© Коллектив авторов, 2021
УДК 612.015.347:612.616:612.45
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16013>
ISSN – 2073-8137

ВЛИЯНИЕ ПАРОВ АММИАКА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ САМЦОВ КРЫС

Н. Г. Беляев¹, Л. Д. Тимченко¹, И. В. Ржепаковский¹, С. И. Писков¹,
А. Д. Груднева¹, В. В. Михайленко², А. А. Нагдалян¹

¹ Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь,
Российская Федерация

² Ставропольский государственный аграрный университет, Российская Федерация

AMMONIUM GAS EFFECT ON THE MALE RATS' REPRODUCTIVE SYSTEM

Belyaev N. G.¹, Timchenko L. D.¹, Rzhepakovsky I. V.¹, Piskov S. I.¹,
Grudneva A. D.¹, Mikhaylenko V. V.², Nagdalian A. A.¹

¹ North Caucasus Federal University, Stavropol, Russian Federation

² Stavropol State Agrarian University, Russian Federation

Приведена оценка влияния хронического воздействия газообразного аммиака в предельно допустимой концентрации для воздуха рабочей зоны на репродуктивную систему самцов крыс. Выявлено усиление функции надпочечников во всех морфологических зонах. Зарегистрированы изменения гормонального статуса в виде увеличения в крови уровня эстрадиола и снижения тестостерона и фоллитропина. Ведущими патологическими изменениями в семенниках явились гипотрофия и частичная десквамация сперматогенного эпителия, отслоение сперматогоний от базальной мембраны и вакуольная дистрофия интерстициальных эндокриноцитов.

Ключевые слова: пары аммиака, семенники, половые гормоны, надпочечники

An assessment of the effect of chronic exposure to gaseous ammonia in the maximum permissible concentration for the air of the working area on the reproductive system of male rats is given. An increase in the function of the adrenal glands in animals was revealed in all morphological zones. Changes in the hormonal status were recorded in the form of an increase in the blood level of estradiol and a decrease in testosterone and follitropin. The leading pathological changes in the testes were hypotrophy and partial desquamation of the spermatogenic epithelium, detachment of spermatogonia from the basement membrane, and vacuolar dystrophy of interstitial endocrinocytes.

Keywords: ammonia gas, testes, sex hormones, adrenal gland

Для цитирования: Беляев Н. Г., Тимченко Л. Д., Ржепаковский И. В., Писков С. И., Груднева А. Д., Михайленко В. В., Нагдалян А. А. ВЛИЯНИЕ ПАРОВ АММИАКА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ СИСТЕМУ САМЦОВ КРЫС. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2021;16(1):51-55. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16013>

For citation: Belyaev N. G., Timchenko L. D., Rzhepakovsky I. V., Piskov S. I., Grudneva A. D., Mikhaylenko V. V., Nagdalian A. A. AMMONIUM GAS EFFECT ON THE MALE RATS' REPRODUCTIVE SYSTEM. *Medical News of North Caucasus*. 2021;16(1):51-55. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16013> (In Russ.)

ЛГ – лютеинизирующий гормон
ПДК – предельно допустимая концентрация

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

Вопросы охраны репродуктивного здоровья мужчин приобретают высокую актуальность ввиду существенного изменения характера внешних и внутренних воздействий физической, химической и биологической природы [1, 2]. Согласно статистике, у 30 % соматически здоровых молодых и среднего возраста мужчин отмечается снижение сексуальной активности [3], а почти каждая седьмая супружеская пара страдает бесплодием, причиной которого в 50 % случаев является патология репродуктивной системы мужчин [4].

Установлено, что химические вещества, действуя на регуляторные системы, могут изменять гормональный статус и как результат повреждать сперма-

тогенез на любой стадии, а возникающие дефекты в репродуктивной системе могут передаваться последующим поколениям, что обусловлено накопительным характером влияния средних и низких концентраций токсических веществ [5, 6].

Индустриальная деятельность человека обеспечивает рост интенсивности контактов с аммиаком, фармакокинетические параметры которого провоцируют многогранное кумулятивное воздействие на разные органы и ткани [7, 8]. Описаны нежелательные эффекты аммиака на функцию печени, органов дыхания, а также на качество и подвижность сперматозоидов [9–11]. Изучения данного вопроса с учетом показателей разных звеньев репродуктивного аппарата не проводилось.

Цель исследования – оценить влияние длительно-го воздействия паров аммиака в концентрациях, не превышающих ПДК для воздуха цехов промышленных производств, на мужскую репродуктивную систему.

Материал и методы. Для создания опытной модели хронического воздействия газообразного аммиака использовались половозрелые (3-месячные) самцы крыс популяции «Wistar». Животные содержались в виварии при температуре 19–22 °С, относительной влажности воздуха 55–65 % и 12-часовом цикле освещения. Для животных соблюдался стандартный виварный пищевой рацион и свободный доступ к воде.

Крысы были разделены на две группы. Первая группа (опытная, $n=15$) включала животных, подвергавшихся в течение 40 дней по 2 часа в сутки ингаляционному воздействию аммиака в дозе 20 мг/м³, соответствующей ПДК для воздуха рабочей зоны. Крысы второй группы (контрольная, $n=15$) также ежедневно на 2 часа помещались в затравочную камеру, но находились там в условиях обычной воздушной среды.

Забор крови у крыс осуществлялся из хвостовой вены под легким эфирным наркозом в утренние часы (8–10 часов). Сыворотку образцов крови получали с использованием центрифуги MicroCL 17R (Thermo, США) в режиме: 3000 об/мин, 10 минут, при температуре 4 °С.

После умерщвления животных быстро удалялись семенники и надпочечники. Органы взвешивались с использованием прецизионных весов ML203E (Mettler Toledo, Испания) с последующим расчетом относительной массы органов.

Изъятые органы фиксировали в 10 % растворе формалина с последующей промывкой, обезвоживанием в изопропиловом спирте и заключением в медицинский парафин. Срезы органов толщиной 6–7 мкм

производили с помощью микротомы MC-2 («АТМ-практика», Россия). Для окраски полученных срезов использовали гематоксилин и эозин.

Визуализацию и гистопатологическую оценку микропрепаратов семенников и надпочечников проводили с применением микроскопа Axio Imager 2 (A2), цифровой камеры AxioCam MRc5 и программного приложения Zen Pro фирмы Carl Zeiss Microscopy (Германия).

Измерение количества в крови лутеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), эстрадиола и тестостерона проводили методом иммуноферментного анализа с помощью микропланшетного фотометра ImmunoChem-2100 (НТИ, США) и коммерческих наборов реактивов.

Статистическая обработка всех количественных данных проводилась с использованием программы Biostat (version 4.03, США). Применялся t-критерий Стьюдента и критерий Манна – Уитни. Результаты представлялись в виде среднего арифметического ($M \pm m$). Достоверность различий величин принималась при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Под влиянием 40-дневной затравки животных аммиаком в дозе 20 мг/м³ относительная масса надпочечников ($10,58 \pm 0,82$ мг/100 г) достоверно превышала таковую у крыс контрольной группы ($6,75 \pm 0,75$ мг/100 г) ($p < 0,05$). Кроме того, в пучковой и клубочковой зонах надпочечников животных опытной группы отмечалась гиперхромность ядер адренокортикоцитов, наблюдалось много гипертрофированных адренокортикоцитов в состоянии декомпенсации, регистрировались разрушенные адренокортикоциты. Выявлено увеличение числа мелких малодифференцированных клеток, расположенных между клубочковой и пучковой зонами (рис. 1).

Рис. 1. Надпочечник крысы, окраска гематоксилин-эозином:

- А – надпочечник крысы контрольной группы.
($\times 100$; 1 – наружная соединительнотканная капсула; 2 – корковое вещество; 3 – мозговое вещество);
В – надпочечник крысы опытной группы
($\times 100$; 1 – наружная соединительнотканная капсула; 2 – корковое вещество; 3 – мозговое вещество);
С – капсула, клубочковая и пучковая зоны коры надпочечника крысы опытной группы
($\times 400$; 1 – гиперхромность ядер адренокортикоцитов клубочковой зоны; 2 – гиперхромность ядер адренокортикоцитов пучковой зоны; 3 – скопление мелких малодифференцированных клеток между клубочковой и пучковой зонами)

В сетчатой зоне надпочечников выявлено расширение кровенаполненных капилляров с признаками стаза. Отмечалось увеличение числа хромаффинных клеток мозгового вещества и анастомозов с расширенными капиллярными синусами.

Затравка крыс аммиаком не изменяла массу семенников ($0,78 \pm 0,02$ г/100 г – опыт; $0,81 \pm 0,03$ г/100 г – контроль). Однако хроническое воздействие аммиака обеспечивало в семенниках развитие подострого очагового паренхиматозного воспаления. Между извитыми семенными канальцами наблюдались скопления жидкости, особенно множественные вокруг кровеносных сосудов, расположенных ближе к белочной оболочке семенника. Обнаруживалась гипотрофия и частичная десквамация сперматогенного эпителия (рис. 2А). В отдельных участках его толщина не превышала двух слоев клеток, в основном были видны сперматогонии и сперматоциты первого порядка. В некоторых извитых семенных канальцах регистрировалось отслоение сперматогоний от базальной мембраны. В просвете $35,0 \pm 5,0$ % извитых семенных канальцев отсутствовали спермии.

В интерстициальной ткани семенников животных опытной группы вокруг извитых семенных канальцев во всех полях зрения обнаруживались эндокринные клетки, большинство из которых были в состоянии вакуольной дистрофии. Выявлялись клеточные инфильтраты, состоящие преимущественно из макрофагов и лимфоцитов и единичных эозинофилов (рис. 2Б). Стенки артерий, расположенных ближе к белочной оболочке, были неравномерно утолщены, местами разволокнены и гомогенизированны. Эндотелий артериол очагово десквамирован, в отдельных артериальных сосудах обнаруживалась очаговая пролиферация клеток эндотелия.

Выявлены достоверные изменения инкреторной функции гипофизарно-семенникового комплекса в крови у животных после затравки аммиаком (табл.) со снижением уровня тестостерона на 11,2 % от исходной величины, ФСГ – на 12,7 %, с двукратным повышением концентрации эстрадиола. Уровень ЛГ не изменялся и был близок к исходному показателю и его величине у животных контрольной группы.

Эти данные подтверждают результаты предыдущих исследований [3], согласно которым у мужчин, длительно работающих на химическом предприятии, где в воздухе производственных помещений одними из основных химических загрязнителей являются оксид азота и аммиак, зарегистрировано достоверное снижение в крови концентраций тестостерона, гонадотропинов и повышение уровня эстрадиола.

Выявленное в эксперименте снижение ФСГ и, как возможное следствие, падение продукции тестостерона могут быть ответственны за вызванные ингаляцией аммиака нарушения морфологической структуры семенников.

Снижение в крови тестостерона и ФСГ у животных в этом эксперименте может быть связано с торможением гипоталамуса и гипофиза в репродуктивной оси. Вполне возможно, это обусловлено развитием у животных химической стресс-реакции и, как следствие, действием кортикостерона на синтез тестостерона, ЛГ и ФСГ по механизму обратной связи с функциональным повреждением клеток Лейдига, изменениями в синтезе 17-гидроксилазы, участвующей в биосинтезе гормонов [12].

Нельзя исключить и непосредственное токсическое действие аммиака на тестикулярные ткани животных, что подтверждается выявленными нарушениями морфологической структуры семенников по типу подострого очагового паренхиматозного токсического воспаления. В этом случае сни-

Рис. 2. Семенник крысы. Окраска гематоксилин-эозином:

А – семенник крысы контрольной группы ($\times 50$; стрелками указаны извитые семенные канальцы); В – семенник крысы контрольной группы ($\times 200$; стрелками указаны интерстициальные клетки); С – извитой семенной каналец крысы контрольной группы ($\times 400$; 1 – сперматогонии; 2 – сперматоциты первого порядка; 3 – сперматоциты второго порядка; 4 – спермии); Д – семенник крысы опытной группы. Скопление жидкости между извитыми семенными канальцами и вокруг кровеносных сосудов ($\times 50$; отмечено стрелками); Е – семенник крысы опытной группы. Гипотрофия и очаговая десквамация сперматогенного эпителия ($\times 200$; отмечено стрелками); Ф – семенник крысы опытной группы. Скопление жидкости и клеточные инфильтраты между извитыми семенными канальцами ($\times 400$; стрелкой отмечены эозинофилы)

жение секреции ФСГ может быть вызвано сигналом отрицательной обратной связи от поврежденных семенных канальцев, которая регулируется продуктом клеток Сертоли – ингибином В [13].

Таблица
Динамика половых и гонадотропных гормонов в крови животных в условиях ингаляционной затравки парами аммиака (M±m)

Группа животных	Тестостерон, нмоль/л	Эстрадиол, нмоль/л	ФСГ, МЕ/л	ЛГ, МЕ/л
Начало эксперимента				
Контрольная	2,51±0,07 ^a	0,62±0,016 ^a	1,79±0,06 ^a	0,76±0,019 ^a
Опытная	2,53±0,08 ^a	0,60±0,015 ^a	1,81±0,07 ^a	0,69±0,017 ^a
Завершение эксперимента				
Контрольная	2,49±0,08 ^a	0,64±0,02 ^a	1,76±0,03 ^a	0,74±0,018 ^a
Опытная	2,37±0,05 ^b	1,15±0,04 ^b	1,56±0,07 ^b	0,71±0,018 ^a

Примечание. Средние значения в одном столбце с разными индексами статистически различны (p<0,05).

Зарегистрированное на фоне хронической затравки аммиаком снижение в крови тестостерона при неизменившемся уровне ЛГ может быть обусловлено уменьшением и количества ЛГ-рецепторов в поврежденных тестикулярных тканях, что неоднократно зафиксировано при изучении репродуктивных токсикантов [14, 15].

Не менее интересным представился статистически достоверный факт повышения концентрации эстрадиола в крови самцов крыс после воздействия парами аммиака. Угнетающее действие гиперэстрогении на сперматогенез может быть как прямым – посредством блокады действия ФСГ, так и опосредованным через подавление активности гипоталамо-гипофизарной системы. Кроме того, избыток эстрадиола или некоторых его метаболитов может

повлиять на нормальную выработку сперматозоидов, из-за прямого воздействия на зародышевый эпителий семенника [13].

Выявленный в эксперименте выраженный подъем уровня эстрадиола в крови также дает основание полагать, что аммиак выступает своего рода эндокринным дизраптором, стимулирует эстрогенную функцию гонад и надпочечников и может быть связан с усилением активности ароматазы, превращающей андрогены в эстрогены, что является еще одной возможной причиной снижения уровня тестостерона в крови [13].

Закключение. Экспериментальное исследование показало, что в условиях хронического воздействия паров аммиака в дозе, соответствующей ПДК для рабочей зоны (до 20 мг/м³), у самцов белых крыс развиваются морфологические нарушения в структуре семенников и изменения гормонального статуса как половых, так и гонадотропных гормонов.

Сперматогенез человека более чувствителен к стрессу и химическим веществам, чем у крыс, поэтому не исключено, что ингаляционное воздействие аммиака кумулятивного характера в концентрациях меньших, чем те, которые использовались в настоящем исследовании, может нарушать сперматогенез у человека. Это вызывает необходимость специальных исследований для установления точных дозозависимых отношений между мужской репродуктивной системой и профессиональным воздействием газообразного аммиака.

Информированное согласие: Экспериментальное исследование проведено в полном соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики, изложенными в национальном стандарте «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434–2009, с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003) и положительным заключением этического комитета.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

- Gur S., Sikka S. C. Environmental Risk Factors Related to Male Reproductive Health in Turkish Society. *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproduction and Sexual Health* / Eds. S. C. Sikka, W. J. G. Hellstrom. 2018;41-52. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801299-4.00003-7>
- Deng Z., Chen F., Zhang M., Lan L., Qiao Z. [et al.]. Association between air pollution and sperm quality: a systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*. 2017;208:663-669. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.044>
- Beutel M. E., Burghardt J., Tibubos A. N., Klein, E. M., Schmutzer G., Brähler E. Declining Sexual Activity and Desire in Men—Findings From Representative German Surveys, 2005 and 2016. *J. Sex. Med.* 2018;15(5):750-756. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2018.03.010>
- Lindgren M. C. Male Infertility. *Phys. Assist. Clin.* 2018;3(1):139-147. <https://doi.org/10.1016/j.cpha.2017.08.002>
- Renu K., Madhyastha H., Madhyastha R., Maruyama M., Vinayagam S., Valsala Gopalakrishnan A. Review on molecular and biochemical insights of arsenic-mediated male reproductive toxicity. *Life Sci.* 2018;212:37-58. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.09.045>
- Zhang W., Zhao Y., Zhang P., Hao Y., Yu S. [et al.]. Decrease in male mouse fertility by hydrogen sulfide and/or ammonia can Be inheritable. *Chemosphere*. 2018;194:147-157. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.164>
- Wlazlo Ł., Nowakowicz-Dębek B., Kapica J., Kwiecień M., Pawlak H. Removal of ammonia from poultry manure by aluminosilicates. *J. Envir. Manag.* 2016;183:722-725. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.028>
- Cope R. Toxic Gases and Vapors. *Veterin. Toxicol.* / Ed. R. C. Gupta. 2018;629-645. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811410-0.00048-9>
- Perkins M. W., Wong B., Tressler J., Rodriguez A., Sherman K. [et al.]. Adverse respiratory effects in rats following inhalation exposure to ammonia: respiratory dynamics and histopathology. *Inhalation Toxicol.* 2017;29(1):32-41. <https://doi.org/10.1080/08958378.2016.1277571>
- Dasarathy S., Mookerjee R. P., Rackayova V., Rangroo Thrane V., Vairappan B. [et al.]. Ammonia toxicity: from head to toe? *Metab. Brain Dis.* 2017;32(2):529-538. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9938-3>
- Zhang W., Zhao Y., Zhang P., Hao Y., Yu S. [et al.]. Decrease in male mouse fertility by hydrogen sulfide and/or ammonia can Be inheritable. *Chemosphere*. 2018;194:147-157. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.164>
- Lu M., Zhang R., Yu T., Wang L., Liu S. [et al.]. CREB-ZF regulates testosterone production in mouse Leydig cells. *J. Cell. Phys.* 2019;234(12):22819-22832. <https://doi.org/10.1002/jcp.28846>

13. Schulster M., Bernie A. M., Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian J. Androl.* 2016;18(3):435-440. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.173932>
14. Darbandi M., Darband S., Agarwal A., Sengupta P., Durairajanayagam D. [et al.]. Reactive oxygen species and male reproductive hormones. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018;16(1):87. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0406-2>
15. Rehman S., Usman Z., Rehman S., AlDraihem M., Rehman N. [et al.]. Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health. *Translat. Androl. Urol.* 2018;7(3):490-503. <https://doi.org/10.21037/tau.2018.05.17>

Сведения об авторах:

Беляев Николай Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биомедицины и физиологии института живых систем; тел.: 89034411854; e-mail: belyaev_nikolay@mail.ru

Тимченко Людмила Дмитриевна, доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры прикладной биотехнологии; тел.: 89054173022; e-mail: l_timchenko@mail.ru

Ржепаковский Игорь Владимирович, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник; тел.: 89054164981; e-mail: 78igorr@mail.ru

Писков Сергей Иванович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; тел.: 89054191482; e-mail: piskovsi77@mail.ru

Груднева Александра Дмитриевна, аспирант; тел.: 89888629264; e-mail: s9888629264@yandex.ru

Михайленко Виктор Васильевич, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы, анатомии и патанатомии; тел.: 89188663103; e-mail: mihaylenko@live.ru

© Л. И. Губарева, 2021

УДК 618. 3:612.64/65.612.45.

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2021.16014>

ISSN – 2073-8137

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ НА АДАПТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ГИПОТАЛАМО- ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К СТРЕССУ У КРЫС

Л. И. Губарева

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Российская Федерация

INFLUENCE OF PRENATAL HYPOGLYCEMIA ON THE ADAPTIVE POSSIBILITIES OF THE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSEAL-ADRENOCORTICAL SYSTEM AND RESISTANCE TO STRESS IN RATS

Gubareva L. I.

North Caucasus Federal University, Stavropol, Russian Federation

Изучали содержание глюкозы в крови, функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГКС) и ее реакцию на действие стрессоров у самок крас, подвергнутых в период беременности гипогликемии введением инсулина, а также у их потомства. Установлено, что гипогликемия во время беременности вызывает стрессовое активирование ГГКС по сравнению с физиологической беременностью. Эпизодическая гипогликемия матери приводит к двухфазной реакции ГГКС её потомства: повышению функциональной активности в поздний пренатальный и ранний постнатальный периоды (–1–30 дней) и последующему понижению (45–365 дней) по сравнению с контролем. Для обеих фаз характерно снижение резистентности к предельным мышечным нагрузкам и иммобилизации, а также истощение ГГКС, наиболее выраженное в период новорожденности, полового созревания и в 12-месячном возрасте.

Ключевые слова: крысы, гипогликемия, гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система, адаптация, стрессрезистентность потомства

We studied the blood glucose content, functional state of HHACS and its response to stressors in female rats exposed to insulin hypoglycemia during pregnancy, as well as in their offspring. It was found that hypoglycemia during pregnancy causes stressful activation of HHACS in comparison the level of physiological pregnancy. Episodic hypoglycemia of the mother leads to a two-phase reaction of HHACS of her offspring: an increase in functional activity in the late prenatal and