

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИЛЕВСЬКОГО  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

**БЄЛКІНА ІННА ОЛЕГІВНА**

УДК 612.616.6+591.463.12

**ЗАСТОСУВАННЯ НАНОЧАСТИНОК ГАДОЛІНІЙ ОРТОВАНАДАТУ  
ДЛЯ КОРЕКЦІЇ РОЗЛАДІВ ЧОЛОВІЧОЇ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ  
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.01.14 – ендокринологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Харків – 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Державній установі «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України».

**Науковий керівник** кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник **Карпенко Ніна Олексіївна**, Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», завідувач лабораторії репродуктивної ендокринології

#### **Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, доцент **Тржецинський Сергій Дмитрович**, Запорізький державний медичний університет, завідувач кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки

кандидат біологічних наук **Фалюш Оксана Анатоліївна**, Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», науковий співробітник відділу ендокринології репродукції та адаптації.

Захист відбудеться «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 р. о \_\_\_\_\_ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.564.01 при Державній установі «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» (61002, м. Харків, вул. Алчевських, 10).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» (61002, м. Харків, вул. Алчевських, 10).

Автореферат розісланий «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Ж. А. Лещенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Важливість корекції чоловічої гіпофертильності визначається збільшенням частки безплідних шлюбів (до 15 %), причиною чого у 20-30 % випадків є чоловічий фактор (Agarwal A. et al., 2015). До порушень репродуктивної функції чоловіків можуть призводити різні чинники як ендогенної (генетичні, ендокринні, інфекційні, метаболічні, імунні розлади), так і екзогенної (фактори довкілля, спосіб життя) природи, які можуть знижувати фертильність поодиночі чи підсилюючи дію один одного (Поворознюк М. В., 2012). Зважаючи на чисельність факторів, здатних порушити функцію відтворення та складність виявлення причин безпліддя, в 30-40 % хворих діагностується ідіопатична гіпофертильність (Kumar R. et al., 2006; Рутінський А. І., 2013).

Доведено, що гіпофертильність може бути наслідком порушень розвитку особини на ранніх етапах онтогенезу під час критичних періодів, так звана диспрограмна гіпофертильність, – коли організм найбільш чутливий до дії різних пошкоджуючих агентів (Wilson C. A. et al., 2007). До таких чинників відносять стрес вагітних або новонароджених, який змінює гормональний фон розвитку плоду, дитини (Резніков О.Г. та співавт., 2004; Toufexis D. et al., 2014). Поширене вживання надмірної кількості рослинних фітоестрогенів (ФЕ), які є гормонально активними складовими раціону, також здатне змінити нормальну програму статевого розвитку та призвести до змін реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи дорослих нащадків, порушення морфогенезу, змін статевої поведінки та погіршення основних показників репродуктивної функції (Нікітін А. І., 2002; Гладкова А.І. та співавт., 2009; Резніков А.Г., 2014). Основні ознаки такої патології відтворює модель неонатально індукованої репродуктопатії, при якій відбувається зменшення фертильності та погіршення статевої поведінки у самців щурів на тлі нормальної концентрації статевих гормонів, незначних змін показників спермограми та метаболічних відхилень (гіпертригліцеридемія, гіперхолестеринемія, зменшення вмісту ліпопротеїдів високої щільності) (Карпенко Н.О. та співавт., 2015).

Лікування у випадках ідіопатичної гіпофертильності здійснюється головним чином емпірично, з використанням лікарських засобів різних груп або допоміжних репродуктивних технологій. Суттєвими недоліками таких дій є протипоказання, побічні ефекти, висока ціна та низька ефективність (Горпінченко І. І. та співавт., 2016). Тому існує нагальна необхідність створення нових засобів корекції репродуктивних розладів та відновлення плідності організму, порушених внаслідок несприятливих обставин під час критичних періодів онтогенезу.

У цьому сенсі одним з перспективних напрямів є застосування наноматеріалів, адже з переходом сполук у наноформу вони здатні набувати нових властивостей, змінювати біодоступність, можуть проникати через гемато-енцефалічний та гемато-тестикулярний бар'єри (Чекман І.С., 2015). Відомо, що наночастинки (НЧ) мають різноманітні біологічні ефекти, у тому числі, здатні впливати на репродуктивну функцію. Так, при використанні НЧ золота, селену, церію відмічалось підвищення рівня тестостерону (Тс), активація сперматогенезу, поліпшення фертильності (Li W.Q. et al., 2013; Kobylak N.M. et al., 2015), НЧ цинку, фулерени позитивно впливали на репродуктивну функцію щурів та мишей зі стрептозотоциновим діабетом (Afifi M. et al., 2015), показано позитивний вплив НЧ гадоліній

ортованадату, активованого європієм ( $GdVO_4:Eu^{3+}$ ), та діоксиду церію на репродуктивну функцію щурів із віковою патологією статевої функції (Karpenko N. et al., 2013; Співак Н. Я. та співавт., 2013).

Біологічна активність гадолінію досліджена недостатньо. Відомо, що він проявляє біофізичні властивості, подібні іонам  $Ca^{2+}$ , та інгібує механосенситивні іонні канали мембран клітин, що активуються розтягуванням (Adding C. et al., 2001). Переважно його використовують у складі магнітно-резонансних контрастних засобів, як радіосенсибілізатор при променевої терапії онкологічних захворювань (Lux F. et al., 2015).

Ванадій – мікроелемент, який існує в організмі у формах метаванадату чи ортованадату та ванаділу. Як його недостатність, так і надмірна кількість негативно позначається на репродуктивній функції людини та тварин. Він бере участь в процесах росту та поділу клітин, мінералізації кісток і зубів, регуляції вуглеводного та ліпідного обміну, проявляє інсуліноміметичну активність. Відомо також, що дія сполук ванадію опосередкована впливом на активність ряду регуляторних ферментів, зокрема,  $Na^+K^+$ -АТФази, фосфотирозинфосфатаз та різних кіназ (Mukherjee B. et al., 2004; Pessoa J. C. et al., 2015; Чекман І. С. та співавт., 2016).

Інсуліноподібна активність сполук ванадію є підставою вважати, що репродуктивна система є також мішенню для цього елемента. Це припущення базується на здатності інсуліну впливати на секрецію гонадотропінів, стероїдогенез, синтез у печінці глобуліну, що зв'язує статеві гормони, та гаметогенез, брати участь у регуляції капацитації сперматозоїдів, їх рухливості, акросомальній реакції. Рецептори до інсуліну виявлено у клітинах Сертолі та Лейдигу, безпосередньо на сперматозоїдах (Pitetti J. L. et al., 2013; Sliwowska J. H. et al., 2014). Можливо, саме інсуліноподібні властивості НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  обумовили зростання концентрації Тс, активацію сперматогенезу, підвищення антиоксидантного статусу сперматозоїдів у щурів віком 20-21 місяців при хронічному надходженні сполуки (Karpenko N. A. et al., 2013).

Виходячи з цього, уявляється доцільним дослідити ефективність НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  для відновлення функціональної активності статевих залоз у тварин із репродуктопатіями, а також визначити віддалені наслідки їх застосування для наступних поколінь.

У той же час повідомляється, що НЧ можуть негативно впливати на репродуктивну функцію, що пов'язано з різницею у формі, розмірі, складі НЧ та режимом їх введення (García T. X. et al., 2014), такі ефекти НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  майже не досліджені. Тому з огляду на значну тривалість терапії репродуктивних розладів, необхідним є оцінювання нешкідливості НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  як для батьківського покоління, так і для нащадків.

Таким чином, значна поширеність репродуктивних розладів внаслідок несприятливих обставин під час критичних періодів онтогенезу вимагає пошуку нових шляхів корекції чоловічої ідіопатичної гіпофертильності за допомогою нового класу сполук, а саме – серед НЧ на основі оксидів рідкісноземельних елементів, зокрема,  $GdVO_4:Eu^{3+}$ , та дослідження їхніх токсикологічних властивостей стосовно репродуктивної функції, що являє собою перспективний та актуальний напрямок досліджень.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційну роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Державної установи «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України» і вона є фрагментом НДР «Оцінка ефективності застосування наночастинок на основі діоксиду церію та ортованадатів рідкісноземельних елементів для корекції вікових змін у самців щурів на низхідній стадії онтогенезу» (№ державної реєстрації 0113 U 007510С, 2013 р.), НДР «Визначити особливості репродуктивних розладів, індукованих неонатально або локальною гіпертермією, та можливість фармакологічної корекції за допомогою тіазолініламідів камфорної кислоти» (№ державної реєстрації 0111U010494, 2012-2014 рр.), НДР «Експериментальне дослідження статевих особливостей впливу наночастинок рідкісноземельних металів на репродуктивну функцію» (№ державної реєстрації 0115U001033, 2015-2017 рр.). Автор роботи був співвиконавцем вказаних НДР.

**Мета і завдання дослідження.** Метою дослідження є експериментальне обґрунтування використання наночастинок гадоліній ортованадату для корекції чоловічих неонатально індукованих репродуктопатій.

Для досягнення мети вирішувались наступні **завдання:**

1. Відтворити модель чоловічої неонатально індукованої репродуктопатії та виявити особливості метаболічних процесів у дорослих тварин після дії ушкоджуючих чинників.

2. Оцінити виразність програмувального зростання (піка) тестостерону під час статевої диференціації мозку у щурят чоловічої статі при дії чинників, що призводять до розвитку чоловічої неонатально індукованої репродуктопатії.

3. На моделі неонатально індукованої репродуктопатії вивчити ефективність застосування НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у складі гідрозолу (НЧгз) та фармацевтичної композиції (рідка лікарська форма) (НЧфк) для корекції репродуктивної функції та метаболічних розладів у самців щурів за показниками маси тіла, масових коефіцієнтів органів, статевої та емоційної поведінки, сперматогенезу, фертильності, а також біохімічними показниками та концентрації статевих гормонів.

4. Визначити наявність та характер впливу НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  на гонадотропну активність гіпофіза дорослих самців щурів з неонатально індукованими розладами репродуктивної функції за умов тривалого надходження сполуки.

5. Провести токсикологічне оцінювання НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  за умов одноразового надходження (гостра токсичність) та повторного введення (субхронічна токсичність) за показниками впливу на репродуктивну функцію інтактних самців щурів та їхніх нащадків.

*Об'єкт дослідження* – порушення функціональної активності чоловічих статевих залоз та репродуктивної функції внаслідок неонатальних втручань, репродуктивна функція здорових самців в умовах хронічного надходження НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ .

*Предмет дослідження* – функціональна активність статевих залоз, сомато-статевий розвиток, статеві поведінка, емоційний стан, фертильність, сперматогенез, стан андроген-залежних та андроген-чутливих органів, гормональні та метаболічні показники самців щурів, НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ .

*Методи дослідження:* фізіологічні – спостереження за станом тварин за інтегральними показниками – для визначення гострої токсичності; життєздатність, соматичний та статевий розвиток щурят – для оцінки розвитку тварин; індекси запліднення та вагітності, рівень внутрішньоутробних втрат у вагітних самиць – для дослідження фертильності самців; для визначення загальної гонадотропної активності гіпофізів за ступенем збільшення маси матки та яєчників у статевонезрілих мишей, яким вводили суспензію гіпофізів досліджуваних самців; етологічні – для оцінки емоційної поведінки щурів за тестом Steru, для дослідження статевої поведінки: кількість наближень самця до самки, кількість садок, інтромісій, еякуляцій та їх латентність; препаративні – визначення маси та стану внутрішніх органів; цитологічні – для оцінки стану сперматогенезу за концентрацію епідидимальних сперміїв, їх рухливістю, відсотком патологічних форм; біохімічні – для визначення метаболічних характеристик щурів за показниками тригліцеридів та загального холестерину, вільного аргініну, стабільних метаболітів циклу оксиду азоту; імуноферментні – для дослідження стану андрогенної активності та обміну статевих гормонів за рівнем тестостерону, естрадіолу; статистичні – для оцінки нормальності, розподілу дат, розрахунку основних статистичних параметрів (середнє арифметичне та його похибка, середнє зважене та його похибка) використовувались програми Excel та Statistika, при порівнянні двох груп використовували U-критерій Манна-Вітні, а кількох груп – критерій Q Дана, значущість розбіжностей якісних показників між групами оцінювали за критерієм  $\chi^2$ , різницю між групами вважали статистично значущою при  $p < 0,05$ .

**Наукова новизна одержаних результатів.** У дисертаційній роботі отримано нове вирішення конкретної наукової задачі експериментальної ендокринології – доведена можливість корекції чоловічих неонатально індукованих репродуктопатій та відновлення фертильності до рівня інтактних тварин за допомогою НЧ гадоліній ортованадату. Встановлено, що одним з можливих шляхів реалізації дії досліджуваних НЧ є модуляція гонадотропної активності гіпофізу.

Отримано нові дані щодо механізму імпринтингової дії емоційного стресу на тлі надходження надмірної кількості ФЕ у критичний період онтогенезу для програми розвитку статевої функції, яким може слугувати зниження програмувального піка Тс у новонароджених щурят.

Поглиблено наукові дані щодо віддалених наслідків емоційного стресу на тлі надмірної фітоестрогенізації в період молочного вигодовування для репродуктивної функції дорослих статевозрілих самців щурів, у яких зниження фертильності поєднується з гормонально-метаболічними розладами (надлишок маси тіла через більшу масу вісцерального жиру, проатерогенні зміни ліпідного обміну, порушення про/антиоксидантного балансу).

Встановлено взаємозв'язок між ступенем біологічної активності НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ , дозою сполуки, терміном її введення та складом присутніх речовин.

**Практичне значення одержаних результатів.** Вперше на основі аналізу результатів комплексного дослідження експериментально обґрунтовано перспективність розробки інноваційних підходів для відновлення чоловічої фертильності, зокрема, при гіпофертильності невизначеного генезу. Результати дисертаційної роботи можуть бути використані при розробці негормональних

лікарських засобів для корекції репродуктопатій чоловіків та увійти в досьє лікарського засобу при проведенні доклінічних досліджень.

Вдосконалено критерії оцінки статевих та метаболічних розладів, що виникають при дії несприятливих чинників під час критичних періодів розвитку. Встановлено, що супутніми розладами у неонатально стресованих та фітоестрогенізованих самців у дорослому віці є зміни гонадотропної активності гіпофізу, схильність до підвищення маси тіла при наявності проатерогенних змін у сироватці крові. Показано, що така модель може слугувати патогенетичною моделлю для розробки новітніх засобів лікування гіпофертильності, що сполучається з метаболічними розладами.

Результати дисертаційної роботи впроваджені у науково-дослідний процес лабораторії фармакології ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», у науково-дослідний та науково-педагогічний процес Інституту гігієни та кафедри гігієни та екології № 4 Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Також створено два нововведення: «Спосіб корекції репродуктивних розладів у самців за допомогою наночастинок гадоліній ортованадату»; «Експериментальне дослідження статевих особливостей впливу наночастинок (НЧ) рідкоземельних металів на репродуктивну функцію» (КПКВ 6561040).

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація – особиста наукова праця автора. Автор самостійно провів патентно-інформаційний пошук, здійснив аналіз наукової літератури стосовно проблеми, що вирішувалась. Разом із науковим керівником автор визначив та сформулював тему, мету та завдання дисертаційної роботи, узгодив вибір предмету та об'єкту дослідження. Самостійно був отриманий фактичний матеріал на базі лабораторії репродуктивної ендокринології ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України». Автором самостійно була проведена систематизація результатів експериментів, статистичний аналіз даних та їхня інтерпретація.

Наночастинки  $GdVO_4:Eu^{3+}$  для експерименту були синтезовані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України к. х. н., с. н. с. В. К. Клочковим згідно з договорами про творчу співпрацю від 18. 04. 2012 року та 10. 01. 2015 року і передані для біологічних досліджень у вигляді гідрозолу. Фармацевтична композиція (рідка лікарська форма) на основі цих НЧ була розроблена у секторі технології лікарських форм лабораторії аналітичних та фізико-хімічних методів дослідження ДУ ШЕП під керівництвом к. фарм. н, с. н. с. С. П. Кустової. Визначення концентрації статевих гормонів проводились спільно з к. б. н. Л. В. Сиротенко.

**Апробація результатів дослідження.** Основні положення дисертації представлено та обговорено на вітчизняних та міжнародних науково-практичних конференціях: Сучасні проблеми науки та освіти (Харків, 2014); Ендокринна патологія у віковому аспекті (Харків, 2014; 2015; 2017); Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології (Данилевські читання) (Харків, 2015; 2016; 2017); Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів (Тернопіль, 2016); Topical issues of new drugs development (Kharkiv, 2017); Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодення

і майбутнє (Харків, 2017); Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2017) (Chernivtsi, 2017); V Національний з'їзд фармакологів України (Запоріжжя, 2017); Фундаментальные и прикладные науки – медицине (Минск, 2017); Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю НАМН України (Київ, 2018); Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів (Харків, 2018); Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2018) (Kyiv, 2018), Медицинская наука: новые возможности (Душанбе, 2018).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 23 наукові праці, у тому числі 6 статей (1 – самостійна та 5 статей у співавторстві) у фахових виданнях України (рекомендованих ДАК МОН України) та включених до міжнародних наукометричних баз, 17 робіт у наукових матеріалах і тезах конференцій.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 188 сторінках, складається з анотації, списку публікацій здобувача, основної частини (вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків), списку використаних джерел, що містить 314 посилання та займає 34 сторінок, 2 додатки. Дисертацію проілюстровано 29 таблицями та 19 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Експерименти виконувались на 250 статевозрілих самцях та самках щурів популяції Вістар різного віку та їх нащадках, лабораторних мишах обох статей (50 голів). Дослідження проводилися відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001).

В роботі використовували водні колоїдні розчини НЧ  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  (гідрозоль), отримані методом колоїдного синтезу в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України згідно з договорами про творчу співпрацю. Тверду фазу гідрозолу склали НЧ  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  стрижнеподібної форми розміром  $8 \times 25$  нм. Для біологічних досліджень використовували гідрозоль НЧ  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  або НЧ у складі фармацевтичної композиції (рідка лікарська форма). Сполуку вводили у дозах, розрахованих спираючись на вихідну кількість  $\text{GdVO}_4$ , використану для синтезу НЧ.

Модель неонатально індукованої репродуктопатії була відтворена шляхом дії емоційного стресу на тлі надлишку ФЕ у раціоні. Для цього у корм самки після пологів з 3 по 21 добу лактації додавали біологічно активну домішку, до складу якої входила суміш ФЕ (дайдзеїн 60 %, гліцитеїн 22 %, геністеїн 18 %). Розрахована доза ФЕ за геністеїновим еквівалентом складала 100 мг/кг маси тіла (м. т.). Самку та її нащадків з 3 по 15 добу життя (д. ж.) піддавали емоційному стресу (модель «maternal separation stress» для матері, модель «clean bedding» для щурят) (Карпенко Н.О., 2011). Нащадки з цих виводків утворювали групу Стрес+ФЕ. У щурят оцінювали виживаність та перебіг сомато-статевого розвитку. Частина щурят-самців на п'яту д. ж. була знеживлена для визначення рівня Тс у критичний період статевої диференціації мозку. Тварин відлучали від матерів у 30-денному віці та підгодували до статевої зрілості, визначаючи її початок. У звичайних умовах віварію щурів самців утримували до 10-ти місячного віку, коли розпочинали курсове введення НЧ. Щурам із групи Стрес+ФЕ аліментарним шляхом натще



індивідуально вводили фармацевтичну композицію або гідрозоль НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  (0,33 мг/кг м. т.) або референтні препарати Трибестан (68 мг/кг м. т.) чи Спеман (168 мг/кг м. т.) впродовж 70 діб. Індивідуальна доза корегувалась щотижня згідно з динамікою маси тіла. По закінченню експерименту вивчали статеву та емоційну поведінку, самців щурів парували з інтактними самками для визначення параметрів фертильності та плідності й отримання нащадків. Після знеживлення тварин шляхом швидкої декапітації досліджували показники спермограми, стан внутрішніх органів, проводили біохімічні та гормональні виміри у зразках сироватки крові, гомогенатах сім'яників, визначали загальну гонадотропну активність гіпофізів. Контрольними вважали результати інтактних тварин відповідного віку, яких утримували у стандартних умовах віварію.

Оцінку гострої токсичності НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  проводили на статевозрілих самцях та самках білих лабораторних мишей. Сполуку у вигляді гідрозолу вводили самцям внутрішньошлунково у дозах 250, 510 та 5050 мг/кг м. т., та самкам мишей внутрішньочеревно в дозі 670 мг/кг м. т. Тривалість спостережень за станом тварин після одноразового введення НЧ складала 14 днів. Після цього тварин виводили з дослідження швидкою декапітацією та здійснювали макроскопічні обстеження, опис внутрішніх органів, визначення абсолютної та відносної маси органів.

В експерименті на здорових статевозрілих самцях щурів шестимісячного віку вивчали дію фармацевтичної композиції на основі НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  на репродуктивну функцію при введенні НЧ у трьох дозах, які відрізнялися одна від одної у 10 разів (0,03, 0,3 та 3 мг/кг м. т.) аліментарним шляхом впродовж 70 діб. У динаміці вивчали стан сперматогенезу на 30-ту та 70-ту добу, потім у самців реєстрували показники статевої поведінки і парували з інтактними самками для дослідження фертильності, плідності й отримання нащадків, у яких спостерігали за перебігом сомато-статевого розвитку. Тварин виводили з експерименту шляхом швидкої декапітації, проводили біохімічні та гормональні дослідження, визначали загальну гонадотропну активність гіпофізів методом біологічного тестування. Контролем слугували тварини, які отримували розчинник НЧ та референс-препарат Трибестан.

Емоційну поведінку самців щурів досліджували за тестом Steru «підвішування за хвіст» (Onodera T. et al., 2000). Статеву поведінку самців щурів вивчали за показниками четвертого парного п'ятнадцятихвилинного тесту з оварієктомованою рецептивною самкою у присмерковий час (Буреш Я. та співавт., 1991).

Фертильність самців оцінювали за результатами їх парування впродовж 8 діб з інтактними статевозрілими самками, що мали нормальний естральний цикл (у співвідношенні 1:2-3). За картиною ранкових вагінальних мазків визначали першу добу вагітності, розраховували індекс запліднення та індекс вагітності. Частину самок знеживлювали на 20-у добу вагітності під тіопенатовим наркозом для підрахунку кількості жовтих тіл, місць імплантації та плодів, вимірювання маси плодів та плаценти, розмірів тіла та ано-генітальної відстані (Бишовець Т. Ф., 2001). За результатами парування розраховували інтегральний показник середньої реалізованої плідності (фертильності) (Фі) самців щурів (Карпенко Н.О. та співавт., 2011). Іншу частину самок залишали до пологів для отримання нащадків.

Стан сперматогенезу та функціональну повноцінність сперматозоїдів досліджували, визначаючи концентрацію епідидимальних спермій, їх рухливість,

відсоток патологічних форм, осмотичну резистентність, відсоток мертвих сперматозоїдів (Стефанов О. В., 2001; Петрищев В. С., 2002).

Рівень статевих гормонів у сироватці крові щурів визначали імуноферментним методом із використанням тест-наборів «Тестостерон-ИФА» та «Естрадиол-ИФА» фірми «Хема» (Росія). Вміст тригліцеридів (ТГ) та загального холестерину (ЗХ) у сироватці крові щурів та 10 % гомогенаті сім'яників вимірювали спектрофотометрично з використанням наборів фірми «СпайнЛаб», Україна. Концентрацію вільного аргініну оцінювали за реакцією взаємодії аргініну гідрохлориду зі спиртовим розчином  $\alpha$ -нафтолу та гіпобромним реактивом (Алейнікова Т. Л. та співавт., 2000). Концентрацію NO досліджували за сумарним вмістом стабільних метаболітів циклу азоту (NOx) при взаємодії NOx із реактивом Грісса (Пат. 31600 UA, МПК А6G01 N33/52, 2000).

Загальну гонадотропну активність гіпофізів щурів, що отримували НЧ, вивчали методом біологічного тестування за оцінкою ступеня збільшення маси матки та яєчників у статевонезрілих мишей під впливом гонадотропних гормонів у порівнянні з даними контрольних тварин (Резніков А. Г., 1980).

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою комп'ютерного пакета програм Excel та Statistika. Нормальність розподілу даних у вибірках перевіряли з використанням критерію Шапиро-Уїлка, дані у таблицях представлені як середнє арифметичне та його похибка ( $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$ ), де  $n$  – кількість тварин у групі. При обчисленні даних про перебіг вагітності самки або про розвиток нащадків у перший місяць життя одиницею розрахунку була вагітна самка або приплід однієї самиці ( $k_1$ ), дані представлені як середнє зважене та його похибка ( $WA \pm S_{WA}$ ). У випадках проведення кількох серій експерименту (дослідження спермограм у неонатально обтяжених самців щурів) результати також представлені як середнє зважене та його похибка ( $WA \pm S_{WA}$ ), де  $k$  – кількість повторів експерименту. Перевірку нульової гіпотези про відсутність різниці між групами проводили із застосуванням параметричних та непараметричних методів. При порівнянні двох груп використовували U-критерій Манна-Вітні, а кількох груп критерій Q Дана [268]. Значущість розбіжностей якісних показників між групами оцінювали за критерієм  $\chi^2$ . Різницю між групами вважали статистично значущою при  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** *Особливості неонатально індукованих репродуктивних розладів у самців щурів.* М'який емоційний стрес матері з нащадками та додавання надмірної кількості ФЕ до раціону самки, що годує, дещо покращили виживаність нащадків у перший місяць життя, сомато-статевий розвиток яких за деякими ознаками гальмувався (прорізання зубів, поява вторинного волосяного покриву) або прискорювався (опущення сім'яників), хоча це не виходило за межі фізіологічної норми. Встановлено зменшення концентрації Тс у термін статевої диференціації мозку (5-а доба життя, програмувальний пік Тс) на 26 % ( $p < 0,05$ ), що могло бути причиною відмінностей у стані репродуктивної функції дорослих самців. Це припущення узгоджується з виявленим зменшенням гонадотропної активності гіпофізів дорослих самців, що зазнавали неонатальних втручань. Такі зміни можуть вказувати на пригнічення вивільнення гонадотропін-рилізінг гормону, пригнічення синтезу або секреції гонадотропних гормонів.

У щурів, які отримували ФЕ з молоком матері на тлі емоційного стресування, у віці 10 місяців виявлено ряд метаболічних особливостей: зростання маси тіла, пізніше у тварин виявлено зменшення концентрації Тс до  $(6,30 \pm 0,43)$  проти  $(9,10 \pm 0,85)$  нмоль/л у контролі ( $p < 0,05$ ), гіпертригліцеридемія –  $(1,07 \pm 0,12)$  проти  $(0,74 \pm 0,06)$  ммоль у контролі ( $p < 0,05$ ), гіперхолестеринемія –  $(3,86 \pm 0,28)$  проти  $(2,81 \pm 0,36)$  ммоль у контролі ( $p < 0,05$ ), збільшення концентрації NOx (на 25 %;  $p < 0,05$ ) та зменшення – вільного аргініну (на 11,4 %;  $p < 0,05$ ). У сім'яниках виявлено більший сумарний вміст нітрат- та нітрит-аніонів (на 23 %).

Серед порушень функції відтворення зареєстровано зміни статевої поведінки, які, можливо, є наслідком зменшення піка Тс під час статевої диференціації мозку. У неонатально обтяжених щурів статистично вірогідно знижувалася як кількість тварин, здатних до еякуляції (у чотири рази;  $p < 0,05$ ), так і середня кількість еякуляцій за час тесту (зменшення у п'ять разів,  $p < 0,05$ ).

Надходження надмірної кількості ФЕ та стресування на ранніх етапах онтогенезу приводило також до порушень сперматогенезу: до зниження загальної концентрації сперматозоїдів на 41 % ( $p < 0,05$ ), збільшення частки їх патологічних форм на 145 % ( $p < 0,05$ ), що зменшувало концентрацію морфологічно нормальних сперматозоїдів майже на 47 % ( $p < 0,05$ ) та викликало погіршення їхніх функціональних характеристик (рис. 1).



Рис. 1. Показники спермограми неонатально стресованих та фітоестрогенізованих щурів, % (дані групи Контроль прийняті за 100 %):  
\* – статистично вірогідна різниця з даними групи Контроль ( $p < 0,05$ ).

Погіршення копулятивної функції внаслідок дії екзогенних чинників зменшило запліднювальну здатність щурів – індекс запліднення дорівнював 70 % проти 94 % у контролі. При цьому вагітних самок серед запліднених було 96 %. Ці вагітності характеризувалися меншою кількістю плодів та збільшенням як пре- (у 2,2 рази), так і постімплантаційних (у 2,3 рази) втрат, що призводило до зростання загальної ембріональної смертності (у 2,1 рази;  $p < 0,05$ ). У самок, яких парували з самцями групи Стрес+ФЕ, плоди були більшими, й серед них було менше плодів жіночої статі.

Розрахунок інтегрального показника середньої реалізованої плідності  $\Phi_i$  (репродуктивний потенціал), який враховує статеву активність самців та якість їхніх статевих клітин, показав, що у неонатально стресованих та фітоестрогенізованих самців він дорівнює 47 % від контрольного рівня, прийнятого за 100 %.

Можливість корекції неонатально індукованих репродуктивних розладів у самців щурів за допомогою наночастинок гадоліній ортованадату. При проведенні курсу корекції за допомогою гідрозолу НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  (група Модель+НЧгз) або фармацевтичної композиції на основі НЧ (група Модель+НЧфк) у щурів із неонатально індукованою репродуктопатією встановлено, що при застосуванні НЧгз збільшився відсоток самців, здатних до еякуляції (до 37,5 %). Ініціація спарювання та час настання еякуляції у них були наближені до значень інтактних тварин, чого не вдалося досягти за використання фармакологічної композиції на основі НЧ.

У самців щурів, що у дорослому віці 70 діб отримували гідрозоль НЧ, зростала загальна концентрація (до  $40,3 \pm 8,6$ ) млн/мл проти ( $30,0 \pm 1,7$ ) млн/мл у тварин з модельною патологією,  $p < 0,05$ ) та концентрація морфологічно нормальних сперматозоїдів внаслідок зменшення відсотка патологічних форм гамет до ( $9,4 \pm 1,1$ ) % проти ( $20,0 \pm 1,0$ ) % у групі Модель ( $p < 0,05$ ). Ці показники статистично вірогідно не відрізнялися від результатів групи Контроль, хоча відмічалось зменшення частки рухливих гамет (рис. 2).

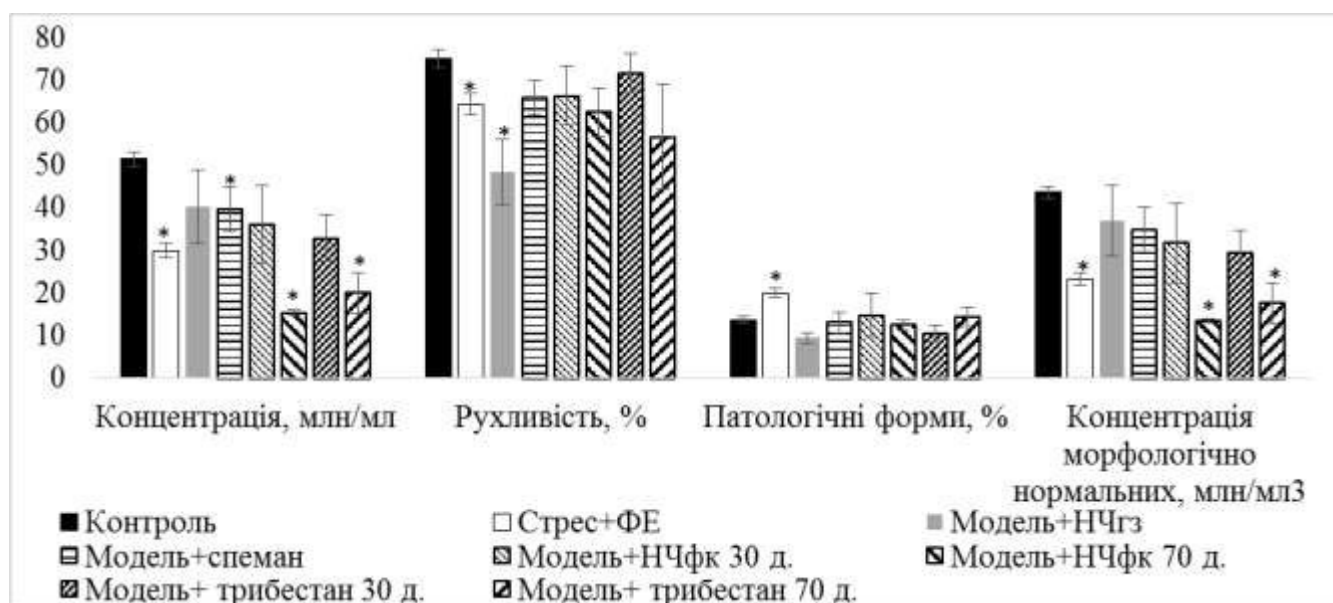


Рис. 2. Показники спермограми неонатально стресованих та фітоестрогенізованих щурів після хронічного введення НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ :  
\* – статистично вірогідна різниця з даними групи Контроль ( $p < 0,05$ ).

Введення фармакологічної композиції на основі НЧ впродовж 30 діб практично нормалізувало всі показники спермограми, але при продовженні терміну лікування до 70 діб ми спостерігали зменшення загальної концентрації сперматозоїдів (майже на 70 % від контролю,  $p < 0,05$ ), що призвело до зменшення і концентрації морфологічно нормальних клітин (на 69 % від контролю,  $p < 0,05$ ). При цьому рухливість гамет не змінилася, а рівень Тс статистично вірогідно не

відрізнявся від контрольних показників через 30 та 70 діб введення НЧ (див. рис. 2). Звертає на себе увагу факт, що аналогічні зміни спостерігалися й при застосуванні Трибестану, що свідчить про більшу чутливість до сполук клітин сперматогенного епітелію на ранніх етапах диференціації, під час поділів мейозу та мітозу. Останнє потребує більш глибоких досліджень щодо тривалості курсу лікування розладів сперматогенезу та впливу на це складу фармацевтичної композиції. Тобто, надходження гідрозолу НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у дорослих щурів із неонатально індукованою патологією репродуктивної функції нормалізувало порушений сперматогенез, позитивно впливаючи на процес сперміогенезу.

Поліпшення сперматогенезу у самців щурів із неонатально індукованими репродуктивними розладами після курсу корекції НЧ призводило до збільшення кількості запліднених ними самок до 95 та 100 % у групах Модель+НЧгз та Модель+НЧфк. Крім цього, нормалізувалася плодючість самців, які отримували НЧ в обох формах, що проявлялось у зменшенні рівнів пре- та постімплантаційних втрат і зменшувало загальну загибель ембріонів таким чином, що ці показники статистично вірогідно не відрізнялися від даних інтактних тварин (рис. 3, рис. 4).

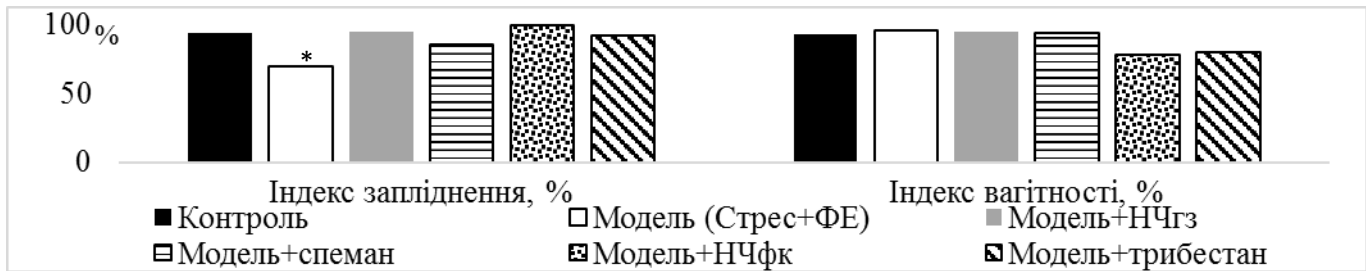


Рис. 3. Показники фертильності самців, які зазнали неонатальних втручань:  
\* – статистично вірогідна різниця з даними групи Контроль ( $p < 0,05$ ).

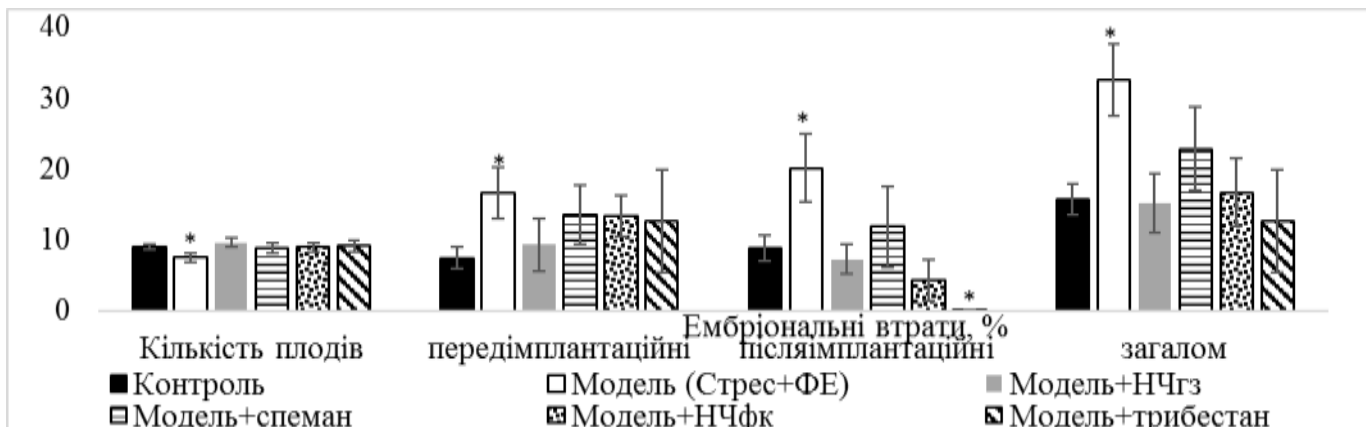


Рис. 4. Показники виживаності плодів у інтактних самок, запліднених піддослідними самцями:  
\* – статистично вірогідна різниця з даними групи Контроль ( $p < 0,05$ ).

Розрахунок величини репродуктивного потенціалу  $\Phi_i$  показав, що введення НЧ впродовж 70 діб нормалізує цей показник у неонатально стресованих та фітоестрогенізованих самців. Зокрема,  $\Phi_i$  дорівнював 124,0 та 75,8 % ( $\Phi_i$  групи

Контроль становив 100 %). Причому, застосування НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у складі гідрозолу справляло більш виразний позитивний вплив на інтегральний показник Фі самців, ніж НЧ у складі фармкомпозиції (рис. 5).

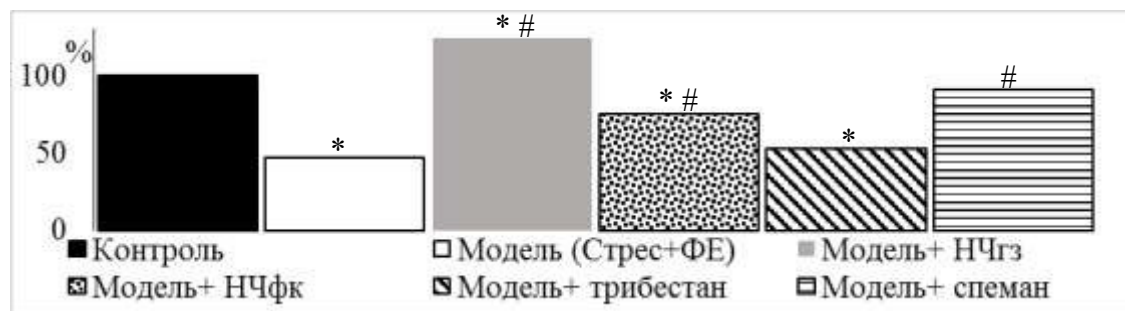


Рис. 5. Інтегральний показник середньої реалізованої плідності самців (Фі):  
\* – статистично вірогідна різниця з даними групи Контроль ( $p < 0,05$ );  
# – статистично вірогідна різниця з даними групи Модель (Стрес+ФЕ) ( $p < 0,05$ ).

Визначення гонадотропної активності гіпофізів неонатально обтяжених самців щурів методом біологічного тестування показало нормалізацію гонадотропної активності гіпофізів неонатально обтяжених самців щурів після курсу корекції НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ , що може вказувати на їх дію на репродуктивну функцію через центральний механізм регуляції.

Застосування коригувальних речовин не приводило до зниження маси тіла та вісцерального жиру, але позитивно впливало на деякі інші метаболічні процеси. Фармацевтична композиція на основі НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  виявила гіполіпідемічну активність, про що свідчила нормалізація вмісту в крові ТГ та ЗХ, концентрація яких була підвищена у тварин групи Модель (рис. 6).

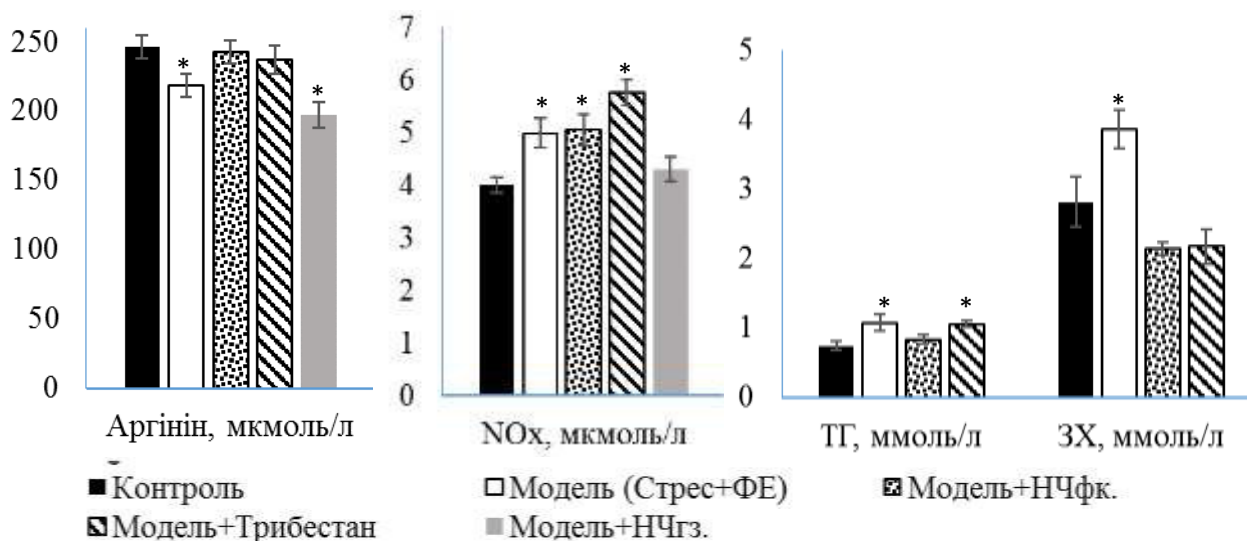


Рис. 6. Показники біохімічних досліджень сироватки крові самців щурів після курсу корекції:  
\* – статистично вірогідна різниця з даними групи Контроль ( $p < 0,05$ ).

У тварин, що мали дефіцит вільного аргініну та надмірну кількість NOx після неонатальних втручань, введення фармацевтичної композиції на основі НЧ нормалізувало вміст вільного аргініну, але не зменшувало концентрацію NOx (див. рис. 6).

Деяка різниця у виразності ефекту НЧ у складі гідрозолу та фармакологічної композиції вказує на важливість фактору оточення НЧ, його складу. Адже відомо, що НЧ ортованадату гадолінію здатні утворювати білкову корону та формувати агрегати, що залежить від їх оточення, складу, розміру, форми (Kavok N. et al., 2017).

*Дослідження токсичності наночастинок гадоліній ортованадату.* При визначенні параметрів гострої токсичності НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  встановлено, що одноразове внутрішньошлункове введення НЧ у максимальній дозі 5050 мг/кг самцям мишей викликало лише деяку короткочасну пригніченість тварин і надалі не позначалося на загальному стані та стані їхніх внутрішніх органів, що свідчить про нешкідливість сполуки при пероральному введенні. Відсутність летальних випадків при введенні НЧ у максимальних дозах дозволило віднести НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  до IV класу токсичності (малотоксичні сполуки). Водночас, при внутрішньочеревному введенні НЧ у максимально можливій дозі самкам мишей виявлена реакція лімфоїдних органів (збільшення маси селезінки та тимуса) та печінки (зміна її щільності та збільшення маси), що може вказувати на накопичення НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у гепатоцитах печінки. Такі результати можуть свідчити про небезпечність досліджуваної речовини при її парентеральному застосуванні у високих дозах.

При дослідженні репродуктивної токсичності у здорових статевозрілих щурів з'ясовано, що вплив НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  на процес сперматогенезу більшою мірою залежить від тривалості застосування. За короткий період надходження, коли НЧ розпочинали діяти на сперматоцити, у спермограмі спостерігалось лише збільшення патологічних форм гамет, що свідчило про вплив на процес сперміогенезу (рис. 7).

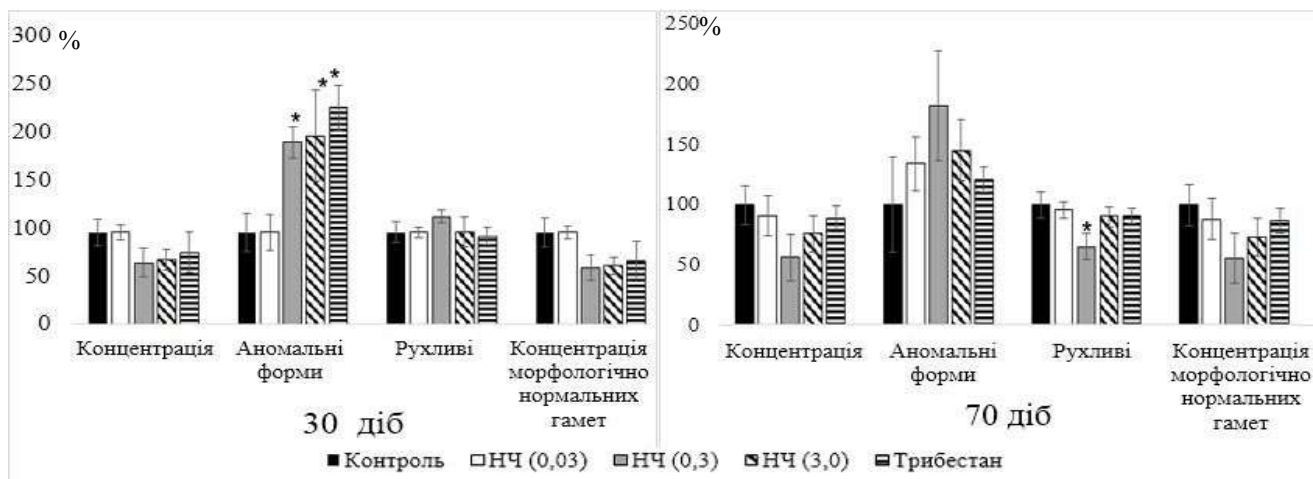


Рис. 7. Показники спермограми інтактних самців щурів, що отримували наночастинок  $GdVO_4:Eu^{3+}$  впродовж 30 або 70 діб, у відсотках до даних групи Контроль:

\* – статистично достовірна різниця з даними групи Контроль ( $p < 0,05$ ).

У випадку проходження повного циклу сперматогенезу під впливом НЧ, починаючи зі стовбурових клітин та сперматогоніїв (70 діб), було виявлено зменшення частки рухливих клітин у групі, що отримувала НЧ у дозі 0,3 мг/кг м. т. При застосуванні інших доз ознак порушення сперматогенезу не виявлено.

Через 70 діб використання НЧ в умовно терапевтичній дозі, 0,3 мг/кг м. т. спостерігалися найменші відмінності статевої поведінки від показників групи Контроль. Дія НЧ не була дозозалежною, хоча можна говорити про деяке пригнічення цієї складової відтворення.

Не виявлено статистично значущих відмінностей у плідності за показниками індексів запліднення та вагітності при паруванні піддослідних самців з інтактними самками (рис. 8).

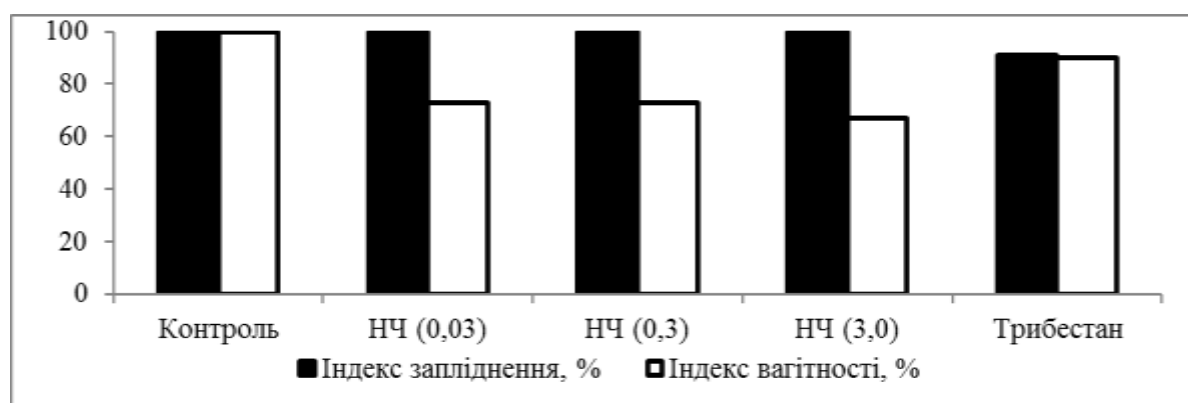


Рис. 8. Показники фертильності інтактних самців, які отримували наночастинки  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у різних дозах.

Зміни перебігу сперматогенезу не позначились на якості сперматозоїдів та здатності зигот, що утворились, до імплантації та розвитку. Аналіз даних щодо внутрішньоутробних втрат у самок, запліднених цими самцями, не виявив ніякої статистично значущої різниці між контрольною та дослідними групами. Репродуктивний потенціал  $\Phi$  самців щурів при надходженні НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  в усіх дозах становив близько 75 % від даних групи Контроль (75,5; 74,4; 74,5 %), тобто, не демонстрував змін в залежності від дози. Однак, більш виразні зміни у групі, що отримувала НЧ у максимальній дозі (3,0 мг/кг), визначили статистично достовірне зменшення  $\Phi$  у порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ). Тобто, НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у розрахункових дозах 0,03 та 0,3 мг/кг м. т. не справляють токсичної дії на фертильність, плідність та репродуктивний потенціал здорових самців щурів.

Надходження НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  не позначалося у здорових самців на динаміці маси тіла, масових коефіцієнтах органів окрім деякого збільшення відносної маси гіпофіза у групі тварин, що отримували НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у дозі 0,3 мг/кг, на аутопсії органи щурів, що отримували НЧ, були нормального вигляду без будь-яких особливостей.

Вживання НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у складі фармацевтичної композиції в усіх досліджених дозах впродовж 70 діб не викликало змін рівню Тс, не спричиняло порушень білкового, ліпідного та вуглеводного обмінів у інтактних самців.



При визначенні гонадотропної активності із використанням методу біологічного тестування відмічено посилення гонадотропної активності гіпофізів тварин, які отримували НЧ, що може вказувати на можливий шлях реалізації біологічної дії сполуки, а саме – через центральний механізм регуляції репродуктивної функції.

Застосування НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у вигляді гідрозолу чи фармацевтичної композиції у інтактних щурів не призводило до негативних змін ембріонального розвитку нащадків. За показниками соматичного розвитку плоди піддослідних груп також не відрізнялися від контрольних значень. Лише плоди чоловічої статі групи НЧ (3,0) виявилися трохи меншими –  $(2,1 \pm 0,1)$  г, ніж нащадки самців груп НЧ (0,03) –  $(2,4 \pm 0,1)$  г, та НЧ (0,3) –  $(2,3 \pm 0,1)$  г ( $p > 0,05$ ). Динаміка маси тіла у нащадків щурів, які отримували НЧ, була дещо знижена. Соматичний та статевий розвиток нащадків самців щурів, які отримували НЧ, знаходився у межах фізіологічних коливань. Тож, НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  не проявляють негативної дії на нащадків самців щурів.

*Аналіз та узагальнення результатів досліджень.* Отримані дані стосовно прояву та характеру віддалених наслідків емоційного стресу на тлі надмірного надходження ФЕ із молоком матері у нащадків чоловічої статі доводять нерозривність порушень репродуктивного здоров'я (гіпофертильність на фоні нормального рівня Тс та незначних порушень сперматогенезу) та метаболічних розладів (надлишок маси тіла за рахунок більшої маси вісцерального жиру, проатерогенні зміни ліпідного обміну, порушення про/антиоксидантного балансу), які утворюють «порочне коло». Аналогічні результати спостерігали й інші дослідники: надходження ксеноестрогенів у ранній період онтогенезу призводило до збільшення маси тіла та ожиріння у дорослому віці, змін у характері харчової поведінки, рівня ТГ, лептину, інтерлейкіну-6 (Raičeki S. et al., 2014; Darbre P. D., 2017). Отримані результати співпадають з клінічними спостереженнями, що ожиріння, наявність надлишкової маси тіла та метаболічний синдром часто асоційовані з гіпофертильністю (Моргунов Л. Ю., 2010; Новікова Є.Г., 2012). Такі стани пов'язують із певною дією негативних чинників у неонатальний період розвитку (Newbold R.R et al., 2011). Тобто, спричинені метаболічні розлади можуть бути ще однією ланкою реалізації дії втручань на ранніх етапах онтогенезу у формування репродуктивних порушень дорослих. Наші результати свідчать, що шляхом реалізації імпринтингової дії емоційного стресу на тлі надмірної фітоестрогенізації у критичний період онтогенезу щодо програми розвитку статевої функції може слугувати зниження програмувального піка Тс у новонароджених щурят, що у дорослих проявляється змінами гонадотропної активності гіпофіза.

Аналіз наслідків корекції чоловічих неонатально індукованих репродуктопатій та факт відновлення фертильності до рівня інтактних тварин за допомогою НЧ гадоліній ортованадату показав, що можливим шляхом реалізації дії досліджуваних НЧ є вплив на центральний механізм регуляції та нормалізація функції гіпофіза.

Важливим є встановлення на рівні організму залежності біологічної активності НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  від дози, терміну введення, складу оточення та вихідного стану організму (з патологією або здоровий). Показано залежність біологічної активності НЧ від середовища (водний колоїдний розчин або складна

фармацевтична композиція), можливо, через утворення великих агрегатів у присутності допоміжних речовин, що потребує подальших досліджень.

Дані про відсутність летальних випадків при одноразовому введенні НЧ  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  в максимально досяжній дозі дозволило віднести їх до малотоксичних сполук, що збігається з результатами вивчення токсичності  $\text{GdVO}_4$  у макроформі.

Не виявлено негативного впливу сполуки на нащадків при преко́нсумаційному використанні НЧ як у інтактних самців щурів, так і у самців-батьків із репродуктопатією.

Таким чином, у результаті дослідження, що проведено з використанням моделі патології чоловічої репродуктивної функції та низки токсикологічних експериментів отримано комплекс даних, що обґрунтовують можливість використання наночастинок гадоліній ортованадату для відновлення репродуктивного потенціалу у випадках чоловічих неонатально індукованих репродуктопатій.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вирішена актуальна наукова задача – доведено позитивний вплив наночастинок  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  на репродуктивну функцію самців щурів із неонатально індукованими репродуктивними розладами. Показано, що наночастинки  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  малотоксичні, а ефект їхньої дії на репродуктивну функцію залежить від дози, терміну надходження та складу.

1. У щурів з диспрограмною репродуктопатією, що викликана емоційним стресом на тлі надмірної фітоестрогенізації в період молочного вигодовування, виявлено погіршення статевої поведінки та сперматогенезу, зниження фертильності та плідності, збільшення ембріональних втрат у запліднених ними самок, що відбувалося на тлі метаболічних розладів, зокрема, збільшення маси тіла, проатерогенних зсувів ліпідного обміну та змін про/антиоксидантного балансу, та загалом призвело до двократного зниження потенціальної плідності.

2. Визначений можливий шлях реалізації дії несприятливих чинників (емоційний стрес та надмірна фітоестрогенізація) у дорослому віці – зниження програмувального піка тестостерону у період статевої диференціації мозку та зменшення гонадотропної активності гіпофізу у дорослих самців щурів.

3. Введення щурам з неонатально індукованою репродуктопатією наночастинок  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  нормалізувало гормональний профіль, запобігало передчасному віковому зростанню маси тіла, зменшувало проатерогенні зміни та явища нітрозивного стресу, покращувало фертильність та плідність, позитивно впливало на сперматогенез, сприяло збільшенню статевих реакцій, нормалізувало рівень внутрішньоутробних втрат, що загалом відновлювало показник репродуктивного потенціалу самців. Встановлено можливий шлях реалізації біологічної дії наночастинок  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ , а саме – через нормалізацію гонадотропної активності гіпофізу.

4. Встановлено, що наночастинки  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  за критерієм гострої токсичності відносяться до класу малотоксичних сполук (IV клас).

5. При введенні інтактним самцям щурів наночастинок  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  в дозах 0,03; 0,3 та 3,0 мг/кг маси тіла не виявлено негативного впливу на масу органів,

метаболичні показники та рівень тестостерону. У тварин, яким вводили наночастинки у дозах 0,03 або 0,3 мг/кг маси тіла, попри окремі зміни якості спермограми, не зменшувались фертильність та плідність самців.

6. Застосування наночастинок  $GdVO_4:Eu^{3+}$  у вигляді гідрозолу чи фармакологічної композиції в інтактних щурів або у самців, які зазнали неонатального стресу та фітоестрогенізації, не призводило до негативних змін ембріонального, соматичного та статевого розвитку їхніх нащадків.

7. Виявлений позитивний вплив наночастинок  $GdVO_4:Eu^{3+}$  на репродуктивну функцію дорослих самців щурів з неонатально індукованими репродуктивними розладами експериментально обґрунтовують перспективність розробки інноваційних підходів до корекції репродуктопатій та застосування наночастинок гадоліній ортованадату для відновлення репродуктивного потенціалу у випадках чоловічих диспрограмичних репродуктопатій.

### СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Белкіна І. О. Гонадотоксичність наночастинок гадоліній ортованадату за умов їх хронічного надходження. *Пробл. ендокрин. патології*. 2017. № 3. С. 78-85.

2. Вплив наночастинок ортованадату гадолінію та діоксиду церію на спермограму дорослих самців щурів із неонатально індукованими розладами репродуктивної функції / Є. М. Коренева, Н. О. Карпенко, Н. П. Смоленко, І. О. Белкіна, Е. Є. Чистякова, Н. Ю. Селюкова, Ю. І. Караченцев, В. К. Клочков, С. Л. Єфімова, Н. С. Кавок. *Пробл. ендокрин. патології*. 2016. № 1. С. 48-55. (Дисертант брав участь у постановці експериментального дослідження, статистичній обробці даних, оформленні статті).

3. Оцінка ефективності наночастинок ортованадату гадолінію для коригування неонатально індукованої репродуктопатії у самців щурів / І. О. Белкіна, Н. П. Смоленко, В. К. Клочков, Е. Є. Малюкін, Н. О. Чистякова, Н. О. Карпенко, Ю. І. Караченцев. *Фізіол. журн.* 2016. Т. 62, № 5. С. 76-82. (Дисертант брав участь у постановці експерименту, статистичній обробці даних, підготовці статті).

4. Вплив наночастинок гадоліній ортованадату у різних дозах на репродуктивну функцію самців щурів / Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, І. О. Белкіна, Є. М. Коренева, Н. О. Карпенко. *Вісн. пробл. біології і медицини*. 2017. Т. 2 (138), № 3. С. 127-130. (Дисертант брав участь у експериментальних дослідженнях, статистичній обробці даних, оформленні статті).

5. Коррекция растройств репродуктивной функции самцов крыс с помощью наночастиц ортованадата гадолиния / И. О. Белкина, Н. А. Карпенко, Е. М. Коренева, Н. П. Смоленко, Э. Е. Чистякова, В. К. Клочков. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук*. 2018. Т. 15, № 3. С. 293-305. (Дисертантом проведено аналіз літератури, робота з експериментальними тваринами, статистичний аналіз даних, підготовка статті).

6. The Assessment of Gadolinium Orthovanadate Nanoparticles Value for Neonatally-Induced Reproductive Disease in Male Rats / I. O. Belkina, N. P. Smolenko, V. K. Klochkov, Y. V. Malukin, E. E. Chistyakova, N. A. Karpenko, Y. I. Karachentsev. *Int. J. Physiol. Pathophysiol.* 2017. Vol. 8, № 4. P. 299-307. (Дисертант брав участь у постановці експерименту, статистичній обробці даних, оформленні статті).

7. Вплив естрогеноподібних речовин і стресу, що діяли у підсосний період, на функціонування печінки та деякі метаболічні показники статевозрілих самців щурів / Є. М. Коренева, Н. О. Карпенко, Н. Ф. Величко, О. О. Лісковська, І. О. Белкіна, Е. І. Хорунжа, Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко. *Сучасні проблеми науки та освіти: матер. 14 міжнар. міждисциплінар. наук.-практ. шк.-конф., Харків, 6 лист. 2014 р. X., 2014. С. 127-130. (Дисертант брав участь у роботі з експериментальними тваринами, дослідженні біохімічних показників, статистичній обробці даних, оформленні публікації).*

8. Вплив естрогеноподібних речовин і стресу, що діяли у період молочного вигодовування, на функціонування печінки та деякі метаболічні показники статевозрілих самців щурів / Н. Ф. Величко, Є. М. Коренева, Н. О. Карпенко, О. О. Лісковська, І. О. Белкіна, Е. І. Хорунжа. *Ендокринна патологія у віковому аспекті: матер. XII наук.-практ. конф. з міжнар. уч., Харків, 27-28 лист. 2014 р. X., 2014. С. 21-22. (Дисертант брав участь у роботі з експериментальними тваринами, дослідженні біохімічних показників, статистичній обробці даних).*

9. Методологічні особливості дослідження специфічної активності сполук, призначених для корекції порушень репродуктивної функції / Н. О. Карпенко, Є. М. Коренева, Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, І. О. Белкіна, Е. І. Хорунжа. *Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: (Чотирнадцяті Данилевські читання): матер. наук.-практ. конф. з міжнар. уч., Харків, 2-3 бер. 2015 р. X., 2015. С. 77-79. (Дисертант брав участь у постановці експерименту, статистичній обробці даних, оформленні публікації).*

10. Неонатальний стрес на тлі надлишку фітоестрогенів – модель для пошуку нових лікарських засобів корекції чоловічого гіпофертильності / Є. М. Коренева, Н. О. Карпенко, Н. П. Смоленко, Е. Є. Чистякова, Н. Ф. Величко, І. О. Белкіна, Е. І. Хорунжа, Н. Ю. Селюкова. *Ендокринна патологія у віковому аспекті: матер. XII наук.-практ. конф. з міжнар. уч., Харків, 27-28 листоп. 2015 р. X., 2015. С. 52-53. (Дисертант брав участь у постановці експерименту, статистичній обробці даних).*

11. Дослідження токсичності наночастинок ортованадату гадолінію / Н. О. Карпенко, І. О. Белкіна, В. Н. Клочков, Н. С. Кавок, Є. М. Коренева, Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко. *Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: (П'ятнадцяті Данилевські читання): матер. наук.-практ. конф. з міжнар. уч., Харків, 10-11 бер. 2016 р. X., 2016. С. 44-45. (Дисертант брав участь у постановці експерименту, статистичному аналізі даних, підготовці публікації).*

12. Нешкідливість тривалого надходження наночастинок гадолінію ортованадату для репродуктивної функції / Є. М. Коренева, Н. О. Карпенко, Н. П. Смоленко, Е. Є. Чистякова, І. О. Белкіна, К. В. Шарун, Н. С. Кавок. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів : матер. VI наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Тернопіль, 10–11 листоп. 2016 р. Тернопіль: ТДМУ, 2016. С. 333-334. (Дисертант брав участь у постановці експерименту, статистичному аналізі даних, підготовці публікації).*

13. Белкіна І. О., Шарун К. В., Капенко Н. О. Можливість корекції метаболічних наслідків неонатальних втручань у статевозрілих самців щурів за допомогою

наночастинок гадоліній ортованадату. *Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології: (Шістнадцяті Данилевські читання): матер. наук.-практ. конф. з міжнар. уч., Харків, 2-3 бер. 2017 р. X., 2017. С. 21-22. (Дисертант брав участь у роботі з експериментальними тваринами, дослідженні біохімічних показників, статистичному аналізі даних, підготовці тез).*

14. Belkina I. O., Sharun K. V., Bogachek Y. R. Gonadotoxicity of nanoparticles from rare earth metal. *Topical issues of new drugs development : Abstr. of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, Kharkiv, April 20, 2017. Kharkiv, 2017. Vol. 2. P.17-18. (Дисертант брав участь у постановці експериментального дослідження, статистичному аналізі даних, підготовці публікації).*

15. Белкіна, І. О. Вплив наночастинок гадоліній ортованадату на спермограму та метаболічні показники статевозрілих самців щурів із неонатально індукованими розладами репродуктивної функції. *Медицина наука на перетині спеціальностей: сьогодні і майбутнє: матер. наук.-практ. конф. з уч. міжнар. спеціалістів, присвяченої Дню науки, Харків, 19 трав. 2017 р. X., 2017. С. 23.*

16. Reproductive function of adult male rats after treatment liquid medicanal form of gadolinium ortovanadat nanoparticles / N. O. Karpenko, Ye. M. Korenyeva, E. Ye. Chystiakova, N. P. Smolienko, I. O. Belkina, S. P. Kustova, M. O. Boiko, V. K. Klochkov, S. V. Efimova. *Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2017): Abstract book of participants of the International Summer School and International research and practice conference, Chernivtsi, 23-26 August, 2017. Kyiv, 2017. P. 64-65. (Дисертант брав участь у роботі з експериментальними тваринами, дослідженні біохімічних показників, статистичній обробці даних).*

17. Эффективность применения наночастиц ортованадата гадолиния для коррекции расстройств репродуктивной функции / И. О. Белкина, Н. А. Карпенко, Е. М. Коренева, Н. П. Смоленко, Э. Е. Чистякова, Е. В. Шарун. *Фундаментальные и прикладные науки – медицине: тр. междунар. науч. конф., Минск, 6 октяб. 2017. Новости медико-биологических наук. News of biomedical sciences. 2017. Т. 16, № 1. С. 13-14. (Дисертант брав участь у постановці експериментального дослідження, статистичному аналізі даних, підготовці публікації).*

18. Наночастинки рідкісноземельних елементів – потенційні засоби фармакотерапії репродуктопатій / Є. М. Коренева, Н. О. Карпенко, І. О. Белкіна, Н. Ф. Величко, Н. П. Смоленко, Е. Є. Чистякова, С. П. Кустова, М. О. Бойко, В. К. Клочков. *Матер. V Національного з'їзду фармакологів України 18 – 20 жовтня 2017 р., Запоріжжя, 2017. С. 66-67. (Дисертант брав участь у постановці експериментального дослідження, статистичному аналізі даних, оформленні публікації).*

19. Репродуктивна функція самців щурів після дії наночастинок гадоліній ортованадату у різних дозах / Н. О. Карпенко, Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, Є. М. Коренева, І. О. Белкіна, В. Н. Клочков, Н. С. Кавок. *Ендокринна патологія у віковому аспекті: матер. наук.-практ. конф. з міжнар. уч., Харків, 23-24 листоп. 2017 р. X., 2017. С. 43-44. (Дисертант брав участь у постановці експерименту, статистичній обробці даних).*

20. Белкіна І. О. Чистякова Е. Є. Вплив хронічного надходження наночастинок гадоліній ортованадату самцям щурів на стан їх нащадків. *Науково-практична конференція молодих вчених, присвячена 25-річчю Національної академії медичних наук України: матер. конф., журнал Національної академії медичних наук України, спеціальний випуск, Київ, 23 бер. 2018 р. К., 2018. С. 121-122. (Дисертант брав участь у постановці експериментального дослідження, статистичному аналізі даних, підготовці публікації).*

21. Наночастинки рідкісноземельних елементів як потенційні засоби для фармакотерапії репродуктивних розладів / І. О. Белкіна, Є. М. Коренева, Е. Є. Чистякова, Н. П. Смоленко, С. П. Кустова, М. О. Бойко, В. К. Клочков, Н. О. Карпенко. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів: матер. II міжнар. наук.-практ. конф., Харків, 28-29 бер. 2018 р. Х., 2018. Т. 2. С. 49. (Дисертант брав участь у постановці експерименту, статистичному аналізі даних, підготовці тез).*

22. Белкина И. О. Острая токсичность наночастиц ортованадата гадолиния. *Медицинская наука: новые возможности: матер. XIII науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, Душанбе, 27 апр. 2018 г. Душанбе, 2018. Т. 2. С. 167-168.*

23. Vanadium nanoparticles as reproductive correctors / N. A. Karpenko, I. O. Belkina, E. M. Koreneva, E. E. Chystiakova, N. P. Smolenko, S. P. Kustova, M. A. Boiko, V. K. Klochkov. *Nanotechnologies and Nanomaterials (NANO-2018): Abstr. 6 th International Conference, Kyiv, 27-30 August, 2018, Kyiv, 2018. P. 78. (Дисертант брав участь у постановці експериментального дослідження, статистичному аналізі даних підготовці публікації).*

## АНОТАЦІЯ

*Белкіна І. О.* Застосування наночастинок гадоліній ортованадату для корекції розладів чоловічої репродуктивної функції (експериментальне дослідження). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.01.14 «Ендокринологія». – Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», Харків, 2019.

Дисертація присвячена вивченню можливості використання наночастинок (НЧ) гадоліній ортованадату, активованого європієм, ( $GdVO_4:Eu^{3+}$ ) для корекції неонатально індукованих репродуктопатій та дослідженню токсикологічних характеристик сполуки щодо репродуктивної функції інтактних тварин.

Отримано нові дані щодо можливого шляху реалізації імпринтингової дії емоційного стресу та надходження надмірної кількості фітоестрогенів у критичний період онтогенезу для програми розвитку статевої функції, яким може слугувати зниження програмувального піка тестостерону у новонароджених щурят. Продемонстровано віддалені наслідки емоційного стресу на тлі надмірної фітоестрогенізації у період молочного вигодовування для репродуктивної функції дорослих статевозрілих самців щурів, у яких зниження фертильності відбувається на тлі гормонально-метаболічних розладів. Встановлена можливість корекції чоловічих

неонатально індукованих репродуктопатій та відновлення фертильності до рівня інтактних тварин за допомогою НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ . Визначено можливий шлях дії досліджуваних НЧ через центральний механізм регуляції, а саме – через модуляцію гонадотропної активності гіпофіза. Показано низьку токсичність НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ , не виявлено негативного впливу на нащадків при прекокусмаційному використанні НЧ як у інтактних самців щурів, так і у самців-батьків з репродуктопатією. Показана залежність біологічної активності НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  від складу, дози, тривалості введення.

**Ключові слова:** наночастинки, гадоліній ортованадат, чоловіча репродуктивна функція, емоційний стрес, фітоестрогени, неонатально індуковані репродуктопатії, щури, самці.

### АННОТАЦІЯ

*Белкина И. О.* Применение наночастиц гадолиний ортованадата для коррекции расстройств мужской репродуктивной функции (экспериментальное исследование). – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 14.01.14 «Эндокринология». – Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского НАМН Украины», Харьков, 2019.

Диссертация посвящена изучению возможности использования наночастиц (НЧ) гадолиний ортованадата, активированного европием, ( $GdVO_4:Eu^{3+}$ ) для коррекции неонатально индуцированных репродуктопатий и исследованию токсикологических характеристик соединения относительно репродуктивной функции интактных животных.

Получены новые данные о возможных путях реализации импринтингового действия эмоционального стресса на фоне поступления избыточного количества фитоэстрогенов в критический период онтогенеза для программирования половой функции, которым может служить снижение программирующего пика тестостерона у новорожденных крысят. Продемонстрированы отдаленные последствия эмоционального стресса на фоне избыточной фитоэстрогенизации в период молочного вскармливания для репродуктивной функции взрослых половозрелых самцов крыс, у которых снижение фертильности сочетается с гормонально-метаболическими расстройствами. Установлена возможность коррекции мужских неонатально индуцированных репродуктопатий и восстановления фертильности до уровня интактных животных с помощью НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ . Определен возможный путь реализации действия исследуемых НЧ через центральный механизм регуляции, а именно – через модуляцию гонадотропной активности гипофіза. Показана низкая токсичность НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$ , не обнаружено негативного влияния на потомство при прекокусмационном использовании НЧ как у интактных самцов крыс, так и у самцов-родителей с репродуктопатией. Показана зависимость биологической активности НЧ  $GdVO_4:Eu^{3+}$  от дозы, состава и продолжительности введения.

**Ключевые слова:** наночастицы, гадолиний ортованадат, мужская репродуктивная функция, эмоциональный стресс, фитоэстрогены, неонатально индуцированные репродуктопатии, крысы, самцы.

## ANNOTATION

*Belkina I.O.* Application of gadolinium orthovanadate nanoparticles in correction of male reproductive function disorders (experimental research). – The manuscript.

The dissertation for the PhD degree by speciality 14.01.14 «Endocrinology». – State Institution «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, 2019.

The increase in the frequency of male hypofertility is an urgent problem of the present, and reproductive disorders of an indefinite genesis are becoming particularly important, one of the reasons of which may be the adverse effect of the damaging factors in the neonatal period of development, which violates the program for the normal functioning of the reproductive system in adulthood. This prompts the search for effective therapeutic agents based on the latest technologies. Nanomaterials can serve as such means.

Thesis is devoted to the study of the possibility of using gadolinium orthovanadate nanoparticles (NPs  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ) for the correction of neonatal induced reproductive pathologies and their toxicological characteristics regarding the reproductive function of intact animals.

Experiments were performed on sexually mature male and female rats of the Wistar population of various ages and their offspring, laboratory mice of both sexes. In the work, we used NPs  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  in the form of a hydrosol, having a rod-like shape and a size of  $8 \times 25$  nm, and a pharmaceutical formulation (liquid dosage form) based on these NPs. To determine the effectiveness of NPs  $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$  in male reproductive disturbance correction, a model of neonatal induced reproductive pathology was created by combining emotional stress conditions (model "maternal separation stress" for the mother and "clean bedding" for the offspring) from 3 to 15 days and the introduction of a diet of females an excess of a mixture of phytoestrogens (group Model).

The thesis provides new data on the mechanism of imprinting action of emotional stress and the intake of excessive of phytoestrogens in the critical period of ontogenesis for a program of development of the sexual function, which may to reduce the programmed peak of testosterone in newborns. The long-terms effects of emotional stress on the background of excessive phytoestrogenization in the suckling period for the reproductive function of adult sexually mature male rats, in which fertility reduction combine with hormonal and metabolic disorders, has been demonstrated. Among violations of the reproduction function, changes in sexual behavior were registered. The violation of spermatogenesis was revealed: the decrease in the total concentration of sperm (by 41 %) and the concentration of morphologically normal gametes (by 47 %), the increase in the proportion of their pathological forms by 145 %. The deterioration of the copulative function as a result of the exogenous factors reduced the fertilizing capacity of the rats - the fertilization index was 70 % vs 94 % in control. Pregnancies differed in fewer fetuses and increased both pre- and post-implantation losses, which led to an increase in total embryonic mortality (2,1 times). The calculation of the integral index of the average realized fertility, which takes into account the male sexual activity and the quality of the germ cells, showed that it was 47 % of the control level adopted for 100 %. In the rats of the Model group a metabolic peculiarities have been revealed: decrease in testosterone concentration, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, increased NOx concentration, lesser free arginine, increased NOx content In the testes.



The possibility of correction of male neonatal induced reproductive diseases and restoration of fertility to the level of intact animals with the help of gadolinium ortovanadate nanoparticles has been established. Corrective therapy of NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> in hydrosol increased the percentage of males capable of ejaculation. The spermatozoa total concentration and the concentration of morphologically normal gametes was increased by reducing the percentage of pathological forms. After correcting therapy of NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> in hydrosol or in pharmaceutical composition pituitary gonadotropic activity burdened neonatal male rats was normalized, which may indicate the mechanism of action of NPs through central-level regulation. When pairing with intact females fertility returned to the control group, which resulted in reduction of pre- and post-implantation losses and total losses of embryos. Reproductive potential (Fi), which takes into account the sexual activity of males and the quality of sperm, increased to 124,0 % (NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> in hydrosol) and 75,8 % (NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> in pharmaceutical composition) of the control group Fi. The use of NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> normalized the content of free arginine, triglycerides, total cholesterol.

The possible mechanism of action of these NPs through the central mechanism of regulation, namely - by modulation of gonadotropic activity of the pituitary gland is determined.

The low toxicity of NP GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> was shown. The absence of lethality in the introduction in the maximum doses allowed including NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> to grade IV toxicity (low toxicity compounds). The use of a hydrosol NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> or NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> in the pharmacological composition in intact rats or in males undergoing neonatal stress and phytoestrogenization did not adversely affect the offspring of male rats, which determines the possibility of creating innovative drugs based on NPs GdVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> for the restoration of male fertility.

**Key words:** nanoparticles, gadolinium ortovanadate, male reproductive function, phytoestrogens, emotional stress, neonatal induced reproductive pathology, rats, males.

#### ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ЗХ	– загальний холестерин
м. т.	– маса тіла
НЧ	– наночастинки
НЧгз	– наночастинки GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup> у складі гідрозолу
НЧфк	– наночастинки GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup> у складі фармацевтичної композиції (рідка лікарська форма)
НЧ GdVO <sub>4</sub> :Eu <sup>3+</sup>	– наночастинки гадолінію ортованадату, активовані європієм
ТГ	– тригліцериди
Тс	– тестостерон
ФЕ	– фітоестрогени
Фі	– показник середньої реалізованої плідності (репродуктивний потенціал)
NO <sub>x</sub>	– стабільні метаболіти циклу оксиду азоту