

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

ЯРОШЕНКО ДЕНИС СЕРГІЙОВИЧ

УДК 591.463.1:591.463.2:612.616.31

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗВИТОК ТА ФУНКЦІОНУВАННЯ СІМ'ЯНИКІВ В УМОВАХ
ТРИВАЛОЇ ДІЇ БІСФЕНОЛУ А В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

спеціальність 222 – «Медицина»

галузь знань 22 - «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ Д. С. Ярошенко

Науковий керівник: Бондаренко Олександр Олександрович, кандидат медичних наук, доцент

Дніпро – 2024

АНОТАЦІЯ

Ярошенко Д. С. Розвиток та функціонування сім'яників в умовах тривалої дії бісфенолу А в експерименті. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії, галузь знань – 22 «Охорона здоров'я», спеціальність – 222 «Медицина» – Міністерство охорони здоров'я України, Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, 2024 р.

Дисертаційне дослідження виконано на кафедрі патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології Дніпровського державного медичного університету.

Дисертація присвячена встановленню особливостей змін гістоархітекtonіки сім'яників, якісних показників еякуляту та гормонального статусу, залежно від дози і термінів експозиції ВРА. Основна увага роботи спрямована на патологічні зміни сперматогенезу за умов тривалої токсичної дії різних доз бісфенолу А.

Безпліддя чоловіків репродуктивного віку є глобальною проблемою здоров'я людей. Забруднення екології хімічними сполуками створює умови для розвитку різних форм безпліддя людей. Серед різноманітних етіологічних чинників чоловічого безпліддя постійно зростає частка хімічних агентів, яким притаманні ендокринні властивості. В світовій промисловості найбільшого поширення, з групи EDCs речовин, набув бісфенол А (ВРА), який став найважливішою антропогенною сполукою, що використовується при синтезі полікарбонатів та епоксидних смол. Наукові дослідження та клінічні спостереження доводять, що ендокринно активні речовини є серйозною проблемою репродуктивної функції чоловіків. Однак, механізми цього впливу, особливо при тривалій дії ВРА, на даний момент є недостатньо зрозумілими.

Тому мета роботи полягала в встановленні особливостей структурних і функціональних змін в сім'яниках, що зазнали тривалої токсичної дії бісфенолу А.

Дослідження, які проводились в межах даної експериментальної роботи відповідали вимогам Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 року). Усі дослідні процедури проведено відповідно до міжнародних вимог і норм гуманного відношення до тварин. Директиви № 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються з науковою метою (2010 р.), Закону України 3447-ІУ від 21.02.2006 р., та висновку комісії з питань біомедичної етики ДДМУ (протокол № 18 від 17.04.2024 р.).

Для дослідження використано 120 щурів самців лінії Wistar віком 2–3 місяці, масою 210–230 г. Тварин утримували у клітках із вільним доступом до води та їжі, що включала в себе всі необхідні вітаміни і мікроелементи за умов 12/12 годинний цикл світло/темрява при температурі 22°C.

Відібрані щури були рандомізовано розділені на чотири групи: F0-1 – контрольна група (n=30) – тварини, які знаходились на звичайному харчуванні і додатково отримували кукурудзяну олію – 2,5 мл/кг маси тіла ; F0-2 – інтактна група (порівняння) (n=30) тварини, які знаходились на звичайному харчуванні; F0-3 – експериментальна група (n=30) – піддослідні тварини, яким протягом 120 діб вводили бісфенол А (Sigma-Aldrich, USA), розчинений в кукурудзяній олії, дозою – 50 мг/кг/добу; F0-4 – експериментальна група (n=30) – тварини, яким протягом 120 діб вводили бісфенол А, розчинений в кукурудзяній олії дозою – 250 мг/кг/доба. Розчинений в кукурудзяній олії ВРА вводили щодня перорально.

Оцінка кількісних та якісних показників еякуляту, зразки якого отримували методом трансректальної електростимуляції сім'яних горбиків щурів, виконувалась за методичними рекомендаціями ВООЗ. Рівень тестостерону та 17 β -естрадіол в сироватці крові визначали з використанням

тест-наборів імуноферментного аналізу: Rat Testosterone ELISA Kit, та Rat Estrogen ELISA Kit. Фертильність щурів визначали шляхом парування дослідних самців з інтактними самицями у співвідношенні самець : самиця – 1:1 протягом 2–3 естральних циклів.

В дослідженні застосовували стандартний морфологічний метод для виготовлення гістологічних препаратів: біоматеріал заливали у парафін, гістологічні препарати сім'яників забарвлювали гематоксилином і еозіном. Під час проведення морфометричних спостережень досліджували звивисті сім'яні каналці, вимірювали їх діаметри, висоту сперматогенного епітелію та діаметри просвіту сім'яних каналців. Вимірювали масу тіла щурів та сім'яників, визначали індекс сперматогенезу, індекс релаксації (напруги сперматогенезу) та гонадо-соматичний індекс. Тварин виводили з експерименту шляхом введення тіопенталу натрію (50 мг/кг маси тіла внутрішньочеревинно).

При проведенні морфометричного аналізу, після 120 доби дослідження впливу бісфенолу А (ВРА) на сім'яники, відзначалося формування більш пухкої організації колагенових волокон білкової оболонки сім'яників, суттєво зросла її товщина. Форма більшості звивистих сім'яних каналців округлилась і їх розташування стало не щільним. У сім'яниках щурів групи F0-3 і, більшою мірою, у тварин групи F0-4, що отримували ВРА, спостерігалися суттєві деструктивні морфологічні зміни, порівняно з сім'яниками тварин груп F0-1 і F0-2. ВРА призводив до зменшення діаметру звитих сім'яних каналців та висоти сперматогенного епітелію щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4 у порівнянні з контрольною і інтактною групами F0-1, і F0-2, які не зазнали впливу ВРА. Крім цього, в сім'яниках щурів в групах F0-3 і F0-4 збільшився середній діаметр просвіту звивистих сім'яних каналців, відповідно до 98,80 і 111,79 мкм, порівняно з аналогічними показниками контрольної групи F0-1 – 89,43 мкм, і групи F0-2 – 86,85 мкм ($p < 0,05$). Отже, при введенні щурам 50

мг/кг/доба і 250 мг/кг/доба ВРА протягом 120 діб відбувались патологічні зміни гістологічної архітекτονіки сім'яників.

Тривалий вплив ВРА на щурів самців призводив до формування десквамації сперматогенного епітелію та інших патогістологічних змін в сім'яниках, що може призвести до зменшення фертильності.

Отримані дані вказують на те, що репродуктивна система є однією з основних мішеней токсичного впливу бісфенолу А. Здобуті в ході експерименту дані показали етіологічне значення тривалого впливу ВРА на щурів самців у формуванні деструктивних змін сперматогенного епітелію та інших патогістологічних змін в сім'яниках.

Протягом експерименту у щурів експериментальних груп маса тіла зростала, в залежності від рівня токсичного впливу ВРА. Тварини груп F0-3 і F0-4 набирали масу на 23,6 і 28,9 % більшу, порівняно з щурами контрольної групи. Протягом експерименту у щурів, які зазнали впливу ВРА дозою 250 мг/кг/доба, спостерігались сповільнення приросту маси сім'яників щурів та зниження гонадо-соматичного індексу, порівняно з сім'яниками щурів контрольної групи. У 27 % звивистих сім'яних каналців, які зазнали важких пошкоджень сперматогенного епітелію, утворювалась порожнина з порушенням процесів сперматогенезу. Показник індексу сперматогенезу в кінці експерименту зменшився з $4,02 \pm 0,25$ до $2,89 \pm 0,31$ і $2,36 \pm 0,28$ або на 28,11 і 41,29 %, відповідно в групах F0-3 і F0-4 ($p > 0,005$).

Порушення сперматогенезу проявлялися також зменшенням частки статевих клітин, відносно стабільної до впливів токсикантів популяції клітин Сертолі. Так, протягом експерименту індекс релаксації (напруженості сперматогенезу) знизився з $19,20 \pm 1,54$ до $17,07 \pm 0,39$ і $16,07 \pm 1,83$ або на 11,19 і 16,30 %, відповідно в групах F0-3 і F0-4, порівняно з тваринами контрольної групи щурів F0-1 ($p < 0,005$), що вказує на зниження функціональної здатності сім'яників щурів, які зазнали патологічного впливу ВРА. В цілому дані фізичного розвитку дослідних тварин демонстрували зміни функціонального

стану організму і були вагомим маркером оцінки стану здоров'я. Отримані експериментальні дані показують, що ВРА викликав патологічні зміни структурних елементів сім'яників, сприяв зменшенню маси і розміру сім'яників щурів груп F0-3 і F0-4, порівняно з аналогічними показниками щурів контрольної групи F0-1.

Аналіз отриманих даних продемонструював, що ВРА призводить до зміни структурних елементів сім'яників та негативно впливає на процеси сперматогенезу. Тварини експериментальних груп під впливом ВРА, протягом експерименту, набирали більшу масу тіла, крім цього у щурів під впливом ВРА відзначалось дозозалежне зменшення індексу сперматогенезу та гонадосоматичного індексу, порівняно з тваринами контрольної групи.

Однією з умов стабільної роботи складної репродуктивної системи є підтримання необхідного рівня гормонального фону. В нашому експерименті ВРА сприяв статистично значущому зниженню концентрації досліджуваних гормонів у сироватці крові щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, які зазнали тривалого впливу ВРА, порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). Отже, концентрація тестостерону в сироватці крові щурів групи F0-4, на 120 добу експерименту, знизилась на 63 %, а у групи F0-3 на 49 %. Показники концентрації 17 β -естрадіолу в сироватці крові щурів груп F0-3 і F0-4 знизились, відповідно на 51 % та 71 %. У тварин контрольної групи F0-1 і групи порівняння F0-2, які не отримували ВРА, концентрація гормонів відповідала фізіологічній нормі і не зазнала статистично значущих змін. ($p < 0,05$)

Фертильність щурів визначали шляхом парування дослідних самців з інтактними самицями. В ході нашого експерименту спостерігалось поступове зменшення фертильності самців, які зазнали тривалого впливу ВРА. Так, період від 113 до 120 доби дослідження характеризувався зниженням фертильності тварин в групі F0-3 на 30 %, $p \leq 0,05$ і в групі F0-4 на 40 %, $p \leq 0,05$. Натомість в групах F0-1 (контроль) і F0-2 показники фертильності,

протягом експерименту, не зазнали статистично значущих змін. Отже, наслідком впливу досліджуваної речовини стало суттєве зменшення фертильності щурів самців експериментальних груп, що отримували ВРА дозою 50 і 250 мг/кг/доба протягом 120 діб, порівняно з інтактними тваринами контрольної групи.

Деструктивна дія ксеноестрогену ВРА спрямована на складні гормонозалежні процеси сперматогенезу. Аналіз дисфункціональних змін і можливість реалізації репродуктивної функцій в довгостроковій перспективі показує, що ВРА є тестикулярним токсикантом.

Під впливом ВРА поступово сформувалися комплекси порушень, які змінювали гормональний статус дослідних тварин: суттєве зниження концентрації тестостерону і 17β -естрадіолу в сироватці крові щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, порівняно з контрольною групою, де концентрація гормонів відповідала фізіологічній нормі і не зазнала статистично значущих змін.

Аналіз дисфункціональних змін і можливість реалізації репродуктивної функції в довгостроковій перспективі показує, що ВРА є тестикулярним токсикантом, який викликає гормональний дисбаланс та негативно впливає на процеси сперматогенезу, знижуючи рівень фертильності тварин.

Встановлено, що тривале застосування ВРА, навіть у невеликих дозах, викликало негативні зміни досліджуваних параметрів сперми – кількості, рухливості та морфології сперматозоїдів, що вказує на порушення в системі сперматогенезу щурів. Визначено зниження параметру загальної кількості сперматозоїдів на 21,8 % $p < 0,05$, та 32,4 %, $p < 0,05$ в групах F0-3 і F0-4 під дією ВРА. Фракція прогресивно рухливих сперматозоїдів мала стійку тенденцію до зниження і, на кінець експерименту, значення параметру склало 22,7 %, $p < 0,05$ та 37,4 %, $p < 0,05$ в групах F0-3 та F0-4, відповідно. Тривалий вплив ВРА призвів до статистично значущого зростання, більше ніж у 2,7 рази, $p < 0,05$ нерухливих сперматозоїдів у тварин груп F0-3 та більше ніж у 5,7 рази, $p < 0,05$,

у групі F0-4, порівняно з групою контролю. Введення ВРА дозою 50 і 250 мг/кг/добу призводило до статистично значущого зростання частки аномальних форм сперматозоїдів. На 120 добу фракція аномальних форм статевих клітин склала 18,01 % і 23,73 %, $p < 0,05$.

Отже, під впливом ВРА поступово сформувалися комплекси порушень, які змінили якісні і кількісні характеристики сперми щурів: прогресуюче зниження загальної кількості сперматозоїдів в аліквоті еякуляту, зменшилась кількість статевих клітин фертильної фракції і збільшилася кількість клітин нефертильної фракції, а також спостерігалось зменшення рухливості статевих клітин. Отримані данні вказують на те, що репродуктивна система є однією з основних мішеней токсичного впливу бісфенолу А. Під впливом ВРА поступово сформувалися комплекси порушень, які змінювали гормональний статус дослідних тварин: суттєве зниження концентрації тестостерону і 17β -естрадіолу в сироватці крові щурів експериментальних групах F0-3 і F0-4, порівняно з контрольною групою, де концентрація гормонів відповідала фізіологічній нормі і не зазнала статистично значущих змін.

Розроблено модель розгортання ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи, яка дозволяє спрогнозувати алгоритм розвитку негативних змін сперматогенезу в сім'яниках від ранніх етапів розгортання патологічних процесів в сперматогенному епітелії до суттєвої дезорганізації сперматогенезу.

Наукова новизна роботи. Вперше на репрезентативному експериментальному матеріалі визначено комплекс чинників, що впливають на дебют патологічних змін сперматогенезу за умов тривалої токсичної дії різних доз бісфенолу А. На основі отриманих даних розширено уявлення про основні характеристики ВРА індукованої деструкції структурних ланок сперматогенного епітелію сім'яників щурів. Уточнено дані про характер формування комплексу порушень процесів сперматогенезу, який змінював гормональний статус та знижував рівень фертильності тварин.

Отримано нові експериментальні дані щодо динаміки якісних і кількісних змін показників сперми, залежно від дози і термінів експозиції ВРА. Вперше, на основі аналізу ВРА індукованих пошкоджень сім'яників, проведено комплексний порівняльний аналіз та виявлено рівень можливостей запліднюючої здатності сперми щурів, які зазнали впливу різних доз ВРА індукованих пошкоджень сім'яників.

Вперше, на основі інтегрованого методу дослідження гістоархітекtonіки сім'яників, якісних показників еякуляту та гормонального статусу, розроблено модель розгортання патологічних змін ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи, яка дозволяє спрогнозувати алгоритм розвитку негативних змін сперматогенезу в сім'яниках від ранніх етапів розгортання патологічних процесів в сперматогенному епітелії до суттєвої дезорганізації сперматогенезу.

При опрацюванні моделі розгортання ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи, на основі кореляційного аналізу отриманих експериментальних результатів, визначено ревалентні предиктори фертильності у щурів, які отримували 250 мг/кг/доба. Виявлено незалежні чинники, що мали сильний кореляційний зв'язок із показником рівня запліднюючої здатності сперми, зокрема: чисельності фракції аномальних форм ($r_s = -0,853$; $p < 0,001$), фракції прогресивно-рухливих сперматозоїдів (відповідно $r_s = 0,782$; $p < 0,001$), непрогресивно-рухливих сперматозоїдів (відповідно $r_s = -0,780$; $p < 0,001$), фракції нерухомих сперматозоїдів ($r_s = -0,791$; $p < 0,001$) та висоти сперматогенного епітелію сім'яників ($r_s = -0,782$; $p < 0,001$).

Теоретична та практична цінність роботи. Результати дослідження патологічних змін сперматогенезу дозволили сформувані основні характеристики ВРА індукованої деструкції структурних ланок сперматогенного епітелію сім'яників щурів на основі яких розроблено модель розгортання ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи. Візуалізація розгортання симптоматики патологічних процесів

сперматогенезу, в наслідок тестикулярної інтоксикації, дозволяє підвищити ефективність діагностичних настанов клінічної практики визначення рівня фертильності.

Виявлені можливості запліднюючої здатності сперми щурів, які зазнали впливу різних ВРА індукованих пошкоджень сім'яників, надають додаткові інструменти поглибленого вивчення чоловічої репродуктивної системи профільним науково-дослідним лабораторіям.

Ключові слова: безпліддя, сім'яники, токсичність, бісфенол А, гормони, композиція, спермограма, сперматогенний епітелій, сперматогенез, статева система, фертильність, деструкція, сечостатева система, діагностика, статеві залози, яєчко.

ANNOTATION

Yaroshenko D. S. development and functioning of testes in conditions of long-term action of bisphenol A in the experiment. - Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of philosophy, field of knowledge – 22, "Healthcare", Specialty – 222 "Medicine" – Ministry of health of Ukraine, Dnipro State Medical University, Dnipro, 2024.

The dissertation research was conducted at the Department of pathological anatomy, Forensic Medicine and pathological physiology of Dnipro State Medical University.

The dissertation is devoted to establishing the features of pathological changes in spermatogenesis under conditions of prolonged toxic action of various doses of bisphenol A. The main attention of the work is aimed at revealing the features of changes in the histoarchitectonics of the testes, qualitative indicators of ejaculate and hormonal status, depending on the dose and duration of BPA exposure.

Infertility in men of reproductive age is a global human health problem. Environmental pollution with chemical compounds creates conditions for the development of various forms of human infertility. Among the various etiological factors of male infertility, the proportion of chemical agents that have endocrine properties is constantly increasing. In the world industry, the most widely used EDCs substance group is Bisphenol A (BPA), which has become the most important anthropogenic compound used in the synthesis of polycarbonates and epoxy resins. Scientific studies and clinical observations prove that endocrine-active substances are a serious problem of male reproductive function. However, the mechanisms of this effect, especially with prolonged exposure to BPA, are currently poorly understood.

Therefore, the aim of the work was to establish the features of structural and functional changes in the testes exposed to prolonged toxic effects of bisphenol A.

The studies that were conducted as part of this experimental work met the requirements of the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes (Strasbourg, March 18, 1986). All research procedures were carried out in accordance with international requirements and norms of humane treatment of animals. Directive No. 2010/63 / EC on the protection of animals used for scientific purposes (2010), law of Ukraine 3447-IU of 21.02.2006, and the conclusion of the commission on biomedical ethics of DSMU (Protocol No. 18 of 17.04.2024).

The study used 120 male rats of The Wistar line aged 2-3 months, weighing 210-230 G. the animals were kept in cages with free access to water and food, which included all the necessary vitamins and trace elements under the conditions of a 12/12 hour light/dark cycle at a temperature of 22°C.

The selected rats were randomly divided into four groups: F0-1 – control group (n=30) – animals that were on a normal diet and additionally received corn oil – 2.5 mL/kg of body weight ; F0-2 – intact group (comparison) (N=30) animals that were on a normal diet; F0-3 – experimental group (n=30) – experimental animals that were injected with bisphenol A for 120 days (Sigma-Aldrich, USA), dissolved in corn oil, dose – 50 mg/kg/day; F0-4 – experimental group (n=30) - animals that were administered bisphenol A dissolved in corn oil at a dose of 250 mg/kg/day for 120 days. BPA dissolved in corn oil was administered daily orally.

Evaluation of quantitative and qualitative indicators of ejaculate, samples of which were obtained by transrectal electrical stimulation of rat seminal tubercles, was carried out according to WHO guidelines. Serum testosterone and 17 β -estradiol levels were determined using enzyme-linked immunosorbent assay tests: Rat Testosterone ELISA Kit and Rat Estrogen ELISA Kit. Rat fertility was determined by mating experimental males with intact females in a male : female ratio of 1:1 for 2-3 estrous cycles.

The study used a standard morphological method for the manufacture of histological preparations, the biomaterial was poured into paraffin, testicular

histological preparations stained with hematoxylin and eosin. During morphometric observations, the seminal strands and convoluted seminal tubules were examined, their diameters, the height of the spermatogenic epithelium, and the lumen diameters of the seminal tubules were measured. The body weight of rats and testes was measured, the spermatogenesis index, the relaxation index (spermatogenesis stress), and the gonado-somatic index were determined. Animals were removed from the experiment by administration of sodium thiopental (50 mg/kg body weight intraperitoneally).

During morphometric analysis, after 120 days of studying the effect of bisphenol A (BPA) on the testes, the formation of a looser Organization of collagen fibers of the protein envelope of the testes was noted, and its thickness significantly increased. The Shape of most of the convoluted seminal tubules has rounded and their location is no longer dense. Significant destructive morphological changes were observed in the testes of rats of the F0-3 group and, to a greater extent, in animals of the F0-4 group treated with BPA, compared with the testes of animals of the F0-1 and F0-2 groups. BPA resulted in a decrease in the diameter of convoluted seminal tubules and the height of epithelium in rats of experimental groups F0-3 and F0-4 compared to the control and intact groups F0-1 and F0-2, which were not exposed to bra. In addition, in the testes of rats in groups F0-3 and F0-4, the average Lumen diameter of the convoluted seminal tubules increased, respectively, to 98.80 and 111.79 microns, compared with similar indicators of the control group F0-1 – 89.43 microns, and Group F0-2 – 86.85 microns ($p < 0.05$). Consequently, when rats were administered 50 mg/kg/day and 250 mg/kg/day of BPA for 120 days, pathological changes in the histological architectonics of the testes occurred.

Prolonged exposure to BPA in male rats led to the formation of spermatogenic epithelial desquamation and other pathohistological changes in the testes, which can lead to a decrease in fertility. The data obtained indicate that the reproductive system is one of the main targets of toxic effects of bisphenol A. The data obtained during the experiment showed the etiological significance of long-term exposure of BPA in

male rats in the formation of spermatogenic epithelial desquamation and other pathohistological changes in the testes, which can lead to a decrease in fertility.

During the experiment, body weight increased in rats of the experimental groups, depending on the level of toxic exposure to BPA. Animals in groups F0-3 and F0-4 gained 23.6 and 28.9 % more weight than rats in the control group. During the experiment, rats exposed to BPA at a dose of 250 mg/kg/day experienced a slowdown in rat testicular weight gain and a decrease in the gonado-somatic index compared to the testes of the control group of rats. In the middle of 27 % of the convoluted seminal tubes that suffered severe damage to the spermatogenic epithelium, a cavity was formed with a violation of spermatogenesis processes. The spermatogenesis index at the end of the experiment decreased from 4.02 ± 0.25 to 2.89 ± 0.31 and 2.36 ± 0.28 , or by 28.11 and 41.29 %, respectively, in groups F0-3 and F0-4 ($p > 0.005$).

Disorders of spermatogenesis were also manifested by a decrease in the proportion of germ cells of the Sertoli cell population that was relatively stable to toxicant exposure. Thus, during the experiment, the relaxation index (spermatogenesis intensity) decreased from 19.20 ± 1.54 to 17.07 ± 0.39 and 16.07 ± 1.83 , or by 11.19 and 16.30 %, respectively, in groups F0-3 and F0-4, compared with animals of the control group of rats F0-1 ($p < 0.005$), which indicates a decrease in the functional ability of the testes of rats exposed to the pathological influence of BPA. In general, the data of physical development of experimental animals showed changes in the functional state of the body and were a significant marker for assessing the state of Health. the experimental data obtained show that BPA caused pathological changes in the structural elements of the testes, contributed to a decrease in the mass and size of the testes of rats of the F0-3 and F0-4 groups, compared with similar indicators of rats of the F0-1 group.

The obtained data demonstrate that BPA leads to changes in the structural elements of the testes and negatively affects the processes of spermatogenesis. Animals of the experimental groups under the influence of bra gained more body

weight during the experiment, in addition, rats under the influence of bra showed a dose-dependent decrease in the spermatogenesis index and gonado-somatic index compared to Animals of the control group.

Rat fertility was determined by mating experimental males with intact females. One of the conditions for the stable operation of a complex reproductive system is to maintain the necessary level of hormonal background.

In our experiment, BPA contributed to a statistically significant decrease in the concentration of the studied hormones in the blood serum of rats of experimental groups F0-3 and F0-4 who were exposed to long-term BPA, compared with the control group ($p < 0.05$). Consequently, the concentration of testosterone in the blood serum of rats of group F0-4, on the 120th day of the experiment, decreased by 63 %, and in group F0-3 by 49 %. Serum concentrations of 17β -estradiol in rats of groups F0-3 F0-4 decreased by 51 % and 71 %, respectively. In animals of the F0-1 control group and the F0-2 comparison group that did not receive BPA, the hormone concentration corresponded to the physiological norm and did not undergo statistically significant changes. ($p < 0.05$) during our experiment, there was a gradual decrease in the fertility of males exposed to long-term BPA exposure. Thus, the period from 113 to 120 days of the study was characterized by a decrease in animal fertility in the F0-3 group by 30 %, $p \leq 0.05$ and in the F0-4 group by 40 %, $p \leq 0.05$. Consequently, the effect of the test substance resulted in a significant decrease in the fertility of male rats in the experimental groups who received bra at a dose of 50 and 250 mg/kg/day for 120 days, compared with intact animals in the control group.

The destructive effect of BPA xenoestrogen is aimed at complex hormone-dependent processes of spermatogenesis. Analysis of dysfunctional changes and the possibility of realizing reproductive functions in the long term shows that BPA is a testicular toxicant.

Under the influence of BPA, complexes of disorders were gradually formed that changed the hormonal status of experimental animals: a significant decrease in the concentration of testosterone and 17β -estradiol in the blood serum of rats of

experimental groups F0-3 and F0-4, compared with the control group, where the concentration of hormones corresponded to the physiological norm and did not undergo statistically significant changes.

Analysis of dysfunctional changes and the possibility of realizing reproductive function in the long term shows that BPA is a testicular toxicant that causes hormonal imbalance and negatively affects the processes of spermatogenesis, reducing the level of fertility of animals.

It was found that long – term use of BPA, even in small doses, caused negative changes in the studied sperm parameters-the number, motility and morphology of spermatozoa, which indicates a violation in the rat spermatogenesis system. A decrease in the parameter of total sperm count by 21.8 % $p<0.05$, and 32.4 %, $p<0.05$ in groups F0-3 and F0-4 under the influence of BPA was determined. The fraction of progressively motile spermatozoa had a steady downward trend and, at the end of the experiment, the parameter value was 22.7 %, $p<0.05$ and 37.4 %, $p<0.05$ in groups F0-3 and F0-4, respectively. Prolonged exposure to BPA resulted in a statistically significant increase, more than 2.7-fold, of $p<0.05$ Immobile spermatozoa in animals of groups F0-3 and more than 5.7-fold, $p<0.05$, in Group F0-4, compared to the control group. Administration of bra at a dose of 250 mg/kg/day resulted in statistically significant changes in the proportion of abnormal sperm forms compared to the control group.

Consequently, under the influence of BPA, complexes of disorders were gradually formed that changed the qualitative and quantitative characteristics of rat sperm: a progressive decrease in the total number of spermatozoa in the ejaculate aliquot, decreased the number of germ cells of the fertile fraction and the number of cells of the non-fertile fraction increased, and a decrease in germ cell motility was also observed. The data obtained indicate that the reproductive system is one of the main targets of toxic effects of bisphenol A. Under the influence of BPA, complexes of disorders were gradually formed that changed the hormonal status of experimental animals: a significant decrease in the concentration of testosterone and 17β -

estradiol in the blood serum of rats in the experimental groups F0-3 and F0-4, compared to the control group, where the concentration of hormones corresponded to the physiological norm and did not undergo statistically significant changes.

Thus, the data obtained during the experiment showed the etiological significance of the long-term effect of BPA on male rats in the formation of spermatogenic epithelial desquamation and other pathohistological changes in the testes, which can lead to a decrease in fertility.

A model of the deployment of BPA-induced damage to the male reproductive system has been developed, which allows predicting the algorithm for the development of negative changes in spermatogenesis in the testes from the early stages of the deployment of pathological processes in the seminiferous epithelium to significant disorganization of spermatogenesis.

Scientific novelty of the obtained results. For the first time, a complex of factors influencing the onset of pathological changes in spermatogenesis under conditions of prolonged toxic action of various doses of bisphenol A was determined on a representative experimental material. based on the obtained data, the understanding of the main characteristics of BPA-induced apoptosis of structural links of the seminiferous epithelium of rat testes is expanded. Data on the nature of the formation of a complex of disorders of spermatogenesis processes, which changed the hormonal status and reduced the level of fertility of animals, were clarified.

New experimental data on the dynamics of qualitative and quantitative changes in sperm parameters, depending on the dose and duration of BPA exposure, were obtained. For the first time, based on the analysis of BPA-induced testicular damage, a comprehensive comparative analysis was performed and the level of fertilization capacity of sperm of rats exposed to various BPA-induced testicular damage was revealed.

For the first time, based on the integrated method of studying the histoarchitectonics of the testes, qualitative indicators of ejaculate and hormonal

status, a model of the deployment of pathological changes in BPA-induced damage to the male reproductive system has been developed, which allows predicting the algorithm for the development of negative changes in spermatogenesis in the testes from the early stages of the deployment of pathological processes in the seminiferous epithelium to significant disorganization of spermatogenesis.

When developing a model for the deployment of BPA-induced damage to the male reproductive system, based on correlation analysis of the experimental results obtained, relevant predictors of fertility were determined in rats treated with 250 mg/kg/day. Five independent factors were identified that had a strong correlation with the indicator of the level of fertilization capacity of sperm, in particular: the number of the fraction of abnormal forms ($r_s=-0.853$; $p<0.001$), the fraction of progressive motile spermatozoa (respectively $r_s=0.782$; $p<0.001$), non-progressive motile spermatozoa (respectively $r_s=-0.780$; $p<0.001$), fixed sperm fraction ($r_s=-0.791$; $p<0.001$), and height of seminiferous epithelium ($r_s=-0.782$; $p<0.001$).

Theoretical and practical value of the work. The results of the study of pathological changes in spermatogenesis allowed us to form the main characteristics of BPA-induced apoptosis of structural links of the seminiferous epithelium of rat testes, on the basis of which a model for the deployment of BPA-induced damage to the male reproductive system was developed. Visualization of the development of symptoms of pathological processes of spermatogenesis, as a result of testicular intoxication, makes it possible to increase the effectiveness of diagnostic guidelines of clinical practice for determining the level of fertility.

The revealed possibilities of fertilizing the sperm capacity of rats exposed to various BPA-induced testicular damage provide additional tools for in-depth study of the male reproductive system in specialized research laboratories.

Key words: infertility, testes, toxicity, bisphenol A, hormones, composition, spermiogram, seminiferous epithelium, spermatogenesis, reproductive system, fertility, destruction, urogenital system, diagnostics, testicles.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких оприлюднено основні наукові результати

1. Lialina AYu., Khmel OS., Bondarenko MO., Silkina YuV., Yaroshenko DS., Kharaponova OB., Kayukova VD. The effect of bisphenol a on the structure and function of internal organs. *Azerbaijan medical journal*. 2021. № 4 p. 151-158 DOI: 10.34921/amj.2021.4.022 (Дисертантом особисто проведено науковий пошук та аналіз, порівняння та інтерпретація результатів, підготовлено матеріал для публікації).
2. Ярошенко Д.С. Вплив бісфенолу А на чоловічу фертильність. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2023. № 4(56). С. 177–181. DOI 10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14314.
3. Ярошенко Д.С. Вплив бісфенолу А на морфофункціональні характеристики еякуляту. *Сучасна медицина, фармація та психологічне здоров'я*. 2023. Вип. № 4 (13). С. 69–74. DOI 10.32689/2663-0672-2023-4-11.
4. Ярошенко Д.С. Оцінка тривалого впливу бісфенолу А на гормональний статус та фертильність. *Перспективи та інновації науки* № 1(35) 202. С. 1067–1077. DOI: [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1\(35\)-1067-1077](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1(35)-1067-1077).
5. Ярошенко Д.С. Аналіз морфологічних змін в сім'яниках за умов тривалого впливу бісфенолу А. *Перспективи та інновації науки*. 2024. № 2(36). 1319–1327. DOI: [10.52058/2786-4952-2024-2\(36\)-1319-1327](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-2(36)-1319-1327).
6. Ярошенко Д. С. Зміна маси тіла та фізіологічного стану сім'яників під впливом бісфенолу А. *Перспективи та інновації науки*. 2024 № 3(37). С. 1562–1570. DOI 10.52058/2786-4952-2024-3(37)-1562-1570.
7. Ярошенко Д. С. Вплив бісфенолу А на чоловічу репродуктивну систему. *Концептуальні шляхи розвитку науки та освіти (частина II)*:

- матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції м. Львів, 13-14 грудня 2021 року. Львів: Львівський науковий форум. 2021. С. 31–32.
8. Сілкіна Ю. В., Ярошенко Д. С. Патологічні зміни у сім'яниках під дією бісфенолу А. Новини і перспективи медичної науки: зб. мат. XXII конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І. В., Бондаренко Н. С.]. Дніпро. 2022. С. 47–48. *(Дисертантом особисто проведено забір матеріалу, опис, аналіз та узагальнення результатів дослідження)*.
 9. Ярошенко Д. С. Статева поведінка щурів-самців після тривалої дії бісфенолу А. Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки: збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 25–26 лютого 2022 року). Львів: ГО «Львівська медична спільнота». 2022. С. 97–99.
 10. Ярошенко Д. С. Життєздатність сперматозоїдів самців щурів за умови тривалої дії бісфенолу А. Міжвузівська конференція молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття». Харківський національний медичний університет 13–15.02.2023 р. С. 396–397.
 11. Ярошенко Д. С. Морфологічні особливості сперматозоїдів самців щурів за умови тривалої дії бісфенолу А. The Vth International scientific and practical conference. «Progressive research in the modern world» 1–3.02.2023. Boston, USA С. 115–116.
 12. Бондаренко О. О., Ярошенко Д. С. Морфологічні особливості змін у сім'яниках під дією бісфенолу А. Новини і перспективи медичної науки : зб. мат. XXIII конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І. В., Бондаренко Н. С.]. Дніпро. 2023. С. 109. *(Дисертантом особисто проведено забір матеріалу, опис, аналіз та узагальнення результатів дослідження)*.
 13. Ярошенко Д. С. Особливості змін еякуляту за умов тривалого впливу бісфенолу А. Теорія та практика сучасної морфології: матеріали Сьомої

Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Дніпро, 1–3 листопада 2023 року). Дніпровський державний медичний університет. Дніпро: ДДМУ. 2023. С. 141–142.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	25
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1.	33
СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕХАНІЗМИ ПОРУШЕНЬ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СІМ'ЯНИКІВ (АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ).....	33
1.1 Проблема інфертильності за чоловічим фактором та її особливості .	33
1.2 Вплив дизрапторів на ендокринну систему людини	35
1.3 Патогенетичні механізми впливу ВРА на чоловічу	37
репродуктивну систему.....	37
1.4 Експериментальні моделі дослідження EDCs речовин.....	39
1.5 Морфологічна характеристика сім'яників та еякуляту	42
1.6 Проблемні питання дослідження фертильності.....	46
1.7 ВРА індукована токсичність як модель дослідження безплідності	48
Висновки до розділу 1.....	50
РОЗДІЛ 2	52
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	52
2.1 Дизайн дослідження. Характеристика досліджуваного матеріалу	52
2.2 Трансректальна електростимуляція. Аналіз еякуляту.....	54
2.3 Біометричні дослідження.....	56
2.4 Морфологічний аналіз.....	58

	23
2.5 Морфометричні дослідження	58
2.6 Імуноферментний аналіз	59
Методом імуноферментного аналізу.....	59
2.7 Визначення фертильності	59
2.8 Статистичні методи дослідження	60
РОЗДІЛ 3	61
ОЦІНКА ВПЛИВУ ВРА НА МОРФОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ СТРУКТУР СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ	61
3.1 Особливості морфометричних параметрів сім'яників.....	61
3.2 Зміна ваги щурів під впливом ВРА індукованої токсичності.....	72
репродуктивної системи	72
3.3 Зміна маси сім'яників щурів за умов тривалої дії ВРА.....	73
Висновки до розділу 3.....	75
РОЗДІЛ 4.	78
ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОКАЗНИКІВ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ ТА ГОРМОНАЛЬНИЙ СТАТУС ЗА УМОВИ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ БІСФЕНОЛУ А	78
4.1 Особливості змін гормонального статусу	78
4.2 Зміни показників фертильності самців щурів за умов	82
токсичної дії ВРА.....	82
Висновки: до розділу 4.....	84
РОЗДІЛ 5.	86
ЗМІНИ ЯКІСНИХ І КІЛЬКІСНИХ ПОКАЗНИКІВ ЕЯКУЛЯТУ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ БІСФЕНОЛУ А	86
5.1 Особливості змін якості еякуляту під впливом ВРА.....	86

	24
5.2 Динаміка змін фертильності щурів під впливом ВРА.....	93
5.3 Багатофакторна бінарна прогностична модель	95
Висновки до розділу 5.....	98
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	100
Висновки до розділу 6.....	114
ВИСНОВКИ	115
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	118
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	119
ДОДАТКИ	144

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

BPA – бісфенол А

EDCs – ендокринні руйнівники (endocrine-disrupting chemicals)

AR – андрогенний рецептор (androgen receptor)

ДНК–дезоксирибонуклеїнова кислота

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

PND – постнатальна доба (postnatal day)

TDI – допустиме добове споживання (tolerable daily intake)

EFSA – Європейське агентство з безпеки харчових продуктів (European Food Safety Authority)

GnRH – гонадотропін-релізінг-гормон

ROC – робоча характеристика приймача (Receiver Operating Characteristic)

AUC – площа під ROC-кривою (Area Under the ROC Curve)

ЕТБ – Екскреторно-токсична безплідність

E2 – естрадіол

ТГ – тиреоглобулін

ЛГ – лютеїнізуючий гормон

ТТГ – тиреотропний гормон

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. В останні роки, а особливо з початком широкомасштабного вторгнення армії Російської федерації, демографічна ситуація в Україні критично погіршилась: смертність населення переважає над народжуваністю, населення України стрімко скорочується. За таких умов профілактика і лікування порушень репродуктивного здоров'я набуває особливої соціальної цінності [1].

Чоловіче безпліддя є поширеною проблемою, на яку може впливати широкий спектр факторів ризику, таких як спосіб життя, якість харчування, негативний вплив хімічних речовин, що потрапляють до організму через забруднене навколишнє середовище. Європейська Комісія та Агентство охорони навколишнього середовища США (EPA) визначили хімічні сполуки, що можуть втручатися в гормональну систему, негативно впливати на сперматогенез, порушувати процеси розвитку та розмноження людини, як ендокринні руйнівники – EDCs (Endocrine-disrupting chemicals). [2–5]. В світовій промисловості найбільшого поширення із групи фенолів набув бісфенол А (BPA) [6], який в Європейському Союзі включено до списку речовин, визнаних як ендокринні руйнівники [7].

Дослідження патологічної дії ендокринних руйнівників з використанням тваринах моделей та клінічні дослідження доводять, що EDCs є серйозною проблемою для громадського здоров'я. Механізми впливу EDCs речовин на організм вирізняються широкою різноманітністю напрямків дії, включаючи: естрогенні, антиандрогенні, тиреоїдні, шляхом патологічного впливу на стероїдні ферменти системи нейромедіаторів і багато інших напрямків, які можна моделювати в лабораторних умовах *in vitro* та *in vivo* [8].

На теперішній час проведено ряд досліджень по виявленню можливого впливу речовин з ендокринними властивостями на складні механізми сперматогенезу в цілому та зміну параметрів сперми (кількість сперматозоїдів, їх рухливість, життєздатність та цілісність ДНК) зокрема. Аналіз досліджень

багатофакторного патологічного впливу ВРА на генну онтологію ряду deregulovanih bilkiv виявив негативний вплив ВРА на імунну систему, що здійснюється шляхом дезорганізації окислювального стресу при імунній відповіді організму. ВРА також відіграє значну роль у патогенезі цілого спектру розладів репродуктивної системи, включаючи безпліддя. Загалом, складність репродуктивної функції робить її вразливою до несприятливих впливів на будь-якому етапі реалізації функції, тому вивчення репродуктивної токсичності, зокрема негативного впливу найбільш поширеного з групи ендокринних дизрапторів – бісфенолу А, зумовлює актуальність вивчення цієї медичної та соціальної проблеми, а розробка заходів прогнозування наслідків впливу, профілактики та лікування порушень репродуктивного здоров'я набуває особливої соціальної цінності при розробці моделі надання медичної допомоги чоловікам, які страждають на безпліддя [9, 10].

Таким чином, враховуючи поширеність ВРА і, можливо, патологічний і кумулятивний вплив ендокринного дизраптора на структуру і функціонування органів чоловічої репродуктивної системи, розглянута медична проблема набуває особливого значення, а вивчення механізмів дії ВРА на репродуктивну функцію є своєчасним і актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є частиною науково-дослідницької роботи кафедри патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології Дніпровського державного медичного університету «Морфологічні та патофізіологічні аспекти впливу компонентів пластику (Bisphenol A) на розвиток та функціонування органів і систем органів», (номер держреєстрації 0120U102944, термін виконання 01.01.2020 – 30.11.2024 рр.) в якій здобувач є співвиконавцем науково-дослідної роботи.

Мета дослідження – встановлення особливостей структурних і функціональних змін в сім'яниках, що зазнали тривалої токсичної дії бісфенолу А.

Завдання дослідження:

1. Змодельовати ВРА індуковані пошкодження сім'яників та патологічні зміни процесів сперматогенезу щурів шляхом тривалого введення різних доз ВРА.
2. З'ясувати морфологічні, морфометричні особливості змін тканин сім'яників та зміни маси тіла щурів на різних стадіях ВРА індукованої токсичності чоловічої репродуктивної системи.
3. Визначити особливості змін якісних та кількісних характеристик еякуляту за умов дії різних доз ВРА.
4. З'ясувати особливості змін гормонального статусу за умов тривалого впливу ВРА.
5. Дослідити вплив ВРА індукованої токсичності на зміну рівня фертильності щурів самців.
6. Розробити прогностичну модель перебігу ВРА індукованої тестикулярної токсичності.

Об'єкт дослідження: структура сім'яників в нормі і за умов тривалої токсичної дії бісфенолу А.

Предмет дослідження: морфологічні та функціональні зміни сім'яників під токсичним впливом різних доз ВРА.

Методи дослідження. Відповідно до поставлених завдань, при проведенні дослідження, застосовано комплекс наступних методів дослідження: гістологічний – виготовлення та аналіз гістологічних препаратів сім'яників щурів, забарвлених гематоксиліном і еозіном; морфометричний – аналіз морфологічних параметрів сім'яників щурів: діаметри звивистих сім'яних каналців, діаметри просвітів, висоту сперматогенного епітелію та інтерстиціальні клітини сім'яників; біометричні – розрахунок гонадосоматичного індексу; біохімічні – визначення тестостерону та 17β -естрадіолу в плазмі крові; функціональні – оцінка стану запліднюючої здатності сперми;

статистичні – порівняння досліджуваних ознак за критерієм Краскела-Уолліса, визначення коефіцієнтів кореляції Спірмена r_s , ROC-аналіз.

Наукова новизна роботи. Вперше на репрезентативному експериментальному матеріалі визначено комплекс чинників, що впливають на дебют патологічних змін сперматогенезу за умов тривалої токсичної дії різних доз бісфенолу А. На основі отриманих даних розширено уявлення про основні характеристики ВРА індукованої деструкції структурних ланок сперматогенного епітелію сім'яників щурів. Уточнено дані про характер формування комплексу порушень процесів сперматогенезу, який змінював гормональний статус та знижував рівень фертильності тварин.

Отримано нові експериментальні дані щодо динаміки якісних і кількісних змін показників сперми, залежно від дози і термінів експозиції ВРА. Вперше, на основі аналізу ВРА індукованих пошкоджень сім'яників, проведено комплексний порівняльний аналіз та виявлено рівень можливостей запліднюючої здатності сперми щурів, які зазнали впливу різних ВРА індукованих пошкоджень сім'яників.

Вперше, на основі інтегрованого методу дослідження гістоархітекtonіки сім'яників, якісних показників еякуляту та гормонального статусу розроблено модель розгортання патологічних змін ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи, яка дозволяє спрогнозувати алгоритм розвитку негативних змін сперматогенезу в сім'яниках від ранніх етапів розгортання патологічних процесів в сперматогенному епітелії до суттєвої дезорганізації сперматогенезу.

При опрацюванні моделі розгортання ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи, на основі кореляційного аналізу отриманих експериментальних результатів, визначено ревалентні предиктори фертильності у щурів, які отримували 250 мг/кг/доба. Виявлено незалежні чинники, що мали сильний кореляційний зв'язок з показником рівня запліднюючої здатності сперми, зокрема: чисельності фракції аномальних

форм ($rs=-0,853$; $p<0,001$), фракції прогресивно-рухливих сперматозоїдів (відповідно $rs=0,782$; $p<0,001$), непрогресивно-рухливих сперматозоїдів (відповідно $rs=-0,780$; $p<0,001$), фракції нерухомих сперматозоїдів ($rs=-0,791$; $p<0,001$) та висоти сперматогенного епітелію сім'яників ($rs=-0,782$; $p<0,001$).

Теоретична та практична цінність роботи. Отримані результати досліджень, щодо тестикулярної токсичної ВРА, створюють теоретичне підґрунтя у використанні еякуляту для ранньої диференціальної діагностики зниження рівня фертильності за чоловічим фактором у групі ризику.

В ході експерименту розроблені параметри моделювання токсичної дезорганізації процесів сперматогенезу, а тривалий режим введення ВРА дозволяє плавно контролювати параметри дії дизраптора з амплітудою пошкодження сім'яних канальців від 3 до 90 % та отримувати релевантні результати. Розроблена нами модель оптимальна при опрацьовуванні нових методів профілактики і лікування репродуктивної системи чоловіків різного ступеня ураження. Експонування ВРА спричиняє дозозалежні гонадотоксичні ефекти, які проявляються в патологічних морфофункціональних змінах сперматозоїдів, а саме рухливості і часу руху, що пропонується використовувати в комплексі з аналізом гормонального фону шляхом підрахунків визначених базових складових матриці прогностичної моделі з застосуванням вектору експериментально визначених коригуючих коефіцієнтів, відповідно до особливостей біологічного об'єкту спостережень, як клінічний маркер визначення рівня дезорганізації сперматогенезу.

Отже, застосована практична модель ВРА індукованої токсичності для чоловічої репродуктивної системи та прогноз найбільш вірогідного перебігу патологічного процесу сперматогенезу чоловіків надає можливість використання отриманих даних в дослідженнях по контролю рівня безплідності подружніх пар за чоловічим фактором.

Крім цього, отримані результати дослідження можуть застосовуватися у навчальному процесі кафедри патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології та можуть стати теоретичною основою для подальших досліджень корекції рівня фертильності чоловіків.

Впровадження результатів дослідження. Матеріали дисертації впроваджені в діагностичний процес Новоолександрівської АЗПСМ (затв. 16.01.2024 р.), Волоської АЗПСМ (затв. 7.03. 2024 р.) та КНП Широківський Центр ПМД (затв. 6.03.2024 р.), Устинівської лікарні (затв. 5.03.2024).

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою науковою працею здобувача, ним самостійно проаналізовано та узагальнено дані наукової літератури та узагальнено дані дослідних робіт вчених за темою дисертації. Спільно з науковим керівником було обрано тему дисертаційної роботи, визначені мета, завдання та методи дослідження. Ним самостійно відтворено експеримент та проведено забір біологічного матеріалу для морфологічних та морфометричних досліджень. Статистичну обробку даних, аналіз та інтерпретацію отриманих даних виконано здобувачем самостійно. При проведенні морфометричних досліджень особисто освоєно методи гістологічних, гістохімічних досліджень. Всі розділи дисертаційної роботи написано, відредаговано й оформлено здобувачем самостійно. Разом із науковим керівником було сформульовано основні наукові висновки. Підготовлені до друку основні матеріали за результатами дисертаційної роботи у наукових статтях рецензувалися науковим керівником і опубліковані у співавторстві, участь здобувача є визначальною.

Апробація результатів дисертації. Наукові положення дисертації оприлюднені на: IV Міжнародній науково-практичній конференції. Концептуальні шляхи розвитку науки та освіти (13–14 грудня, 2021 року, м. Львів); XXII конференції студентів та молодих учених. Новини і перспективи медичної науки (2022 рік, Дніпро); Міжнародній науково-практичній конференції. Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників

медичної науки ((25–26 лютого, 2022 року, м. Львів); Міжвузівській конференції молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття» (13–15 лютого, 2023 року, м. Харків); The Vth International scientific and practical conference. «Progressive research in the modern world»(1–3 february, 2023 year, Boston, USA); XXIII конференції студентів та молодих учених. Новини і перспективи медичної науки (2023 рік, м. Дніпро); Сьомій Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю. Теорія та практика сучасної морфології. (1–3 листопада, 2023 року, м. Дніпро).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 14 наукових праць, з них 5 статей у фахових виданнях України, 1 стаття, що індексується у міжнародній наукометричній базі Scopus; 8 робіт – у матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура і обсяг дисертації. Матеріали дисертаційної роботи викладено українською мовою на 150 сторінках друкованого тексту, складається з анотацій українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, опису дизайну дослідження, матеріалів і методів дослідження, трьох розділів експериментальних досліджень, узагальнення та обговорення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури та додатків. Дисертація ілюстрована 36 рисунками. Список літературних джерел включає 187 праць, з них 32 – кирилицею та 155 – латиницею.

РОЗДІЛ 1.

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МЕХАНІЗМИ ПОРУШЕНЬ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СІМ'ЯНИКІВ (АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Проблема інфертильності за чоловічим фактором та її особливості

Безпліддя є глобальною проблемою здоров'я близько 50–100 млн людей, тобто одна із 5–7 пар репродуктивного віку безплідна [11, 12].

Демографічна ситуація в Україні щороку стає дедалі гіршою: смертність населення переважає над народжуваністю, чисельність українців скорочується внаслідок багатьох факторів: військових, медичних, соціальних та політичних. Отже, для сучасної України проблема безпліддя набула виняткового значення. Терміном безпліддя визначається нездатність сексуально активної пари досягти вагітності протягом 12 місяців [12]. В подружніх парах безпліддя за чоловічим фактором становить 30–50 %, нездатність до зачаття впливає на самооцінку людей та їх психічне здоров'я [13, 14].

Велика частина статевих захворювань зумовлена токсичним впливом хімічних речовин. Ряд медичних досліджень свідчить, що пластики та еластомери, які застосовуються в різних галузях народного господарства в тому числі і медицині, можуть проявляти шкідливу дію на організм людини. [15]. Зміни екологічного балансу все частіше відображаються на репродуктивному здоров'ї людей [16]. Забруднення ґрунту, повітря, води хімічними сполуками, дія рецесивних мутацій створюють умови для розвитку різних форм безпліддя. Вплив полютантів може викликати комплекс органічних змін в органах статевої системи та знижувати фертильність чоловіків [17–20].

Безпліддя чоловіків – це інтегральний показник порушення загального здоров'я чоловіків репродуктивного віку та лімітуючий фактор

народжуваності в популяції. Проблема чоловічого безпліддя систематично зростає, кожного року кількість хворих на безпліддя чоловіків в Україні збільшується на 10 тис випадків [21–23].

Серед різних етіологічних чинників чоловічого безпліддя частка хімічних агентів, яким притаманні ендокринні властивості, постійно зростає. До їх числа входять ендокринні дизраптори (EDCs) – препарати, яким властива вибіркова негативна дія на ендокринну систему. В науковій літературі обговорюються можливі причини чоловічого безпліддя невідомої етіології, в тому числі і негативний вплив ендокринних дизрапторів на процеси сперматогенезу [24, 19]. В навколишнє середовище потрапляє велика кількість хімічних речовин, які викликають дисбаланс ендокринної системи та органів, що регулюються ендокринною системою. Дослідним шляхом доведено патологічний вплив EDCs, причому наслідки негативного впливу на ендокринну систему, під час пренатального і раннього постнатального розвитку, часто є незворотними [25].

Найбільш відомим з групи ендокринно-активних хімічних речовин є бісфенол А (BPA), який має широке застосування в якості складового компонента промислових пластикових виробів. На сьогоднішній день BPA виявляють в усіх біологічних речовинах організму людини, що може свідчити про його високу проникну здатність та накопичувальний ефект [24]. Так, наприклад, у дослідженні Liao C. було проаналізовано 315 зразків сечі, взятих у населення: Сполучених Штатів, Китаю, Індії, Японії, Кореї, Кувейту, Малайзії та В'єтнаму, зразки проаналізували на наявність загальних концентрацій бісфенолу (вільний плюс кон'югований) методом рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (HPLC-MS/MS). Досліджуваний EDCs було виявлено у 81 % проаналізованих зразків сечі в концентраціях 0,02–21,00 нг/мл, в середньому 0,168 нг/мл [26].

Доведено, що шляхом функціональної модифікації генів BPA впливає на диференціювання сперматогенних клітин. У ряді досліджень показано

погіршення якості еякуляту у чоловіків, які мали, як правило, тривалий контакт з ВРА. Механізми впливу ВРА на репродуктивну систему чоловіків, на даний момент, є недостатньо зрозумілими [27, 28].

1.2 Вплив дизрапторів на ендокринну систему людини

Ендокринні дизраптори це різні синтетичні або природні за походженням речовини; до групи найбільш розповсюджених в світі EDCs входять діетилстильбестрол, бісфенол А, фталати, полібромовані дифенілові ефіри та парабени [29]. Вони мають різні механізми дії в залежності від дози та стадії пренатального та постнатального розвитку організму [30]. В науковій літературі опубліковано ряд звітів по дослідженню несприятливих наслідків для людей впливу високих концентрацій дизрапторів. Однак, залишається невизначеним при якій концентрації ендокринно-активних поллютантів, присутніх у навколишньому середовищі, питній воді та їжі виникають суттєві негативні ефекти для окремої людини та популяції людей в цілому. Разом з тим залишається наукова невизначеність щодо фактичних причин таких наслідків. Тим не менш, немає сумнівів, що суттєві порушення ендокринної функції, особливо на певних чутливих стадіях життєвого циклу людини, можуть призвести до системних і тривалих негативних наслідків [31, 32].

З групи ендокринних дизрапторів найбільше поширення здобув бісфенол А (ВРА) $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ – синтетична органічна сполука, яка належить до групи фенолів і має гідроксильні залишки, безпосередньо приєднані до ароматичного кільця (рис.1.1). Поступово бісфенол А став найважливішою антропогенною сполукою з річним виробництвом понад 3,8 мільйона тонн [6]. ВРА використовується для виробництва полікарбонатної пластмаси і епоксидних смол [33–35]. ВРА, зазвичай, присутній в різних виробках повсякденного використання, включаючи упаковки харчових продуктів, електронне обладнання, папір, іграшки тощо [36].

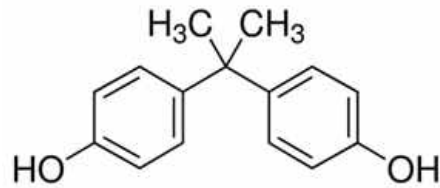


Рис. 1.1 Бісфенол А $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$ [37].

Аналіз літературних джерел показує, що репродуктивна система є однією з основних мішеней токсичного впливу бісфенолу А. Ця хімічна сполука має естрогеноподібну дію, модифікує метилювання ДНК і негативно впливає на ферментативну активність організму, що призводить до дисметаболических розладів, порушення сперматогенезу та може викликати зниження фертильності [38–24].

Дослідження характеру розповсюдження ВРА показали високий вміст ВРА в воді найбільших річок: Індії – $1,95 \text{ мкг/л}^{-1}$, Єгипту – $85,5 \text{ мкг/л}^{-1}$ та Китаю – $44,65 \text{ мкг/л}^{-1}$ [40, 41]. Масштабним біомедичним дослідженням вчених спеціалізованої лікарні Rigshospitalet (Копенгаген, Данія) доведено, що понад 70 % загальної популяції чоловіків Данії мали бісфенол А в сечі і, відповідно, знаходилися під його постійним впливом [42]. Європейська Комісія та Агентство охорони навколишнього середовища США (EPA) визначили хімічні сполуки, що можуть втручатися в гормональну систему, негативно впливати на сперматогенез, порушувати процеси розвитку та розмноження людини, як ендокринні руйнівники [2–5]. Бісфенол А на рівні ЄС включено до списку речовин, визнаних як ендокринні руйнівники [7].

Європейське агентство з безпеки харчових продуктів (EFSA), беручи до уваги наукові дослідження, які доводять широке розповсюдження і негативний вплив бісфенолу А на здоров'я людей, визначило та неодноразово знижувало показник допустимого добового споживання TDI для бісфенолу А. Так, у 2015 році EFSA змінила TDI для бісфенолу А з 50 to 4 мкг/кг/доба , а в грудні 2021 року експертна група Європейського агентства з безпеки харчових продуктів

(EFSA) з матеріалів, ферментів і технологічних допоміжних речовин (SEF Panel) оголосила про результати своєї оцінки ризиків для здоров'я людини від дії ВРА. Після аналізу наукових звітів EFSA дійшла висновку, що бісфенол А має негативний вплив на людину у менших дозах ніж вважалось раніше і прийняла рішення знову знизити показник допустимої добової дози (TDI) для ВРА з 4 до 0,00004 мкг/кг/доба [43, 44].

1.3 Патогенетичні механізми впливу ВРА на чоловічу репродуктивну систему

Патогенетична дія ВРА обумовлена естрогеноподібними властивостями цієї хімічної речовини завдяки характерній поліциклічній фенольній структурі, аналогічній естрадіолу [45]. Дослідним шляхом доведено, що ВРА є ендокринним руйнівником, здатним активувати естроген-чутливий репортер люциферази аналогічно 17β -естрадіолу та змінювати концентрацію гормону і його метаболізм [46, 47]. В ряді наукових досліджень були з'ясовані патологічні наслідки впливу ВРА на репродуктивну систему людини через гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь [33] та зроблено припущення, що ВРА має як короткостроковий, так і довгостроковий негативний вплив на чоловіків [48]. Дослідним шляхом виявлено, що сполука шляхом функціональної модифікації генів бере участь в диференціюванні сперматогенних клітин [49]. У більшості досліджень вплив ВРА на чоловіків, як правило, призводив до зниження кількості сперматозоїдів, їх рухливості, порушення нормальної морфології сперматозоїдів, пошкодження їх ДНК та проявів дисфункції сперматогенезу в цілому, притому негативний вплив ВРА відзначався в широкому діапазоні доз препарату [33, 50].

Слід відзначити, що організм чоловіків виявився особливо чутливим до впливу бісфенолу А в пренатальний період розвитку плоду при потраплянні до організму матері під час вагітності та лактації. ВРА діяв пролонговано і знижував рівень внутрішньотестикулярного і циркулюючого тестостерону у

чоловічому організмі в репродуктивному віці [51]. У чоловіків такий естрогеноподібний вплив викликає порушення механізмів зворотного зв'язку гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі, призводячи до зниження секреції гіпофізом гонадотропінів та уповільнення і деструкцію процесів сперматогенезу [52]. ВРА також може проявляти антиандрогенну активність, зменшуючи експресію рецептора андрогену в сім'яниках та втручатись в передачу сигналів рецептора андрогену (AR) [53, 54]. Не викликає сумнів системна негативна дія бісфенолу А на біосинтез і активність тестостерону, особливо в період статевого дозрівання, що негативно впливає на сперматогенез в дорослому віці [55]. Іспанські дослідники, що вивчали вплив ВРА на рівень загального тестостерону, лютеїнізуючого гормону, фолікулостимулюючого гормону та кортизолу отримали дані, що демонструють патологічну дію ВРА на гормональний статус хлопчиків в віці 9–11 років та негативні зміни в роботі їх ендокринної системи [56]. Дослідним шляхом доведено, що в регулюванні процесів сперматогенезу домінують тестостерон та інгібін В, які утворюються клітинами Лейдіга та Сертолі. Будь-які порушення гормонального фону можуть справляти патологічний вплив на процеси сперматогенезу, що веде до погіршення якості сперми та зниження фертильності [57].

ВРА може викликати дисфункціональні зміни сперматогенезу, а оскільки сперматогенез це складний процес, що забезпечується багатьма факторами такими як – генетичні, гормональні та екологічні, тому порушення будь-якого з них може призвести до втрати фертильності [58, 59, 17]. Ряд авторів на основі як експериментальних, так і епідеміологічних даних класифікували ВРА, як тестикулярний токсикант, що негативно впливає на репродуктивну систему [59]. В комплексних дослідженнях було визначено роль EDCs, як імовірні етіологічні чинники безпліддя чоловіків [58, 59].

1.4 Експериментальні моделі дослідження EDCs речовин

Хімічні речовини – EDCs, що порушують роботу ендокринної системи впливають на її функціональну здатність та можуть сприяти розладам репродуктивної, метаболічної та інших складних систем. Дослідження патологічного впливу ендокринних дизрапторів неможливо змоделювати в клітинних або інших простих системах, тому для наукових досліджень виникає потреба в використанні тваринних моделей. Відповідно вибір найбільш інформативної тваринної моделі, необхідний для ефективного моделювання людської реактивності на дозування та експозицію EDCs, а також забезпечення трансляційної корисності та відтворюваності експерименту проводиться *in vivo* [60]. Отже, механізми, що лежать в основі порушення розвитку життєво важливих систем, таких як ендокринна, репродуктивна та імунна, досліджуються на прикладі лабораторних тварин.

Jaе Kwan Kim з колегами досліджував вплив різних доз бісфенолу А на ріст та розвиток щурів. Отримані дані вказують на порушення біосинтезу стероїдних гормонів у щурів під дією ВРА. Дослідники відзначають дозозалежний характер негативного впливу бісфенолу А, так за максимальної дози 250 мг/кг/доба ВРА викликав дисфункцію біосинтезу стероїдних гормонів [61]. В дослідженні Yuki A. встановлено, що рівень вільного тестостерону сприяє втраті м'язової тканини [62].

Moreman J. з колегами, на прикладі тваринних моделей, довів, що ВРА сприяє тератогенезу і негативно впливає на морфологію сім'яників. При дослідженні ембріонів рибок *Danio rerio* (zebrafish) доведено, що ВРА, залежно від дози, проявляє різні тератогенні властивості, які призводять до численних патологій, а саме: серцевого набряку, черепно-лицьовій аномалії, вад розвитку хребта та крововиливів в черепній коробці [63]. Дослідження впливу ВРА на репродуктивну функцію мишей також показали негативні зміни в морфології сім'яників: зміна розмірів сім'яних каналців і епітелію, крім цього ВРА порушував стадії сперматогенезу [64].

В дослідженнях Benjamin Tan спостерігали вплив бісфенолу А на статевий розвиток молодих самців щурів. В експериментальній групі щурам (PND23) протягом 30 діб перорально вводили 100 мг/кг маси тіла ВРА. Було виявлено, що у більшості піддослідних тварин бісфенол А викликав деструкцію сім'яників, затримку настання статевого дозрівання, порівняно з контрольною групою, а також порушення процесів сперматогенезу [65].

В той же час Tyl R.W. та Myers C.V. притримуються іншої точки зору і вважають, що бісфенол А не спричиняє впливу на фертильність лабораторних щурів, які зазнали дії препарату в дорослому віці при малих дозах [66], разом з тим Brouard V. доводить, що ВРА по різному впливає на фертильність гризунів залежно від віку дослідних тварин [67]. ВРА може перешкоджати сперматогенезу та зменшувати кількість сперматозоїдів у сім'яниках щурів, знижувати рівень тестостерону у плазмі крові та справляти патологічний вплив на репродуктивну здатність самців мишей [68].

Дослідженнями Al-Niyasat A. S. доведено, що зниження частоти вагітності і збільшення частоти резорбцій у інтактних самок гризунів були пов'язані з негативним впливом малих доз ВРА на дорослих самців, тобто погіршенням якості сперми [69].

Крім цього, ряд авторів отримали неоднозначні експериментальні дані в дослідженнях пренатального впливу бісфенолу А на розвиток чоловічої репродуктивної системи. Проведено ряд досліджень щодо впливу бісфенолу А на показники спермограм, однак отримано неоднозначні результати щодо впливу ВРА на якість еякуляту. Одні дослідження виявили певні ознаки негативної дії тільки великих доз ВРА [70], інші відзначали негативний вплив навіть незначної кількості дизраптора ВРА в період статевого розвитку молодих щурів-самців [70]. У дослідженнях Aikawa H. зі співавторами виявлено у потомства гризунів зниження рухливості сперматозоїдів і збільшення відсотку аномальних форм сперматозоїдів за дози ВРА 50 мкг/кг/доба при відсутності значних морфологічних змін сім'яників [71].

Клінічні дослідження доводять, що ендокринно-активні речовини є серйозною проблемою для громадського здоров'я. Дослідження впливу ВРА на стероїдогенез *in vitro*, продемонстрували зниження фертильності піддослідних тварин під дією ендокринного дизраптору. ВРА порушував експресію генів: SHAC1 (передача сигналів NOTCH та окислювальний баланс), JUN (пов'язаний із шляхом MAPK), NR4A1 (інгібування секреції естрадіолу), ARRDC4 (ендоцитоз GPCR) та KLF10 (клітинний ріст, диференціювання та апоптоз) [72].

Дослідним шляхом доведено, що вплив високих доз ВРА в пубертатний період у гризунів викликав апоптоз клітин Лейдіга і зародкових клітин, що призводило до розвитку гістопатологічних порушень сім'яників включаючи деформацію сім'яних каналців, зменшення кількості шарів сперматогенного епітелію, збільшення клітин з пікнотичними ядрами. А також зменшення ваги сім'яників та дисфункцію сперматогенезу, яка проявлялась у дорослому віці, значно пізніше після періоду впливу бісфенолу А [73]. Щури-самці, які піддавалися впливу ВРА в період пренатального та постнатального розвитку, мали низьку вагу сім'яників та низький рівень тестостерону у дорослому віці [74].

ВРА може дезорганізувати ендоканабіноїдну систему в клітинах Сертолі, які відіграють важливу роль в процесі сперматогенезу. У експериментальних умовах введення мишам ВРА дозою 6,0 мкм призводило до цитотоксичної дії дизраптора на клітини Сертолі, підвищувався рівень експресії специфічних компонентів ендоканабіноїдної системи, а саме: рецептора канабіноїдів типу 1 (CB1), діацилгліцеролліпази- α (DAGL- α) та рецептора канабіноїду типу 2 (CB2) [75].

В аналітичному дослідженні Czarnywojtek A. надаються додаткові докази несприятливого впливу бісфенолу А на розвиток репродуктивної системи ссавців. При дослідженні щурів найбільший патологічний вплив бісфенолу А був спрямований на порушення процесів сперматогенезу та

деструкцію епітелію сім'яників щурів. Поряд з цим вказується, що вплив бісфенолу А на людину ще не вивчений і активно досліджується [76]. Досліди Ryu D. доводять, що при дозі ВРА 50 мг/кг/доба спостерігаються гістопатологічні ураження сім'яників гризунів, разом з тим погіршення загального стану не відзначається [77].

Gupta С. (США) вивчав вплив бісфенолу А на репродуктивну функцію чоловіків. Отримані дані показали, що під дією ВРА збільшувався розмір передміхурової залози та зменшувались придатки сім'яників, разом з тим дослідник не виявив статистично значущих змін ваги сім'яників. Експериментальним шляхом довели, що ВРА сприяє росту простати та підвищує активність зв'язування андрогенів з рецепторами. Крім цього, результати досліджень *in vivo* показали, що ВРА негативно впливає на розвиток репродуктивних органів в пренатальний період [78].

1.5 Морфологічна характеристика сім'яників та еякуляту

Сім'яники щура мають яйцеподібну форму, вкриті оболонкою зі сполучної тканини, у статевозрілих щурів сім'яники мають масу приблизно 1,25 г і розташовані в мошонці [79]. Сім'яники ссавців містять численні трубчасті утвори: звивисті сім'яні каналці, прямі каналці, сітку сім'яників, виносні протоки сім'яників [80], їм властива висока швидкість диференціювання клітин, сперматогонії диференціюються в сперматозоїди протягом усього життя самця. Сперматогенез гризунів вперше дослідив і описав в своїй роботі Oakberg E. в 1956 році. Вчений простежив послідовність розвитку статевих клітин та розділив їх на стадії [81].

Проведене Пастуховою В. А. порівняльне морфологічне дослідження будови сім'яників статевозрілих щурів і людей доводить аналогічність будови розглянутих біологічних об'єктів. Сперматогенний епітелій звивистого сім'яного каналця складається з типових трьох шарів статевих клітин, а базальна мембрана контактує з клітинами Сертолі. Визначені структурні

елементи сім'яника формують гематотестикулярний бар'єр, який забезпечує трофіку сперматогенного епітелію [82].

Сім'яник людини – парний паренхіматозний орган, який знаходиться в калитці та містить численні трубчасті утвори: звивисті сім'яні каналці, прямі каналці, сітку яєчка, виносні протоки яєчка. У звивистих сім'яних каналцях утворюються чоловічі статеві клітини – сперматозоїди; інші трубчасті структури яєчка забезпечують депонування та виведення сперматозоїдів і належать до сім'явивідних шляхів. Сім'яник має овально-округлу форму, довжину 4-6 см, ширину - 2,5-3,5 см, масу 15-30 г [80].

Попередніми дослідженнями доведено, що сім'яники людини є органом-мішенню, що пошкоджуються, як поллютантами навколишнього середовища, так і терапевтичними препаратами. Небезпечним результатом впливу є незворотне пошкодження сім'яників, що характеризується тривалою азооспермією і безпліддям. Раніше вважалося, що необоротне пошкодження сім'яників є результатом повного виснаження статевих клітин, однак на теперішній час доведено, що статеві клітини можуть бути присутніми у атрофованому сім'янику, що надає можливість терапевтичного втручання для відновлення сперматогенезу. На прикладі тваринних моделей доведено, що при імітації атрофії сім'яників, після впливу токсиканта, сім'яники містять статеві клітини, а гормональні маніпуляції можуть відновити сперматогенез. Отримані дані роблять дослідження по відновленню процесів сперматогенезу особливо актуальними при розробці методів профілактики і лікування репродуктивної системи чоловіків [83].

Погіршення параметрів якості сперми прямо впливає на показники чоловічого безпліддя [18]. Базовими показниками якості сперми є концентрація сперматозоїдів, їх рухливість та морфологія. Дослідження показали, що порушення функціональної здатності ендокринної та репродуктивної системи чоловіків є основними причинами погіршення сперми [17]. Справедливість гіпотези про можливий деструктивний вплив

ВРА на процеси сперматогенезу і, як наслідок, на фертильність доводиться численними дослідженнями з використанням тваринних моделей. Доведено, що ВРА негативно впливає на якість сперми, крім цього ендокринний руйнівник знижує показник концентрації сперматозоїдів, їх рухливість, життєздатність, а також цілісність ДНК і акросом [84–86].

Чоловічі сперматозоїди чутливі до окислювального стресу, такий стрес запускає каскад перекисного окислення ліпідів, який завершується утворенням електрофільних ліпідних альдегідів, які зв'язуються з ДНК і низкою білків, які беруть участь у доставці функціонально компетентних клітин. Однією з груп мішеней для цих альдегідів є білки мітохондріального ланцюга транспортування електронів. Коли відбувається ця взаємодія, мітохондріальна генерація АФК посилюється, що призводить до тривалого генерування окисного пошкодження в циклі, що самозберігається. Таке пошкодження впливає на функціональну здатність сперматозоїдів, включаючи рухливість, розпізнавання яйцеклітин, акросомальний екзоцитоз і злиття сперматозоїдів і ооцитів. Окислювальний стрес також порушує цілісність ДНК сперматозоїдів, потенційно впливаючи на здатність до розвитку ембріонів та здоров'я нащадків [87, 88, 32]. Широкими дослідженнями сечі, сперми та крові чоловіків Данії доведено, що бісфенол А збільшує концентрації ТГ, ЛГ, Е2 і ТТГ, та зменшує відсоток прогресивно рухливих сперматозоїдів. Причому, інші показники сперми не змінювалися [42]. Аналогічні результати отримані при дослідженні чоловіків Італії, де високий рівень ВРА в сечі мав прямий зв'язок з підвищенням рівня ТТГ, в цей же час показники Е2 не змінювалися. У іншому дослідженні сечі та крові чоловіків у віці від 20 до 74 років, які мешкали в гірській місцевості Італії з'ясовано, що концентрація ВРА в сечі на рівні 3,59 нг/мл може викликати дисбаланс ендокринної системи [89]. Експериментальні дані показали, що висока концентрація ВРА через посилене перекисне окислення ліпідів і нітрування тирозину, а також виснаження внутрішньоклітинного рівня АТФ та активності протеїнкінази А в

сперматозоїдах зменшує їх концентрацію в еякуляті та пригнічує рухливість сперматозоїдів. У тварин, які отримували ВРА, ідентифіковано експресовані білки, що відіграють провідну роль в енергетичному метаболізмі та впливають на показники фертильності тварин. Виходячи з цих результатів, гестаційний вплив ВРА може змінити морфометричні характеристики сперматозоїдів та протеомний профіль, що в кінцевому підсумку знизить потенціал фертильності [27, 85].

ВРА впливає на розвиток сім'яників плода та створює схильність до синдрому дисгенезії сім'яників. Цей синдром може проявлятися не тільки при народженні крипторхізмом і гіпоспадією, але й у зрілому віці, коли з'являються пухлини сім'яників та відзначається гіпогонадізм і безпліддя [90]. Літературні дані свідчать про те, що ВРА може спричинити гістологічні аномалії сім'яників, які призводять до нерегульованої проліферації, апоптозу клітин Лейдіга та інших патологічних змін стероїдогенезу [91].

Дослідження Wang Y. показали, що тривалий вплив бісфенолу А при добовій дозі (0,05 мг/кг/добу) потенційно небезпечний, оскільки тривалий вплив бісфенолу А пригнічує мейоз в сім'яниках і, в кінцевому результаті, погіршує репродуктивну функцію потомства самців [92].

В інших дослідженнях Toshihiro Такао вивчав вплив бісфенолу А на імунореактивність та mRNA естрогенового рецептора $-\alpha$ і $-\beta$ в сім'яниках мишей, автор відзначає суттєве зниження експресії ER β mRNA в групі, що отримувала 50 мкг/мл бісфенолу А, порівняно з контрольною групою та групою, яка отримувала 0,5 мкг/мл ВРА. Разом з тим показник експресії ER α mRNA суттєво зростав в групі, що отримувала 50 мкг/мл ВРА, порівняно з контрольною групою та групою, яка отримувала 0,5 мкг/мл бісфенолу А. В експерименті відзначено негативний вплив високих доз бісфенолу А у пренатальний та постнатальний період розвитку тварин, показано можливий вплив ВРА на розвиток репродуктивних органів, включаючи аномальну гормональну секрецію та дезорганізацію процесів сперматогенезу [93, 94].

Однак, вплив низьких доз бісфенолу А на ссавців досі непевний, а результати залишаються суперечливими [95].

Дослідження *in vivo* на щурах лінії Вістар, проведені на різних стадіях розвитку, показали, що естрогенна дія ВРА призводить до пригнічення тестикулярного стероїдогенезу, що, в свою чергу, викликає гіпогонадотропний гіпогонадизм з розвитком дефектів репродуктивних шляхів [96, 28].

Дослідження вчених з Медичного університету Сюйчжоу (Xuzhou Medical University, China) показали, що ВРА інгібує проліферацію клітин Сертолі та діє шляхом блокування аміно- та карбоксильних кінцевих ділянок (AR N/C) AR, посилюючи взаємодію AR з медіатором пригнічення рецепторів тиреоїдних гормонів (SMRT) і корепресором ядерного рецептора (NCoR) [97].

1.6 Проблемні питання дослідження фертильності

Традиційні методи дослідження фертильності з використанням природнього спарювання та тестування потомства витратні та трудомісткі. Електроєякуляція є швидшим методом збору сперми для наукових досліджень та аналізу, має суттєві переваги та потребує використання менше тварин. В дослідженнях сперми, в тваринних моделях, отримав розповсюдження удосконалений метод трансректальної електростимуляції сім'яних пухирців з використанням легкої газової анестезії та електростимулятора для збору сперми.

Електростимуляція еякуляції успішно використовується для отримання сперми у багатьох тварин. Забір сперми у щурів вперше було описано в 1959 році, а в 1960-х і 1970-х роках технологію забору сперми удосконалили і до теперішнього часу технологія отримання еякуляту, практично, не змінилась [98, 99, 100]. Розроблені методи електростимуляції давали позитивний результат у 92,6 % досліджень і кожна тварина могла давати еякулят повторно [100].

Електростимуляція стала надійним методом отримання зразків сперми для оцінки широкого спектру патологічних впливів різного походження на репродуктивну систему піддослідних тварин. Однак, процедура виявилась болючою, тому було проведено ряд досліджень, спрямованих на пошук способів зменшити больових відчуттів піддослідних тварин, пов'язаних з електроеякуляцією. В результаті проведених досліджень по обезболюванню електростимуляції запропоновано ряд епідуральних, внутрішньовенних та місцевих анестетиків [101, 102]. Разом з тим на больові відчуття, пов'язані з електростимуляцією, впливали: сила току, його частоти та тривалість навантажувального імпульсу, які легко регулюються сучасними електростимуляторами [102]. Дослідження альтернативних способів отримання еякуляту, таких як масаж та штучні піхви – виявились не ефективними, порівняно з електростимуляцією [101].

В дослідженнях, проведених в Університеті Чунан (Chung-Ang University, Republic of Korea) доведено, що ВРА сприяє утворенню нетипових фенотипів дослідних тварин, які можуть передаватися наступним поколінням. Однак механізми впливу, за допомогою яких ВРА провокує ці негативні наслідки, невідомі. В експерименті вагітним самкам мишей перорально вводили ВРА – 50 мкг/кг/доба, 5 мг/кг і 50 мг/кг/доба. Шляхом спаровування народжених експериментальних самців з інтактними самицями отримували самців поколінь F1, F2 і F3. Високі дози ВРА знижували фертильність самців всіх досліджуваних поколінь, тобто дезорганізовували сперматогенез, змінювали біохімічні властивості сперматозоїдів, знижували їх кількість і рухливість. В експерименті спостерігався трансгенераційний ефект під дією ВРА. Три покоління дослідних тварин, під впливом високої дози ВРА, передавали аномальні репродуктивні зміни в моделях метилювання ДНК сперматозоїдів. Авторами зроблено висновки, що вплив факторів навколишнього середовища, під час вагітності, може негативно впливати на фертильність майбутніх поколінь [103].

1.7 ВРА індукована токсичність як модель дослідження безплідності

Аналіз літературних джерел показує, що протипухлинні препарати доксорубіцин і цисплатин мають чітко виражену гонадотоксичну дію [104]. Так, в дослідженнях Zhang X. з'ясовано, що цисплатин запускає апоптоз герміногенних клітин сім'яників вже після одноразової внутрішньочеревної ін'єкції дозою 10 мг/кг. Індукований цисплатином апоптоз виявлено у сперматогоніях, сперматоцитах і сперматидах сім'яників мишей [105]. У багатофакторному 10 річному медичному спостереженні за чоловіками, які вживали цисплатин в дозі 39–82 мг/м², що проведено в США, доведено статистично значуще зниження рівня фертильності [106]. У дослідженні Romerius P. після проведеного курсу лікування цисплатином дозою 500 мг/м² у 66 % чоловіків спостерігалася азооспермія, разом з тим малі дози препарату не викликали подібних порушень [107]. У пацієнтів, які лікувались цисплатином, спостерігалася пригнічення сперматогенезу, деформація сім'яних каналців, пошкодження клітин Сертолі та загибель клітин сперматогенного епітелію. Згодом дія препарату призводила до тимчасового або постійного зниження кількості сперматозоїдів та їх рухливості, життєздатності та цілісності ДНК, що викликало безпліддя [108].

Враховуючи поширеність ксеноекстрогенів та недослідженість механізмів впливу ВРА на структуру і функціонування органів чоловічої репродуктивної системи, розглянута проблема вимагає фундаментальних досліджень, що, без сумніву, виводить цей науковий напрямок в розряд своєчасних і актуальних.

ВРА визнається потужним ендокринним руйнівником, який порушує гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь протягом онтогенезу. Порушує клітинний окисно-відновний баланс сім'яників та сперми, що призводить до змін у розвитку і функціонуванні сім'яників та патологічних порушень ендокринної системи. Загалом літературні дані доводять несприятливий вплив ВРА на якість сперми та збільшення генетичних аномалій; однак ці зміни не

супроводжувалися чіткими даними про результати фертильності. Виявлення ефективних маркерів впливу ВРА, здатних визначити та передбачити наслідки для здоров'я та репродуктивної системи чоловіків, а також ідентифікація терапевтичних компонентів, здатних врятувати ВРА індуковану токсичність чоловічої репродуктивної системи, є основними проблемами в галузі андрології. Слід відзначити, що особливості змін стану структурних елементів сім'яників під дією ВРА залишаються недостатньо дослідженими. Таким чином, з теоретичної та практичної точки зору, важливим є проведення досліджень усіх структурних елементів сім'яників та їх стану в різні періоди сперматогенезу [109].

Як показав аналіз наукової літератури по дослідженню впливу ВРА на дисбаланс гомеостазу ендокринної системи та морфофункціональний стан чоловічої статеві системи, до теперішнього часу не проводились фундаментальні дослідження тривалого впливу ВРА, а окремі дослідження мають мозаїчний характер та не охоплюють весь спектр проблематики негативного впливу ВРА на чоловічу репродуктивну систему. Складність репродуктивної здатності робить її вразливою до несприятливих впливів хімічних речовин. В цьому контексті важливо системно дослідити механізми впливу ВРА на чоловічу репродуктивну систему з метою передбачення медичних наслідків та зменшення негативного впливу ендокринного дизраптору на фертильність чоловіків для збереження суспільного здоров'я.

Складність механізмів репродуктивних процесів робить їх вразливими до несприятливих впливів на будь-якому етапі реалізації функції, тому вивчення впливу ендокринних дизрапторів, зокрема найбільш поширеного з них бісфенолу А на якість еякуляту, зумовлює важливість вивчення цієї медичної проблеми, а розробка заходів профілактики та лікування порушень репродуктивного здоров'я через вплив ВРА набуває особливої цінності при створенні моделі комплексної медичної допомоги чоловікам, які страждають на безпліддя [110].

ВРА, ймовірно, відіграє значну роль у патогенезі широкого спектру розладів здоров'я чоловіків, в тому числі безпліддя. Враховуючи поширеність ксеноекстрогену та недослідженість механізмів впливу ВРА на структуру і функціонування органів чоловічої репродуктивної системи виникає необхідність в фундаментальних дослідженнях, що, без сумніву, виводить цей науковий напрямок в розряд своєчасних і актуальних.

Експериментальним шляхом доведено, що дизраптори негативно впливають на чоловічу статеву систему. Разом з цим тривалий вплив ВРА на сперматогенез вивчено недостатньо.

Останнім часом кількість людей із ожирінням у всьому світі зросла, розкриваючи складну картину значних відмінностей між націями та різними профілями дорослих і дітей, регіонами та професіями. Загальноприйняті причини ожиріння – переїдання та гіподинамія не пояснюють причину ожиріння. Існує ряд доказів того, що природні механізми контролю ваги організмом людини дезорганізовані. Висловлено припущення, що головною причиною може бути екологічне забруднення в тому числі і потужний вплив ендокринних дизрапторів [111, 112]. До останнього часу не звертали уваги на те, що навколишнє середовище значно змінилося протягом останніх десятиліть через експоненціальне виробництво та широке використання синтетичних речовин з гормонально подібною дією на організм людини. Однією хімічних речовин, яка набула світового поширення є ВРА. Науковці розробили гіпотезу про те, що ендокринний дизраптор ВРА впливає на механізм накопичення жирової тканини [113–115].

Висновки до розділу 1

Хімічні речовини з ендокринними властивостями, зокрема ВРА, негативно впливають на чоловічу фертильність. Вони здатні діяти селективно, змінюючи статус ендокринної системи. В науковій літературі обговорюються можливі причини безплідності за чоловічим фактором, включаючи негативну

дію ВРА на процеси сперматогенезу. Експериментальні дослідження ряду авторів підтверджують патологічний тестикулярний вплив ВРА і вказують, що негативна дія дизраптора має часто незворотній характер. Автори підкреслюють важливість подальших досліджень маніфестації та характеру токсичної дії ВРА на репродуктивне здоров'я чоловіків.

За результатами аналізу наукової літератури, стосовно впливу ВРА на гомеостаз ендокринної системи та морфофункціональний стан чоловічої статеві системи, можна зробити висновок, що до цього часу не було проведено фундаментальних досліджень тривалого впливу ВРА. Проведені дослідження мають, як правило, фрагментарний характер і не охоплюють усі аспекти проблеми негативного впливу ВРА на чоловічу репродуктивну систему. Оскільки репродуктивна здатність людини є складним процесом, вона стає вразливою до негативних впливів хімічних речовин. У зв'язку з цим важливо провести системні дослідження механізмів дії ВРА на чоловічу репродуктивну систему з метою передбачення медичних наслідків та зменшення негативного впливу ВРА на фертильність чоловіків.

Основні положення розділу 1 викладені в наступних наукових працях:

- 1 Лялина А. Ю., Хмель Е.С., Бондаренко Н. А., Силкина Ю. В., Ярошенко Д. С. Влияние бисфенола А на структуру и функцию внутренних органов. *Azerbaijan medical journal*. 2021. № 4. с. 151-158. DOI 10.34921/amj.2021.4.022 [116].
- 2 Ярошенко Д. С. Вплив бісфенолу А на чоловічу фертильність. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2023. № 4(56). С. 177–181. DOI 10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14314 [117].
- 3 Бондаренко О.О., Ярошенко Д.С. Морфологічні особливості змін у сім'яниках під дією бісфенолу А Новини і перспективи медичної науки : зб. мат. ХХІІІ конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І.В., Бондаренко Н.С.]. Дніпро. 2023. С. 109 [118].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Дизайн дослідження. Характеристика досліджуваного матеріалу

Дослідження проведено на кафедрі патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології Дніпровського державного медичного університету (м. Дніпро). Тварини утримувались у стандартних умовах віварію ДДМУ, які відповідають вимогам Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 року) [119]. Усі дослідні процедури проведено відповідно до міжнародних вимог і норм гуманного відношення до тварин. Директиви № 2010/63/ЄС про захист тварин, що використовуються з науковою метою (2010 р.), Закону України 3447-ІУ від 21.02.2006 р., та висновку комісії з питань біомедичної етики ДДМУ (протокол № 18 від 17.04.2024 р.).

Розроблений дизайн дослідження наведено на рисунку 2.1. Дослідження проведені на 120 щурах самцях лінії Wistar віком 2–3 місяці, масою 210–230 г. Тварин утримували у клітках із вільним доступом до води та їжі, що включала в себе всі необхідні вітаміни і мікроелементи за умов: 12/12 годинний цикл світло/темрява при температурі 22°C [120]. Відібрані щури були рандомізовано розділені на чотири групи: F0-1 – контрольна група (n=30) – тварини, які знаходились на звичайному харчуванні і додатково отримували кукурудзяну олію – 2,5 мл/кг маси тіла; F0-2 – група порівняння (інтактна) (n=30) тварини, які знаходились на звичайному харчуванні; F0-3 – експериментальна група (n=30) – піддослідні тварини, яким протягом 120 діб вводили бісфенол А (Sigma-Aldrich, USA), розчинений в кукурудзяній олії, дозою – 50 мг/кг/добу; F0-4 – експериментальна група (n=30) – тварини, яким протягом 120 діб вводили бісфенол А, розчинений в кукурудзяній олії дозою – 250 мг/кг/доба. Розчинений в кукурудзяній олії ВРА вводили щодня з 8 до 9

години ранку перорально в обсязі 2,5 мл/кг маси тіла. Протягом експерименту щотижня щурів зважували [28].

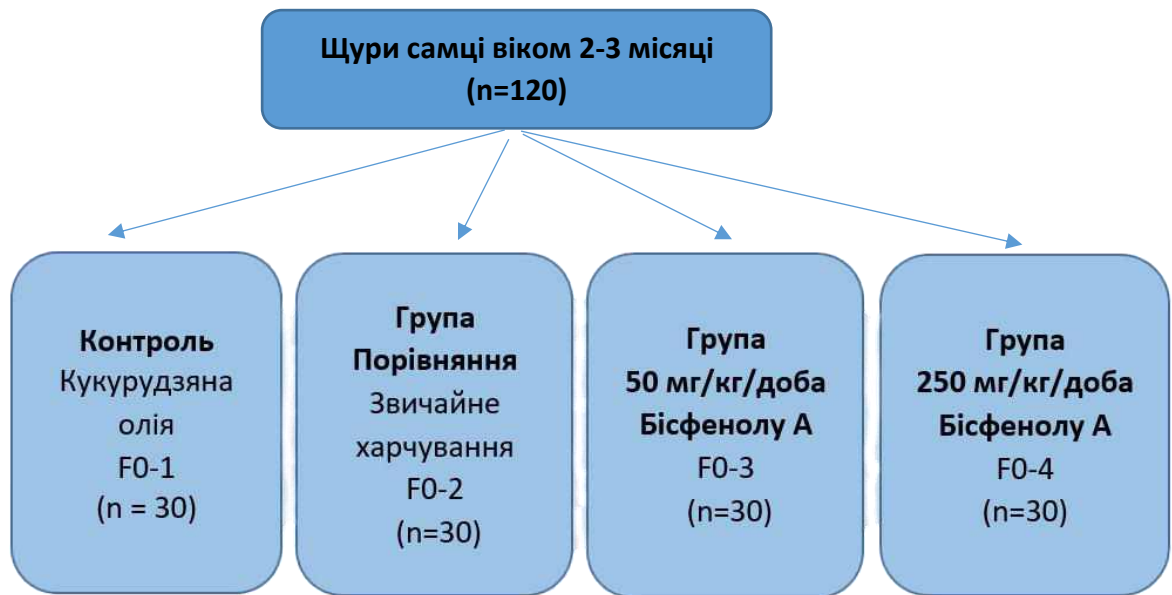


Рис. 2.1 Загальний дизайн дослідження.

Розподіл досліджуваного матеріалу контрольної, інтактної та експериментальних груп надано у таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Розподіл експериментальних тварин по групах

Усього об'єктів	Назва експериментальних груп			
	Контрольна	Інтактна	ВРА 50 мг/кг/доба	ВРА 250 мг/кг/доба
	F0-1	F0-2	F0-3	F0-4
120	30	30	30	30
100 %	25 %	25 %	25 %	25 %

Експериментальну модель ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи викликали щоденним пероральним введенням розчиненого в кукурудзяній олії ВРА із розрахунку 50 і 250 мг/кг маси тіла, впродовж 120 діб. Застосовані протягом експерименту дози ВРА, за даними морфології сім'яників, обумовлювали розвиток патологічних змін

гістологічної архітекτονіки сім'яників, порушення процесів сперматогенезу та зниження запліднюючої здатності сперми [20, 22, 168].

2.2 Методи дослідження

Відповідно до поставлених завдань при проведенні дослідження застосовано комплекс наступних методів дослідження: гістологічний – для вивчення розвитку, будови та функції клітин сім'яників щурів, морфометричний – для визначення кількісної морфологічної оцінки маси і параметрів сім'яників щурів самців; біометричні – для визначення біометричних параметрів сім'яників; функціональні – для оцінки стану запліднюючої здатності сперми; біохімічні – для визначення рівню статевих гормонів: тестостерону та 17β -естрадіолу в плазмі крові; статистичні – для визначення кількісних та якісних характеристик діяльності організмів експериментальних тварин і оцінки достовірності отриманих результатів.

2.2 Трансректальна електростимуляція. Аналіз еякуляту

Репродуктивну функцію щурів оцінювали по кількісним та якісним показникам еякуляту і фертильності тварин, зразки еякуляту отримували методом трансректальної електростимуляції сім'яних горбиків щурів [121–123].

Трансректальний електростимулятор щурів формує від 0,5 до 9,5 вольт синусоїдального змінного струму, який випромінюється серією електричних імпульсів у вигляді хвиль із частотою 120 Гц на секунду. Прилад обладнано таймером, який автоматично контролює випромінювання та цикли перерв. Електричний струм подається через біполярний електрод діаметром валу 3,5 мм і довжиною 60 мм. Обидва полюси розташовані на одному електроді. Перший знаходиться на кінчику електроду і має еліпсоїдну форму 6*4 мм, а другий складається з двох менших еліпсоїдів по 1,5*2,0 мм кожний, полюси розділені смугою ізоляційного матеріалу. З протилежного боку електрод

облаштовано зеленим світловим індикатором поточного випромінювання для наочного контролю циклів випромінювання та перерв (рис. 2.2).

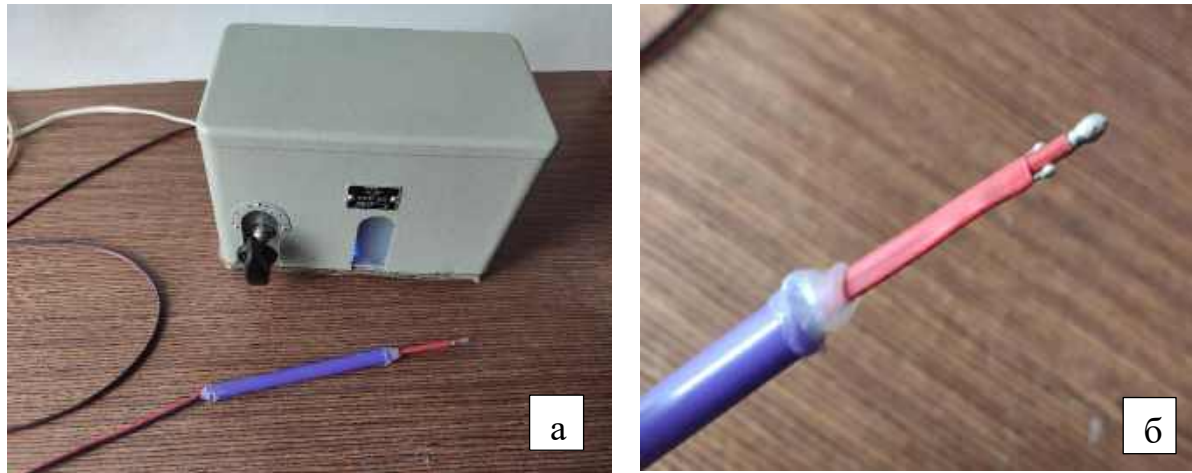


Рис. 2.2 Трансректальний електростимулятор щурів, виготовлений на кафедрі патологічної анатомії, судової медицини та патологічної фізіології Дніпровського державного медичного університету. а) прилад; б) біполярний електрод.

Дослідним щурам проводили анестезію, потім вводили змащений вазеліновим маслом електрод на 30 мм в пряму кишку і подавали серію електричних імпульсів з частотою 120 Гц і напругою 0,5 В. Через кожні 5–7 секунд випромінювання робили 5–7 секундну перерву і збільшували напругу на 1,5 В до появи ерекції. Продовжували електростимуляцію до еякуляції, але не більше 12 хвилин і максимальній напрузі струму 9,5 В (рис. 2.3).

При аналізі спермограм, відповідно до рекомендацій ВООЗ визначали: об'єм еякуляту, кількість і концентрацію сперматозоїдів, їх рухливість та життєздатність. Крім цього, визначали фракції морфологічно нормальних та аномальних форм сперматозоїдів. Підрахунок загальної кількості статевих клітин виконували з урахуванням характеру їх рухливості в камері Маклера (рис. 2.4) [124].



Рис. 2.3 Забір сперми у щура шляхом трансректальної електростимуляції.



Рис. 2.4 Аналіз еякуляту методом фазово-контрастної мікроскопії, Сперматозоїд щура, світловий мікроскоп ZEISS «Primo Star», Зб.: $\times 400$.

2.3 Біометричні дослідження

Досліджуваний біологічний матеріал: сім'яники, еякулят та кров щурів самців відбирався кожні 20 діб від початку досліджень. Маса тіла щурів та їх

сім'яників вимірювали лабораторними електронними вагами (FEN-600, Україна).

Гонадо-соматичний індекс (ГСІ) розраховували за формулою [125] 1:

$$\text{ГСІ} = \frac{\text{маса сім'яників (г)}}{\text{маса тіла (г)}} \times 100 \quad (1);$$

Щойно вилучені сім'яники перед фіксацією зважували [126, 127]. Оскільки орган парний, має морфометричні параметри мінливі і схильні до коливань в досить широких діапазонах, для стандартизації брали правий сім'яник (рис. 2.5).



Рис. 2.5 Дослідження сім'яників щурів, підготовка до морфологічного аналізу.

2.4 Морфологічний аналіз

Вилучені сім'яники оглядали, визначали масу і розмір, потім лівий сім'яник фіксували в 10 % нейтральному формаліні. Після фіксації біологічного матеріалу робили гістологічну проводку (зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації), заливали біоматеріал у парафін за допомогою станцій Thermo Scientific HistoStar (Thermo Fisher Scientific, USA). Отримані парафінові блоки нарізали на напівавтоматичному мікроскопі Thermo Scientific Microm HM 340 E Rotary Microtome (MICROM International GmbH, Німеччина), товщина зрізів становила 5 мкм.

2.5 Морфометричні дослідження

Гістологічні препарати сім'яників, забарвлені гематоксиліном і еозіном [128–130] досліджували за допомогою світлового мікроскопа (ZEISS «Primo Star», Німеччина), оснащеного цифровою камерою (AxioCam ERC 5s, Німеччина) [131, 132]. Зображення аналізувалися за допомогою програмного пакету ZEN 2 blue edition. Цифрові кольорові фотографії робили збільшенням $\times 100/200/400$, площу та лінійні розміри вимірювали за допомогою інструментів програмного пакету ImageJ 1.53t [133] відповідно до рекомендацій по обробці і аналізу зафіксованих інформативних полів зору [134, 135].

Під час проведення морфометричних спостережень досліджували звивисті сім'яні каналці: вимірювали діаметри звивистих сім'яних каналців, діаметри просвітів, висоту сперматогенного епітелію та кількість клітин Лейдіга. Розраховували індекс сперматогенезу (IC) за формулою [136], 2:

$$IC = \frac{\Sigma a}{N} \quad (2);$$

де: а – сума шарів сперматогенного епітелію в кожному сім'яному каналці; N – число підрахованих каналців.

Підраховували кількість сім'яних каналців, визначали якісні зміни сперматогенного епітелію: деформацію сім'яних каналців, відшарування сперматогенного епітелію від базальної мембрани та висоту сперматогенного епітелію [136–138, 82]. Індекс релаксації (напруги сперматогенезу) визначали відношенням суми усіх порахованих статевих клітин до суми клітин Сертолі [139, 140].

2.6 Імуноферментний аналіз

Методом імуноферментного аналізу визначали рівень тестостерону та 17β -естрадіолу в плазмі крові, збирали зразки в пробірки епендорфа, в які попередньо вливали антикоагулянт етилендіамінтетраоцтову кислоту (EDTA) (BD Vacutainer, USA), біологічні препарати центрифугували та отриману плазму зберігали при температурі $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рівень тестостерону в плазмі, 17β -естрадіолу визначали з використанням тест-наборів імуноферментного аналізу: Rat Testosterone ELISA Kit та Rat Estrogen ELISA Kit.

2.7 Визначення фертильності

Кожні 20 діб, протягом експерименту, з кожної групи рандомізовано відбирались по 10 самців щурів, яких парували з інтактними самицями у співвідношенні самець : самиця – 1:1 протягом 2–3 естральних циклів для визначення фертильності [141]. Зміну індексу запліднювальної здатності щурів самців (ІЗЗ) визначали за формулою 3:

$$\text{ІЗЗ} = \frac{\Sigma \text{Вагітні самиці}}{\Sigma \text{Спаровані самиці із самцями}} \times 100 \quad (3);$$

Щурів виводили з експерименту шляхом введення тіопенталу натрію в дозі 50 мг/кг маси внутрішньочеревинно.

2.8 Статистичні методи дослідження

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою пакету програм STATISTICA 6.1 (StatSoftInc., серійний № AGAR909E415822FA). Для оформлення результатів дослідження застосовували програмне забезпечення Microsoft Office Home and Business (серійний № 2KB4Y-6H9DB-VM47K-749PV-PG3KT). Перевірку розподілу даних на нормальність проводили за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Оскільки розподіл більшості даних оцінювався як відмінні від нормального, для оцінки відмінностей між експериментальними групами використовувався критерій Краскела-Уолліса. Результати надано у вигляді $m \pm m$ і min-max, де m – вибіркоче середнє вимірюваних величин, m – стандартна помилка, min і max – мінімальне і максимальне значення, а також у відсотках або абсолютних числах. Критичний рівень значимості нульової статистичної гіпотези приймали $< 0,05$ [142]. Також проводився аналіз сили кореляційних зв'язків з визначенням коефіцієнтів кореляції Спірмена (r_s), ROC аналіз [143]. Оброблені експериментальні дані представлені у вигляді гістограм.

РОЗДІЛ 3

ОЦІНКА ВПЛИВУ ВРА НА МОРФОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ СТРУКТУР СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ

3.1 Особливості морфометричних параметрів сім'яників

Світлова мікроскопія гістологічних зразків сім'яників щурів контрольної групи F0-1 і групи порівняння F0-2 показала правильний порядок розташування статевих клітин, які утворювали шари відповідно стадіям сперматогенного циклу, а морфометричні параметри сперматогенезу у щурів груп F0-1 і F0-2, протягом експерименту, відповідали фізіологічній нормі (рис. 3.1).

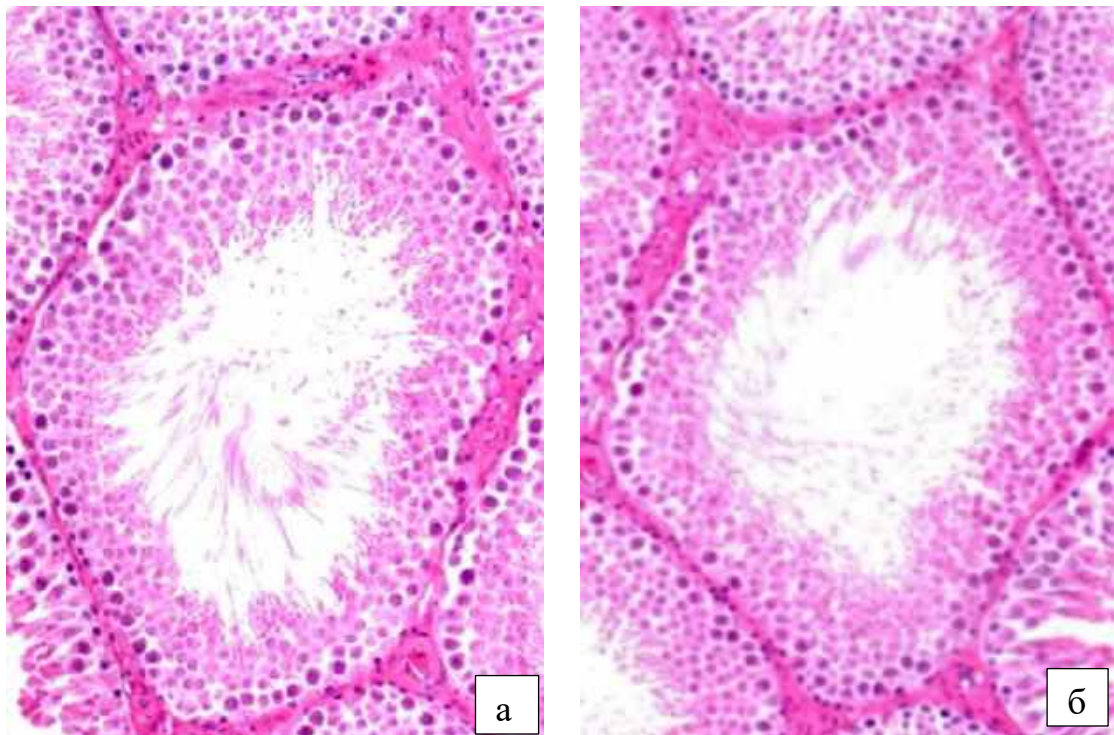


Рис. 3.1 Гістоструктура сім'яників щурів, забарвлення: гематоксилін-еозин. Мікрофотографії. Зб.: x200.

Примітки: а) контрольна група F0-1; б) група порівняння F0-2.

При дослідженні сім'яників щурів, що зазнали впливу ВРА протягом перших 60 діб експерименту, не було виявлено статистично значущих патологічних змін гістологічної архітекτονіки сім'яників щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, відповідно і порушення процесів сперматогенезу не спостерігалось.

Однак, вже після 80 доби експерименту в сім'яниках щурів групи F0-4, спостерігались патоморфологічні зміни в звивистих сім'яних канальцях, відзначалось редукування частини клітин сперматогенного епітелію. Визначення середнього діаметру звивистих сім'яних канальців показало, що у щурів групи F0-4, які отримували 250 мг/кг/доба ВРА, даний показник статистично значуще зменшився на 10,4 % і склав $212,49 \pm 0,25$ мкм, ($p < 0,05$) порівняно з контролем F0-1; поряд з цим в групі F0-3, за дози 50 мг/кг/доба ВРА, середній показник діаметру звивистих сім'яних канальців сім'яників щурів на 80 добу експерименту продемонстрував лише тенденцію до зменшення. Визначення діаметру просвіту сім'яних канальців показало, що у щурів, які отримували 250 мг/кг/доба ВРА, даний показник статистично значуще збільшився до $102,71 \pm 0,29$ мкм, порівняно з контролем (рис. 3.2; табл. 3.1).

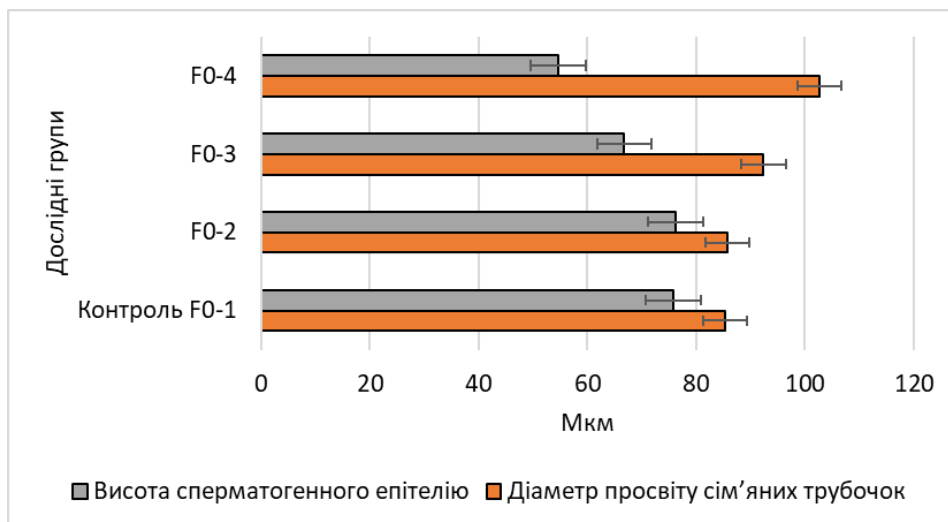


Рис. 3.2 Діаметр просвіту звивистих сім'яних канальців і висота сперматогенного епітелію сім'яників, 80 доба після початку введення ВРА, мкм.

Примітки: вірогідні відмінності між морфометричними показниками звивистих сім'яних каналців експериментальних груп F0-3 і F0-4 і контролем ($p < 0,05$).

Таблиця 3.1

Результати морфометричних досліджень звивистих сім'яних каналців сім'яників

Доба	Група	Діаметр, мкм		Висота сперматогенного епітелію, мкм M±m
		сім'яних каналців, M±m	просвіту сім'яних каналців, M±m	
40	Контроль F0-1	231,14±0,48	82,16±0,16	74,49±0,21
	F0-2	233,25±0,33	83,35±0,30	74,95±0,37
	F0-3	233,06±0,18	84,42±0,29	74,32±0,26
	F0-4	234,01±0,21	88,61±0,25	72,70±0,44
80	Контроль F0-1	237,15±0,30	85,34±0,36	75,91±0,29
	F0-2	238,12±0,27	85,72±0,19	76,20±0,21
	F0-3	226,27±0,44	92,43±0,23	66,92±0,50
	F0-4	212,49±0,25	102,71±0,29	54,89±0,42
120	Контроль F0-1	248,41±0,24	89,43±0,45	79,49±0,38
	F0-2	246,28±0,58	89,65±0,51	78,32±0,25
	F0-3	214,31±0,22	98,80±0,26	57,76±0,24
	F0-4	193,08±0,39	111,79±0,17	40,64±0,31

Примітки: вірогідні відмінності між морфометричними показниками звивистих сім'яних каналців експериментальних груп F0-3 і F0-4 і контролем ($p < 0,05$).

Протягом 100 діб експерименту у щурів групи F0-3, які отримували по 50 мг/кг/доба ВРА і, більшою мірою, у тварин групи F0-4 (250 мг/кг/доба ВРА) поступово наростали некротичні і деструктивні процеси (рис. 3.3), натомість у сім'яниках груп F0-1 і F0-2 патологічних змін не виявлялось.

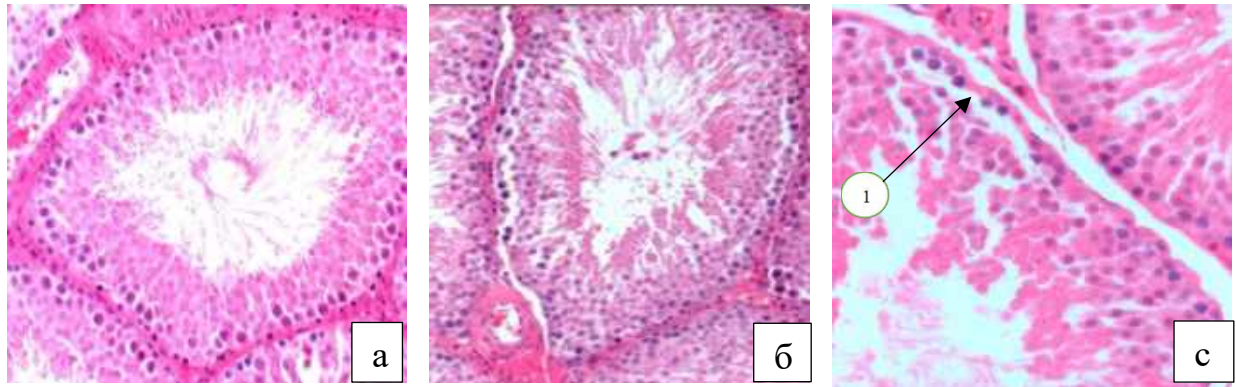


Рис. 3.3 Гістоструктура сім'яників щурів на 100 добу дії ВРА. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Мікрофотографії. Зб.: x100, 200.

Примітки: а) контрольна група, F0-1; б) дослідна група ВРА – 50 мг/кг/доба, F0-3, с) дослідна група ВРА – 250 мг/кг/доба, F0-4,

Позначення: 1– деструкція сперматогенного епітелію.

У тварин експериментальних груп F0-3 і F0-4 відзначалось зменшення діаметру звивистих сім'яних каналців та висоти сперматогенного епітелію, як у порівнянні з контрольною групою F0-1, так і з групою F0-2, які не зазнали впливу ВРА. Разом з цим в сім'яниках щурів груп F0-3 і F0-4 збільшився середній діаметр просвіту звивистих сім'яних каналців, відповідно до $95,10 \pm 0,42$ і $106,9 \pm 0,24$ мкм, порівняно з аналогічними показниками контрольної групи F0-1 – 87,21 мкм, і групи F0-2 – 86,85 мкм ($p < 0,05$) (рис. 3.4).

Слід відзначити, що максимальні прояви деструкції відзначались в сім'яниках тварин групи F0-4, де суттєво зменшилась товщина сперматогенного епітелію, шари епітеліальної тканини відшаровувались один від одного в просвіт сім'яних каналців з утворенням конгломератів статевих клітин. Навіть у звивистих сім'яних каналцях, з легким ступенем пошкоженості, кількість клітин сперматогенного епітелію редукувалася відповідно до $41,23 \pm 2,81$; $60,55 \pm 2,31$ та $171,54 \pm 4,33$. Разом з тим в сім'яниках

контрольних тварин аналогічні показники склали: $74,19 \pm 2,51$; $167,30 \pm 5,12$ і $376,45 \pm 6,54$, ($p < 0,05$).

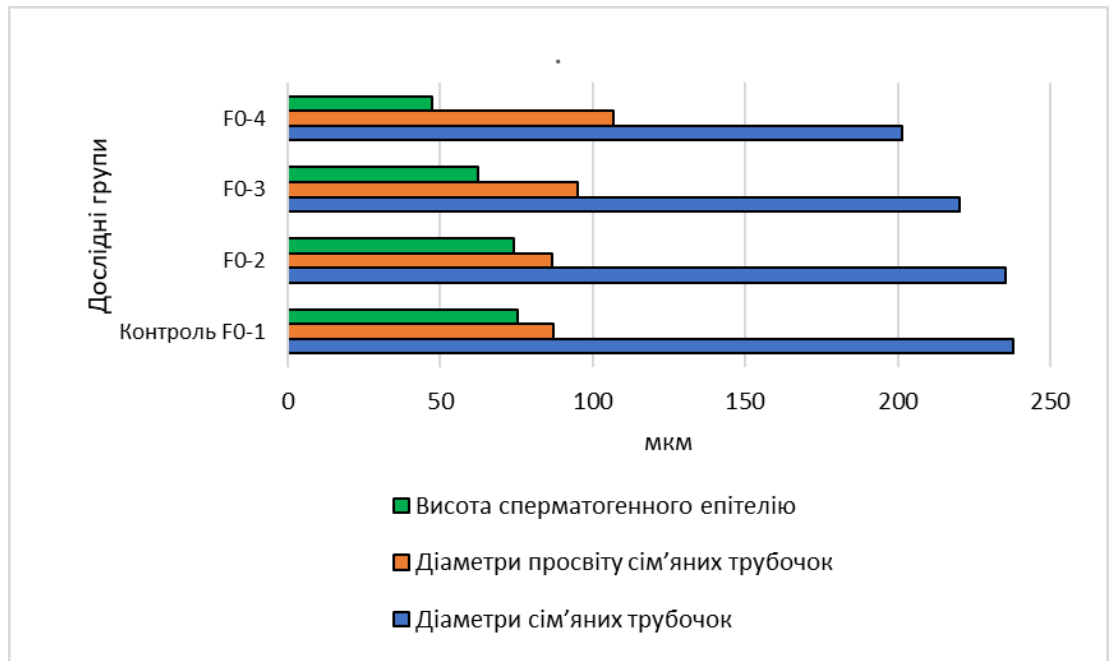


Рис. 3.4 Зміни морфометричних показників звивистих сім'яних каналців щурів за умов тривалого впливу ВРА, 100 доба експерименту.

Примітки: вірогідні відмінності між морфометричними показниками звивистих сім'яних каналців експериментальних груп F0-3 і F0-4 і контролем ($p < 0,05$).

У 27 % звивистих сім'яних каналців, які зазнали важких пошкоджень сперматогенного епітелію, утворювалась порожнина з порушенням процесів сперматогенезу. Показник індексу сперматогенезу на 100 добу експерименту, як і в попередньому визначенні, знизився з $4,00 \pm 0,32$ до $3,18 \pm 0,44$ і $3,01 \pm 0,35$ або на 20,5 і 24,75 %, відповідно в групах F0-3 і F0-4, порівняно з щурами контрольної групи F0-1, ($p > 0,005$), індекс релаксації (напруженості сперматогенезу) також зменшився з $19,19 \pm 1,33$ до $17,32 \pm 1,25$ і $16,31 \pm 1,41$ або на 9,74 і 15,01 %, відповідно в групах F0-3 і F0-4, порівняно з тваринами контрольної групи F0-1 ($p < 0,005$).

В морфометричних дослідженнях по визначенню діаметрів звивистих сім'яних каналців сім'яників щурів на 120 добу експерименту отримано наступні показники: контрольна група F0-1 – $248,41 \pm 0,24$ мкм; група порівняння F0-2 – $246,28 \pm 0,58$ мкм, а також експериментальні групи F0-3 і F0-4, відповідно $214,31 \pm 0,22$ і $193,08 \pm 0,39$ мкм. Середній діаметр просвіту звивистих сім'яних трубочок в сім'яниках щурів груп F0-3, і F0-4, відповідно склав $98,80 \pm 0,26$ і $111,79 \pm 0,17$ мкм, аналогічні показники контрольної і групи порівняння склали – $89,43 \pm 0,45$ мкм, і – $86,9 \pm 0,51$ мкм відповідно ($p < 0,05$) (рис. 3.5).

Крім цього, проведення морфометричного аналізу в кінці експерименту на 120 добу виявило більш пухку організацію колагенових волокон білкової оболонки сім'яників та суттєве збільшення її товщини. Шляхом проліферації зросла кількість сполучнотканинних елементів інтерстиційної тканини (рис. 3.6). Форма більшості звивистих сім'яних каналців округлилась і їх розташування стало не щільним.

Аналіз даних, представлених на рисунку 3.7, демонструє дезорганізацію процесів сперматогенезу після тривалого застосування ВРА. В кінці експерименту у щурів дослідних груп F0-3 і F0-4 спостерігалось збільшення відсотка сім'яних каналців з деформованим епітелієм та зменшення кількості клітин Лейдіга, що синтезують статеві гормони.

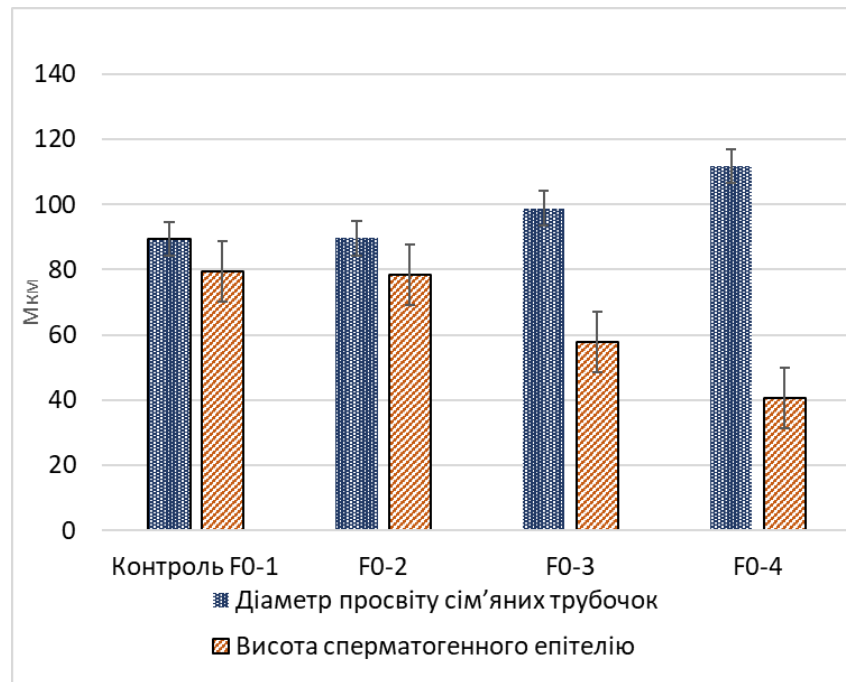


Рис. 3.5 Діаметр просвіту звивистих сім'яних каналців і висота сперматогенного епітелію сім'яників, 120 доба після початку введення ВРА, мкм.

Примітки: вірогідні відмінності між морфометричними показниками звивистих сім'яних каналців експериментальних груп F0-3 і F0-4 і контролем ($p < 0,05$).

Сперматогенез в частині звивистих сім'яних каналців порушувався внаслідок редукції шарів сперматогенного епітелію, що викликало спочатку часткову, а потім і повну втрату здатності окремих звивистих сім'яних каналців до утворення сперматозоїдів. У просвіті таких сім'яних каналців спостерігався клітинний детрит та конгломерати клітин (рис. 3.8). При дослідженні гістологічних препаратів сім'яників щурів, які зазнали тривалого токсичного впливу ВРА відзначалось, що в сім'яних каналцях тварин групи F0-3 середня кількість сперматогоній зменшилась до $39,92 \pm 2,77$; сперматоцитів – до $59,31 \pm 2,23$ і сперматид – до $164,17 \pm 3,52$. Відповідні показники щурів групи F0-4 склали: $37,23 \pm 2,15$; $50,22 \pm 4,01$ і $132,17 \pm 3,12$, натомість в контрольному варіанті досліджувані гістологічні показники склали: $74,12 \pm 2,50$; $166,31 \pm 5,22$ та $374,19 \pm 6,14$ ($p < 0,05$).

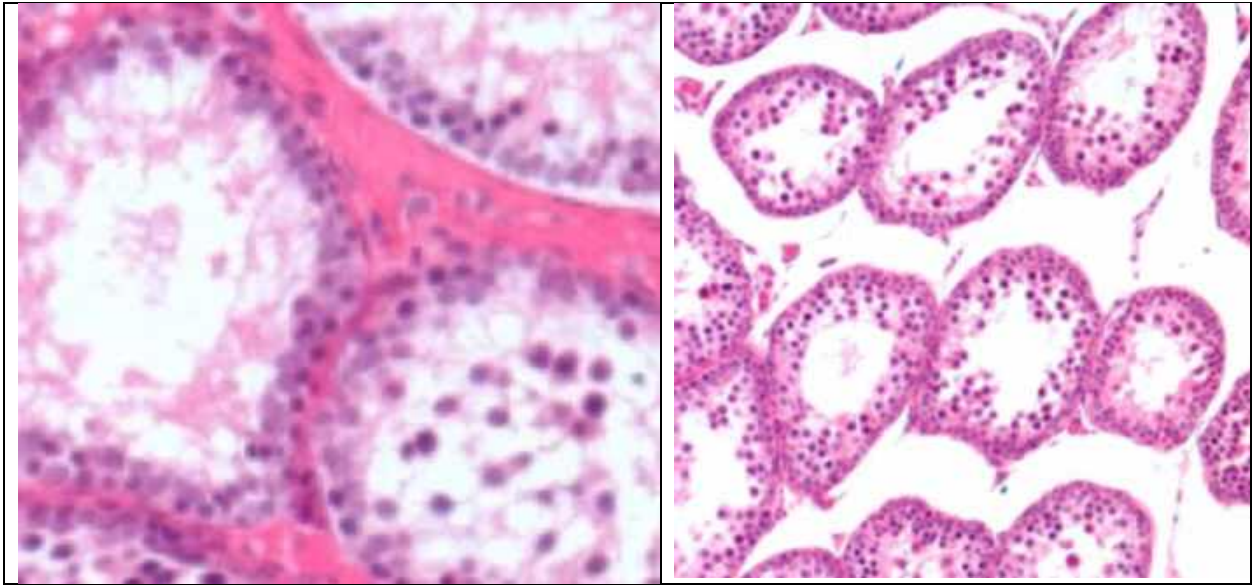


Рис. 3.6 Редукція шарів клітин сперматогенного епітелію, набряк сполучної тканини сім'яника, 120 доба ВРА індукованої інтоксикації щурів (250 мг/кг/доба). Забарвлення зрізу гематоксиліном і еозином. Мікрофотографія. Зб.: x100. 400.

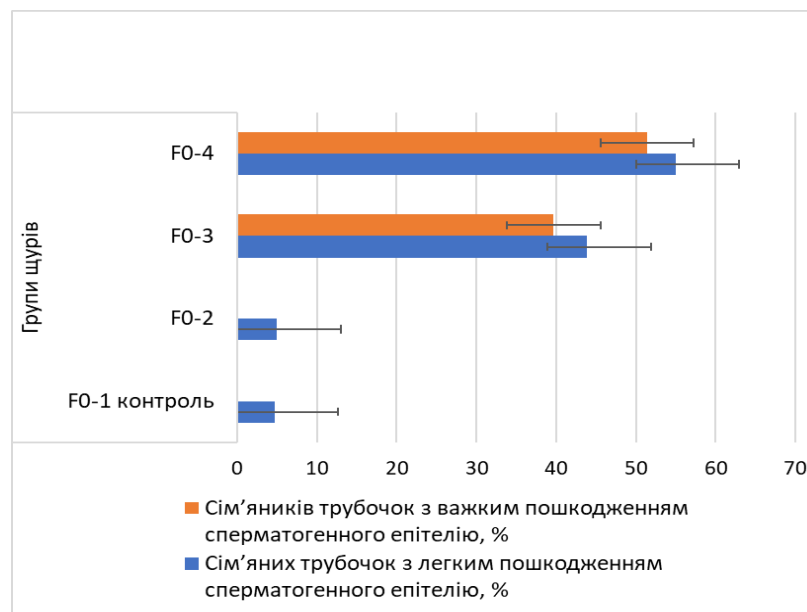


Рис. 3.7 Зміни морфометричних показників звивистих сім'яних каналців щурів за умов тривалого впливу ВРА, 120 доба експерименту.

Примітки: вірогідні відмінності між морфометричними показниками звивистих сім'яних каналців експериментальних груп F0-3 і F0-4 і контролем F0-1 ($p < 0,05$).

При морфометричному аналізі біоптатів сім'яників щурів, які зазнали токсичного впливу ВРА експозицією 120 діб виявлено, що в звивистих сім'яних канальцях відбувалась редукція частини шарів сперматогенного епітелію (рис. 3.9).

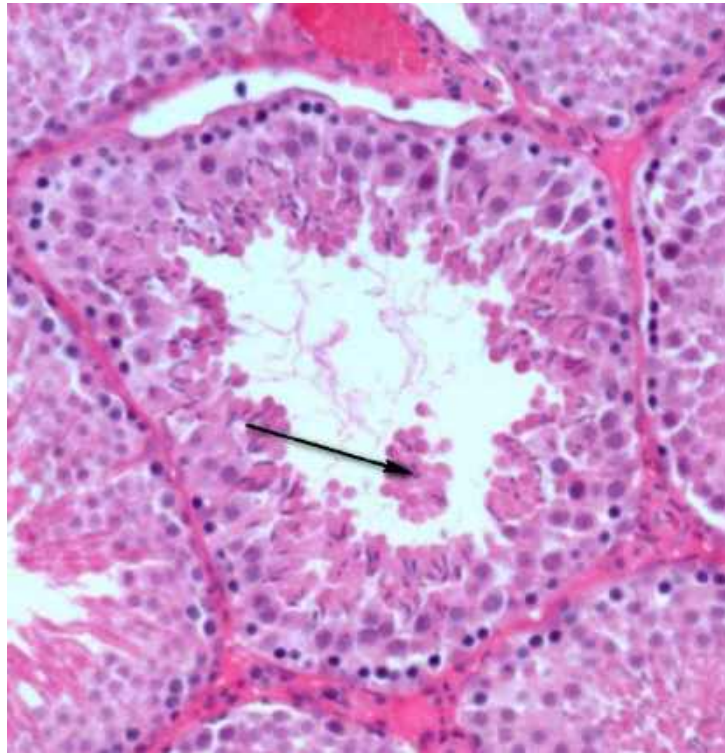


Рис 3.8 Морфологічні зміни сім'яника щура на 120 добу дії ВРА, експериментальна група F0-4 (конгломерат клітин). Забарвлення: гематоксилін-еозин. Мікрофотографії. Зб.: x400.

При високій варіабельності досліджуваних показників, під впливом високої дози ВРА, в кінці експерименту кількість сім'яних канальців з важкими патологічними змінами сперматогенного епітелію зросла до 43,9 % і 55,0 %, в групах щурів F0-3 і F0-4, відповідно. Досліджуваний дизраптор – ВРА в дозах 50 і 250 мг/кг/доба і експозиції 120 діб спричиняв патологічний вплив на процеси сперматогенезу щурів та фізіологічну систему організму.

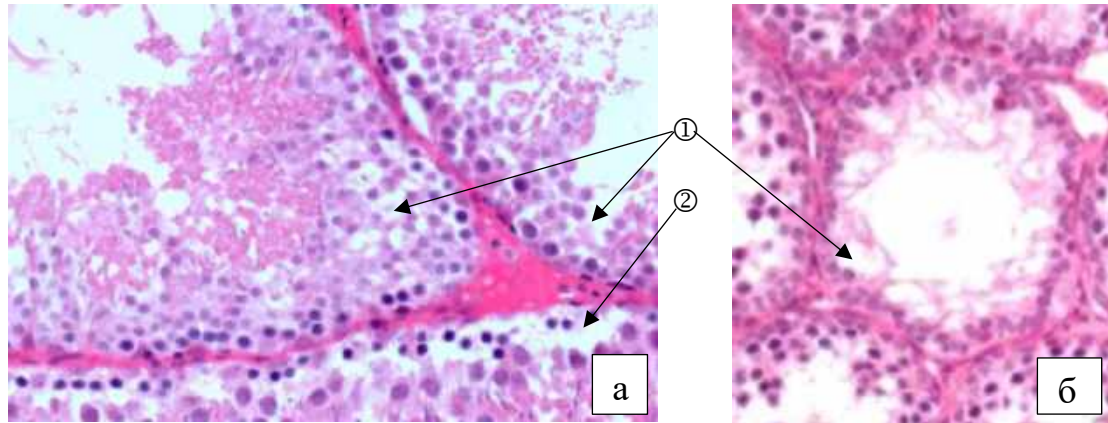


Рис. 3.9 Морфологічні зміни сім'яників щурів на 120 добу дії ВРА, а) група F0-3; б) група F0-4. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Мікрофотографії. Зб.: x100.

Позначення: 1 – атрофія сперматогенного епітелію, 2 – відшарування сперматогенного епітелію від базальної мембрани.

Натомість, у щурів груп F0-1 і F0-2, які не отримували ВРА протягом експерименту, відзначалась нормальна гістоархітектоніка сім'яників. Отже, за умов тривалої дії ВРА у сім'яниках щурів відбувалось прогресування деструктивних змін сперматогенезу.

В безпосередній близькості до кровоносних судин, що проходять у інтерстиціальній тканині сім'яників, розташовані поодинокі або групами по 3–6 клітин Лейдіга (рис. 3.10). За період дослідження токсичного впливу ВРА у сім'яниках щурів груп F0-3 і F0-4 зменшилась на 15 % кількість ендокриноцитів та змінилась їх форма, порівняно з контрольним варіантом F0-1.

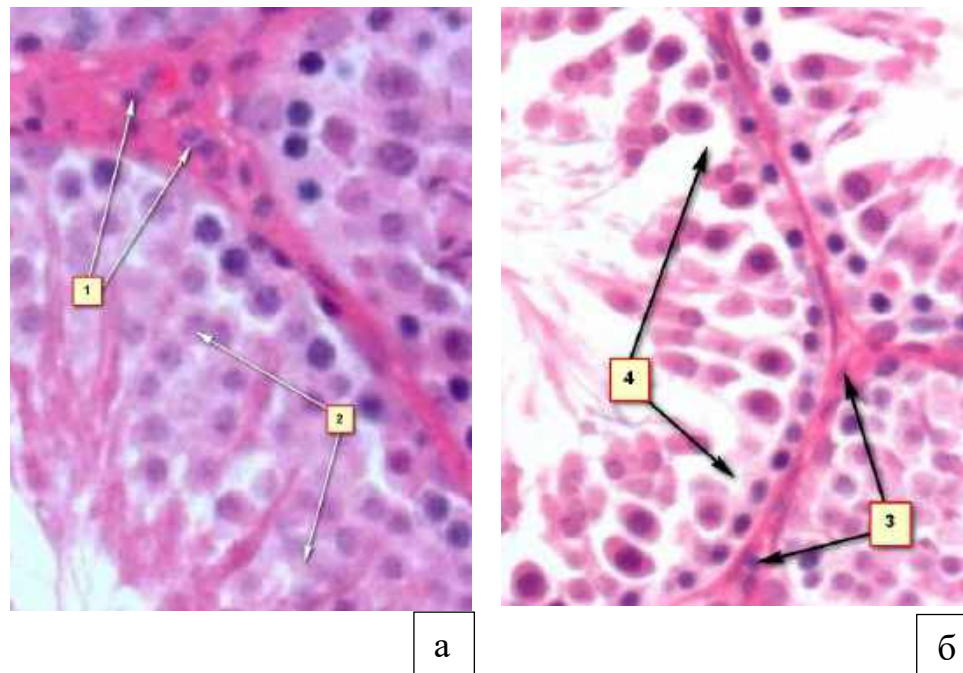


Рис. 3.10 Сім'яник щура контрольної групи F0-1 (а) та експериментальної групи F0-4 (б), на 120 добу. Забарвлення гематоксилін-еозин. Зб.: x400.

Позначення: 1 – ендокриноцити, 2 – сперматогенний епітелій; 3 – ендокриноцити, 4 – редуковані шари сперматогенного епітелію.

Результати досліджень показали, що тривале застосування ВРА дозами 50 і 250 мг/кг/доба діяв, як тестикулярний дозозалежний токсикант і викликав порушення сперматогенезу. Визначення індексу сперматогенезу в кінці експерименту на 120 добу продемонструвало зниження показника з $4,02 \pm 0,25$ до $2,89 \pm 0,31$ і $2,36 \pm 0,28$ або на 28,11 і 41,29 %, відповідно в групах F0-3 і F0-4, порівняно з щурами контрольної групи F0-1, ($p > 0,005$).

Порушення сперматогенезу проявлялися також зменшенням частки статевих клітин відносно стабільної і, значною мірою, резистентної до впливів токсикантів популяції клітин Сертолі, так індекс релаксації (напруженості сперматогенезу) зменшився з $19,20 \pm 1,54$ до $17,07 \pm ,39$ і $16,07 \pm 1,83$ або на 11,19 і 16,30 %, відповідно в групах F0-3 і F0-4, порівняно з тваринами

контрольної групи F0-1 ($p < 0,005$), що вказує на зниження функціональної здатності сім'яників щурів, що зазнали патологічного впливу ВРА.

3.2 Зміна ваги щурів під впливом ВРА індукованої токсичності репродуктивної системи

Однією з основних ознак рівня токсичного ураження організму є суттєва зміна маси тіла. Протягом 120 діб експерименту у щурів всіх експериментальних груп відбувалось поступове зростання маси тіла, однак приріст маси тіла по групах тварин суттєво відрізнявся. Так, у тварин контрольної групи F0-1 і інтактної F0-2 спостерігалось збільшення маси на 116,3 і 115,5 %, ($p < 0,005$). Разом з тим, у групах F0-3 і F0-4 – моделювання ВРА індукованої токсичності репродуктивної системи, показник маси тіла збільшився на 139,9 і 145,2 % ($p < 0,005$), порівняно з вагою на початок експерименту (рис. 3.11).

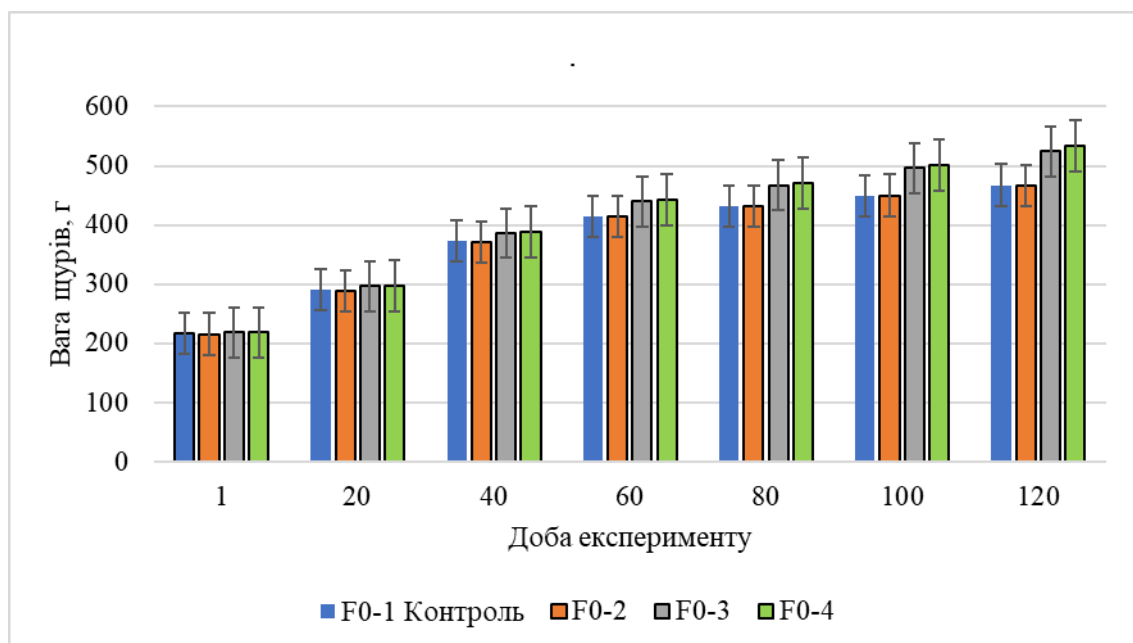


Рис. 3.11 Динаміка зміни маси тіла щурів протягом експерименту в середньому, г.

Примітки: вірогідна різниця між експериментальними групами і контролем ($p < 0,005$).

Отже, контроль маси тіла експериментальних щурів, протягом дослідження, продемонстрував позитивну динаміку змін в залежності від рівня токсичного впливу ВРА. Статистично значущих відмінностей маси тіла щурів у групах F0-1 і F0-2 не відзначалось. Однак, слід звернути увагу на те, що тварини груп F0-3 і F0-4, протягом 120 діб експерименту, набирали масу на 23,6 і 28,9 % більшу, порівняно з щурами контрольної групи F0-1 і інтактної групи F0-2.

3.3 Зміна маси сім'яників щурів за умов тривалої дії ВРА

Експериментальним шляхом виявлено рівень токсичного впливу ВРА на морфометричні показники сім'яників щурів та динаміку змін маси органу. Протягом експерименту не відзначалось статистично значущої різниці між масовими коефіцієнтами сім'яників у групах F0-1 F0-2. У щурів груп F0-3 і F0-4 відзначалось дозозалежне зменшення маси сім'яників, їх об'єму та зменшення гонадо-соматичного індексу, порівняно з тваринами контрольної групи. Разом з тим істотних змін питомої ваги сім'яників у щурів групи F0-3, які зазнали тривалого впливу ВРА дозою 50 мг/кг/доба, не спостерігалось, натомість застосування ВРА дозою 250 мг/кг/доба викликало суттєві патологічні зміни біометричних параметрів сім'яників (рис. 3.12). Спостерігалось сповільнення приросту маси і об'єму сім'яників щурів та зниження гонадо-соматичного індексу, порівняно з сім'яниками щурів контрольної і інтактної груп F0-1 і F0-2, відповідно (рис 3.13).



а



с



б



д

Рис. 3.12 Сім'яники щурів, 120 доба експерименту;

а, б) – сім'яники щурів групи F0-1; с, д) сім'яники щурів групи F0-4.

В цілому дані фізичного розвитку дослідних тварин демонстрували зміни функціонального стану організму і були вагомим маркером оцінки стану здоров'я. Можна припустити, що зменшення маси і розміру сім'яників щурів груп F0-3 F0-4, порівняно з аналогічними показниками щурів групи F0-1, було пов'язане з деструкцією клітин сім'яників щурів після тривалого токсичного впливу ВРА, що викликало редуціювання шарів клітин епітеліальної тканини та зменшення гонадо-соматичного індексу.

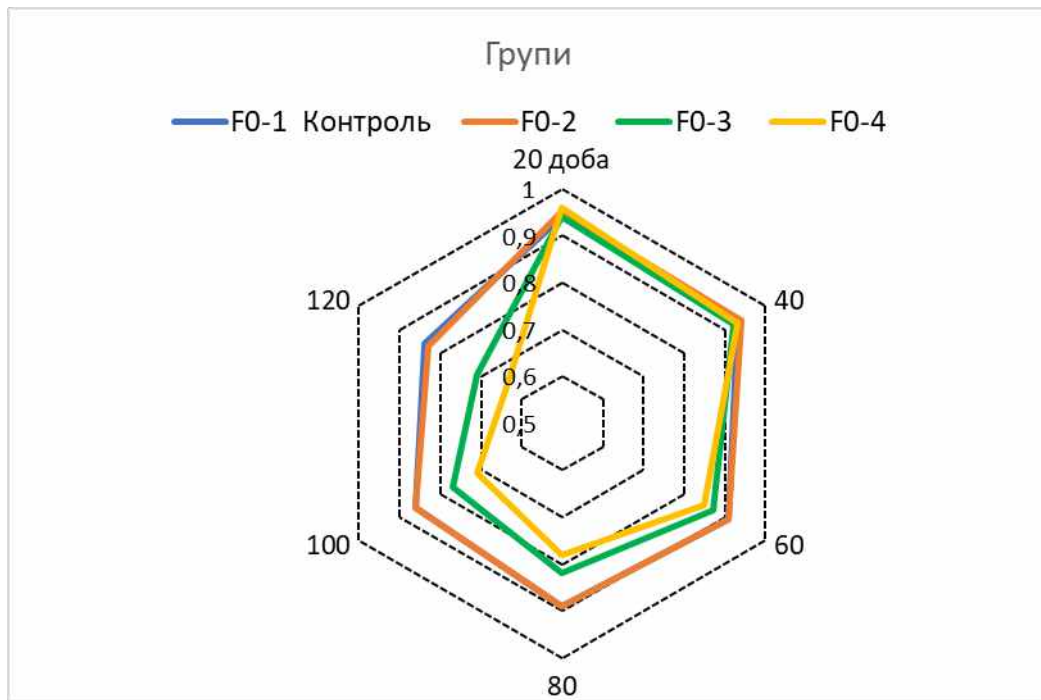


Рис. 3.13 Зміна гонадо-соматичного індексу сім'яників щурів в умовах тривалого впливу ВРА впродовж 120 діб експерименту.

Примітки: вірогідна різниця між експериментальними групами і контролем ($p < 0,005$).

Висновки до розділу 3

Отримані дані вказують на те, що репродуктивна система є однією з основних мішеней токсичного впливу бісфенолу А. Патологічні поліморфні зміни гістологічної архітекτονіки сім'яників експериментальних груп F0-3 і F0-4 демонструють прогресування дистрофічно-деструктивних змін сперматогенного епітелію.

В ході експерименту встановлено, що при введенні щурам 50 мг/кг/доба і 250 мг/кг/доба ВРА, протягом 120 діб, в гістологічній архітектоніці сім'яників відбуваються патологічні зміни. Отримані дані демонструють несприятливий вплив бісфенолу А на розвиток репродуктивної системи дослідних тварин.

Отже, патологічний вплив ВРА був спрямований на порушення процесів сперматогенезу та призводив до зміни структурних елементів сім'яників, викликав редукцію сперматогенного епітелію, деформацію сім'яних каналців та деструкцію інтерстиціальних ендокриноцитів та суспендоцитів. Патологічний процес мав тривалий, дозозалежний характер, в звивистих сім'яних каналцях експериментальних груп F0-3 і, більшою мірою, в групі F0-4 в наслідок некротичних і деструктивних процесів на 120 добу експерименту спостерігалось злушення епітеліальної тканини, всередині епітеліальної тканини утворювалась порожнина, частина звивистих сім'яних каналців не формувала сперматозоїдів.

Здобуті в ході експерименту дані показали етіологічне значення тривалого впливу ВРА на щурів самців у формуванні десквамації сперматогенного епітелію та інших патогістологічних змін в сім'яниках, які можуть призвести до зменшення рівня фертильності. ВРА індуковане ураження чоловічої репродуктивної системи викликало зменшення показників середнього діаметру звивистих сім'яних каналців, атрофію та десквамацію сперматогенного епітелію, що демонструється отриманими даними.

Основні положення розділу 3 викладені в наступних наукових працях:

1. Ярошенко С. Д. Аналіз морфологічних змін в сім'яниках за умов тривалого впливу бісфенолу А. Перспективи та інновації науки. 2024 № 2(36). Р. 1319–1327. doi: 10.52058/2786-4952-2024-2(36)-1319-1327 [144].
2. Ярошенко С. Д. Зміна маси тіла та фізіологічного стану сім'яників під впливом бісфенолу А. Перспективи та інновації науки. 2024 № 3(37) [145].
3. Ярошенко Д. С., Бондаренко О. О. Морфологічні особливості змін у сім'яниках під дією бісфенолу А. Новини і перспективи медичної

науки: зб. мат. XXIII конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І.В., Бондаренко Н.С.]. Дніпро. 2023. С. 109 [146].

РОЗДІЛ 4.

ЗМІНИ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОКАЗНИКІВ РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМИ ТА ГОРМОНАЛЬНИЙ СТАТУС ЗА УМОВИ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ БІСФЕНОЛУ А

4.1 Особливості змін гормонального статусу

Однією з умов стабільної роботи репродуктивної системи є підтримання необхідного рівня гормонального фону. В перші 60 діб дослідження амплітуда коливання показників гормонального фону в сироватці крові щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4 практично не відрізнявся від досліджуваних показників контрольної групи і групи порівняння. Однак, після 80 доби у тварин групи F0-4, що отримували ВРА дозою 250 мг/кг/доба, рівень тестостерону в сироватці крові знизився до 194 ± 23 нг/л ($p < 0,05$), при аналогічній експозиції ВРА, але меншій дозі – 50 мг/кг/доба середній рівень тестостерону склав 200 ± 27 нг/л. У щурів-самців контрольної групи F0-1 і групи порівняння F0-2 середні показники тестостерону, відповідно, склали 277 ± 19 і 279 ± 22 нг/л. Отже, на 80 добу експерименту концентрація тестостерону в сироватці крові щурів групи F0-3 знизилась на 28 %, а у групи F0-4 на 30 % (рис. 4.1).

Разом з цим відзначалась аналогічна тенденція динаміки змін рівня 17β -естрадіолу в крові дослідних тварин. Так, середня концентрація гормону у щурів групи F0-3, з початку експерименту і до 60 доби, коливалась в межах статистичної похибки, натомість у щурів групи F0-4 рівень 17β -естрадіолу знизився до статистично значущих показників 29 ± 4 нг/л ($p < 0,05$). Після 80 доби від початку експерименту концентрація гормону в крові щурів дослідних груп F0-3 і F0-4 статистично значуще знизилась до рівня 27 ± 3 і 24 ± 2 нг/л ($p < 0,05$), показник контрольної групи склав – 36 ± 3 нг/л. Таким чином, показники концентрації 17β -естрадіолу в сироватці крові щурів груп F0-3 і F0-

4 знизились, відповідно, на 25 % та 33 %. У щурів контрольної групи концентрація гормонів не зазнала статистично значущих змін (рис. 4.2).

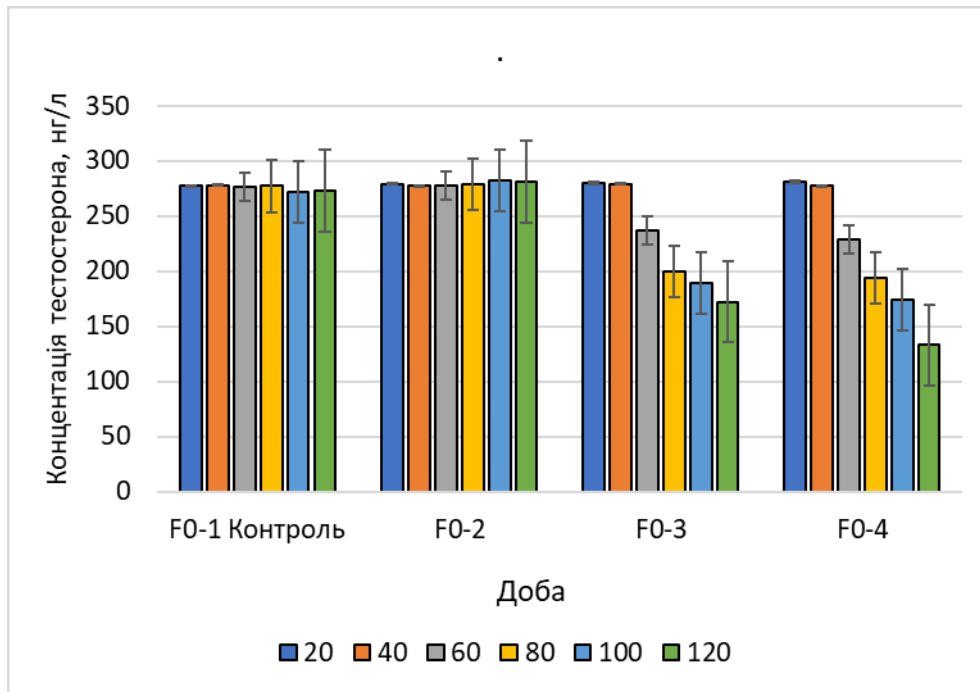


Рис. 4.1 Вплив ВРА на рівень тестостерону в сироватці крові протягом експерименту, нг/л.

Примітки: відмінності були статистично значущими, порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$.

Рівень тестостерону та 17β -естрадіолу в плазмі крові після 100 доби експерименту у всіх групах, які отримували ВРА, статистично значуще знизився, у порівнянні з контролем (див. рис 4.1 і 4.2). У групі F0-4, якій вводили 250 мг/кг/доба ВРА, мала найнижчі показники досліджуваного гормонального фону із середньою концентрацією 174 ± 11 нг/мл і 18 ± 2 нг/мл, відповідно тестостерону і 17β -естрадіолу ($p < 0,05$); досліджувані показники контрольної групи склали 272 ± 20 нг/л і 34 ± 3 , ($p < 0,05$). У щурів групи F0-3, рівень тестостерону та 17β -естрадіолу в плазмі крові після 100 доби експерименту також знизився і склав 189 ± 17 і 23 ± 2 нг/л ($p < 0,05$).

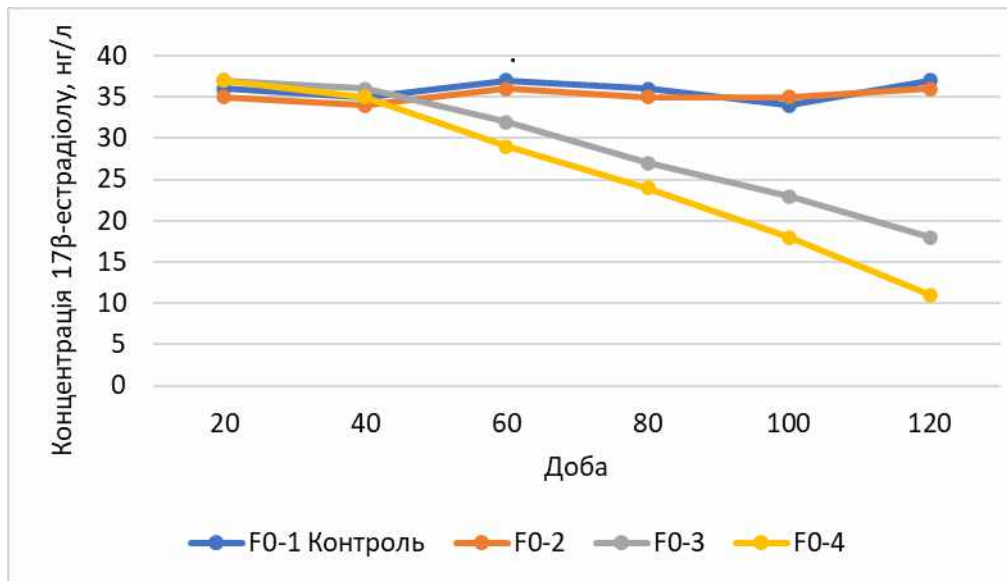


Рис. 4.2 Вплив ВРА на рівень 17β-естрадіолу в сироватці крові протягом експерименту, нг/л.

Примітки: відмінності були статистично значущими, порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$.

ВРА сприяв статистично значущому зниженню концентрації досліджуваних гормонів у сироватці крові щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, які зазнали тривалого впливу ВРА, порівняно з контрольною групою і групою порівняння ($p < 0,05$). Так, дослідні тварини групи F0-4, що отримували ВРА протягом 120 діб дозою 250 мг/кг/доба, мали найнижчий рівень тестостерону в сироватці крові із середньою концентрацією 133 ± 21 нг/л ($p < 0,05$), за аналогічних умов, але меншій дозі ВРА в групі F0-3 середній рівень тестостерону склав 172 ± 17 нг/л. У щурів-самців контрольної групи F0-1 і групи порівняння F0-2 середні показники тестостерону, відповідно, склали 273 ± 16 і 281 ± 21 нг/л. Отже, концентрація тестостерону в сироватці крові щурів групи F0-3, на 120 добу експерименту, знизилась на 49 %, а у групи F0-4 на 63 % (рис. 4.3).

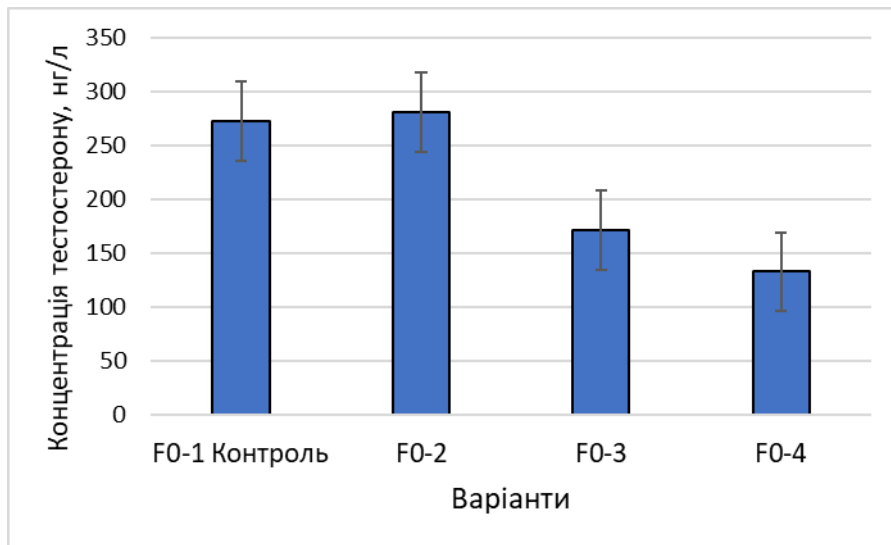


Рис. 4.3 Вплив ВРА на рівень тестостерону в сироватці крові, 120 доба експерименту, нг/л.

Примітки: відмінності були статистично значущими, порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$.

До того ж, ВРА помітно пригнічував і рівень 17β -естрадіолу, так середня концентрація 17β -естрадіолу в сироватці крові щурів груп F0-3 і F0-4 склала 18 ± 3 і 11 ± 2 нг/л ($p < 0,05$), а у контрольній групі – 37 ± 4 нг/л. Таким чином, показники концентрації 17β -естрадіолу в сироватці крові щурів груп F0-3 і F0-4 знизились, відповідно, на 51 % та 70 %. У тварин контрольної групи F0-1 і групи порівняння F0-2, які не отримували ВРА, концентрація гормонів відповідала фізіологічній нормі і не зазнала статистично значущих змін (рис. 4.4).

Найбільш імовірно, що зниження рівня тестостерону в сироватці крові щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4 обумовлено негативним впливом ВРА на проліферативну активність ендокриноцивів, а низький рівень 17β -естрадіолу може бути відповідальним за дегенерацію статевих клітин і сприяти зменшенню кількості шарів сперматогенного епітелію та дисквамацію фрагментів статевих клітин в просвіті звивистих сім'яних

каналців сім'яників щурів груп F0-3 F0-4, які отримували ВРА протягом 120 днів.

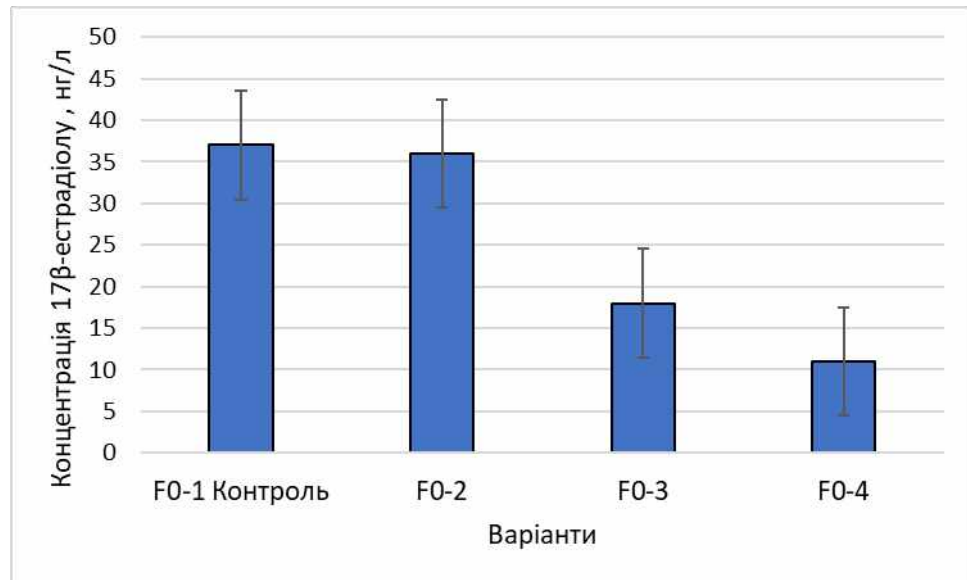


Рис. 4.4 Вплив ВРА на рівень 17β-естрадіолу в сироватці крові, 120 доба, нг/л.

Примітки: відмінності були статистично значущими, порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$.

4.2 Зміни показників фертильності самців щурів за умов токсичної дії ВРА

В ході нашого експерименту спостерігалось поступове зменшення фертильності самців, які зазнали тривалого впливу ВРА. Перші результати тенденції негативного впливу ксеноестрогену відзначались вже після двох місяців експерименту. Однак, статистично значущі зміни показників фертильності відзначались в кінці експерименту ($p \leq 0,05$). Так, період від 110 до 120 доби дослідження характеризувався зниженням фертильності тварин в групі F0-3 на 30 %, $p \leq 0,05$ і в групі F0-4 на 40 %, $p \leq 0,05$. Натомість в групах F0-1 (контроль) і F0-2 показники фертильності, протягом експерименту, не мали статистично значущих змін (рис. 4.5).

Отже, наслідком впливу досліджуваної речовини стало суттєве зменшення фертильних щурів самців експериментальних груп, що отримували ВРА дозою 50 і 250 мг/кг/доба, порівняно з інтактними тваринами контрольної групи на 120 добу експерименту (рис. 4.6). Рівень запліднюючої здатності сперми корелював з рівнем тестостерону ($r_s=0,844$; $p<0,05$).

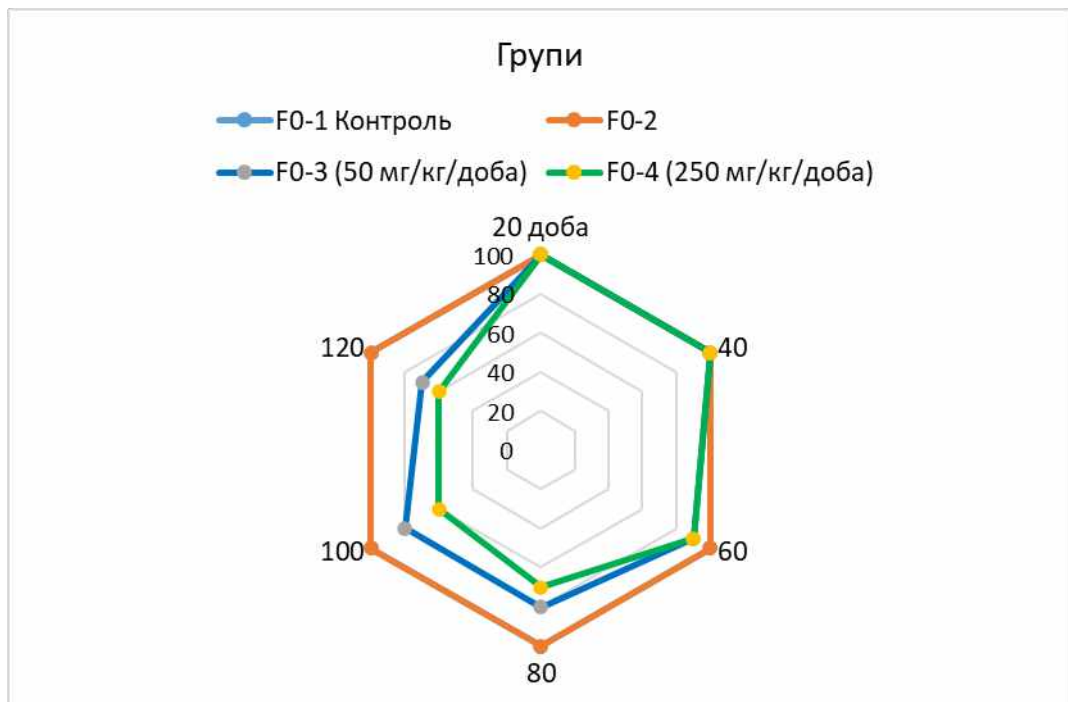


Рис. 4.5 Зміни запліднюючої здатності сперми щурів під впливом ВРА, протягом експерименту, %.

Примітки: відмінності були статистично значущими, порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$.

Таким чином, експериментальні дані виявили комплекс пролонгованих негативних змін токсичної дії ВРА, які, практично, не проявлялись за експозиції препарату менше 60 діб. Руйнівна дія ВРА при короткотривалому впливі, імовірно, компенсувалася антистресовими механізмами ендокринної та репродуктивної систем. Комплексний аналіз дисфункціональних змін і можливість реалізації репродуктивної функцій в довгостроковій перспективі

показали, що ВРА є тестикулярним токсикантом, який викликає гормональний дисбаланс та негативно впливає на процеси фертильності.

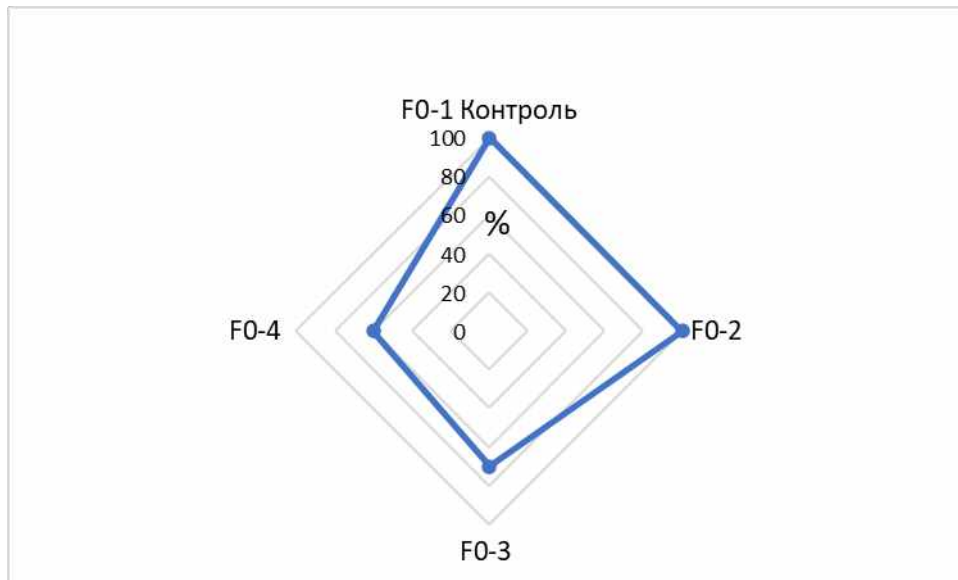


Рис. 4.6 Зміни фертильності щурів під впливом ВРА, 120 доба експерименту, %.

Примітки: відмінності були статистично значущими, порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$.

Висновки: до розділу 4

Оцінюючи отримані результати експериментальних досліджень можна зробити наступні підсумки:

Деструктивна дія ксеноестрогену ВРА спрямована на складні гормонозалежні процеси сперматогенезу. Під впливом ВРА поступово сформувалися комплекси порушень, які змінювали гормональний статус дослідних тварин: суттєве зниження концентрації тестостерону і 17β -естрадіолу в сироватці крові щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, порівняно з контрольною групою, де концентрація гормонів відповідала фізіологічній нормі і не зазнала статистично значущих змін.

Отже, аналіз впливу ВРА на сім'яники щурів вказує на тестикулярну токсичність препарату, а виявлений дисбаланс гормонів та зниження якості сперми демонструють серйозні проблеми з репродуктивною функцією.

Основні положення розділу опубліковані в таких наукових працях:

1. Ярошенко Д. С. Оцінка тривалого впливу бісфенолу А на гормональний статус та фертильність. Перспективи та інновації науки № 1(35) 202. С. 1067–1077. Doi: 10.52058/2786-4952-2024-1(35)-1067-1077_ [147].
2. Ярошенко Д. С. Вплив бісфенолу А на чоловічу фертильність. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2023. № 4(56). С. 177–181. DOI: 10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14314 [117].
3. Бондаренко О. О., Ярошенко Д. С. Морфологічні особливості змін у сім'яниках під дією бісфенолу А. Новини і перспективи медичної науки : зб. мат. XXIII конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І. В., Бондаренко Н.С.]. Дніпро. 2023. С. 109. (Особистий внесок - забір матеріалу, опис, аналіз та узагальнення результатів дослідження) [118].

РОЗДІЛ 5.

ЗМІНИ ЯКІСНИХ І КІЛЬКІСНИХ ПОКАЗНИКІВ ЕЯКУЛЯТУ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ВПЛИВУ БІСФЕНОЛУ А

5.1 Особливості змін якості еякуляту під впливом ВРА

У ході експерименту визначено, що тривале застосування ВРА погіршувало якість еякуляту щурів-самців груп F0-3 та F0-4. Негативні зміни досліджуваних параметрів еякуляту виявлено в кількості сперматозоїдів, їх рухливості та в морфологічних характеристиках сперматозоїдів.

На початку експерименту не спостерігалось статистично значущого зниження кількості сперматозоїдів в еякуляті щурів ($p < 0,05$), які зазнали впливу ВРА, порівняно з контрольною групою (рис. 5.1).

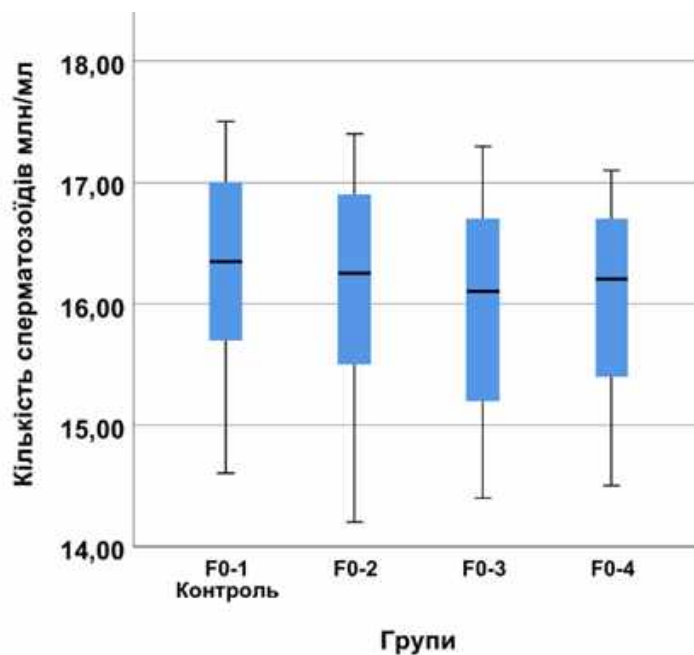


Рис. 5.1 Кількість сперматозоїдів в еякуляті на 20 добу після початку експерименту, млн/мл (статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$).

Однак, після 60 діб експерименту у щурів-самців груп F0-3 та F0-4 спостерігалось статистично значуще зниження кількості сперматозоїдів в аліквоті еякуляту, відповідно, на 7,4 % та 15,0 %, $p < 0,05$ (рис. 5.2).

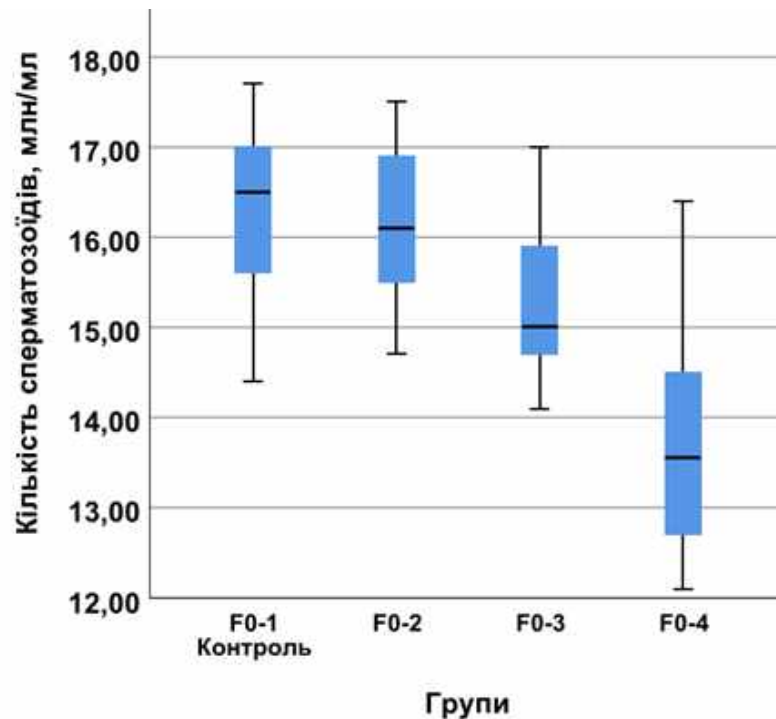


Рис. 5.2 Кількість сперматозоїдів в еякуляті на 60 добу після початку експерименту, млн/мл (статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$).

До кінця експерименту відзначалось прогресуюче зниження даного параметру, який на 120 добу знизився на 21,8 % у групі F0-3 та 32,4 % у групі F0-4, порівняно з контрольним варіантом $p < 0,05$. Слід зазначити, що при отриманих, статистично значущих, показниках зниженої кількості сперматозоїдів в еякуляті щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, тварини все ще зберігали здатність до запліднення. Разом з тим параметр кількості сперматозоїдів в контрольній групі не демонстрував статистично значущого відхилення від аналогічного показника у групі інтактних щурів $p < 0,05$ (рис. 5.3).

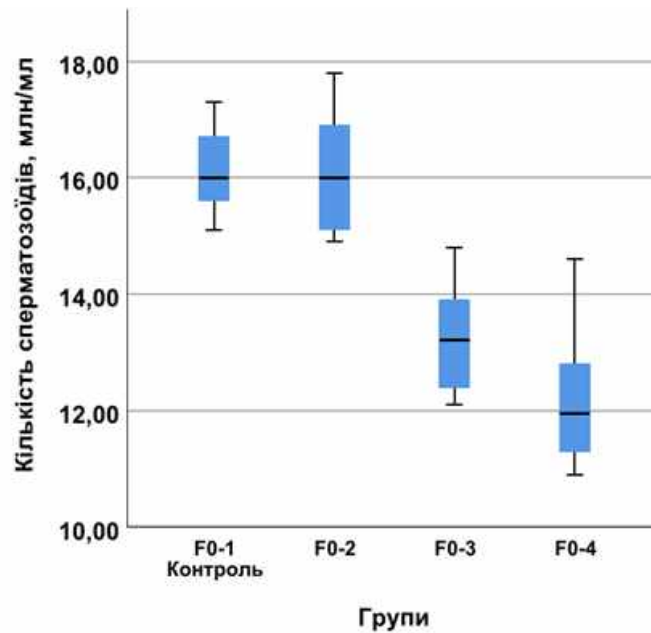


Рис. 5.3 Кількість сперматозоїдів в еякуляті на 120 добу після початку експерименту, млн/мл (статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$).

На початку експерименту не спостерігалось статистично значущих змін кількості нормальних та аномальних форм сперматозоїдів в еякуляті щурів ($p < 0,05$), які зазнали впливу ВРА порівняно з контрольною групою (рис. 5.4).

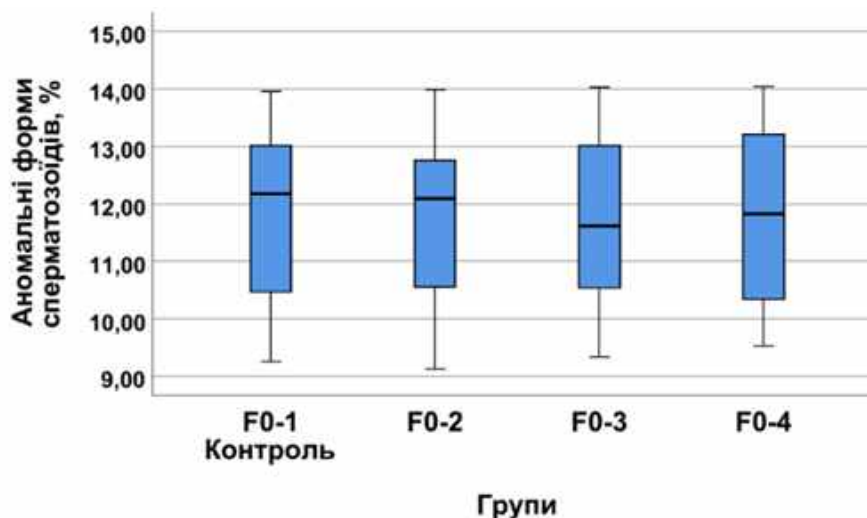


Рис. 5.4 Зміни кількості морфологічно аномальних форм сперматозоїдів щурів на 20 добу експерименту, % (статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$).

В експериментальних групах щурів, які зазнали тривалого впливу ВРА, спостерігалось зменшення частки нормальних та збільшення частки аномальних форм сперматозоїдів, порівняно з контрольною групою та групою порівняння. Так, в ході експерименту, починаючи з 59–61 доби виявлено збільшення кількості аномальних форм сперматозоїдів в групах щурів, F0-3 і F0-4, порівняно з контрольним варіантом, відповідно на 2,8 і 7,0 % (рис. 5.5), причому їх кількість постійно зростала і на 120 добу дослідження становила 18,01 % і 23,73 % (рис. 5,6).

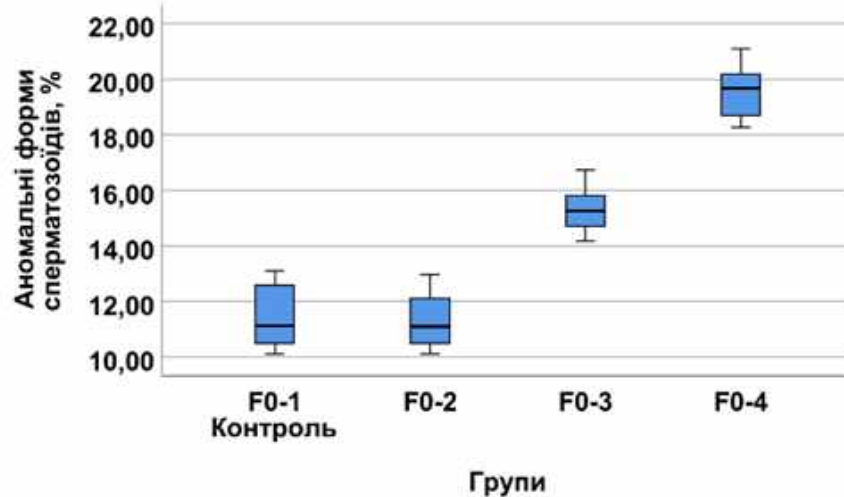


Рис. 5.5 Зміна кількості морфологічно аномальних форм сперматозоїдів щурів на 60 добу експерименту, % (статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$).

Перевірка значущості відмінностей частки аномальних форм сперматозоїдів по групах за критерієм Краскела-Уолліса показала, що починаючи від 60 доби і до кінця експерименту зміна досліджуваних параметрів якості еякуляту у щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, досягла статистично значущого рівня відхилення від контрольного варіанту F0-1. Разом з цим, при порівнянні контрольного варіанту F0-1 з варіантом F0-

2, значущої відмінності між кількістю анормальних форм сперматозоїдів, протягом всього експерименту, не спостерігалось.

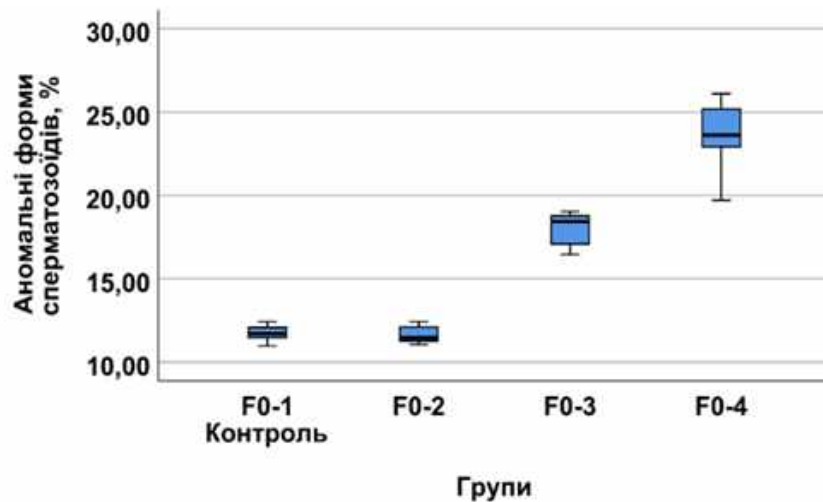


Рис. 5.6 Зміна кількості морфологічно анормальних форм сперматозоїдів щурів на 120 добу експерименту, % (статистично значущі відмінності порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$).

Після 120 діб дослідження у щурів груп F0-3 і F0-4, які отримували ВРА, виявлено деформацію головок сперматозоїдів, патології шийки, вкорочені хвости, тоді як у контрольній групі F0-1 спостерігалась нормальна морфологія статевих клітин. Відзначені морфологічні зміни сперматозоїдів свідчать про негативний вплив ВРА на їх структуру. Сперматозоїди з анормальними змінами морфологічної будови характеризувались гіршими показниками рухливості та життєздатності, що негативно впливало на запліднюючу здатність тварин (рис 5.7)

При аналізі рухової активності сперматозоїдів з'ясовано, що з 60 доби відзначалась тенденція до зниження частки прогресивно рухливих сперматозоїдів в групах щурів F0-3 і F0-4 на 13,9 % та 17,0 %, $p < 0,05$, порівняно з контрольною групою F0-1. На кінець експерименту (120 доба)

зниження цього показника склало 22,7 % та 37,4 %, $p < 0,05$, порівняно з контрольною групою.

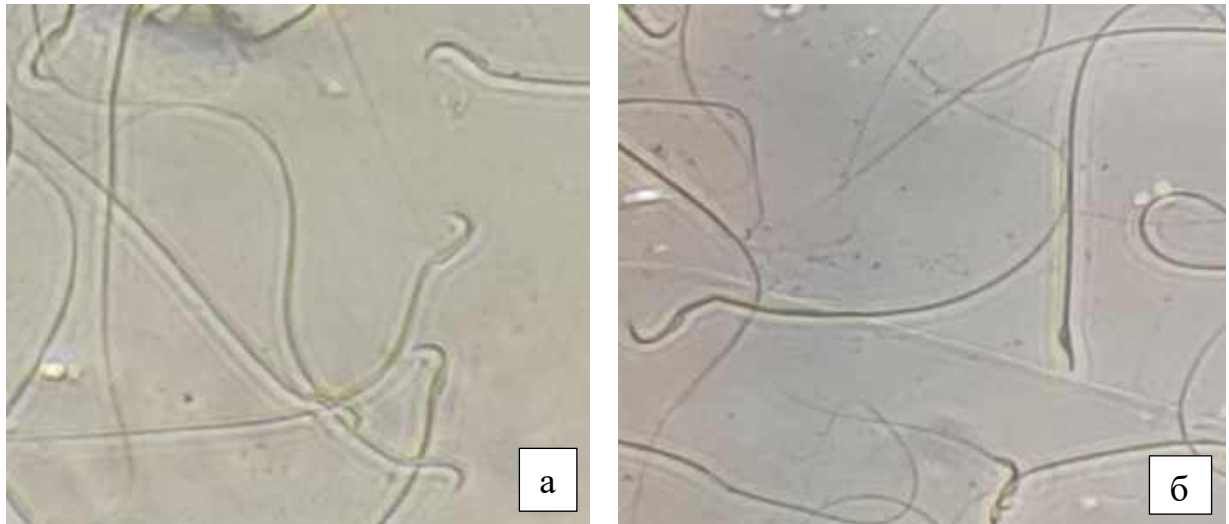


Рис. 5.7 Морфологія сперматозоїдів щурів груп F0-1 і F0-4 на 120 добу експерименту Зб.: $\times 400$.

Примітки: а) морфологічно нормальні сперматозоїди контрольної групи F0-1, б) сперматозоїди щура групи F0-4, що отримував ВРА 250 мг/кг/доба з аномальними головками та укороченими хвостами.

Слід відзначити, що при зменшенні частки прогресивно рухливих сперматозоїдів спостерігалось зростання показників обох фракцій сперматозоїдів: як непрогресивно рухливих так і нерухливих сперматозоїдів.

На 60 добу в групах F0-2 та F0-3 відзначено збільшення частки непрогресивно-рухливих сперматозоїдів на 8,0 % та 10,1 %, $p < 0,05$, порівняно з контрольною групою, причому в групах, які зазнали впливу ВРА, міжгрупова різниця була мінімальна. Найбільше зростання кількості нерухомих сперматозоїдів відзначено наприкінці експерименту. Так, в експериментальних групах F0-3 та F0-4 цей показник зріс, відповідно на 16,1 % та 43,6 %, $p < 0,05$, порівняно з контрольною групою. Зауважимо, що тривалий вплив ВРА призвів до статистично значущого зростання, більше ніж

у 2,7 рази ($p < 0,05$), нерухливих сперматозоїдів у тварин груп F0-3 та більше ніж у 5,7 рази, ($p < 0,05$), у групі F0-4, порівняно з групою контролю (рис.5.8).

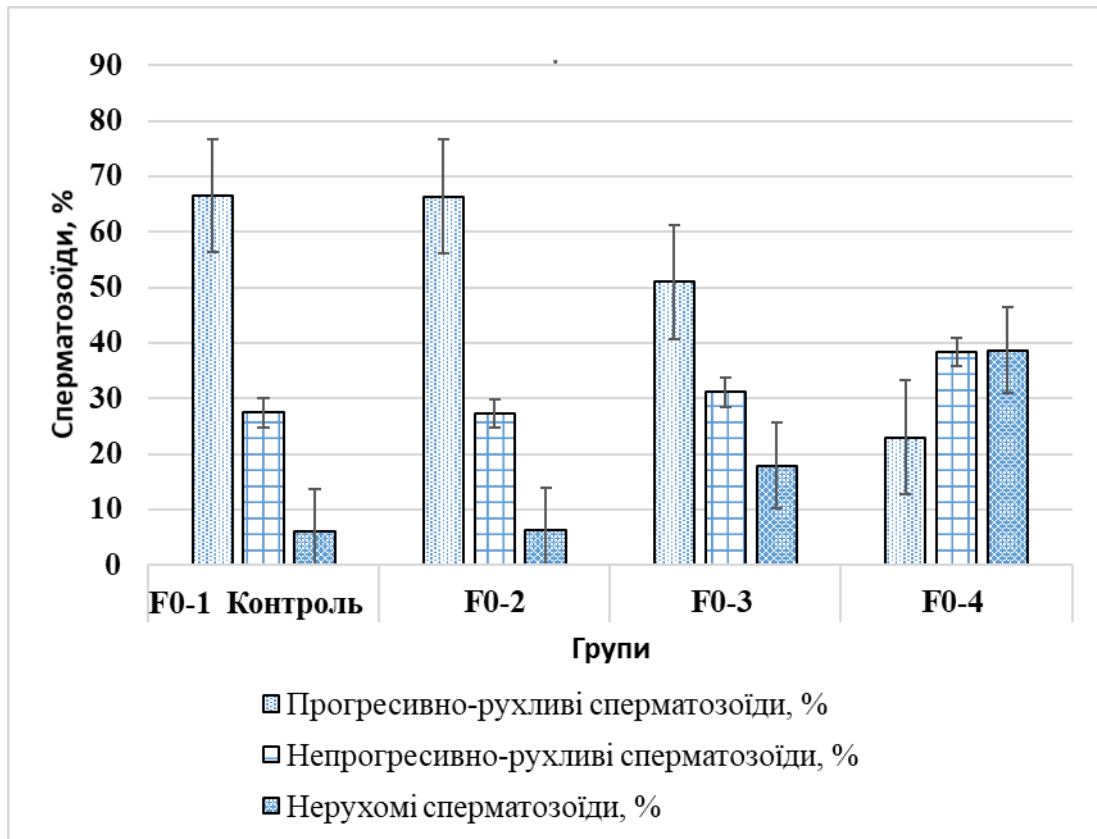


Рис. 5.8 Вплив ВРА на співвідношення фракцій сперматозоїдів за показником рухливості, %.

Примітки: відмінності були статистично значущими, порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$.

В еякуляті щурів експериментальної групи F0-4 спостерігалась аглютинація сперматозоїдів, що вказує на порушення рухливості сперматозоїдів та їхньої здатності до запліднення яйцеклітини (рис. 5.9).

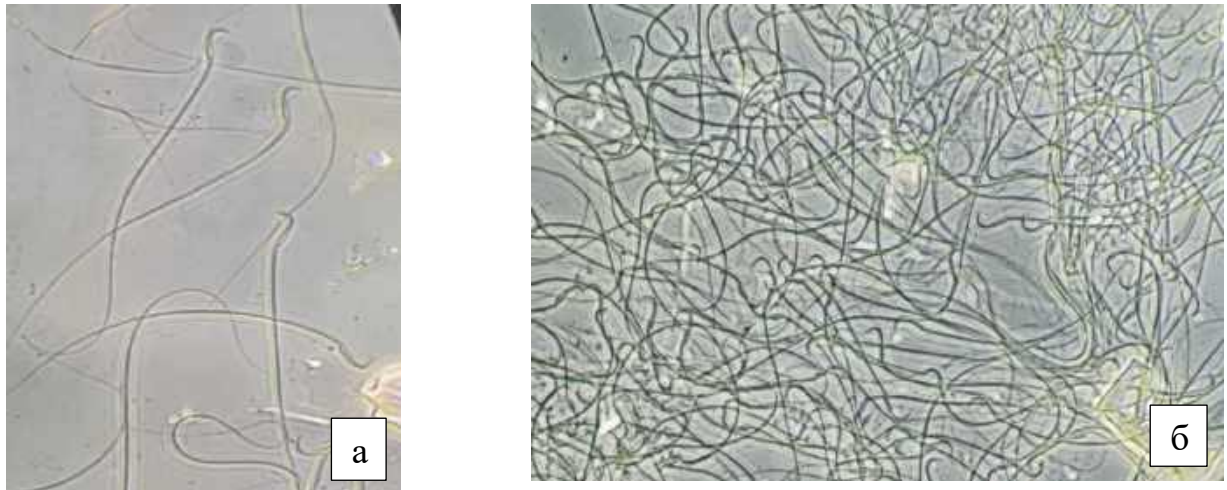


Рис. 5.9 Вплив ВРА на характеристику еякуляту. Зб.: $\times 400$.

Примітки: а) нормальні сперматозоїди щура групи F0-1;

б) аглютинація сперматозоїдів група F0-3.

Таким чином, аналіз рухової активності сперматозоїдів щурів, які зазнали впливу бісфенолу А, показав статистично значуще зменшення кількості сперматозоїдів в фракціях прогресивно-рухливих і непрогресивно-рухливих та зростання показників фракції нерухомих сперматозоїдів, що вказує на зниження показників фертильності щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, порівняно з контрольною групою F0-1 ($p < 0,05$). При дослідженні фертильності щурів-самців з'ясовано, що, ймовірно, основна деструктивна дія ксеноестрогену ВРА була спрямована, власне, на сперматогенез, оскільки отримані результати дослідження свідчать про те, що тривала дія ВРА призводила до системних змін сперматогенезу. Наслідком впливу досліджуваної речовини стало значне зменшення кількості клітин фертильної фракції і збільшення клітин нефертильної фракції.

5.2 Динаміка змін фертильності щурів під впливом ВРА

В ході експерименту спостерігалось поступове зменшення фертильності самців, які зазнали тривалого впливу ВРА. Перші результати тенденції

негативного впливу ксеноестрогену відзначались вже після перших двох місяців експерименту. Однак, статистично значущі зміни показників фертильності відзначались в кінці експерименту ($p < 0,05$). Так, період від 113 до 120 доби дослідження характеризувався зниженням фертильності тварин в групі F0-3 на 30 %, $p < 0,05$ і в групі F0-4 на 40 %, $p < 0,05$. Натомість, в групах F0-1 (контроль) і F0-2 показники фертильності протягом експерименту не мали статистично значущих змін (рис. 5.10).

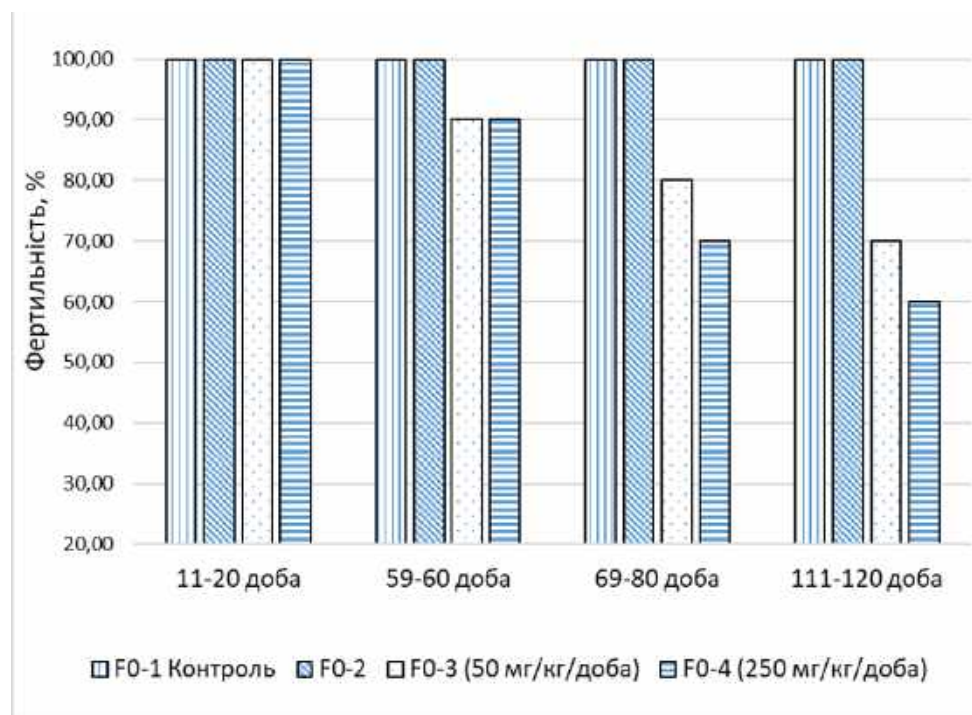


Рис. 5.10 Динаміка змін фертильності щурів під впливом ВРА протягом експерименту, %.

Примітки: відмінності були статистично значущими, порівняно з показниками контрольної групи, $p < 0,05$.

Отже, експериментальні дані виявили негативний дозозалежний вплив ВРА на показники фертильності щурів самців груп F0-3 і F0-4, що відповідно, отримували ВРА дозами 50 і 250 мг/кг/доба.

5.3 Багатофакторна бінарна прогностична модель

Визначення прогностичної цінності моделі ВРА індукованого тестикулярного ураження є важливою для встановлення зв'язку між змінами якісних показників сперми в комплексі з гістологічним аналізом біоптату сім'яників та їхнім впливом на рівень запліднюючої здатності щурів. При опрацюванні моделі розгортання ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи, на основі кореляційного аналізу отриманих експериментальних результатів, визначено ревалентні предиктори фертильності в дослідних групах щурів. Виявлено незалежні чинники, що мали сильний кореляційний зв'язок з показником рівня запліднюючої здатності сперми.

Аналіз сперми надає інформацію про показники рухливості, концентрації та морфологічні характеристики сперматозоїдів, що може вказати на можливі порушення функціонування процесів сперматогенезу та репродуктивну здатність. Гістологічна оцінка статусу сперматогенного епітелію дозволяє виявити структурні зміни в тканинах сім'яників, такі як зменшення кількості гаметогенних клітин, дегенерація клітин та інші патологічні прояви, що може негативно впливати на процеси сперматогенезу та репродуктивну функцію. При створенні прогностичної моделі перебігу ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи виконано порівняльний кореляційний аналіз можливих предикторів розгортання дисфункціональних змін сперматогенезу у щурів дослідних груп.

Для аналізу і класифікації результатів впливу показників сперми та даних гістологічного дослідження сім'яників на рівень фертильності різних груп щурів використано метод ROC аналізу, який дозволив оцінити ефективність розробленої моделі прогнозування бінарного результату запліднення з урахуванням значущості та ваги досліджуваних вхідних факторів.

Для ROC аналізу розглядалися всі досліджувані потенційні предиктори впливу на фертильність щурів, що зазнали дії ВРА, в результаті для багатофакторної моделі були обрані ті, які демонстрували високі коефіцієнти кореляції з запліднюючою здатністю еякуляту, які включали: чисельність фракції аномальних форм ($rs=-0,853$; $p<0,001$), непрогресивно-рухливих сперматозоїдів (відповідно $rs=-0,780$; $p<0,001$), фракції нерухомих сперматозоїдів ($rs=-0,791$; $p<0,001$), висоти сперматогенного епітелію сім'яників ($rs=-0,782$; $p<0,001$), також визначено сильний прямий кореляційний зв'язок між кількістю прогресивно-рухливих сперматозоїдів (відповідно $rs=0,782$; $p<0,001$) із показниками запліднюючої здатності сперми.

При проведенні ROC-аналізу оцінку фертильності визначали наступним чином: якщо самець щура запліднив самицю, то результат дорівнював – 1, а якщо запліднення не відбулося, то результат дорівнював – 0.

ROC-аналіз показав статистично значуще прогностичне значення ($p<0,001$) визначених предикторів в експериментальних групах щурів F0-3 і F0-4, які зазнали впливу ВРА. При аналізі отриманих даних були визначені оптимальні точки відсікання, значення змінної вище порогу класифікувалася як позитивний шанс, а значення, нижче порогу, як негативний шанс.

Прогностична модель запліднюючої здатності сперми щурів мала хорошу дискримінаційну характеристику, що дозволило чітко відрізнити групи тварин з різним рівнем фертильності та виявити певні групові особливості. Розроблена прогностична модель перебігу ВРА індукованої тестикулярної токсичності по визначенню позитивних випадків запліднення та негативних спроб демонструвала високі показники площі під кривою AUC $>0,940$; чутливість (Se) – 93,2; специфічність (Sp) – 77,8; стандартна похибка (AUC SE) – 0,023; $p<0,001$; що вказує на відмінну прогностичну здатність розробленої ROC-кривої (рис. 5.11).

Отримані результати свідчать про потенційну корисність прогностичної моделі для наукової роботи профільних лабораторій та для застосування в клінічній практиці, дозволяючи вчасно і з високою імовірністю визначати можливі ризики запліднення при патологічних змінах в роботі репродуктивної системи, пов'язаних з токсичним впливом ВРА.

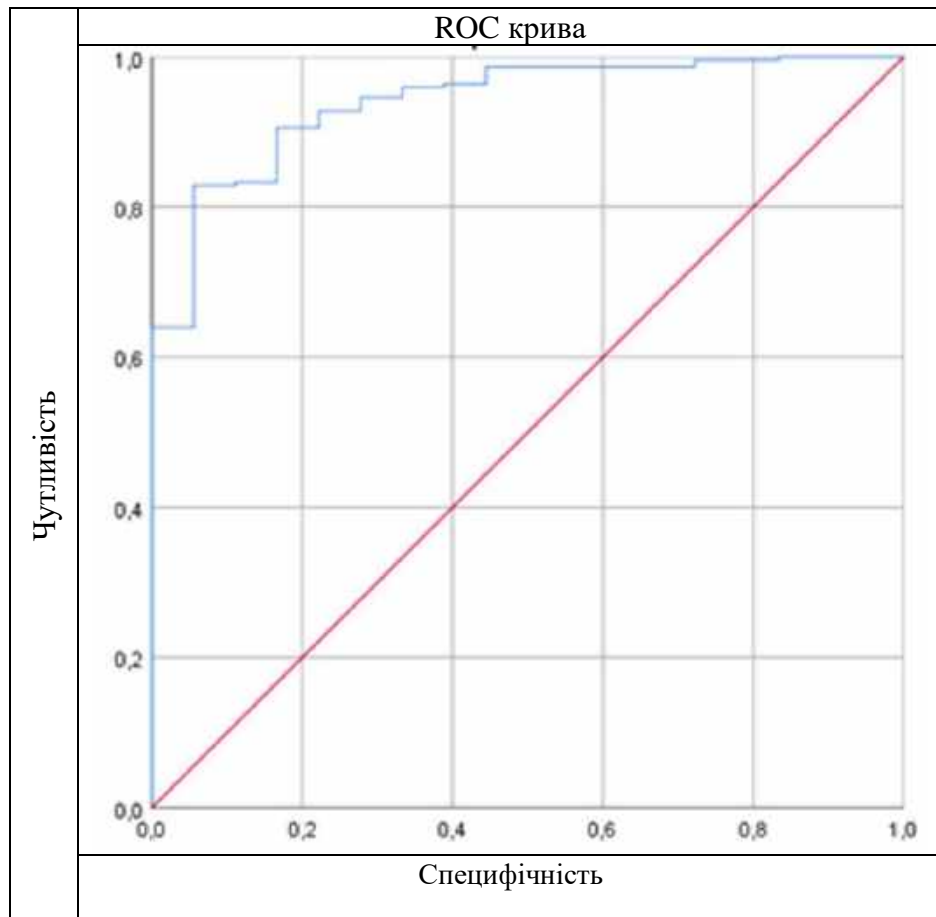


Рис. 5.11 ROC - крива прогнозування запліднення за умов тривалого впливу ВРА

Враховуючи статистичну значущість прогностичного значення отриманих даних, дослідники та практикуючі лікарі можуть використовувати розроблену модель для елаборації рекомендацій і прийняття більш

обґрунтованих рішень щодо профілактики та лікування пацієнтів із групи ризику, які зазнали тривалого впливу ВРА.

Висновки до розділу 5

Оцінюючи отримані результати експериментальних досліджень можна зробити наступні підсумки:

Деструктивна дія ксеноестрогену ВРА спрямована на складні гормонозалежні процеси сперматогенезу. Під впливом ВРА поступово сформувалися комплекси порушень, які змінили якісні і кількісні характеристики сперми щурів: прогресуюче зниження кількості сперматозоїдів в аліквоті еякуляту, зменшилась кількість статевих клітин фертильної фракції і збільшилася кількість клітин нефертильної фракції, а також зменшення рухливості статевих клітин. Показник ефективності спарювання демонстрував статистично значуще ($p < 0,05$) зниження рівня фертильності щурів. Отримані данні показали етіологічне значення ксеноекстрогену ВРА у формуванні патологічних розладів статевої системи, що може негативно вплинути на репродуктивну функцію за чоловічим фактором.

Розроблено прогностичну модель перебігу ВРА індукованої тестикулярної токсичності, що демонструє високі показники чутливості – 93,2 % і специфічності – 77,8 %.

Основні положення розділу 5 викладені в наступних наукових працях:

1. Ярошенко Д. С. Вплив бісфенолу А на морфофункціональні характеристики еякуляту. Сучасна медицина, фармація та психологічне здоров'я. 2023. Вип. № 4 (13) С. 69–74. DOI 10.32689/2663-0672-2023-4-11 [148].

2. Yaroshenko D. S. Changes in hormonal status and fertility under the action of bisphenol A. XI International Scientific and Practical Conference. «Quality management in education and industry: experience, problems and prospects». Florence, Italy. March 18–20, 2024. P. 171 [149].

РОЗДІЛ 6.

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У науковій літературі широко обговорюють можливі причини чоловічого безпліддя невідомої етіології, до яких відносять негативний вплив на організм штучних гормоноподібних хімічних речовин [19]. Найбільш відомим з групи ендокринно-активних хімічних речовин є бісфенол А, який має широке розповсюдження в якості складового компонента промислових пластикових виробів.

ВРА, ймовірно, відіграє значну роль у патогенезі широкого спектру розладів здоров'я чоловіків, в тому числі безпліддя. Враховуючи поширеність, ксеноекстрогенні властивості та недослідженість механізмів впливу ВРА на структуру і функціонування органів чоловічої репродуктивної системи виникає проблема, що вимагає фундаментальних досліджень і, без сумніву, виводить цей науковий напрямок в групу своєчасних і актуальних.

Аналіз відкритих літературних джерел засвідчив наявність незначної кількості публікацій, що описують дебют симптомів та патологічні процеси сперматогенезу в сім'яниках за умов тривалої токсичної дії різних доз ВРА. Дослідження впливу ВРА на чоловічу репродуктивну систему виявили нелінійний характер дії EDCs препарату, яка проявляється в порушенні сперматогенезу в фертильному віці з позитивною кореляцією між концентрацією ВРА і рівнем тестостерону внаслідок зниження кількості клітин Лейдіга [150, 151].

В дослідженнях впливу ВРА на молодих щурів самців з'ясовано, що під дією досліджуваного дизраптора порушувався розвиток сім'яників, у тварин виникав гіпогонадізм та безпліддя у зрілому віці [90]. Логістичний регресійний аналіз причин погіршення якості еякуляту підтвердив припущення, що основні дисфункціональні зміни в ендокринній системі

викликалися хімічними полютантами та інфекційними захворюваннями, які поступово викликали патологічні зміни в процесах сперматогенезу та сприяли зниженню рівня фертильності чоловіків [152]. Дослідним шляхом доведено, що ВРА спричиняє порушення балансу між вільними радикалами і антиоксидантами в організмі (окислювальний стрес), що запускає каскад перекисного окислення ліпідів і завершується утворенням електрофільних ліпідних альдегідів, які зв'язуються з ДНК та рядом білків і негативно впливають на чоловічі сперматозоїди та викликають порушення репродуктивної здатності чоловіків [87, 88, 32].

Разом з тим, залишається наукова невизначеність щодо фактичних причин таких наслідків для окремої людини і популяції людей в цілому. Складність механізмів репродуктивних процесів робить їх вразливими до несприятливих впливів на будь-якому етапі реалізації функції, тому вивчення впливу ендокринних дизрапторів, зокрема найбільш поширеного з них бісфенолу А на процеси сперматогенезу, зумовлює важливість вивчення цієї медичної проблеми, а розробка заходів профілактики та лікування порушень репродуктивного здоров'я, через вплив ВРА, набуває особливої значущості [110].

В науковій літературі опубліковано ряд звітів по дослідженню розповсюдження і патологічних наслідків впливу дизрапторів на людей. Акцентується увага на патологічному впливі ВРА на сперматогенез – складному процесі, що включає поєднання генетичних, гормональних, екологічних та інших факторів, а тому дисбаланс будь-якого з них може призвести до втрати фертильності [85, 85]. В дослідженні Radwan E. зі співавторами проаналізовано зразки питної води з понад 500 джерел в Єгипті і в кожному було знайдено ВРА, який чинив тривалий патологічний вплив на ендокринну систему людини [41].

В наших дослідженнях, при введенні щурам 50 мг/кг/доба і 250 мг/кг/доба ВРА протягом 120 діб, відбувались патологічні зміни гістологічної

архітектоніки сім'яників, в кінці експерименту середній діаметр звивистих сім'яних каналців сім'яників щурів груп F0-3 і F0-4 склав $110,51 \pm 4,85$ мкм, аналогічний показник в гістологічних препаратах контрольної групи дорівнював $218,72 \pm 1,56$ мкм. У 32,1 % сім'яних каналців спостерігався суттєвий рівень ушкодження клітин, а у 16,8 % сперматогенний епітелій був повністю атрофований. Крім цього, виявлені патологічні зміни гістоархітектоніки сім'яників відзначались потовщенням базальної мембрани, зменшенням діаметрів звивистих сім'яних каналців, дистрофією сперматогенного епітелію, дистрофічно-деструктивними змінами клітин Сертолі та зменшенням кількості клітин Лейдіга. Аналогічні результати патологічних змін процесів сперматогенезу в своїх дослідженнях отримали Tomza-Marciniak A., і Gao Z. зі співавторами, де під впливом EDs речовини – ВРА в сім'яниках дезорганізувалася функція гемато-тестикулярного бар'єру клітин Сертолі, відбувалися патологічні процеси апоптозу, метаптозу та дистрофії сперматогенного епітелію [153, 154].

При аналізі гістологічних препаратів сім'яників в нашому експерименті у щурів груп F0-3 і F0-4 встановлено зменшення середніх діаметрів звивистих сім'яних каналців до $110,51 \pm 4,83$ мкм³, часткову атрофію сперматогенного епітелію у 18,6 % сім'яних каналців, істотну редукцію шарів сперматогенного епітелію у 32,1 % сім'яних каналців та зменшення кількості клітин Лейдіга на 11 %, що негативно впливає на гормональний фон організму.

При дослідженні токсичної дії ВРА відзначались патологічні зміни морфології та загибелі частини статевих клітин, в сім'яних каналцях спостерігалось відшарування клітин сперматогенного епітелію. Крім цього, ВРА сприяв деструктивним змінам сперматозоїдів та викликав порушення ендокринної функції сім'яників.

Слід відзначити кореляцію між даними нашого дослідження і аналізом експериментальних даних Rahman M. S. [103] і Maran R.R. [155], де автори

відзначають дегенеративні зміни гістоархітекtonіки сім'яників, які віддзеркалюються в показниках: зменшення висоти сперматогенного епітелію діаметрів сім'яних каналців, зростання діаметрів просвіту сім'яних каналців, зменшення маси сім'яників та пригнічення процесів сперматогенезу за умов тривалої токсичної дії бісфенолу А.

Токсичні речовини з навколишнього середовища часто є індукторами пошкодження сім'яників та тригером окислювального стресу, який призводить до посилення апоптозу зародкових клітин і гіосперматогенезу. Такі стреси можуть спричиняти суттєві патологічні зміни в ендокринній системі, викликати ожиріння людей та негативно впливати на запліднюючу здатність сперми [156]. Так, Ventimiglia E. зі співавторами проаналізували клінічні та лабораторні дані 1337 чоловіків, які страждають на безпліддя. Аналізи сперми проводили на основі рекомендацій Всесвітньої організації охорони здоров'я. На основі використання моделі логістичної регресії перевіряли зв'язок між параметрами сперми, клінічним статусом та ожирінням. Зайву вагу виявлено у 128 чоловіків. Такі пацієнти мали нижчі рівні загального тестостерону ($p < 0,001$), глобуліну, що зв'язує статеві гормони ($p = 0,004$), інгібіну В ($p = 0,03$) та антимюллерового гормону ($p = 0,009$) [157].

В наших дослідженнях маса тіла щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4 статистично значуще зростала, а маса сім'яників зменшувалось, порівняно з показниками контрольної групи F0-1. Разом з тим в групах тварин, що зазнали тривалого токсичного впливу ВРА, відзначалось зниження гормонального фону, а саме гормонів: тестостерону і 17- β -естрадіолу. Такі зміни, в свою чергу, негативно впливали на рівень запліднюючої здатності сперми.

У дослідних групах щурів F0-3 і F0-4 відзначалось зменшення індексу сперматогенезу, що вказувало на погіршення генеративної функції сім'яників. До аналогічних висновків прийшли Sallmen M. зі співавторами,

проаналізувавши історії хвороб 2111 подружніх пар з безпліддям. Автори дослідження виявили статистично значущий зв'язок між індексом маси тіла партнерів і безпліддям [158]. До схожих висновків прийшли і Youfa Wang зі співавторами після аналізу причини безпліддя подружніх пар США за 34 річний період аналізу, вони виявили зв'язок між ожирінням і порушенням процесів сперматогенезу та зниженням в 1,19 рази запліднюючої здатності сперми [159].

Пероральне введення ВРА молодим самцям щурів викликало зміни в роботі органів ендокринної системи, найбільші патологічні зміни спостерігались при тривалому введенні високих доз ВРА. Подібні результати отримано в дослідженнях Ventimiglia E. і Kasturi S. зі співавторами. Дослідники акцентують увагу на зменшенні рівня тестостерону, як основного складника патогенезу метаболічного синдрому у чоловіків репродуктивного віку, які мають зайву вагу та низькі показники фертильності [160, 157].

В регулюванні процесів сперматогенезу домінують тестостерон та інгібін В, які утворюються клітинами Лейдіга та Сертолі. Будь-які порушення гормонального фону можуть справляти патологічний вплив на процеси сперматогенезу, що веде до зниження фертильності [57, 161]. В роботі іспанських дослідників, що вивчали вплив ВРА на рівень загального тестостерону, лютеїнізуючого гормону, фолікулостимулюючого гормону та кортизолу отримано дані, що демонструють дію ВРА на гормональний статус чоловіків та викликають негативні зміни в роботі їх ендокринної системи [56]. Дослідження в тваринних моделях впливу ВРА на стероїдогенез GC *in vitro*, показали зниження фертильності піддослідних тварин під дією ендокринного дизраптору [72]. Справедливість висновків про деструктивний вплив ВРА на процеси сперматогенезу, порушення синтезу стероїдів і, як наслідок, на фертильність доводиться рядом інших досліджень [88, 68].

Використання сучасних діагностичних методів виявлення цілісності ДНК є важливим інструментом визначення запліднюючої здатності сперми. Отже, якщо аналіз морфології сперматозоїдів проводиться правильно і ретельно при строгому дотриманні рекомендацій ВООЗ [124], то визначення морфологічних параметрів сперми відіграє основну роль в оцінці клінічного статусу фертильності чоловіків. Хоча комплексний аналіз еякуляту на основі рекомендацій ВООЗ залишається основним методом оцінки чоловічого безпліддя, світовою науковою спільнотою проводиться широкий пошук нових методів дослідження сперми, спрямованих на визначення показників патологічних відхилень від норми та визначення причини безпліддя за чоловічим фактором [162].

Погіршення параметрів якості сперми прямо впливає на рівень фертильності чоловіків [18]. Базовими показниками якості сперми є концентрація сперматозоїдів, їх рухливість та морфологія. В експериментах Tomza-Marciniak А. доведено негативний вплив ВРА на якість і рухливість сперматозоїдів [154]. Дослідження показали, що порушення функціональної здатності ендокринної та репродуктивної системи чоловіків є основними причинами погіршення сперми [17]. Справедливість гіпотези про можливий деструктивний вплив ВРА на процеси сперматогенезу і, як наслідок, на фертильність доводиться рядом досліджень з використанням тваринних моделей. Ендокринний дизраптор негативно впливав на рухливість сперматозоїдів, викликав окислювальний стрес та змінював синтез стероїдів [87, 88].

Аналіз спермограм, в наших дослідженнях, виявив комплекс негативних змін параметрів якості еякуляту при тривалому застосуванні ВРА. Так, тільки після 61 доби експерименту відзначалось статистично значуще зниження кількості сперматозоїдів, їх рухливість та збільшення фракції аномальних форм. Можливо, що за експозиції менше 60 діб руйнівна дія ВРА

компенсується антистресовими механізмами ендокринної та репродуктивної системи чоловіків.

Застосування ВРА дозою 250 мг/кг/доба, протягом тривалого часу, викликало у сім'яниках тварин ряд патологічних змін. У щурів групи F0-4 виявлено зниження на 37 %, ($p < 0,05$) показника рухливості сперматозоїдів та збільшення фракції патологічних форм на 41 %, ($p < 0,05$), порівняно з показниками контрольної групи.

Отже, комплексний аналіз дисфункціональних змін сперматогенезу і можливість реалізації функцій сперматозоїдами після тривалого впливу ВРА показав, що досліджуваний дизраптор проявляв характеристики тестикулярного токсиканту. Імовірно, ВРА корегує функціонування ендокринної системи, що негативно впливає на репродукційну функцію чоловічого організму.

В нашому дослідженні визначено тісний кореляційний зв'язок між дією бісфенолу А та якістю і запліднюючою здатністю сперми. Зниження рівня тестостерону в сироватці крові щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4 обумовлено негативним впливом ВРА на функціональну активність клітин Лейдіга. Аналогічну закономірність в своїх дослідженнях визначив Nanjappa Manjunatha, він припустив, що ВРА діє як мітоген у клітинах Лейдіга та пригнічує експресію білка рецептора лютеїнізуючого гормону (LHCGR) і ферменту 17-бета-гідроксистероїд дегідрогенази (HSD17B3), тим самим зменшуючи секрецію андрогенів клітинами Лейдіга [163]. Низький рівень 17 β -естрадіолу, з іншого боку, може бути відповідальним за апоптичну дегенерацію статевих клітин, як описав в своїх дослідженнях Pentikäinen V. [164], що пояснює зменшення кількості шарів сперматогенного епітелію, а також наявність фрагментів статевих клітин в просвіті звивистих сім'яних каналців сім'яників щурів груп F0-3 і F0-4, які отримували ВРА протягом 120 діб. В іншому дослідженні введення ВРА зменшував біосинтез тестостерону, пригнічуючи активність нейронів GnRH та експресію стероїдогенних

ферментів. Як наслідок дії ВРА, спостерігалось зниження рівня тестостерону та зменшення концентрації сперматозоїдів [95]. Експерименти *in vivo* на щурах лінії Вістар показали, що естрогенна дія ВРА призводить до пригнічення тестикулярного стероїдогенезу, що, в свою чергу, викликає гіпогонадотропний гіпогонадизм з розвитком дефектів репродуктивних шляхів [96]. В інших дослідженнях вивчали вплив ВРА на гормональний фон чоловіків різного віку. Визначили критичний рівень гістопатологічної відповіді та залежність реакції гормонального статусу від дози ВРА [165].

В дослідженнях Desdoits-Lethimonier С. було виявлено дозозалежне інгібування тестостерону, який виміряли в культуральному середовищі, під впливом ВРА (через 24 і 48 годин $P=0,00778$ та $P=0,0291$). Рівень пригнічення вироблення тестостерону змінювався залежно від тривалості впливу та концентрації ВРА (10^{-9} М; $P<0,05$). Разом з тим статистично значущого впливу на функціональну здатність клітин Сертолі бісфенол А не справляв [166].

У експериментальній роботі Gao Z., оцінювали вплив ВРА на чоловічу репродуктивну систему. Результати експерименту показали, що ВРА порушував проліферацію зародкових клітин, впливав на процеси індукції апоптозу статевих клітин, змінював фізіологічні параметри сперми та дезорганізовував процеси сперматогенезу, що було результатом порушення біосинтезу тестостерону у клітинах Лейдіга. Загалом Gao Z., після проведених досліджень, прийшов до висновку, що ВРА є тестикулярним токсикантом [153].

В дослідженнях Маєвського О.Є. зі співавторами вивчалась дія біологічних токсинів: *V. berus berus* і *V. berus nikolskii* на сім'яники щурів, авторами виявлено суттєві зміни у ферментативній активності тканин сім'яників під впливом біологічних токсинів. Відзначалась підвищена активність фізіологічно неактивних ферментів під дією токсичних речовин,

що модифікують метаболізм уражених клітин. У той же час, гіперактивація процесів синтезу білку спричиняла збільшення кількості модифікованих та частково змінених білків, які залишалися активними, але зі зміненою субстратною специфічністю. Це викликало біохімічні зміни, які не характерні для фізіологічно нормального стану сім'яників. Отримані дані підтверджують припущення про активацію патологічних процесів зміни білкового профілю під впливом токсичних речовин, що призводить до зміни субстратної специфічності біохімічного ланцюжка у тканинах сім'яників щурів [167–169].

В наших дослідженнях тривалий вплив дизраптора ВРА також проявляв характеристики тестикулярного токсиканту, який активізував патологічні процеси в сім'яниках щурів з імовірною зміною білкового профілю сперматогенного епітелію, викликав десквамацію клітин та редукцію шарів. В кінцевому підсумку спричиняв каскад дисфункціональних змін сперматогенезу, які суттєво знижували можливість реалізації функцій запліднення яйцеклітин сперматозоїдами.

Слід відзначити, що на репродуктивну систему діють різноманітні екзогенні стрес-фактори, які викликають зміни гормонального фону, іноді схожі за наслідками впливу з ВРА. Так наприклад, в дослідженнях дії теплового стрес-фактору на органи і системи органів, відзначається, що теплова травма впливає на рівень гормонів та може призвести до змін у функціонуванні ендокринної системи [170]. Серед полютантів, крім ВРА, отримали поширення сполуки кадмію та свинцю, які спричиняють токсичну дію на функціональний стан статевої системи. Ці солі важких металів завдають негативний вплив на статеву систему чоловіків. Спричиняють деструктивні зміни в сім'яних каналцях і викликають порушення гормональної регуляції. Негативно впливають на кількісні та якісні показники еякуляту, що знижує рівень фертильності. [171–173].

Отже, зміни у гормональному фоні під впливом різних стрес-факторів можуть діяти на статеву систему, викликаючи різноманітні порушення та ускладнення.

В нашому експерименті тривале застосування ВРА дозою 250 мг/кг/доба призводило до статистично значущого зниження рівня тестостерону у крові. Також було виявлено зниження рівня тестостерону і при дозі ВРА 50 мг/кг/доба, що вказує на цитотоксичну активність ВРА та суттєвий вплив дизраптора на процеси секреції тестостерону.

В дослідженнях Поліона М.Ю. розглядається порушення в системі органів, відповідальних за виділення сечі та репродукцію. Робиться висновок про загрозу здоров'ю наступному поколінню при порушенні правильного функціонування органів статевої системи [174, 175]. При вивченні екскреторно-токсичної безплідності у чоловіків (ЕТБ), яка характеризувалася ураженням репродуктивної системи та значним погіршенням якості сперми. Встановлено, що при ЕТБ спостерігається зміна рН сперми у лужний бік, зменшується концентрація сперматозоїдів у еякуляті та знижується їх рухливість до критично низького рівня. Крім того, відзначається збільшення кількості патологічних форм сперматозоїдів. Показник чисельності живих статевих клітин в еякуляті не перевищував 30 % від нормальних значень. Разом з тим автором доводиться можливість ефективного та безпечного покращення якісних та кількісних показників сперми при комплексному лікуванні екскреторно-токсичної безплідності у чоловіків [176].

В літературних джерелах відзначається, що тестостерон – стероїдний гормон, який виробляється в основному клітинами Лейдіга [177], має життєво важливе значення для підтримки нормального сперматогенезу та функціонування чоловічої репродукційної системи [178]. У науковій праці Haider, S.G описуються результати дослідження диференціювання клітин Лейдіга та регуляції їх кількості в сім'яниках. Автор надав короткий опис

маркерів функціональних порушень клітин Лейдіга. Зробив аналіз генів у клітинах Лейдіга та ролі лютеїнізуючого гормону, стероїдогенного регуляторного білку, гідроксистероїддегідрогенази, андрогену та антимюллерового гормону. З'ясував, як комплекс факторів модулюють диференціацію, регенерацію та стероїдогенну здатність клітин Лейдіга. Експериментальним шляхом довів, що апоптоз клітин Лейдіга може індукуватися цитотоксинами, а патологічні зміни в ендокриноцитах, в свою чергу, можуть призвести до безпліддя [177].

Отримані експериментальні дані Braver-Sewradj S. P. доводять репродуктивну токсичність ВРА, однак вказується, що потенціал впливу EDCs речовини на сім'яники був незначним і рекомендується продовжити експеримент для всебічної оцінки впливу ВРА на репродуктивну систему, включаючи дослідження *in vitro* [179].

В дослідженнях Нефьодової О.О. доведено, що накопичення токсичних поллютантів у сім'яниках може призвести до порушень в гормональній регуляції репродуктивної системи та викликати дистрофічні зміни в сперматогенному епітелії сім'яників. Такі порушення можуть призвести до погіршення кількісних та якісних показників еякуляту [180].

В наших дослідженнях спостерігався аналогічний токсичний вплив досліджуваного поллютанта ВРА, який зміщував рівень гормонального фону в бік пониження показників тестостерону і 17β -естрадіолу в крові, що негативно впливало на процеси сперматогенезу та викликало зниження репродуктивної здатності досліджуваних тварин.

За результатами досліджень Нефьодової О. О. і Грузд В. В. доведено, що токсиканти суттєво впливали на показники гістологічних структур сім'яників щурів. Так, середні діаметри сім'яних каналців у тварин експериментальних груп під впливом токсичних речовин коливались в широких межах від $224,74 \pm 18,92$ до $348,29 \pm 21,61$ мкм, залежно від препарату,

аналогічні гістологічні показники у щурів контрольної групи склали $301,71 \pm 15,81$ мкм [181].

В наших дослідах EDCs тестикулярний токсикант також модифікував гістоархітекtonіку сім'яників, викликав зміни показників діаметрів сім'яних каналців. Введення щурам ВРА дозою 50 мг/кг/доба і 250 мг/кг/доба протягом 120 діб викликало патологічні зміни гістологічної архітекtonіки сім'яників, а саме зменшення діаметру сім'яних каналців та висоти сперматогенного епітелію у щурів експериментальних груп, порівняно з щурами контрольної групи. Крім того, в сім'яниках щурів з експериментальних груп спостерігалось збільшення середнього діаметру просвіту сім'яних каналців, відповідно до 98,80 і 111,79 мкм, у порівнянні з аналогічними показниками контрольної групи – 89,43 мкм, і групи порівняння – 86,85 мкм ($p < 0,05$). Отже, тривалий вплив ВРА на щурів самців призводив до зміни гістологічних структур в сім'яниках, що може призвести до зменшення фертильності.

Досліджувались особливості змін сім'яників щурів, яким вводили токсичні полютанти, в порівнянні з щурами контрольної групи. Аналіз змін вагових коефіцієнтів щурів, протягом 30 добового експерименту, продемонстрував суттєвий вплив досліджуваних токсичних речовин на масометричні показники, найбільших змін зазнав індекс маси сім'яників, який, порівняно з показниками контрольної групи, зріс в 1,4 рази [182].

Отримані експериментальні данні наших дослідів свідчать, що за умов тривалого впливу ВРА відбувається зменшення маси і розміру сім'яників у щурів експериментальних груп, порівняно з контрольною групою. Зокрема, застосування ВРА дозою 250 мг/кг/доба викликало суттєві патологічні зміни у біометричних параметрах сім'яників. Можна припустити, що зменшення маси і розміру сім'яників пов'язане з деструкцією клітин сім'яників та редуціюванням шарів клітин епітеліальної тканини після тривалого

токсичного впливу ВРА. Таким чином, отримані дані вказують на потенційно негативний вплив ВРА на репродуктивну систему щурів.

Значні порушення сперматогенної та гормональної функції сім'яників виникають при впливі ендогенних і екзогенних токсичних факторів, що зумовлюють структурні зміни в звивистих сім'яних каналцях та розлади сперматогенезу, так як сім'яники є гормонально активним і гормоно-залежним органом [183].

Дослідження впливу ВРА, в нашому експерименті, показали аналогічну негативну дію ксеноестрогену на складні гормоно-залежні процеси сперматогенезу. Під впливом ВРА спостерігалось статистично значуще зниження концентрації досліджуваних гормонів у сироватці крові щурів, які тривалий час отримували ВРА, порівняно з контрольною групою. Концентрація тестостерону в сироватці крові щурів експериментальних груп в кінці експерименту знизилась на 49–63 %. Аналогічно, показники концентрації 17β -естрадіолу в сироватці крові щурів експериментальних груп знизились на 51–71 %, відповідно. У тварин контрольної групи і групи порівняння, які не отримували ВРА, концентрація гормонів відповідала фізіологічній нормі.

В дослідженні структурної перебудови тканин сім'яників експериментальних груп щурів лінії Вістар, яким вводили неорганічний токсикант, відзначалась виражена зміна кількісних морфологічних показників судин гемомікроциркуляторного русла, погіршення кровопостачання, дистрофія та некроз клітин в сім'яниках під впливом токсиканта [184, 185].

В нашому дослідженні тригером аналогічних ендогенних процесів виступив ВРА, активізувавши механізми деструкційних змін в сім'яних каналцях, що викликало суттєві порушення сперматогенезу. При високій варіабельності досліджуваних показників, під впливом ВРА, в кінці експерименту кількість сім'яних каналців з важкими патологічними змінами сперматогенного епітелію зросла до 44–55 %, в експериментальних групах

щурів. ВРА у дозах 50 і 250 мг/кг/доба та тривалості експозиції 120 діб справляв патологічний вплив на процеси сперматогенезу у щурів, а також на їх репродуктивну систему.

Отже, розв'язання проблеми чоловічого безпліддя вимагає комплексного підходу, який включає в себе медичні, науково-дослідні та соціальні аспекти вирішення проблеми запобігання впливу токсикантів на репродуктивне здоров'я чоловіків. Крім того, важливо проводити інформаційну роботу серед суспільства щодо методів попередження зниження рівня фертильності, особливо в групах ризику – чоловіків молодого віку, які зазнають системного впливу EDCs тестикулярних токсикантів.

На початку нашого експерименту в інтерстиціальній тканині сім'яників щурів груп F0-3 і F0-4 спостерігалось спочатку зростання потім стабілізація кількості клітин Лейдіга, що вказує на компенсаторні механізми сперматогенезу, а починаючи з 80 доби відзначається зменшення кількості ендокриноцитів, що свідчить про дезорганізацію функціонування компонентів гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі; додатковою ознакою дисбалансу процесів репродуктивної системи було падіння рівня тестостерону. До аналогічних висновків прийшли дослідники Bostwick D. G. і Мао J. зі співавторами. Автори вказують, що зміни кількості клітин Лейдіга, ймовірно, пов'язані з механізмами порушень гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі [186, 187].

Аналіз показників сперми, за методичними показниками ВООЗ, не може безпосередньо визначити можливе пошкодження генетичного матеріалу сперми, крім цього використання непрямих методів визначення потенціалу фертильності за чоловічим фактором відзначається відносною простотою досліджень, але і похибкою в отриманих результатах.

Проведено кореляційні аналізи та визначено показники спермограм, які доповнені даними гістологічних аналізів біоптату сім'яників – висотою сперматогенного епітелію, що виявились найбільш чутливими та

специфічними для прогнозування фертильності. При аналізі виявлено тісні прямі і зворотні зв'язки між рівнем фертильності і якісними показниками сперми та відібраними досліджуваними показниками гістоархітекtonіки сім'яників.

Висновки до розділу 6

Отримані експериментальні дані доводять те, що сім'яники є мішенню токсичного впливу бісфенолу А. За умов тривалої токсичної дії дизраптора ВРА поступово відбувалися патологічні зміни гістологічної архітекtonіки сім'яників щурів, що викликало порушення розвитку та функціонування репродуктивної системи щурів.

Патологічний процес мав тривалий дозозалежний характер в звивистих сім'яних каналцях експериментальних груп F0-3 і, більшою мірою, в групі F0-4 в наслідок некротичних і деструктивних змін сім'яників, протягом експерименту, спостерігалось злуцнення епітеліальної тканини, всередині епітеліальної тканини утворювалась порожнина, частина звивистих сім'яних каналців не формувала сперматозоїдів.

Отримані дані показали етіологічне значення патогістологічних змін, які, ймовірно, індукували зменшення запліднюючої здатності еякуляту щурів. Комплексний аналіз патологічних змін і можливості реалізації репродуктивної функції показав, що ВРА є тестикулярним токсикантом, який викликає гормональний дисбаланс та негативно впливає на процеси сперматогенезу, знижуючи рівень запліднюючої здатності ссавців.

ВИСНОВКИ

У дисертаційному дослідженні наведено теоретичне узагальнення та запропоновано нові підходи до вирішення наукової проблеми прогнозування розгортання патологічних процесів в сім'яниках при тривалому негативному впливі бісфенолу А. Аналізі отриманих даних показав, що ВРА є тестикулярним токсикантом, який викликає гормональний дисбаланс, негативно діє на процеси сперматогенезу, знижуючи рівень фертильності тварин.

1. Морфометричний аналіз сім'яників, після впливу бісфенолу А (ВРА) експозицією 120 діб, показав негативні зміни: в сім'яниках щурів сформувалась більш пухка організація колагенових волокон білкової оболонки, суттєво зросла її товщина. Форма більшості звивистих сім'яних каналців округлилась і їх розташування стало не щільним, порівняно з сім'яниками тварин контрольної групи F0-1 і групи порівняння F0-2.
2. При введенні щурам 50 мг/кг/доба і 250 мг/кг/доба ВРА протягом 120 діб відбувались патологічні зміни гістологічної архітекtonіки сім'яників. Спостерігалось зменшення діаметру звитих сім'яних каналців та висоти сперматогенного епітелію в сім'яниках щурів експериментальних груп F0-3 і F0-4, у порівнянні з контрольною і інтактною групами F0-1, і F0-2. В сім'яниках щурів в групах F0-3 і F0-4 збільшився середній діаметр просвіту звивистих сім'яних каналців, відповідно до 98,80 і 111,79 мкм, порівняно з аналогічними показниками контрольної групи F0-1 – 89,43 мкм, і інтактної групи F0-2 – 86,85 мкм ($p < 0,05$). Показник індексу сперматогенезу в кінці експерименту зменшився на 28,11 і 41,29 %, відповідно в групах F0-3 і F0-4 ($p > 0,005$).
3. Деструктивні зміни сперматогенезу проявлялися також зменшенням частки статевих клітин відносно стабільної до впливів токсикантів

популяції клітин Сертолі. Індекс релаксації (напруженості сперматогенезу) знизився з $19,20 \pm 1,54$ до $17,07 \pm 0,39$ і $16,07 \pm 1,83$ або на 11,19 і 16,30 %, відповідно в групах F0-3 і F0-4, порівняно з тваринами контрольної групи щурів F0-1 ($p < 0,005$), що вказує на зниження функціональної здатності сім'яників щурів, які зазнали патологічного впливу ВРА.

4. Протягом експерименту у всіх щурів зростала маса тіла, однак у групах, що отримували ВРА дозою 50 і 250 мг/кг/доба тварини набирали масу на 23,6 і 28,9 % більшу, порівняно з тваринами контрольної групи. Під впливом ВРА відзначалось зниження гонадо-соматичного індексу порівняно з сім'яниками щурів контрольної групи.
5. Введення ВРА дозами 50 і 250 мг/кг/добу і експозицією 120 діб викликало негативні зміни еякуляту. Визначено зниження параметру загальної кількості сперматозоїдів на 21,8 % та 32,4 %, в групах F0-3 і F0-4. В експериментальних групах встановлено збільшення фракції аномальних форм сперматозоїдів на 53,7 % і 102,5 %, $p < 0,05$, порівняно з показниками тварин контрольної групи.
6. Тривала деструктивна дія ВРА викликала комплекс порушень якісних і кількісних характеристик сперми: зміни фракційного складу – зменшення загальної кількості сперматозоїдів на 21,8 % та 32,4 %, збільшення фракції аномальних форм на 18,01 % і 23,73 %, скорочення частки прогресивно рухливих сперматозоїдів на 22,7 % і 37,4 % та збільшення більше ніж у 2,7 і 5,7 рази фракції нерухливих сперматозоїдів в групах F0-3 та F0-4, порівняно з групою контролю ($p < 0,05$).
7. В експерименті ВРА сприяв статистично значущому зниженню концентрації досліджуваних гормонів у сироватці крові щурів

експериментальних груп F0-3 (ВРА – 50 мг/кг/доба) і F0-4 (ВРА – 250 мг/кг/доба), порівняно з контрольною групою та групою порівняння. Рівень тестостерону в сироватці крові щурів експериментальних груп в кінці експерименту, відповідно знизилась на 63 % і 49 % ($p < 0,05$). Показники концентрації 17β -естрадіолу в сироватці крові щурів груп F0-3, F0-4 знизились відповідно на 51 % та 71 % ($p < 0,05$). У тварин контрольної групи і групи порівняння концентрація гормонів відповідала фізіологічній нормі і не зазнала статистично значущих змін.

8. Наслідком впливу досліджуваної EDCs речовини стало суттєве зменшення фертильності щурів самців експериментальних груп, що отримували ВРА дозою 50 і 250 мг/кг/доба протягом 120 діб. За період експерименту відзначалось зниження фертильності тварин в групі F0-3 на 30 %, ($p \leq 0,05$) і в групі F0-4 на 40 %, ($p \leq 0,05$), порівняно з тваринами контрольної групи.
9. Розроблено прогностичну модель перебігу ВРА індукованої тестикулярної токсичності, що демонструє високі показники площі під кривою $AUC > 0,940$; чутливості – 93,2 % та специфічності – 77,8 %.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Отримані результати дослідження, щодо дебюту розгортання симптомів порушення фертильності, можуть бути використані для вдосконалення клінічних настанов і протоколів лікування безпліддя, а саме діагностики та лікування чоловіків молодого віку, які зазнають системного впливу EDCs тестикулярних токсикантів.

Дані дисертаційного дослідження, про алгоритм розвитку ранніх патологічних порушень сперматогенезу, можуть бути використані в клінічній практиці при діагностуванні якості еякуляту чоловіків, що зазнали негативного системного впливу EDCs речовин.

Використання розробленої моделі ВРА індукованого ураження чоловічої репродуктивної системи надає додаткові інструменти для поглибленого вивчення чоловічої репродуктивної системи профільним науково-дослідним лабораторіям.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Горпинченко И. И., Стусь В. П., Малышкин Д. И., Полион Н. Ю. Мужское бесплодие: этиология, патогенез, классификация, диагностика и методы лечения: Монография. Днепр: ООО «Акцент ПП», 2016. 344 с.
2. Overview of Endocrine Disruption. An official website of the United States government. URL: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/overview-endocrine-disruption#examples>.
3. Murata M., Kang J.H. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnol. Adv.* 2018. № 36 p.311–327. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.002.
4. European Commission Endocrine Disruptors. URL: https://ec.europa.eu/info/policies/endocrine-disruptors_en.
5. Environmental Protection Agency What is Endocrine Disruption? URL: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-disruption>.
6. Adoamnei E., Mendiola I., Vela-Soria F. Urinary bisphenol A concentrations are associated with reproductive parameters in young men. *Environ Res.* 2018 Feb. 161. P.122–128. doi: 10.1016/j.envres.2017.11.002.
7. ECHA (European Chemical Agency). List I: Substances identified as endocrine disruptors at EU level. URL: <https://edlists.org/>.
8. Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J., Giudice L., Hauser R. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews.* June 30(4). 2009. p. 293–342. doi: 10.1210/er.2009-0002.
9. Principles for the toxicological assessment of pesticide residues in food. World Health Organization. EHC. Geneva. Switzerland. 1990. 86 p.

10. Summary of Principles for Evaluating Health Risks in Children Associated with Exposure to Chemicals. World Health Organization. Geneva. Switzerland. 2011. 51 p.
11. Refaat B. Ectopic pregnancy secondary to in vitro fertilisation-embryo transfer: pathogenic mechanisms and management strategies. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2015. Vol. 13. P. 30. doi: 10.1186/s12958-015-0025-0.
12. Нікітін О. Д., Ясинецький М. О. Сучасний алгоритм діагностики та лікування захворювань у чоловіків, що призводять до безпліддя. *Здоров'я чоловіків.* № 4 (75) 2020. С 9–14.
13. Barati E., Nikzad H., Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci.* 2020. Vol. 77. P. 93–113. doi: 10.1007/s00018-019-03253-8.
14. Ломейко О. О. Механізми виникнення порушень морфо-функціонального стану сперматозоїдів та їх корекція у чоловіків репродуктивного віку в умовах великого промислового міста (Запоріжжя та Запорізька область): дис. на здоб. наук. ступеня канд. мед. наук.: 14.03.04. Запоріжжя. 2020. С. 26.
15. Turkina V., Chemodurova N., Hrushka O., Pryzyhlei H. Topical effect of minoxidil containing lotion on morphofunctional indicators of male rats' reproductive system. *Ukrainian journal of modern problems of toxicology.* 2020. № 2. P. 27–31. doi: 10.33273/2663-4570-2020-89-2-27-31.
16. Харченко Т.Ф., Левицька В.М., Ісаєва С.С. Наукове обґрунтування моделі експерименту для визначення хімічного фактора потенційного ризику застосування медичних виробів одноразового використання, які контактують з кров'ю. *Сучасні проблеми токсикології.* 2012. № 1. С. 47–51.

17. Eisenberg M., Esteves S., Lamb D., Hotaling J., Giwercman A. Male infertility. *Nat Rev Dis Primers*. 2023. Sep 14. № 9(1) p. 49. doi: 10.1038/s41572-023-00459-w.
18. Pathak U., Gabrielsen J., Lipshultz L. Cutting-Edge Evaluation of Male Infertility. *Urol Clin North Am*. 2020. № 47(2). P. 129–138. doi: 10.1016/j.ucl.2019.12.001.
19. Castellini C., Totaro M., Parisi A., et al. Bisphenol A and Male Fertility: Myths and Realities. *Frontiers in Endocrinology*. June 2020. Vol. 11. 353. P. 1–10. doi: 10.3389/fendo.2020.00353.
20. Беденюк А. Д., Твердохліб В. В., Мисак А. І., Нестерук С. О. Шляхи поліпшення показників сперматогенезу в комплексному лікуванні чоловічого безпліддя. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*. 2020 № 2. С. 83–87. doi: 10.11603/1811-2471.2019.v0.i2.10373.
21. Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., et al. Male infertility. *The Lancet*. 2021. Vol. 397. Issue 10271, 23–29. P. 319–333. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32667-2.
22. Меленевський О. Д., Чайка О. М., Третьякова О. В. Дослідження показників про- та антиоксидантної системи в спермоплазмі при порушенні фертильності у чоловіків. *Урологія*. 2021. Том. 25. №. 2. С. 107–113. doi: 10.26641/2307-5279.25.2.2021.238228.
23. Minhas S., Bettocchi C., Boeri L., Capogrosso P., Carvalho J. And all. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur Urol*. 2021. Nov. № 80(5). P. 603-620. doi: 10.1016/j.eururo.2021.08.014.
24. Cimmino I. Fiory F., Perruolo G. Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *Int J Mol Sci*. 2020. 21(16). P. 5761. doi: 10.3390/ijms21165761.

25. Colborn T., Saal F., Soto A. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 1993 Vol. 101(5). P. 378–384. doi: 10.1289/ehp.93101378.
26. Liao C., Liu F., Alomirah H., Loi V., Mohd M., Moon H. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol.* 2012. Vol. 46(12). P. 6860–6866. doi: 10.1021/es301334j.
27. Сухонос О. С., Нікіфоров О. А., Авраменко Н. В. Генетичні аспекти порушення репродуктивної функції у чоловіків. *Вісник проблем біології і медицини.* 2019. Вип. 2. Том 1 (150). С. 65–71. doi: 10.29254/2077-4214-2019-2-1-150-65-71.
28. Wisniewski P., Romano R.M., Kizys M.M., Oliveira K.C., Kasamatsu T., Giannocco G., Chiamolera M.I., Dias-da-Silva M.R., Romano M.A. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-. pituitary-testicular axis. *Toxicology.* 2015. Vol. 2(329). P. 1–9. doi: 10.1016/j.tox.2015.01.002.
29. Kabir E. R., Rahman M. S., Rahman I. A. review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2015. Jul;40. P. 241–258. doi: 10.1016/j.etap.2015.06.009.
30. Vandenberg L. N., Hunt P. A., Gore A. C. Endocrine disruptors and the future of toxicology testing – Lessons from CLARITY-BPA. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2019. Jun;15(6). P. 366–374. doi: 10.1038/s41574-019-0173-y.
31. Third annual forum on endocrine disruptors. Exchanging Knowledge, Identifying Challenges, Building Synergies 21-22 September 2021. p. 8–9.
32. Aitken R. J. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. *Reproduction.* 2020. Apr. 159(4). P.189–201. doi: 10.1530/REP-19-0452.

33. Sharma A., Mollier J., Brocklesby R. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reproductive Medicine and Biology*. 2020. P. 243–253. doi: 10.1002/rmb2.12326.
34. Fonseca M. I., Lorigo M., Cairrao E. Endocrine-Disrupting Effects of Bisphenol A on the Cardiovascular System: A Review. *J. Xenobiot*. 2022. Jul. 12. P. 181–213. doi: 10.3390/jox12030015.
35. Hoekstra E., Simoneau C. Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013. Vol. 53(4). P. 386–402. doi: 10.1080/10408398.2010.536919.
36. Abraham A., Chakraborty P. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health*. 2020. Jun 35(2). P. 201–210. doi: 10.1515/reveh-2019-0034.
37. Bisphenol A URL: <https://www.sigmaaldrich.com/GB/en/product/aldrich/133027>.
38. Manfo F. P., Jubendradass R., Nantia E. A., Moundipa P. F., Mathur P. P. Adverse effects of bisphenol A on male reproductive function. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 2014. № 228. P. 57–82. doi: 10.1007/978-3-319-01619-1_3.
39. Dhiman S., Dureja H. Significance of and Challenges in Regulating Endocrine Disruptors - How Regulators and Industry Can Conquer? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2020. № 20(10). P. 1664–1681. doi: 10.2174/1871530320666200606225104.
40. Lee C., Liqun L., Kuq Y., Hsieh C., Chen C. The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. *Chemosphere*. Vol. 91. 2013. P. 904-911. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.02.006.

41. Radwan E., Ibrahim M., Adel A., Farouk M. The occurrence and risk assessment of phenolic endocrine-disrupting chemicals in Egypt's drinking and source water. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020. Jan 27(2). P. 1776–1788. doi: 10.1007/s11356-019-06887-0.
42. Lassen T. H., Frederiksen H., Jensen T. K., Petersen J. H. Urinary bisphenol A levels in young men: Association with reproductive hormones and semen quality. *Environ. Health Perspect.* 2014. May. 122(5). P. 478–484. doi: 10.1289/ehp.1307309.
43. Food Packaging Forum. EFSA proposes to lower daily tolerable intake of bisphenol A. URL: <https://www.foodpackagingforum.org/news/efsa-proposes-to-lower-daily-tolerable-intake-of-bisphenol-a>.
44. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids (CEP). Lambre C., Barat Baviera J. M., Bolognesi C., Chesson A. Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA J.* 2023. 21. e06857. doi: 10.2903/j.efsa.2023.6857.
45. Pivonello C., Pivonello C., Muscogiuri G., Nardone A. Bisphenol A: an emerging threat to female fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020. P. 18–22. doi: 10.1186/s12958-019-0558-8.
46. Kurosawa T., Hiroi H., Tsutsumi O., Ishikawa T. The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr J.* 2002. Aug. 49(4). P. 465–71. doi: 10.1507/endocrj.49.465.
47. Abraham A., Chakraborty P. A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Rev Environ Health.* 2020 Jun 35(2). P. 201-210. doi: 10.1515/reveh-2019-0034.

48. Mileva G. Baker S. L., Konkle A. T. Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *Int Journal Environ Res Public Health*. 2014. № 11. P. 7537–61. doi: 10.3390/ijerph110707537.
49. Song X., Miao M., Zhou X. Bisphenol A exposure and sperm ACHE Hydroxymethylation in Men. *Int Journal Environ Res Public Health*. 2019. P. 16-152. doi: 10.3390/ijerph16010152.
50. Saal F., Vandenberg L. Update on the Health Effects of Bisphenol A: Overwhelming Evidence of Harm. *Journal Endocrinology*. 2021 № 3. P. 1–24. doi: 10.1210/endocr/bqaa171.
51. Yang Q., Sui X., Cao J. Wu corresponding author Effects of Exposure to Bisphenol A during Pregnancy on the Pup Testis Function. *J Endocrinol*. 2019. № 21. 2019. P. 67–85. doi: 10.1155/2019/6785289.
52. Nanjappa M. K., Nanjappa M. K., Simon L., The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat leydig cells. *Biol Reprod*. 2012. № 86:135. P. 1–12. doi: 10.1095/biolreprod.111.09.5349.
53. Xu L. C., Sun H., Chen J. F. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology*. 2005. № 216. P. 197–203. doi: 10.1016/j.tox.2005.08.006.
54. Liu C., Duan W. Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death Dis*. 2013. № 4. P. 676. doi: 10.1038/cddis.2013.203.
55. Chen D., Zhao X., Huang F. Pubertal Bisphenol A exposure increases adult rat serum testosterone by resetting pituitary homeostasis. *Environ Pollut*. 2022. № 1. P. 9–8. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118764.

56. Mustieles V., Ocón-Hernandez O., Mínguez-Alarcón L., Dávila-Arias C., Pérez-Lobato R. Bisphenol A and reproductive hormones and cortisol in peripubertal boys: The INMA-Granada cohort. *Sci Total Environ.* 2018. Mar 15(618). P. 1046–1053. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.09.093.
57. Grami D., Rtibi K., Selmi S., Jridi M., Sebai H., Marzouki L. Aqueous extract of *Eruca Sativa* protects human spermatozoa from mitochondrial failure due to bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol.* 2018 Dec 82. P. 103–110. doi: 10.1016/j.reprotox.2018.10.008.
58. Xiao X., Mruk D.D., Tang E. I., Wong C. K., Lee W. M. Environmental toxicants perturb human Sertoli cell adhesive function via changes in F-actin organization mediated by actin regulatory proteins. *Hum. Reprod.* 2014. Jun. 29. P. 1279–1291. doi: 10.1093/humrep/deu011.
59. Peretz J., Vrooman L., Ricke W., Hunt P., Ehrlich S. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007–2013. *Environ Health Perspect.* 2014. Aug. 122(8). P.775–786. doi: 10.1289/ehp.1307728.
60. Patisaul H., Fenton S., Aylor D. Animal models of endocrine disruption. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018 Jun. 32(3). P. 283–297. doi: 10.1016/j.beem.2018.03.011.
61. Kim J., Khan A., Cho S., Na J., Lee Y. Effect of developmental exposure to bisphenol A on steroid hormone and vitamin D3 metabolism. *Chemosphere.* 2019. Dec. 237 p. 124–469. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.124469.
62. Yuki A., Ando F., Otsuka R., Shimokata H. Low free testosterone is associated with loss of appendicular muscle mass in Japanese community-dwelling women. *Geriatr Gerontol Int.* 2015. Vol. 15 (3). P. 326–333. doi 10.1111/ggi.12278.
63. Moreman J., Lee O., Trznadel M. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and

bisphenol AF in zebrafish embryo-larvae. *Environmental Science and Technology*. 2017. № 51. P. 796–805. doi 10.1021/acs.est.7b03283.

64. Hong J., Chen F., Wang X. Exposure of preimplantation embryos to low-dose bisphenol A impairs testes development and suppresses histone acetylation of StAR promoter to reduce production of testosterone in mice. *Mol Cell. Endocrinol.* 2016. № 427. P. 97–101. doi 10.1016/j.mce.2016.03.009.

65. Tan B., Kassim N., Mohd M. Assessment of pubertal development in juvenile male rats after sub-acute exposure to bisphenol A and nonylphenol. *Toxicol Lett.* 2003. №143(3). P. 261–270. doi 10.1016/s0378-4274(03)00172-3.

66. Tyl R. W., Myers C. B., Marr M. C. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in rats. *Toxicol Sci.* 2002. № 68. P. 121–146.

67. Brouard V., Drouault M., Elie N. Effects of bisphenol A and estradiol in adult rat testis after prepubertal and pubertal exposure. *Reprod Toxicol.* 2022. № 111. P. 211–224. doi 10.1016/j.reprotox.2022.06.004.

68. Tan H., Zheng Z., Wang S., Yang L., Widelka M., Chen D. Neonatal exposure to bisphenol analogues disrupts genital development in male mice. *Environ Pollut.* 2023. Aug 1. 330. 12–17. doi 10.1016/j.envpol.2023.121783.

69. Al-Hiyasat A. S., Darmani H., Elbetieha A. M. Effects of bis-phenol A on adult male mouse fertility. *European Journal of Oral Sciences.* 2002. № 110(2). P. 163–167.

70. Tinwell H., Haseman J., Lefevre P. A. Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sei.* 2002. № 68. P. 339–348.

71. Aikawa H., Koyama S., Matsuda M. Relief effect of vitamin A on the decreased motility of sperm and the increased incidence of malformed sperm in mice exposed neonatally to bisphenol A. *Cell Tissue Res.* 2004. № 315. P. 119–124.

72. Têteau O., Carvalho A., Papillier P., Mandon-Pépin B., Jouneau L. Bisphenol A and bisphenol S both disrupt ovine granulosa cell steroidogenesis but through different molecular pathways. *J Ovarian Res.* 2023. Vol. 16(1). P.30. doi 10.1186/s13048-023-01114-4.
73. Li Y., Song T., Cai Y., Zhou J., Song X., Zhao X. Bisphenol a exposure induces apoptosis and upregulation of Fas/FasL and caspase-3 expression in the testes of mice. *Toxicol Sci.* 2009. Vol. 108. P. 427–436. doi 10.1093/toxsci/kfp024.
74. Akingbemi Benson T., Sottas Chantal M., Koulova Anna I., Klinefelter Gary R. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme. gene expression in rat leydig cells. *Endocrinology.* 2004. Vol. 145. P. 592–603. doi 10.1210/en.2003-1174.
75. Rossi G., Dufrusine B., Lizzi A., Luzi C., Piccoli A. Bisphenol A Deranges the Endocannabinoid System of Primary Sertoli Cells with an Impact on Inhibin B Production. *Int J Mol Sci.* 2020. Nov. 21(23). P. 8986. doi 10.3390/ijms21238986.
76. Czarnywojtek A., Borowska M., Dyrka K., Moskal J. The influence of various endocrine disruptors on the reproductive system. *Endokrynol Pol.* 2023. Vol. 74. № 3. P. 221–233. doi 10.5603/EP.a2023.0034.
77. Ryu D., Pang W., Adegoke E., Rahman S., Park Y. Pang M. Bisphenol-A disturbs hormonal levels and testis mitochondrial activity, reducing male fertility. *Human Reproduction Open* 2023. Nov 15. hoad044. doi 10.1093/hropen/hoad044.
78. Gupta C. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000. Ju224(2). P. 61–8. doi 10.1046/j.1525-1373.2000.22402.x.
79. Krinke G.J. ed. *The laboratory rat.* Amsterdam Elsevier-Academic Press, 2000. P. 145–152.

80. Луцик О. Д., Чайковський Ю. Б., Білий Р. О. Гістологія. Цитологія. Ембріологія: підручник для студ. стомат. ф-тів. Вінниця: Нова Книга. 2020. С. 453–459.
81. Oakberg E. F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat.* 1956. Nov. 99(3). P. 507–516. doi 10.1002/aja.1000990307.
82. Пастухова В.А. Морфологічне дослідження сперматогенезу статевозрілих щурів. *Вісник проблем біології і медицини.* 2011. Вип. 3. Том. 2(88). С. 145–146.
83. Boekelheide K., Schoenfeld H. Spermatogenesis by Sisyphus: proliferating stem germ cells fail to repopulate the testis after 'irreversible' injury. *Adv Exp Med Biol.* 2001. Vol.500. p. 421–428. doi 10.1007/978-1-4615-0667-664.
84. Rahman M. S., Kwon W. S., Karmakar P. C., Yoon S. J., Ryu B. Y., Pang M. G. Gestational Exposure to Bisphenol A Affects the Function and Proteome Profile of F1 Spermatozoa in Adult Mice. *Environ. Health Perspect.* 2017. № 125. p.238–245. doi 10.1289/EHP378.
85. Rahman M. S., Kwon W. S., Ryu D. Y., Khatun A., Karmakar P. C., Ryu B. Y., Pang M. G. Functional and Proteomic Alterations of F1 Capacitated Spermatozoa of Adult Mice Following Gestational Exposure to Bisphenol A. *J. Proteome Res.* 2018. № 17. P. 524–535. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00668.
86. Li N., Kang H., Peng Z., Wang H. F., Weng S.Q., Zeng X. H. Physiologically detectable bisphenol A impairs human sperm functions by reducing protein-tyrosine phosphorylation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2021. № 221 p. 112–418. doi 10.1016/j.ecoenv.2021.112418.

87. Liu, X.; Wang, Z.; Liu, F. Chronic exposure of BPA impairs male germ cell proliferation and induces lower sperm quality in male mice. *Chemosphere*. 2021 Jan. № 262. P.12–78. doi 10.1016/j.chemosphere.2020.127880.
88. Mostari M. H., Rahaman M. M., Akhter M. A., Ali M. H. Transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues and sperm motility. *Reprod. Toxicol.* 2022. № 109. P. 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.02.005>.
89. Galloway T., Cipelli R., Guralnik J., Ferrucci L., Bandinelli S. Daily bisphenol A excretion and associations with sex hormone concentrations: Results from the InCHIANTI adult population study. *Environ. Health Perspect.* 2010. Nov. 118 p. 1603–1608. doi: 10.1289/ehp.1002367.
90. Matuszczak E., Komarowska M. D., Debek W., Hermanowicz A. The impact of bisphenol a on fertility, reproductive system, and development: a review of the literature. *Int J Endocrinol.* 2019. Apr 10. 4068717. doi 10.1155/2019/4068717.
91. Williams C, Maria B, Dimitry KN, Cory T. Gestational bisphenol a exposure and testis development. *Endocr Disruptors (Austin)*. 2014. 2(1):e29088. doi 10.4161/endo.29088.
92. Wang Y., Wu Y., Zhang S. Impact of bisphenol-A on the spliceosome and meiosis of sperm in the testis of adolescent mice. *BMC Vet Res.* 2022. Jul 15. Vol. 18(1) p. 278. doi 10.1186/s12917-022-03336-y.
93. Takao T., Nanamiya W., Nazarloo H., Matsumoto R., Asaba K., Hashimoto K. Exposure to the environmental estrogen bisphenol A differentially modulated estrogen receptor-alpha and -beta immunoreactivity and mRNA in male mouse testis. *Life Sci.* 2003. Vol. 72(10). P. 1159–1169. doi 10.1016/s0024-3205(02)02364-0.

94. Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch Toxicol.* 2001. Vol. 75(1). P. 42–51. doi 10.1007/s002040000204.
95. Furuya M., Adachi K., Kuwahara S., Ogawa K., Tsukamoto Y. Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by bisphenol-a. *Life Sci.* 2006. Vol. 78(15). P. 1767–1776. doi 10.1016/j.lfs.2005.08.016.
96. Vom Saal F. Triennial reproduction symposium: environmental programming of reproduction during fetal life: effects of intrauterine position and the endocrine disrupting chemical bisphenol A. *J Animal Sci.* 2016. Vol. 94. P. 2722–2736. doi 10.2527/jas. 2015-0211.
97. Wang H., Ding Z., Shi Q., Ge X., Wang H., Li M. Anti-androgenic mechanisms of bisphenol a involve androgen receptor signaling pathway. *Toxicology.* 2017. Jul 15(387). P. 10-16. doi 10.1016/j.tox.2017.06.007.
98. Scott J. V., Dziuk P. J. Evaluation of the electroejaculation techniques and spermatozoa thus obtained from rats, mice and guinea pigs. *Anat Record.* 1959. Vol. 133. P. 655–664.
99. Birnbaum D., Hall T. An ejaculation technique for rats. *Anat Record.* 1961. May 140. P. 49–50. doi 10.1002/ar.1091400107.
100. Semczuk M., Zrubek H., Geazowski H.T. Some aspects of obtaining rat semen by electroejaculation method. *Acta Physiologica Polonica.* 1977. Vol. 28(4). P. 365–368.
101. Palmer C. Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology.* 2005. Aug 64(3). P. 469–479. doi 10.1016/j.theriogenology.2005.05.032.
102. Barta M., Jakubicka I. Collection of sperm from foxes using electroejaculation under halothane anesthesia. *Vet Med (Praha).* 1989. Oct 34(10) P. 637–640.

103. Rahman M., Pang W., Ryu D., Park Y., Ryu B., Pang M. Multigenerational impacts of gestational bisphenol A exposure on the sperm function and fertility of male mice. *J Hazard Mater.* 2021. Vol. 15. P. 416:125791. doi 10.1016/j.jhazmat.2021.125791.
104. Fouad A., Refaie M. Abdelghany M. Naringenin palliates cisplatin and doxorubicin gonadal toxicity in male rats. *Toxicol Mech Methods.* 2019 vol. 29(1)/ p. 67–73. doi 10.1080/15376516.2018.1512180.
105. Zhang X., Yamamoto N., Soramoto S., Takenaka I. Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. *Arch Androl.* 2001. Vol. 46(1). P. 43–49. doi 10.1080/01485010150211146.
106. Chow E.J., Stratton K.L., Leisenring W.M., Oeffinger K.C., Sklar C.A., Donaldson S.S. Pregnancy after chemotherapy in male and female survivors of childhood cancer treated between 1970 and 1999: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *The Lancet Oncology.* 2016. Vol. 17(5). P. 567–576. doi 10.1016/S1470-2045(16)00086-3.
107. Romerius P., Ståhl O., Moëll C., Relander T., Cavallin-Ståhl E., Wiebe T. High risk of azoospermia in men treated for childhood cancer. *International journal of andrology.* 2011. Vol. 34(1). P. 69–76. doi 10.1111/j.1365-2605.2010.01058.x.
108. Aboul-Naga A.M, Hamam E.T., Awadalla A., Shokeir A.A. The protective role of l-carnitine on spermatogenesis after cisplatin treatment during prepubertal period in rats: A pathophysiological study. *Life Sciences* 2020. Vol. 258. 118242. doi 10.1016/j.lfs.2020.118242.
109. Небесна З. М., Готюр О. І. Структурно–функціональні особливості кровоносних судин і гемодинаміки яєчка у чоловіків різного віку. *Світ медицини та біології.* 2017. № 1. С. 133–136. URL: <http://nbuv.gov.ua/UJRN/Smed2017134>.

110. Хміль С. В., Майорова О. Ю., Дудчук І. В. Вплив екологічних факторів на якісні та кількісні параметри еякуляту чоловіків (літературний огляд). Вісник Вінницького національного медичного університету. 2019. Т. 23. №3. С. 530–534. doi: 10.31393/. reports-vnmedical-2019-23(3)-32.
111. Grün F., Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology*. 2006. Vol. 147. № 50. P. 55. doi 10.1210/en.2005–1129.
112. Newbold R. R., Padilla-Banks E., Snyder R. J., Jefferson W. N. Developmental exposure to estrogenic compounds and obesity *Birth. Defects. Res. A Clin. Mol. Teratol.* 2005. Vol. 73. P. 478–480. doi 10.1002/bdra.20147.
113. Baillie-Hamilton P. F. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic *J. Altern. Complement. Med.* 2002. Vol. 8. P. 185–192. doi 10.1089/107555302317371479.
114. Shankar A., Teppala S., Sabanayagam C. Urinary bisphenol A levels and measures of obesity: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2008. *ISRN Endocrinol.* 2012. 965243. doi 10.5402/2012/965243.
115. Trasande L., Attina T.M., Blustein J. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA.* 2012. Vol. 308. P. 1113–1121. doi 10.1001/2012.jama.11461.
116. Лялина А. Ю., Хмель Е.С., Бондаренко Н. А., Силкина Ю. В., Ярошенко Д. С. Влияние бисфенола А на структуру и функцию внутренних органов. *Azerbaijan medical journal.* 2021. № 4. с. 151–158. <https://doi.org/10.34921/amj.2021.4.022>.
117. Ярошенко Д.С. Вплив бісфенолу А на чоловічу фертильність. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2023. № 4(56). С. 177–181. doi: 10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14314.

118. Бондаренко О. О., Ярошенко Д. С. Морфологічні особливості змін у сім'яниках під дією бісфенолу А Новини і перспективи медичної науки : зб. мат. XXIII конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І. В., Бондаренко Н. С.]. Дніпро. 2023. С. 109.
119. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей: Конвенція Ради Європи від 18.03.1986. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text.
120. Carro-Juárez M., Rodríguez-Santiago M., Franco M., Hueletl-Soto M. Aphrodisiac Activity of the Aqueous Crude Extract of Purple Corn (*Zea mays*) in Male Rats. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*. 2017. 22(4). P. 637–645. doi: 10.1177/. 2156587217708521.
121. Benavides F., Sutovsky P., López V., Kennedy C. Semen Parameters of Fertile Guinea Pigs (*Cavia porcellus*) Collected by Transrectal Electroejaculation. *Animals*. 2020. Vol. 10. P. 767. doi: 10.3390/ani10050767.
122. Swanson W. F., Bateman H. L., Vansandt L. M. Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reprod Dom Anim*. 2017. Vol. 52 (2). P. 255–260. DOI 10.1111/rda.12863.
123. McCoy M., Montonye D., Bryda E. Electroejaculation of chimeric rats. *Lab Anim (NY)*. 2013 vol. 42(6). P. 203–205. doi 10.1038/labani.301.
124. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen - 6th ed. World Health Organization. Geneva. Switzerland. 2021. 276 p. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>.
125. Monteiro J., Matta S., Predes F., Paula T. Testicular morphology of adult wistar rats treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. leaf infusion. *Braz Arch Biol Technol*. 2012 vol. 55(1). P. 101–105. doi: 10.1590/S1516-89132012000100013.

126. Parkinson C., O'Brien A., Albers T., Simon M., Clifford C., Pritchett-Corning K. Diagnostic Necropsy and Selected Tissue and Sample Collection in Rats and Mice. *J Vis Exp*. 2011. Vol. 54. 2966. doi: 10.3791/2966.
127. Павлюк М. В., Вовк С. О. Вікова динаміка розвитку і формування сім'яників бугайців чорно-рябої породи. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького Том 12 № 2 (44) Частина 3*, 2010. С 171.
128. *Методики морфологічних досліджень: монографія; за ред. М. М. Багрія, В. А. Діброви. Нова Книга, 2016. 328 с.*
129. Dey P. *Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology 1st ed.* Singapore: Springer. 2018. 300 p.
130. Hess R. A, Moore B. J. Histological methods for evaluation of the testis. *Methods in toxicology*. 1993. № 4. P. 52–85. doi: 10.1016/B978-0-12-461207-5.50008-0
131. Gartner L.P. *Textbook of histology. 5th ed.* Philadelphia. Elsevier. 2020. P. 519–545.
132. Mulisch M., Welsch U. *Romeis Mikroskopische Technik (German Edition).* Springer Spektrum. December. 2015. 621 p.
133. Пославська О. В. *Методологія використання програмного забезпечення для аналізу цифрових мікрофотографій на базі курсу патоморфології з метою підвищення професійного рівня студентів і науковців.* *Morphologia*. 2015. Т. 9. № 3. С. 122–126.
134. Tony J. C. *ImageJ for microscopy.* *BioTechniques*. 2007. Vol. 43(1). P. 25-30.
135. Schindelin J., Rueden C. T., Hiner M. C., Eliceiri K. W. *The ImageJ ecosystem: an open platform for biomedical image analysis.* *Mol. Reprod. Dev.* 2015. Vol. 2015. P. 1–12.

136. Shetty G., Wilson G., Huhtaniemi I., Shuttlesworth G.A., Reissmann T., Meistrich M.L. Gonadotropin releasing hormone analogs and testosterone inhibits the recovery of spermatogenesis in irradiated rats. *Endocrinology*. 2000. Vol. 141. P. 1735–1745. doi: 10.1210/endo.141.5.7446.
137. Грицуляк Б. В, Грицуляк В. Б, Пастух М. Б, Івасюк І. Й. Характер відновних процесів в яєчку щурів у різні терміни після припинення алкоголізації. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2014. Вип. 21. № 1112. с. 111–115.
138. Dai M., Hall S., Vantangoli Policelli M., Boekelheide K., Spade D. Spontaneous testicular atrophy occurs despite normal spermatogonial proliferation in a Trp53 knockout rat. *Andrology*. 2017. Nov. 5(6). P. 1141–1152. doi: 10.1111/andr.12409.
139. Yunagimachi R., Mastroianni G., Biggers J. D. Fertilization and embryonic development in vitro. New York: Plenum press. 1981. 81 p.
140. Thomas L. *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. Frankfurt. Germany: TH-Books Verlagsgesellschaft. 1998. 1727 p.
141. Коваленко В. М., Ткаченко О. Є., Шаяхметова Г. М., Матвієнко А. В. Вплив метформіну на морфофункціональні характеристики сім'яників щурів за метаболічного синдрому, що розвинувся в ювенільному віці. *Фармакологія та лікарська токсикологія*, № 2 (58). 2018. С 32–40.
142. George D., Mallery P. *IBM SPSS Statistics 27 Step by Step: A Simple Guide and Reference 17th Edition*. Taylor & Francis Ltd. 2022. 404 p.
143. Sharma A. K. *Text book of Correlations and Regression*. Discovery Publishing House. 2017. 212 p.

144. Ярошенко Д. С. Аналіз морфологічних змін в сім'яниках за умов тривалого впливу бісфенолу А. Перспективи та інновації науки. 2024 № 2(36). P. 1319–1327. doi: 10.52058/2786-4952-2024-2(36)-1319-1327.
145. Ярошенко Д. С. Зміна маси тіла та фізіологічного стану сім'яників під впливом бісфенолу А. Перспективи та інновації науки. 2024 № 3(37). С. 1562–1570. doi: 10.52058/2786-4952-2024-3(37)-1562-1570.
146. Ярошенко Д. С., Бондаренко О. О. Морфологічні особливості змін у сім'яниках під дією бісфенолу А. Новини і перспективи медичної науки: зб. мат. XXIII конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І.В., Бондаренко Н.С.]. Дніпро. 2023. С. 109.
147. Ярошенко Д. С. Оцінка тривалого впливу бісфенолу А на гормональний статус та фертильність Перспективи та інновації науки № 1(35) 202. С. 1067–1077. doi: 10.52058/2786-4952-2024-1(35)-1067-1077.
148. Ярошенко Д. С. Вплив бісфенолу А на морфофункціональні характеристики еякуляту. Сучасна медицина, фармація та психологічне здоров'я. 2023. Вип. № 4 (13). С. 69–74. doi: 10.32689/2663-0672-2023-4-11.
149. Yaroshenko D. S. Changes in hormonal status and fertility under the action of bisphenol A. XI International Scientific and Practical Conference. «Quality management in education and industry: experience, problems and prospects». Florence, Italy. March 18–20, 2024. P. 171.
150. Lang I.A., Galloway T.S., Scarlett A., Henley W.E., Depledge M., Wallace R.B., Melzer D. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. JAMA. 2008. Vol. 300. P. 1303-1310. doi: 10.1001/jama.300.11.1303.

151. Хмель Е. С., Лялина А. Ю., Бондаренко Н. А., Силкина Ю. В., Ярошенко Д. С. Влияние бисфенола А на структуру и функцию внутренних органов. *Azerbaijan medical journal*. 2021. № 4 p. 151–158. doi: 10.34921/amj.2021.4.022.
152. Bayasgalan G., Naranbat D., Radnaabazar J. Male infertility: Risk factors in Mongolian men. *Asian Journal of Andrology*. 2004. Vol. 6. P. 305-311.
153. Gao Z., Liu S., Tan L., Gao X., Fan W., Ding C. Testicular toxicity of bisphenol compounds: Homeostasis disruption of cholesterol/testosterone via PPAR α activation Affiliations. *Sci Total Environ*. 2022. Vol. 25. 155628. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155628.
154. Tomza-Marciniak A., Stępkowska P., Kuba J., Pilarczyk B. Effect of bisphenol A on reproductive processes: A review of in vitro, in vivo and epidemiological studies Affiliations. *J Appl Toxicol*. 2018. Vol. 38(1). P. 51–80. doi: 10.1002/jat.3480.
155. Maran R. R., Arunakaran J., Aruldas M. M. T3 directly stimulates basal and modulates LH induced testosterone and oestradiol production by rat Leydig cells in vitro. *Endocr J*, 2000. Vol. 47(4). P. 417–28. doi: 10.1507/endocrj.47.417.
156. Turner T.T., Lysiak J.J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl*. 2008. Vol.29(5). P. 488–498. doi: 10.2164/jandrol.108.005132.
157. Ventimiglia E., Capogrosso P., Colicchia M. Metabolic syndrome in white European men presenting for primary couple's infertility: investigation of the clinical and reproductive burden. *Andrology*. 2016. Vol. 4(5). P. 944–951. doi: 10.1111/andr.12232.
158. Sallmén M., Sandler D.P., Hoppin J.A., Blair A., Baird D.D. Reduced Fertility Among Overweight and Obese Men. *Epidemiology*. 2006. Vol. 17(5). P. 520–523. doi: 10.1097/01.ede.0000229953.76862.e5.

159. Wang Y., Beydoun M.A., Liang L., Caballero B., Kumanyika S.K. Will All Americans Become Overweight or Obese? Estimating the Progression and Cost of the US Obesity Epidemic. *Obesity (Silver Spring)*. 2008. Vol. 16(10). P. 2323–2330. doi: 10.1038/oby.2008.351.
160. Kasturi S. S., Tannir J., Brannigan R. E. The metabolic syndrome and male infertility *J. Androl.* 2008. Vol. 29(3)3. P. 251–259. doi: 10.2164/jandrol.107.003731.
161. Hamzeh M., Robaire B. Effect of Testosterone on Epithelial Cell Proliferation in the Regressed Rat Epididymis. *Journal of Andrology*. 2009. Vol. 30. № 2. P. 200–212. doi: 10.2164/jandrol.108.006171.
162. Franken D. R., Oehninger S. Semen analysis and sperm function testing. *Asian J Androl*. 2012. Vol.14(1) P. 6–13. doi: 10.1038/aja.2011.58.
163. Manjunatha N., Simon L., Akingbemi B. The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biol Reprod*. 2012. Vol. 86(5). P. 135. doi: 10.1095/biolreprod.111.095. /biolreprod.111.095349.
164. Pentikäinen V., Erkkilä K., Suomalainen L., Parvinen M., Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000. Vol. 85(5). P. 2057-2067. doi: 10.1210/jcem.85.5.6600.
165. Churchwell M., Camacho L., Vanlandingham M. Comparison of life-stage-dependent internal dosimetry for bisphenol A, ethinyl estradiol, a reference estrogen, and endogenous estradiol to test an estrogenic mode of action in Sprague Dawley rats. *Toxicol. Sci*. 2014. Vol. 139. № 4. P. 20. doi: 10.1093/toxsci/kfu021.
166. Desdoits-Lethimonier C., Lesné L., Gaudriault P., Zalko D. Parallel assessment of the effects of bisphenol A and several of its analogs on the adult human testis. *Hum Reprod*. 2017. Vol.32(7). P. 1465–1473. doi: 10.1093/humrep/dex093.

167. Palamarchuk M., Niyazmetov T., Halenova T., Raksha N., Maievskiy O., Dzevulska I., Zaichko K., Savchuk O., Ostapchenko L. Effect of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* venom on proteolytic balance in the tissue of the adrenal glands and testicles of rats. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)* 2022. 6(4). P. 543–549. doi: 10.4103/bbrj.bbrj_287_22.
168. Raksha N., Vovk T., Halenova T., Mudrak A., Slyeptsova I., Mudrak H., Turba L., Yaremenko L., Yanchyshyn A., Maievskiy O., Savchuk O. Influence of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii* venom on protein-peptide profile in the liver, kidneys and small intestine of rats. *Current Topics in Peptide & Protein Research*, 2022. Vol. 23, 63–72. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85150524412&origin=inward&txGid=8afab279052d5ea4c982f449fc4370a5>.
169. Palamarchuk M., Bobr A., Mudrak A., Gunas I., Maievskiy O., Samborska I., Ostapchenko L. Proteolytic Homeostasis in the Tissue of the Spleen and the Heart of Rats Injected with the Venom of *Vipera berus berus* and *Vipera berus nikolskii*. *Current Applied Science and Technology*. 2023. 23(6). doi: [10.55003/cast.2023.06.23.015](https://doi.org/10.55003/cast.2023.06.23.015).
170. Кравець О. В., Баранник С. І., Єхалов В. В., Стусь В. П., Поліон М. Ю. Патолофізіологія видільної системи при загальному ненавмисному перегріванні організму (науково-літературний огляд). *Урологія*. 2023. Т. 27. № 1–2. С. 28–36. doi:10.26641/2307-5279.27.1-2.2023.291345
171. Онул Н. М., Головкова Т. А., Шаторна В. Ф. Експериментальні дослідження ізольованого впливу свинцю та у комбінації зі сполуками цинку на організм вагітних самиць щура. *Перспективи та інновації науки*. 2024. Vol. 3(37). P. 1446–1456. doi: [10.52058/2786-4952-2024-3\(37\)-445-1456](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-3(37)-445-1456).
172. Шаторна В. Ф. Вплив важких металів на морфо-функціональний стан репродуктивної системи (огляд даних літератури). *Журнал «Перспективи та інновації науки»*.

інновації науки». 2024. № 3(37). P. 1541–1550. doi: [10.52058/2786-4952-2024-3\(37\)-1541-1550](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-3(37)-1541-1550).

173. Шаторна В.Ф., Краснов О.О. Динаміка накопичення кадмію, цинку та міді в нирках та крові щурів при ізольованому введенні кадмію та комбінованому з сукцинатами цинку та міді. Вісник проблем біології і медицини. 2022. № 4 (167). С. 242–250. doi: [10.29254/2077-4214-2022-4-167-242-250](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2022-4-167-242-250).

174. Diudiun A., Polion M., Polion N. Nosomorphosis of diseases caused by urogenital infections. Med. perspekt. 2021. Sep. 30. 26(3) 114–118. doi: [10.26641/2307-0404.2021.3.242083](https://doi.org/10.26641/2307-0404.2021.3.242083).

175. Diudiun S., Gorbuntsov V., Diudiun A., Polion N., Polion M. Urogenital malasseziosis in men: features of the clinical course and manifestations. Georgian Medical News. 2019. Vol. 292–293. P. 7–11. <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85072695445&origin=inward&txGid=cbc077381fe0938b7c9617cc7c2856ec>.

176. Поліон М.Ю. Досвід відновлення сперматогенезу при екскреторно-токсичній безплідності за допомогою комплексної фітотерапії. Урологія. 2020. Т.24. №2 (93). с. 169–174. doi: [10.26641/2307-5279.24.2.2020.208827](https://doi.org/10.26641/2307-5279.24.2.2020.208827)

177. Haider S. G. Cell biology of Leydig cells in the testis. Int Rev Cytol. 2004. Vol. 233. P. 181–241. doi: [10.1016/S0074-7696\(04\)33005-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)33005-6).

178. Hu F., Zhu Q., Sun B., Cui C., Li C., Zhang L. Smad ubiquitylation regulatory factor 1 promotes LIM-homeobox gene 9 degradation and represses testosterone production in Leydig cells. FASEB J. 2018. Vol. 32(9). P. 4627–4640. doi: [10.1096/fj.201701480R](https://doi.org/10.1096/fj.201701480R).

179. Braver-Sewradj S. P., Spronsen R., Hessel E. Substitution of bisphenol A: a review of the carcinogenicity, reproductive toxicity, and endocrine disruption

potential of alternative substances. *Crit Rev Toxicol.* 2020. Vol. 50(2). P. 128–147. doi: 10.1080/10408444.2019.1701986.

180. Нефьодова О.О., Грузд В.В., Гальперин О.І., Бойко О.В. Кадмій-індуковані зміни яєчок: актуальний погляд на сучасний стан проблеми. *Вісник проблем біології та медицини.* 2021. №1 (159). С. 297-301. doi: 10.29254/2077-4214-2021-1-159-297-301.

181. Нефьодова О.О., Грузд В.В. Експериментальний аналіз комбінованого впливу хлориду кадмію з сукцинатами цинку та заліза на морфогенез яєчка щура. *Перспективи та інновації науки (Серія «Педагогіка», Серія «Психологія», Серія «Медицина»).* 2024. №4 (38). 1363–1375. doi: [10.52058/2786-4952-2024-4\(38\)-1363-1375](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-4(38)-1363-1375)

182. Нефьодова О.О., Грузд В.В. Експериментальне вивчення динаміки морфологічних змін яєчка щура при хронічному впливі хлориду кадмію. *Morphologia.* 2023. Том 17. № 4. С. 34–39. doi: 10.26641/1997-9665.2023.4.34-40.

183. Konovalenko S., Kritsak M., Stechyshyn I., Pavliuk B. Male infertility as a consequence of endogenous and exogenous factors. *Pharmacologyonline.* 2021. Vol. 3. P. 265–274.

184. Hnatjuk M., Tatarchuk L., Kritsak M., Konovalenko S., Slabyu O., Monastyrskaya N. Morphometric assessment of peculiarities of blood vessels of the testis in experimental animals at arterial hypertension in a little circle of circulation. *Georgian. medical news.* 2021. Vol. 313. P. 163–168.

185. Konovalenko S., Kritsak M., Yasinovsky O., Pavliuk B., Stechyshyn I., Diadiun T. Quantitative morphological aspects of the study of the features of the remodeling of the hemomicrocirculatory channel of the testicles under the action of aluminum chloride. on the body. *Wiadomości Lekarskie.* 2023. Vol. 76 (12). P. 2668–2673. doi: 10.36740/WLek202312116.

186. Bostwick D.G. Urologic Surgical Pathology, 3rd Edition. Saunders. 2014. 976 P.

187. Mao J., Xu H., Wang X., Huang B., Liu Zh., Zhen J., Nie M., Min L., Wu X. Congenital combined pituitary hormone deficiency patients have better responses to gonadotrophin-induced spermatogenesis than idiopathic hypogonadotropic hypogonadism patients. *Hum. Reprod.* Vol. 30, 2015. P. 2031–2037. doi: 10.1093/humrep/dev158.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

Праці, в яких оприлюднено основні наукові результати

1. Lialina AYu., Khmel OS., Bondarenko MO., Silkina YuV., Yaroshenko DS., Kharaponova OB., Kayukova VD. The effect of bisphenol a on the structure and function of internal organs. *Azerbaijan medical journal*. 2021. № 4 p. 151-158 DOI: 10.34921/amj.2021.4.022 (Дисертантом особисто проведено науковий пошук та аналіз, порівняння та інтерпретація результатів, підготовлено матеріал для публікації).
2. Ярошенко Д.С. Вплив бісфенолу А на чоловічу фертильність. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*. 2023. № 4(56). С. 177–181. DOI 10.11603/1811-2471.2023.v.i4.14314.
3. Ярошенко Д.С. Вплив бісфенолу А на морфофункціональні характеристики еякуляту. *Сучасна медицина, фармація та психологічне здоров'я*. 2023. Вип. № 4 (13). С. 69–74. DOI 10.32689/2663-0672-2023-4-11.
4. Ярошенко Д.С. Оцінка тривалого впливу бісфенолу А на гормональний статус та фертильність. *Перспективи та інновації науки* № 1(35) 202. С. 1067–1077. DOI: [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1\(35\)-1067-1077](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1(35)-1067-1077).
5. Ярошенко Д.С. Аналіз морфологічних змін в сім'яниках за умов тривалого впливу бісфенолу А. *Перспективи та інновації науки*. 2024. № 2(36). 1319–1327. DOI: [10.52058/2786-4952-2024-2\(36\)-1319-1327](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-2(36)-1319-1327).

6. Ярошенко Д. С. Зміна маси тіла та фізіологічного стану сім'яників під впливом бісфенолу А. Перспективи та інновації науки. 2024 № 3(37). С. 1562–1570. DOI 10.52058/2786-4952-2024-3(37)-1562-1570.

Праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Ярошенко Д. С. Вплив бісфенолу А на чоловічу репродуктивну систему. Концептуальні шляхи розвитку науки та освіти (частина II): матеріали IV Міжнародної науково-практичної конференції м. Львів, 13-14 грудня 2021 року. Львів: Львівський науковий форум. 2021. С. 31–32.
2. Сілкіна Ю. В., Ярошенко Д. С. Патологічні зміни у сім'яниках під дією бісфенолу А. Новини і перспективи медичної науки: зб. мат. XXII конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І. В., Бондаренко Н. С.]. Дніпро. 2022. С. 47–48. *(Дисертантом особисто проведено забір матеріалу, опис, аналіз та узагальнення результатів дослідження)*.
3. Ярошенко Д. С. Статева поведінка щурів-самців після тривалої дії бісфенолу А. Нове та традиційне у дослідженнях сучасних представників медичної науки: збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 25–26 лютого 2022 року). Львів: ГО «Львівська медична спільнота». 2022. С. 97–99.
4. Ярошенко Д. С. Життєздатність сперматозоїдів самців щурів за умови тривалої дії бісфенолу А. Міжвузівська конференція молодих вчених та студентів «Медицина третього тисячоліття». Харківський національний медичний університет 13–15.02.2023 р. С. 396–397.
5. Ярошенко Д. С. Морфологічні особливості сперматозоїдів самців щурів за умови тривалої дії бісфенолу А. The Vth International scientific and practical conference. «Progressive research in the modern world» 1–3.02.2023. Boston, USA С. 115–116.

6. Бондаренко О. О., Ярошенко Д. С. Морфологічні особливості змін у сім'яниках під дією бісфенолу А. Новини і перспективи медичної науки : зб. мат. XXIII конф. студ. та мол. учених: [під ред. Твердохліба І. В., Бондаренко Н. С.]. Дніпро. 2023. С. 109. *(Дисертантом особисто проведено забір матеріалу, опис, аналіз та узагальнення результатів дослідження).*
7. Ярошенко Д. С. Особливості змін еякуляту за умов тривалого впливу бісфенолу А. Теорія та практика сучасної морфології: матеріали Сьомої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (м. Дніпро, 1–3 листопада 2023 року). Дніпровський державний медичний університет. Дніпро: ДДМУ. 2023. С. 141–142.

АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Директор
 КНП "ЦПМД" Новоолександрівської сільської ради"
 Сергій СОТНИК
 « 16 » 01 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. «Розвиток та функціонування сім'яників в умовах тривалої дії бісфенолу А»
 (назва пропозиції для впровадження)
2. Дніпровський державний медичний університет, м. Дніпро, вул. Вернадського, 9 49000, Ярошенко Д.С.
 (установа-розробник, її поштовий адрес, ПІБ авторів)
3. Джерело інформації: Ярошенко Д.С. Вплив бісфенолу А на морфофункціональні характеристики еякуляту, Сучасна медицина, фармація та психологічне здоров'я. 2023. Вип. № 4 (13)
 (назва, рік видання методичних рекомендацій, інформаційного листа, вихідні данні статті, № патенту тощо)
4. Впроваджено за 2023 р. в діагностичний процес амбулаторії
 (назва лікувально-профілактичної або учбово-наукової установи)
5. Строки впровадження: 1.08.2023–1.12.2023 р.
6. Загальна кількість спостережень: 25
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3) дозволяє зробити прогноз найбільш вірогідного перебігу патологічного процесу сперматогенезу чоловіків, та контролювати рівень безплідності подружніх пар за чоловічим фактором, проводячи відповідні лікувально – профілактичні заходи.
8. Зауваження, додатки немає.

« 16 » 01 2024 р.

Відповідальний за впровадження
 Завідувач Новоолександрівської АЗПСМ


 (посада, підпис)

Дар'я БОЙКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Директор
 КНП "ЦПМД" Новоолександрівської сільської ради"

 Сергій СОТНИК
 « 07 » 03 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. «Розвиток та функціонування сім'яників в умовах тривалої дії бісфенолу А»
 (назва пропозиції для впровадження)
2. Дніпровський державний медичний університет, м. Дніпро, вул. Вернадського, 9
49000. Ярошенко Д.С.
 (установа-розробник, її поштовий адрес, ПІБ авторів)
3. Джерело інформації: Ярошенко Д.С. Оцінка тривалого впливу бісфенолу А на
 гормональний статус та фертильність.
 Перспективи та інновації науки № 1(35) 202. С. 1067–1077. DOI:
[https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1\(35\)-1067-1077](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1(35)-1067-1077)
 (назва, рік видання методичних рекомендацій, інформаційного листа, вихідні данні
 статті, № патенту тощо)
4. Впроваджено за 2023–2024 р. в діагностичний процес амбулаторії (назва
лікувально-профілактичної або учбово-наукової установи)
5. Строки впровадження: 1.12.2023 –20.02.2024
6. Загальна кількість спостережень: 30
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі
 інформації (п.3) дозволяє виявити ранні ознаки порушення фертильності у чоловіків
та призначати відповідні лікувально - профілактичні заходи для боротьби з
чоловічим безпліддям.
8. Зауваження, додатки немає.

« 07 » 03 2024 р.

Відповідальний за впровадження
 Завідувач Волоської АЗПСМ

Валентина ПАРАСОВЧЕНКО

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Медичний директор
 КНП "Устинівської лікарні
 УСТИНІВСЬКОЇ СЕЛИЩОЇ РАДИ"


 Максим ТАРАНЕНКО
 « 05 » Серпень 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. «Розвиток та функціонування сім'яників в умовах тривалої дії бісфенолу А»
(назва пропозиції для впровадження)
2. Дніпровський державний медичний університет, м. Дніпро, вул. Вернадського, 9 49000, Ярошенко Д.С.
(установа-розробник, її поштовий адрес, ПІБ авторів)
3. Джерело інформації: Ярошенко Д.С. Оцінка тривалого впливу бісфенолу А на гормональний статус та фертильність. Перспективи та інновації науки № 1(35) 2024. С. 1067–1077. DOI: [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1\(35\)-1067-1077](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1(35)-1067-1077)
(назва, рік видання методичних рекомендацій, інформаційного листа, вихідні дані статті, № патенту тощо)
4. Впроваджено за 2023–2024 р. в діагностичний процес амбулаторії (назва лікувально-профілактичної або учбово-наукової установи)
5. Строки впровадження: 1.12.2023 –20.02.2024
6. Загальна кількість спостережень: 30
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3) дозволяє виявити ранні ознаки порушення фертильності у чоловіків та призначати відповідні лікувально - профілактичні заходи для боротьби з чоловічим безпліддям.
8. Зауваження, додатки немає.

«05» Серпень 2024 р.

Відповідальний за впровадження
 Лікар хірург КНП "УЛ УСР"




 Олександр МИХАЙЛОВ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Медичний директор
 КНП «Широківський центр ПМД»

 Марина КОКУЛ
 3 2024 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. «Розвиток та функціонування сім'яників в умовах тривалої дії бісфенолу А»
 (назва пропозиції для впровадження)
2. Дніпровський державний медичний університет, м. Дніпро, вул. Вернадського, 9 49000, Ярошенко Д.С.
 (установа-розробник, її поштовий адрес, ПІБ авторів)
3. Джерело інформації: Ярошенко Д.С. Оцінка тривалого впливу бісфенолу А на гормональний статус та фертильність.
 Перспективи та інновації науки № 1(35) 202. С. 1067–1077. DOI: [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1\(35\)-1067-1077](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-1(35)-1067-1077)
 (назва, рік видання методичних рекомендацій, інформаційного листа, вихідні данні статті, № патенту тощо)
4. Впроваджено за 2023–2024 р. в діагностичний процес амбулаторії (назва лікувально-профілактичної або учбово-наукової установи)
5. Строки впровадження: 1.12.2023 – 20.02.2024
6. Загальна кількість спостережень: 30
7. Ефективність впровадження у відповідності з критеріями, викладеними в джерелі інформації (п.3) дозволяє виявити ранні ознаки порушення фертильності у чоловіків та призначати відповідні лікувально - профілактичні заходи для боротьби з чоловічим безпліддям.
8. Зауваження, додатки немає.

«06» 03 2024 р.

Відповідальний за впровадження
 Лікар ЗПСМ Широківської АЗПСМ



Тетяна КИРИЧУК