palasthy, J. Kaszaki, G. Lazar [et al.] // *Scand J Gastroenterol.* – 2006. – V. 41, №8. – P. 910-918.
120. Samel S. Supplementation and inhibition of nitric oxide synthesis influences bacterial transit time during bacterial translocation in rats / S.Samel, M. Keese, S. Lanig [et al.] // *Shock.* – 2003. – V.19, №4. – P. 378-382.
121. Sartor R. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis / R. Sartor // *Nature Clinical Practice Gastroenterol. Hepatol.* – 2006. – V.3. – P. 390-407.
122. Ssempebwa J.C. The generation, use and disposal of waste crankcase oil in developing countries: a case for Kampala district, Uganda / Ssempebwa J.C., Carpenter D.O. // *J. Hazard. Mater.* – 2009. – V. 161, №2-3. – P. 835-841.
123. Ssempebwa J. Waste crankcase oil: an environmental contaminant with potential to modulate estrogenic responses / Ssempebwa J., Carpenter D., Yilmaz B. [et al.] // *J. Toxicol. Environ. Health.* – 2004. – V.67, №14. – P.1081-1094.
124. Takeuchi K. Lack of gastric toxicity of nitric oxide-releasing indomethacin, NCX- 530, in experimental animals / K. Takeuchi, H. Mizoguchi, H. Araki [et al.] // *Dig Dis Sci.* – 2001. – V.46. – P.1805-1818.