

Оцінка ефективності наночастинок ортованадату гадолінію для коригування неонатально індукованої репродуктопатії у самців щурів

І.О. Белкіна¹, Н.П. Смоленко¹, В.К. Клочков², Ю.В. Малюкін², Е.С. Чистякова¹, Н.О. Карпенко¹, Ю.І. Караченцев¹

¹ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», Харків; ²ДУ «Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України», Харків; e-mail: chistelina@i.ua; nina_karpenko@mail.ru

Вивчали ефективність наночастинок ортованадату гадолінію (НЧ GdVO₄) для коригування розладів чоловічої репродуктивної функції на моделі неонатально індукованої репродуктопатії. Нащадки інтактних щурів-батьків з 3-ї по 22-гу добу життя на тлі емоційного стресу («Maternal separation stress») отримували надмірну кількість суміші фітоестрогенів (ФЕ) з молоком матері (1-ша група). У віці 10 міс самцям 1-ї групи упродовж 70 діб з кормом вводили НЧ GdVO₄ у дозі 0,33 мг/кг (2-га група) або референтний препарат спеман у дозі 158 мг таблеткової маси на 1 кг маси тіла (3-тя група). Досліджено статеву поведінку й фертильність самців, розраховано інтегральний показник репродуктивного потенціалу (Фі) порівняно з контрольною групою, які отримували розчинник (вода). У 1-ї групи статеву поведінку самців характеризувалася прискоренням спарювальних реакцій на самицю (дворазове скорочення латентності садок та інтромісії) та зниженою спроможністю до завершення парування еякуляцією та початку другого туру копуляції. Самці цієї групи запліднювали менше самиць (67 щодо 91 % у контролі), які майже всі завагітніли. Неонатально індуковане погіршення якості статевих клітин зумовило більші ніж двократне зростання внутрішньоутробних втрат у вагітних і зменшення загальної кількості плодів у самиці (на 21 %). Це визначило зменшення Фі самців у 2,6 раза порівняно з контролем. Застосування НЧ GdVO₄ відновило показники статевої поведінки самців до рівня контрольної групи, що спричинило зростання кількості запліднених самиць (до 95 %). У вагітних самиць на тлі зменшення рівня внутрішньоутробних втрат (до 15,2 щодо 18,1 % у контролі, P<0,05) на 25 % (P<0,05) зростає кількість плодів, що свідчить про підвищення якості сперматозоїдів. Показник Фі збільшився до 8,3±0,5 відносно 3,0±0,3 од. у 1-ї групі, що було статистично достовірно вище, ніж у контрольній та 3-ї групах. Застосування НЧ GdVO₄ у щурів з патологією репродуктивної функції та метаболічними розладами, що індуковані неонатально, нормалізує статеву поведінку, відновлює фертильність та підвищує репродуктивний потенціал ефективніше за референтний препарат спеман.

Ключові слова: неонатальний стрес; фітоестрогени; наночастинок рідкоземельних металів; самці щурів; репродуктивний потенціал.

ВСТУП

Нині найбільш актуальною є проблема чоловічої гіпофертильності. За даними різних дослідників у 30-40 % випадків причиною подружнього непліддя є порушення статевої функції у чоловіка, з яких приблизно 30 % становить так зване ідіопатичне непліддя [1, 2]. Крім того, існує тенденція до пізнього

© І. О. Белкіна, Н. П. Смоленко, В. К. Клочков, Ю. В. Малюкін, Е. С. Чистякова, Н. О. Карпенко, Ю. І. Караченцев

входження у вік батьківства як жінками, так і чоловіками [3, 4], тобто «старіння» репродуктивної функції є додатковим негативним чинником гіпофертильності.

Для розвинених країн, де зростають темпи депопуляції [5], важливою є розробка препаратів, спроможних позитивно впливати на чоловічу репродуктивну функцію та підвищувати якість життя у пізньому зрілому

віку. Сучасна терапія зазвичай застосовує екзогенні гонадотропіни, антиестрогени, препарати тестостерону, вітаміни [6], що нерідко ускладнюється визначенням адекватної дози, протипоказаннями та побічними ефектами [7]. Існуючі терапевтичні засоби для лікування гіпофертильності мало ефективні, а сучасні допоміжні репродуктивні технології мають завищу ціну.

Це є підставою для пошуку нових напрямків створення препаратів для корекції розладів репродуктивної функції чоловіків. В останні десятиріччя накопичуються дані про роль інсуліну у фізіології репродуктивної системи [8, 9]. Останній за допомогою найвищих регуляторних механізмів (гонадотропний рилізінг-гормон та гонадотропні гормони) діє на стероїдо- й гаметогенез і впливає на плідність самців, посилюючи рухливість сперматозоїдів, збільшуючи продукування NO та підвищуючи чутливість акросомальної реакції до специфічних стимулів [10, 11].

З'являється все більше доказів, що такі стани, як цукровий діабет 1-го й 2-го типів, інсулінорезистентність можуть бути причетними до поширеності репродуктопатій у осіб репродуктивного та працездатного віку [12]. Цілком вірогідно, що використання інсуліноміметиків та інсулінсенситайзерів буде сприяти відновленню порушеної репродуктивної функції й плідності. У цьому сенсі увагу привертають ванадійовмісні сполуки, проте вони токсичні [13, 14] та мають слабку адсорбцію у шлунково-кишковому тракті. На відміну від загальноприйнятого у світі пошуку біологічно активних речовин у напрямку дослідження чотиривалентних солей та органічних ванадилів [15], перспективним є використання унікальних властивостей сполук ванадію у наноформі завдяки змінам біодоступності наноречовини. Раніше ми показали, що за умов тривалого надходження наночастинок ортованадату гадолінію (НЧ $GdVO_4$) у старіючих самців стимулюється стероїдогенез (тестостерон) та сперматогенез на тлі гальмування розвитку вікової гіпер-

глікемії та зростання маси тіла [16].

Мета роботи – визначення ефективності НЧ $GdVO_4$ для коригування розладів чоловічої репродуктивної функції на моделі неонатально індукованої репродуктопатії.

МЕТОДИКА

Експериментальні роботи з тваринами виконували відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, котрі використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [17]. Для дослідження ефективності НЧ $GdVO_4$ (20-40 нм) у новонароджених щурят було відтворено модель неонатальної патології введенням фітоестрогенів (ФЕ) на тлі емоційного стресу – 1-ша група [18]. Усього у досліді було задіяно 55 самців і 78 самиць щурів популяції Вістар з розплідника інституту.

Самці по досягненні 10-місячного віку протягом 70 діб натще отримували з кормом НЧ $GdVO_4$ у дозі 0,33 мг/кг (2-га група) та препарат порівняння спеман, який містить складну рослинну композицію (стимулює сперматогенез та призначається у випадках гіпофертильності чоловіків [19]) у дозі 158 мг таблеткової маси на 1 кг маси тіла (3-тя група) [20]. Об'єм розчину корегували щотижня з урахуванням змін маси тіла тварин. Інтактні тварини відповідного віку, які отримували розчинник (вода) у відповідному об'ємі, увійшли до контрольної групи.

Після формування у самців статевого досвіду у присмерковий час впродовж 15 хв досліджували статеву поведінку у парних тестах з рецептивною самицею після оваріектомії за часовими та кількісними показниками садок, інтромісії та еякуляцій. Розраховували тривалість постеякуляторного рефрактерного періоду.

Фертильність самців вивчали згідно з загальноприйнятою методикою [21] за

результатами парування з інтактними здоровими самицями. Розраховували індекси запліднення та вагітності; рівень загальних внутрішньоутробних втрат на 20-ту добу вагітності. Крім того, оцінювали репродуктивний потенціал самців за розрахунковим показником середньої реалізованої плідності (фертильності) самців (Φ_i) за рівнянням:

$$\Phi_i \pm S_{\Phi_i} = \frac{N_2 \times N_3 \times (N_4 \pm S_{N_4})}{N_1 \times N_1} = \frac{N_2 \times N_3 \times N_4}{N_1 \times N_1} \pm \frac{N_2 \times N_3 \times S_{N_4}}{N_1 \times N_1}$$

де: N_1 – кількість самиць у групі; N_2 – кількість запліднених самиць; N_3 – кількість вагітних самиць; N_4 – середня кількість плодів у самиці; S_{N_4} – помилка середнього арифметичного кількості плодів у самиці [22].

Щурів утримували у стандартних умовах віварію при природному освітленні, раціоні та питному режимі *ad libitum* [23]. По закінченні експерименту їх швидко декапітували. Самиць вводили в легкий тіопентал натрієвий наркоз, а самців не наркотизували для запобігання змін вмісту статевих гормонів.

Отримані результати відповідали закону нормального розподілу, тому наведені як середнє арифметичне та його похибка. Статистичну вірогідність відмінностей між групами оцінювали із застосуванням критеріїв *t* Стьюдента та χ^2 -квадрат за допомогою програми Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз показників статевої поведінки самців 1-ї групи виявив стимулювання ініціації парування, що виражалось у скороченні у 2 рази латентних періодів садок (54 ± 16 с щодо 111 ± 21 с у контролі; $P < 0,05$) та майже 2,5 рази інтромісії (55 ± 16 с щодо 135 ± 37 с у контролі; $P < 0,05$). Це означає, що у дослідних тварин стан статевого потягу (аналог лібідо у людини) був сильнішим, ніж у контролі, але досягти кінцевого елемента спарювальної поведінки – еякуляції, та розпочати другий

тур спарювання був спроможний лише один самець з восьми. Тобто навіть при швидкому початку спарювання дослідні тварини не встигали за час тесту провести повноцінний статевий акт, що свідчить про зростання латентності еякуляції.

Послаблення статевої активності у самців щурів 1-ї групи призводить до погіршення фертильності та плідності. Це виявилось у вірогідному зниженні частки запліднених інтактних самиць до 67 % порівняно з таким у контролі (91 %), хоча майже усі запліднені самиці цієї групи виявилися вагітними (93 відносно 100 % у контролі). На їх розтині зафіксовано вірогідне зменшення (на 21 %) загальної кількості плодів (таблиця) за рахунок зростання відсотка внутрішньоутробних втрат більш ніж в 2 рази порівняно з таким у контролі (рис. 1). Значення Φ_i у самців 1-ї групи було нижче за контрольні у 2,6 рази ($P < 0,05$; рис. 2). Отже, стресування та фітоестрогенізація щурят чоловічої статі у неонатальний період призводить до репродуктивних порушень у дорослому віці. Аномальні сперматозоїди порівняно з морфологічно нормальними статевими клітинами мають нижчу запліднювальну здатність. Це зумовлено як меншою їх здатністю до penetрації ооцитів, так і змінами в реакції гіперактивації, капацитації та акросомної реакції. У таких сперматозоїдах частіше рееструються аномалії хроматину, а інколи – збільшення рівня структурних хромосомних аберацій, що надалі може негативно впливати на наступний розвиток ембріонів або взагалі на настання вагітності після запліднення [24, 25].

Відомо, що лікування пацієнтів з так званою ідіопатичною гіпофертильністю, за якої неможливо встановити причини розладу, викликає особливу складність. Використана в експерименті модель неонатально індукованої гіпофертильності, на яку отримано патент [18], достатньо повно відтворює такий стан. Зокрема, у дорослих самців на тлі нормальної вікової концентрації статевих гормонів, показників спермограми, гормональної функ-

Показники перебігу вагітності інтактних самок, запліднених самцями з неонатальною патологією, які отримували наночастинки ортованадату гадолінію ($\bar{x} \pm S \bar{x}$)

Показник	Інтактні тварини (n=28)	Самці з неонатальною патологією (n=13)	Самці з неонатальною патологією, які отримували наночастинки ортованадату гадолінію (n=20)	Самці з неонатальною патологією, які отримували спеман (n=17)
Кількість плодів у приплоді (загальна)	9,0±0,4	7,2±0,8*	9,6±0,6**	8,8±0,8
самиць	4,1±0,4	3,3±0,4	4,8±0,6**	4,5±0,5
самців	4,9±0,3	3,9±0,6	4,9±0,6	4,4±0,5
Відношення самиць до самців	1,1±0,2	1,0±0,2	1,4±0,3	1,4±0,3
Маса плодів, г				
самиці	2,1±0,0	2,1±0,0	2,1±0,1	2,1±0,1
самці	2,3±0,0	2,2±0,0	2,2±0,2	2,4±0,1
Довжина плодів, мм				
самиці	30,2±0,3	30,8±0,4	29,9±0,3	29,9±0,3
самці	31,3±0,3	31,6±0,4	31,5±0,2	31,4±0,4
Ано-генітальна відстань у плодів, мм				
самиці	1,1±0,0	1,1±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0
самці	2,9±0,0	2,9±0,0	3,0±0,0	2,9±0,1

* P<0,05 відносно контролю, ** P<0,05 відносно групи тварин з неонатальною патологією; n – кількість приплодів

ції кори надниркових та щитоподібної залоз реєстрували погіршення запліднювальної здатності; більший рівень загибелі зародків у вагітних самиць, запліднених цими самця-

ми; зниження Фі самців на 69,2 % [26]. Крім того, вони відрізняються від інтактних тварин більшою масою тіла (майже на 20 %), що збігається з підвищеним вмістом глюкози натще

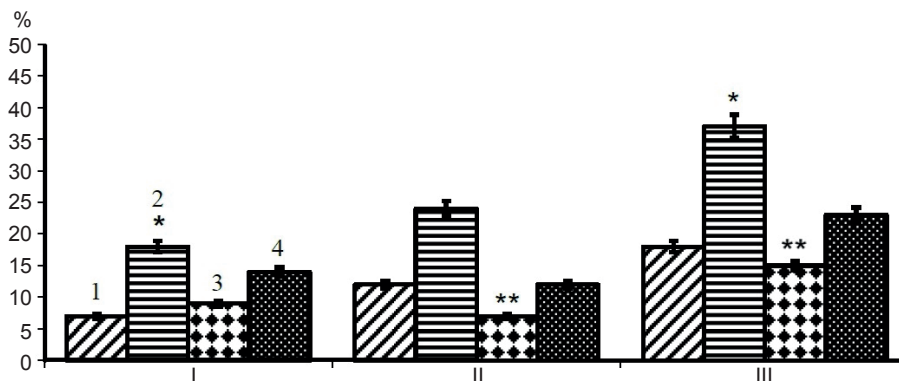


Рис. 1. Внутрішньоутробна загибель плодів самиць, запліднених самцями з неонатальною патологією, які отримували наночастинки ортованадату гадолінію: I – преімплантаційна; II – постімплантаційна; III – загальна; 1 – інтактні тварини; 2 – самці з неонатальною патологією; 3 – самці з неонатальною патологією, які отримували наночастинки ортованадату гадолінію; 4 – самці з неонатальною патологією, які отримували спеман.

* P<0,05 відносно контролю; ** P<0,05 відносно значень у самців з неонатальною патологією

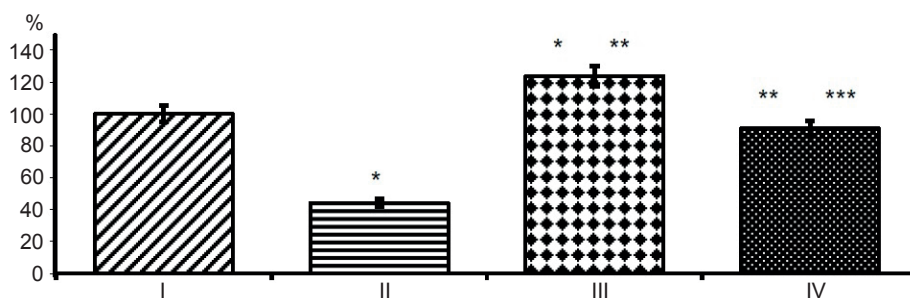


Рис. 2. Зміна інтегрального показника плідності самців з неонатальною патологією, які отримували наночастинок ортованадату гадолінію (за 100 % прийнято значення контрольної групи): I – інтактні тварини, II – самці з неонатальною патологією, III – самці з неонатальною патологією, які отримували наночастинок ортованадату гадолінію, IV – самці з неонатальною патологією, які отримували сперман. * $P < 0,05$ відносно контролю, ** $P < 0,05$ відносно значень самців з неонатальною патологією, *** $P < 0,05$ відносно значень самців з неонатальною патологією, які отримували наночастинок ортованадату гадолінію

(до $6,1 \pm 0,1$ щодо $4,7 \pm 0,3$ ммоль/л у контролі) та концентрації тригліцеридів та загального холестерину [18]. Тому вибір такої патогенетичної моделі є обґрунтованим, як такої, що поєднує метаболічні порушення та репродуктивну патологію. Можна стверджувати, що ця модель пояснює розвиток частини випадків ідіопатичної гіпофертильності у чоловіків.

Призначення НЧ $GdVO_4$ тваринам 2-ї групи вже на 56-ту добу призвело до збільшення кількості елементів залицяльної поведінки (у 2,2 рази; $P < 0,05$) та відсотка тварин (до 37,5 %), що спроможні до еякуляції. Ініціація спарювання (латентність садок та інтромісії) й час настання еякуляції у цих самців були подібні до таких у інтактних тварин. Слід зазначити, що надання тваринам НЧ $GdVO_4$ наближує статевий потяг та ініціацію спарювання до показників інтактних тварин, а також сприяє ефективності спарювання (збільшення відсотка тварин з еякуляцією). Треба акцентувати, що зміни статевої поведінки у такому напрямку спостерігалися вже на 26-ту добу. Ефект препарату порівняння сперману, який давали тваринам 3-ї групи, був подібним до того, що спостерігали при введенні шурам НЧ $GdVO_4$, тобто статистично значущих розбіжностей між групами не виявлено.

Такі ж позитивні зміни спостерігалися й у показниках фертильності та плідності. Так, у самців 2-ї групи частка запліднених ними

інтактних самиць вірогідно зросла до 95 %, що було вище, ніж у дослідних тварин без корекції (67 %), і свідчить про покращення статевої активності та якості сперматозоїдів після вживання сполуки. Ефект сперману (3-тя група) був слабкішим: частка запліднених самиць дорівнювала 86 %, що не відрізнялося від результату 1-ї групи ($P = 0,16$).

Майже усі запліднені самиці виявилися вагітними (95 та 92 % у 2-й та 3-й групах відповідно). Кількість плодів на самицю у 2-й групі збільшилася на 25 % ($P < 0,05$), а у 3-й групі – на 22 % ($P > 0,05$) порівняно зі значеннями без корекції (див. таблицю). Такі зміни пояснюються зниженням рівня загальних внутрішньоутробних втрат з 37 % у групі без корекції до 15 % у 2-й групі ($P < 0,05$) та до 23 % ($P > 0,05$) – у 3-й групі (див. рис. 1).

Загалом, і це є найголовнішим, ці зміни призвели до статистично значущого зростання Φ_i у тварин 2-ї групи – майже у 3 рази порівняно зі значенням 1-ї групи (див. рис. 2). У 3-ї групі цей показник також зріс у 1,5 рази, але різниця з тваринами, що не отримували лікування, не набувала статистичної значущості.

Згідно з нашими попередніми дослідженнями, споживання НЧ $GdVO_4$ старими самцями шурів призвело до збільшення концентрації тестостерону, активації сперматогенезу, збільшення антиоксидантної активності зрілих сперматозоїдів, зменшення індукованої

хемілюмінесценції суспензії епідидимальних сперматозоїдів у реакції Фентона [16]. Цілком можливо, що аналогічні зміни покращення якості статевих клітин відбувалися у самців щурів з неонатально індукованою патологією, що призвело до зменшення утворення аномальних зародків.

Таким чином, застосування оксидів рідкісноземельних металів (а саме $GdVO_4$) у вигляді наночастинок у самців щурів з неонатально індукованими розладами репродуктивної функції призводить до збільшення майже в 3 рази відсотка тварин, які за час тесту досягли еякуляції, до зростання на 30 % кількості запліднених самиць та сприяє їх плодючості. За своєю ефективністю, яку ми оцінювали за інтегральним показником Fi , досліджувана речовина перевищує референтний препарат спеман.

И.О. Белкина¹, Н.П. Смоленко¹, В.К. Клочков², Ю.В. Малюкин², Э.Е. Чистякова¹, Н.А. Карпенко¹, Ю.И. Караченцев¹

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ОРТОВАНДАТА ГАДОЛИНИЯ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ НЕОНАТАЛЬНО ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕПРОДУКТОПАТИИ У САМЦОВ КРЫС

Цель работы – определение эффективности наночастиц ортованадата гадолия ($NP\ GdVO_4$) для коррекции расстройств мужской репродуктивной функции на модели неонатально индуцированной репродуктопатии. Потомки интактных крыс-родителей с 3-го по 22-й день жизни на фоне эмоционального стресса («Maternal separation stress») получали избыточное количество смеси фитоэстрогенов с молоком матери (1-я группа). В возрасте 10 мес самцам в течение 70 сут с кормом давали $NP\ GdVO_4$ в дозе 0,33 мг/кг (2-я группа) или референтный препарат спеман в дозе 158 мг таблеточной массы на 1 кг массы тела (3-я группа). Исследовали половое поведение и фертильность самцов, рассчитывали интегральный показатель репродуктивного потенциала Fi в сравнении со значениями контрольной группы (вода). В 1-й группе половое поведение самцов характеризовалось ускорением половых реакций на самку (двукратное укорочение латентности садок и интромиссий) и сниженной способностью к завершению копуляций эякуляцией и началу второго тура спариваний. Самцы этой группы оплодотворяли меньше самок (67 против 91 % в контрольной группе), которые почти все забеременели. Не-

онатально индуцированное ухудшение качества половых клеток обусловило более, чем двукратное увеличение внутриутробных потерь у беременных и уменьшение общего количества плодов у самки (на 21 %). Это определило уменьшение Fi самцов в 2,6 раза по сравнению с контролем. Применение $NP\ GdVO_4$ восстановило показатели полового поведения самцов до уровня контрольной группы, что обусловило увеличение количества оплодотворенных самок (до 95 %). У беременных самок на фоне уменьшения уровня внутриутробных потерь (до 15,2 против 18,1 % в контроле) на 25 % увеличилось количество плодов, что свидетельствует об улучшении качества сперматозоидов. Показатель Fi увеличился до $8,3 \pm 0,5$ против $3,0 \pm 0,3$ ед. в группе без коррекции, что статистически достоверно выше, чем в контрольной и 3-й группах. Применение $NP\ GdVO_4$ у крыс с патологией репродуктивной функции и метаболическими нарушениями, индуцированными неонатально, нормализует половое поведение, восстанавливает фертильность и повышает репродуктивный потенциал эффективнее, чем референтный препарат спеман.

Ключевые слова: неонатальный стресс; фитоэстрогены; наночастицы редкоземельных металлов; самцы крыс; репродуктивный потенциал.

I. O. Belkina¹, N. P. Smolenko¹, V. K. Klochkov², Yu. V. Malukin², E. E. Chistyakova¹, N. A. Karpenko¹, Yu. I. Karachentsev¹

THE EFFECT OF GADOLINIUM ORTHOVANADATE NANOPARTICLES BY NEONATAL INDUCED REPRODUCTIVE DISEASE IN MALE RATS

For the purpose to develop of method for treatment of male hypofertility the efficiency of gadolinium orthovanadate nanoparticles ($NP\ GdVO_4$) in rats with neonatal induced reproductive disease, has been investigated. The progeny of intact rats parents were exposed to emotional stress («Maternal separation stress») and received an excessive amount of the blend of phytoestrogens (Ph) with mother's milk (1st group) from 3 to 22 day life. At the age of 10 months males received $NP\ GdVO_4$ (0.33 mg/kg; 2nd group) or speman (158 mg/kg; 3rd group) with feed over the 70 days. Sexual behavior and fertility of males were investigated; the integrated indicator of reproductive potential (Fi) was calculate and was estimated with the data of animals from group Control who were given vehicle (water). In the 1st group sexual behavior of males was characterized by accelerating sexual responses on female (double shortening of mounting and intromission latency) and a reduced ability to achieve ejaculation and to start the second round of copulations. The less females have been inseminated by these males (67% vs. 91% in Control group), but almost all became pregnant. As a result of the neonatal induction deterioration in the quality of male gametes intrauterine pregnancy loss increased more than twice, and the total number of foetus decreased (on 21%). These changes have led to a

reduction of the male integrated indicator of reproductive potential (Fi) in 2.6 times compared with control animals. Using a NP GdVO₄ rehabilitated male sexual behaviour indicators to Control group level, resulting in an increase in the number of fertilized females (up to 95%). In pregnant females decreased fetal losses (up to 15.2% vs. 18.1% in control, p<0,05) and increase in the number of fetuses (on 25%, p<0,05) that shows an improvement in the quality of sperm. The integrated indicator of reproductive potential (Fi) increased to (8.3 ± 0.5) vs. (3.0 ± 0.3) u. in the 1st group (without treatment), that statistically higher than in groups Control and 3rd. Application of NP GdVO₄ in rats with neonatal inductive pathology of the reproductive function and metabolic disorders normalizes sexual behaviour, the quality of sperm that restores male fertility and improves reproductive potential much more efficiently than the reference drug speman.

Key words: neonatal stress, phytoestrogens, rear-earth-based nanoparticles, male rats, reproductive potential.

¹SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of NAMS of Ukraine», Kharkov;

²Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, Kharkov; e-mail: chistelina@i.ua

REFERENCES

1. Gorpynchenko I, Nikitin O. Marriages infertility. New reality. *Man Health*. 2010; (3):184-90. [Russian].
2. Yatskiv O, Tamovska A. Causes and forms of male infertility and methods of diagnosis ejaculate, as the main indicator of male health. *Visn Lviv Univ Ser Biol*. 2012; 60:4-20. [Ukrainian].
3. Social Medicine and Health Organization. Voronenko YuV, Moskalenko VF, editor. Ternopil: Ukrmedkniga: 2000. [Ukrainian].
4. The health status of Ukraine's population and the results of the health. Kiev: 2003. [Ukrainian].
5. Eberhardt P. Distribution and dynamics of rural population in Central Eastern Europe in the 20th century. *Geogr Pol*. 1994. (63):75-94.
6. Tiktinskiy OL, Mihaylichenko VV, *Andrology*. Sankt-Peterburg: Mediapress: 1999. [Russian].
7. Kulakov VI. Infertile marriage. Current approaches to diagnosis and treatment. Eds VI Kulakov. Moscow: GAOTAP-Media: 2005. [Russian].
8. Baccetti B, LaMarca A, Piomboni P, et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod*. 2002;17:2673-7.
9. Shrivastav P, Swann J, Jeremy JY, Thompson C, Shaw RW, Dandona P. Sperm function and structure and seminal plasma prostanoid concentrations in men with IDDM. *Diabetes Care*. 1989;12:742-4.
10. Schoeller EL, Schon S, Moley KHM. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis. *Cell Tissue Res*. 2012;349(3):839-47.
11. Lampiao F, Du Plessis SS. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide

- production. *Asian J Androl*. 2008;10:799-07.
12. Luchitskij YeV, Tronko ND. Androgen deficiency states in men with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: pathogenetic role and the possibility of correcting. In: Luchitskij YeV, Bondarenko VA, editor. *Selected lectures on clinical andrology*. Kiev, Harkiv: Nova Soft: 2010. p. 115-43. [Ukrainian].
13. Domingo JL. Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects. *Biol Trace Elem Res*. 2002;88(2):97-112.
14. Morgan AM, El-Tawil OS. Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacol Res*. 2003; 47(1):75-85.
15. Crebelli R, Leopardi P. Long-term risks of metal contaminants in drinking water: a critical appraisal of guideline values for arsenic and vanadium. *Ann Ist Super Sanita*. 2012;48(4):354-61.
16. Karpenko NA, Malukin YV, Koreneva EM, Klochkov VK, Kavok NS, Smolenko NP, Pochernyaeva SS. The Effects of Chronic Intake of Cerium Dioxide or Gadolinium Ortovanadate Nanoparticles in Aging Male Rats: 3-rd Proceedings of the international conference nanomaterials «Applications and properties»; 2013; Sept. 16-21; Alushta the Crimea, Ukraine. p. 04NABM28-1 – 04NABM28-4.
17. Reznikov AG. General ethical principles of animal experimentation. *Endocrinology*. 2003; 8(1):142-5. [Ukrainian].
18. Karpenko N, Chistyakova E, Korenyeva Ye. Velichko N. Method simulation induced neonatal males hypofertility. *Ukraine patent US 95758*. 2015.
19. Kuzmenko VV, Alferov KV. Our experience with Speman drug: Proceedings of Scientific Conference «Men's Health»; 2003; Novem. 19-21; Moscow. p. 16. [Russian].
20. Ribolovlyev YuR. Prediction of xenobiotics on human action. *Pharmacol Toxicol*. 1991; (1): P. 110-4. [Russian].
21. Bishovets TF. Experimental study embryotoxic action of drugs guidance: methodical recommendations. In: OV Stefanov, editor. *Preclinical studies of drugs*. Kiev: Avitsena: 2001. p. 115-38. [Ukrainian].
22. Karpenko NO, Talko VV, Omelchuk ST, Lapta SS. Integral assessment of the reproductive function of male laboratory animals. *Ukr Biopharm Zh*. 2011; 13(2): 64-8. [Ukrainian].
23. Zapadnyuk IP. *Laboratory animals. Breeding, maintenance, use in experiments*. Kiev: Vischa Skola: 1983. [Russian].
24. Ingel FN, Gevorkyan NM, Ilyushina NA., Long psychomotor stress as an inducer of mutations in mammals and modifier mutagenesis. *Bull Experim Biol Med*. 1993; 116 (9):307-9. [Russian].
25. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; (82):378-83.
26. Karpenko NO, Smolenko NP, Korenyeva YeM, Chistyakova EYe, Velichko NF. Dynamics and spoluchenist age involution of some components of male reproductive function. *Probl Endocrin Patol*. 2014; (1):49-54. [Ukrainian].

Матеріал надійшов до редакції 18.12.2015.