

УДК 547.455.623'233.1:612.694:612.69-008.6:612.617

Л. В. ЯКОВЛЄВА, Є. О. КОВАЛЬОВА, О. Ю. КОШОВА

*Національний фармацевтичний університет*

## ДИНАМІКА ВМІСТУ N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМІНУ НА ТЛІ СТАРІННЯ СТАТЕВОЇ СИСТЕМИ ЩУРІВ САМЦІВ

*Дослідження присвячене експериментальному вивченню залежності рівня ендogenous N-АцГА від вікових змін репродуктивної системи щурів самців. Встановлено, що інволюція репродуктивної системи спостерігається, починаючи з віку 18 місяців, найбільш виражені зміни функціональних показників були у 21 місячних тварин, але виразні порушення морфоструктури спостерігали у 26 місячних самців. Виражені зміни згасання репродуктивної системи у 18-26-місячних тварин корелюють зі збільшенням вмісту загального та вільного N-АцГА у сироватці крові та зі зменшенням вмісту N-АцГА у сім'яниках, що вказує на наявність взаємозв'язку між віком щурів, динамікою показників сперматогенної функції та вмістом N-АцГА.*

*Ключові слова:* старіння; репродуктивна функція; самці щурів

### ВСТУП

В останні роки спостерігається збільшення тривалості статевого життя в середньому на 10-12 років у чоловіків і на 7-8 років у жінок. Це веде до тривалішого періоду життя після початку розвитку інволюційних процесів сексуальності як у чоловіків, так і у жінок [6]. У зв'язку з цим актуальним є вивчення факторів, від яких залежить збереження репродуктивної функції більш тривалий час. На сьогодні проблема дослідження фундаментальних механізмів старіння та пошуку геропротекторних засобів щодо репродуктивної системи є широко досліджуваною у багатьох країнах світу [1, 8]. Разом з тим аналіз даних вітчизняної та іноземної літератури з цих питань переконливо свідчить про обмеженість досліджень у цьому напрямку (Кудрявцева Т. А. і співавт., 2006; Bravo L., 1998; Cutler R., 1999; Salan N., 1995; Lynnette R., 2001).

Глюкозамін, який є природним метаболітом та субстратом, необхідним для біосинтезу таких сполук, як гліколіпіди, глікопротеїни, глікозаміноглікани, гіалуронат та протеоглікани, бере участь у процесах функціонування репродуктивної системи. Глюкозамін входить до складу гіалуронової кислоти – сполуки, важливої для репродуктивних процесів. Глюкозамін входить також до складу протеогліканів, яким належить важлива роль у регуляції функціонування сім'яників та у синтезі тестостерону клітинами Лейдіга (Grudet N. et al., 1999) [10]. Проте даних щодо вікових особливостей динаміки розподілу ендogenous глюкозаміну у сироватці крові та тканинах статевих органів при згасанні функціонування репродуктивної систе-

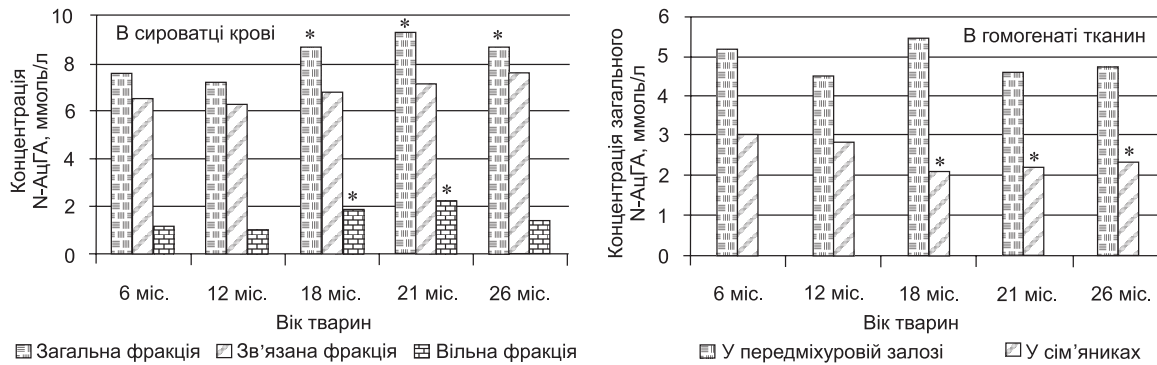
ми експериментальних тварин при старінні ще немає. В експериментальних роботах закордонних дослідників є дані про те, що введення глюкозаміну самцям щурам підвищує синтез субстрату, необхідного для утворення мембран сперматозоїдної клітини та сприяє збільшенню кількості сперматозоїдів. До того ж глюкозамін сприяє збільшенню клітинами Сертолі продукції факторів, що стимулюють сперматогенез (S. Brucato та співавт., 2002) [9]. Останнім часом в акушерсько-гінекологічній та урологічній практиці успішно використовують лікарські засоби, що містять глікозаміноглікани, до складу яких входить аміноцукор глюкозамін. Привертають увагу роботи японських учених з вивчення впливу N-АцГА на взаємодію яйцеклітини зі сперматозоїдами.

Метою даного дослідження було вивчення динаміки рівня ендogenous метаболіту N-ацетилглюкозаміну у процесі старіння репродуктивної системи щурів самців у сироватці крові та гомогенатах андрогенозалежних органів.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведені на білих безпородних щурах самцях різного віку – 6, 12, 18, 21 та 26 місяців. Співвідношення віку тварин з віком людини визначали за Гуськовою Т. А. [3]. Вік 6 місяців відповідає статевозрілому репродуктивному віку (20-24 роки), вік 12 міс. – зрілому ранньому (31-43 роки), 18 міс. – передстаречому (45-55 років), 21-26 міс. – старечому (56-60 років та старше). Під час експерименту тварини знаходилися у віварії при температурі 18-24 °С, вологості 50-60 %, природному світловому режимі «день-ніч» у пластикових клітках на збалансованому харчовому раціоні. Дослідження проведені з дотриман-

© Яковлєва Л. В., Ковальова Є. О., Кошова О. Ю., 2015



**Рис. 1.** Динаміка рівня різних фракцій *N*-ацетилглюкозаміну у сироватці крові (а) та андрогенозалежних органах (б) тварин різного віку,  $n = 6-8$  (\* – відмінності статистично значущі при порівнянні з групою інтактних 6-місячних тварин (критерій Ньюмена-Кейлса,  $p < 0,05$ ).

ням правил «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) [4].

Кількісне визначення ендogenous *N*-ацГА проводили за методом Ельсона-Моргана, заснованого на взаємодії гексозаміну з реактивом Ерліха в спиртовому середовищі в модифікації авторів І. А. Зупанця, С. К. Шебеко, 2005 [5]. У крові визначали загальну та зв'язану фракції *N*-АцГА. Фракцію вільного *N*-АцГА розраховували за різницею середніх значень вмісту загального і зв'язаного аміноцукру. У сім'яниках та передміхуровій залозі (ПЗ) вміст загального *N*-АцГА визначали за тією ж методикою [5].

Як інтегральний показник фізіологічного стану внутрішніх статевих органів визначали відносну масу (масові коефіцієнти (МК) г/100 г маси тіла тварини) сім'яників, придатків сім'яників, сім'яних пухирців та передміхурової залози. У суспензії, отриманій з придатків сім'яників, оцінювали показники функціонального стану сперматозоїдів (кількість, рухливість, патологічні форми) [2]. Шляхом світлової мікроскопії проводили гістологічне дослідження тканин сім'яників. Сім'яники фіксували в 10 % розчині формаліну, заливали в парафін. Зрізи забарвлювали гематоксилином і еозином. На зрізах сім'яників окрім оглядової мікроскопії проводили морфометричну оцінку процесу сперматогенезу з визначенням індексу сперматогенезу, відносної кількості звивистих сім'яних каналців з 12-ю стадією мейозу, відносної кількості звивистих сім'яних каналців зі злущеним сім'яродним епітелієм, середньої кількості нормальних сперматогоній у звивистому сім'яному каналці [2].

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики. Відмінності між групами вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ . Для отримання статистичних висновків при порівнянні вибірок відносних перемінних застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (або критерій Крускала-Уоліса для даних, які не підлягають нормальному закону розподілення). Статистичні відмінності між експериментальними групами визначали за

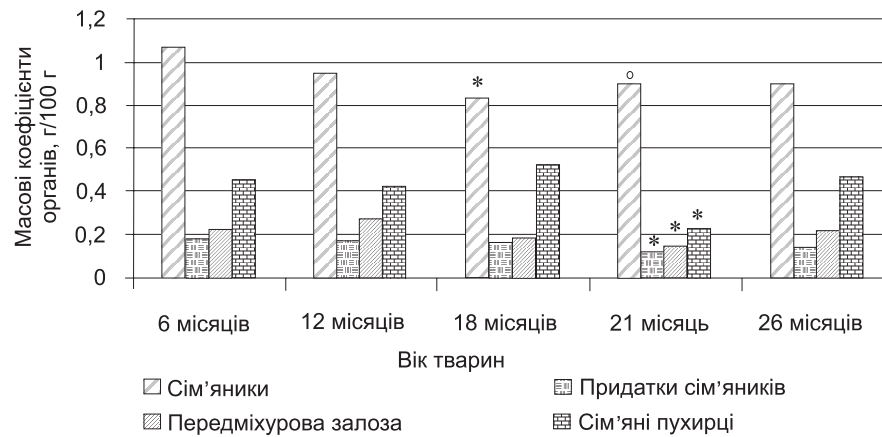
критеріями Ньюмана-Кейлса або Манна-Уйтні [7]. Кореляційний аналіз проводили з використанням коефіцієнта Спірмана при рівні значущості відмінностей  $p < 0,05$ . Для проведення математичних розрахунків застосовували стандартний пакет статистичних програм «Statistica, v. 6,0».

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті дослідження динаміки вмісту *N*-АцГА та його розподілу в організмі інтактних щурів у процесі онтогенезу встановлені значні відмінності при порівнянні з групою репродуктивного контролю віком 6 місяців (рис. 1).

Головним чином збільшувався рівень загального *N*-АцГА у сироватці крові щурів самців віком 18, 21 та 26 місяців ( $p = 0,00003$ ), кореляційний аналіз показав сильну позитивну залежність даного показника від віку ( $r = 0,65$ ,  $p = 0,00002$ ). Динаміка зв'язаної фракції *N*-АцГА мала незначне збільшення у віці 21 та 26 місяців без статистичної значущості за дисперсійним аналізом, хоча кореляційний аналіз виявив середню позитивну залежність динаміки зв'язаної фракції *N*-АцГА від віку ( $r = 0,55$ ,  $p = 0,0007$ ). Переважний вплив на динаміку рівня загального *N*-АцГА мала вільна фракція *N*-АцГА, яка також збільшувалась у 18 та 21 місячних щурів у 1,7 та 2 рази відповідно, у 26 місячних щурів збільшення було менш виразним. Кореляційний аналіз вказує на середню позитивну залежність збільшення вільного *N*-АцГА від віку ( $r = 0,45$ ,  $p = 0,0067$ ). У тварин 12-місячного віку не спостерігали відмінностей динаміки вмісту *N*-АцГА та його розподілу при порівнянні з показниками у щурів репродуктивного контролю.

Проведені дослідження з визначення вмісту *N*-АцГА в андрогенозалежних органах дозволили встановити деяке зниження рівня цього аміноцукру в передміхуровій залозі, але зміни не мали стійкої направленості та статистично не відрізнялися від репродуктивного контролю 6 місячних самців. Вміст *N*-АцГА в сім'яниках статистично значуще знижувався з віком, починаючи зі щурів віком 18 місяців (на 33 %)



**Рис. 2.** Масові коефіцієнти андрогензалежних органів щурів різного віку (\* – відмінності статистично значущі при порівнянні з групою 6-місячних тварин,  $p < 0,05$ , ° – тенденція  $0,1 < p < 0,05$  (критерій Ньюмена-Кейлса).

та стійко зберігався у 21 та 26 місячних самців (на 29 % та 25 % відповідно) (рис. 1). Кореляційний аналіз також підтвердив залежність вмісту N-АцГА у сім'яниках від віку ( $r = -0,53$ ,  $p = 0,0025$ ).

Вивчення вікових змін маси органів статеві системи показало, що з віком у тварин відбувається зниження відносної маси статевих органів. Однак, достовірні стійкі зміни зафіксовані для маси сім'яників починаючи з віку 18 місяців (рис. 2).

Маса передміхурової залози і сім'яних пухирців знижується більш повільно, статистично значущі зміни спостерігаються тільки з 21-місячного віку. Найбільш виразно знижувались МК статевих органів у самців віком 21 місяць. Кореляційний аналіз показав залежність зміни МК сім'яників та їх придатків від віку – негативний середній та сильний зв'язок відповідно ( $r = -0,36$ ,  $p = 0,0293$  та  $r = -0,61$ ,  $p = 0,00005$ ).

Інволюція органів статеві системи щурів самців свідчить про наявність порушень їх функції, тому на наступному етапі було досліджено функціональну активність сперматозоїдів.

Вивчення спермограми щурів різного віку показало, що при старінні відбувається суттєве порушення показників функціонального стану сперматозоїдів: зменшується їх кількість та тривалість рухливості (сильний негативний зв'язок  $r = -0,64$ ,  $p = 0,0000$  та  $r = -0,72$ ,  $p = 0,0000$  відповідно), підвищується відносна кількість нерухомих гамет та відносна кількість патологічних форм сперматозоїдів (середній позитивний зв'язок  $r = 0,37$ ,  $p = 0,0253$  та  $r = 0,36$ ,  $p = 0,0262$  відповідно) у тварин віком 18-26 місяців у порівнянні з тваринами репродуктивного віку. Зниження кількості сперматозоїдів мало стійку виразність у тварин віком 18-26 місяців. Найбільш виразні зміни показників спермограми встановлені у тварин віком 21 місяць: кількість сперматозоїдів знижувалась майже у 4 рази, тривалість рухливості – в 1,7 рази, на 24 % підвищувалась відносна кількість нерухомих сперматозоїдів та у 2 рази підвищувалась кількість патологічних форм сперматозоїдів (табл. 1). Всі наведені зміни мали статистично значущі відмінності від 6 місячних тварин.

Таблиця 1

#### ДИНАМІКА ПОКАЗНИКІВ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ СПЕРМАТОЗОЇДІВ У ЩУРІВ САМЦІВ ПРИ СТАРІННІ (n = 6-8)

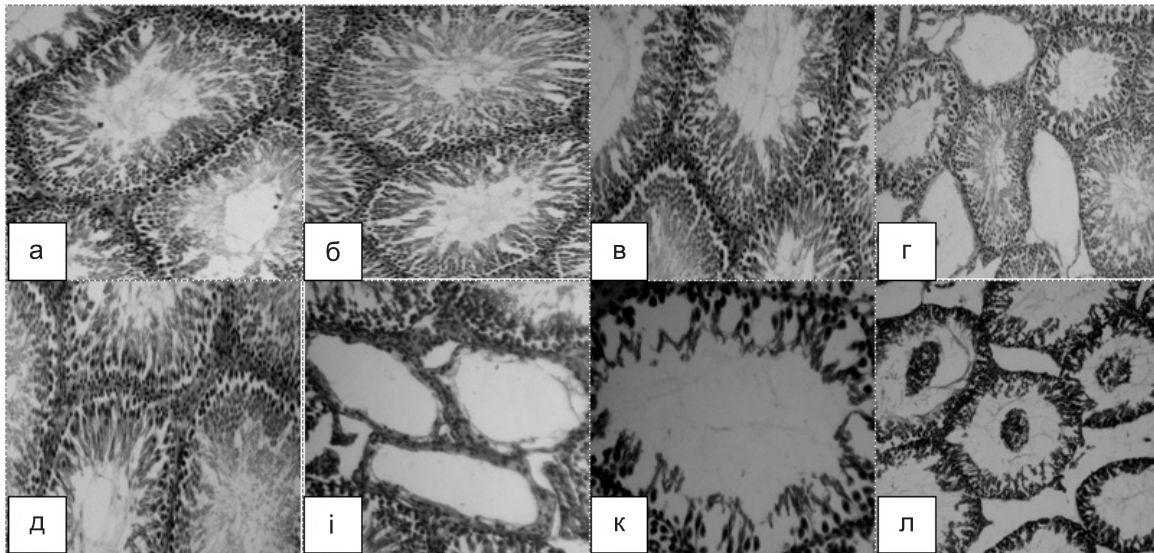
Вікові категорії тварин	Показники функціонального стану сперматозоїдів			
	кількість, млн	тривалість рухливості, хв	відносна кількість нерухомих, %	відносна кількість патол. форм, %
6 місяців	46 ± 4	413 ± 11	70 (63; 77)	9 (8; 13)
12 місяців	30 ± 5	430 ± 13	64 (63; 64)	9 (8; 13)
18 місяців	29 ± 7*	388 ± 11	83 (76; 95)*	14 (10; 27)
21 місяць	12 ± 3*	240 ± 41*	87 (80; 90)*	18 (17; 19)*
26 місяців	20 ± 3*	302 ± 27*	77 (73; 79)	13 (10; 19)

Примітки:

1) \* – відмінності статистично значущі при порівнянні з групою 6-місячних тварин (критерій Ньюмена-Кейлса<sup>1</sup>, Манна-Уїтні<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ );

2)  $M \pm m$  – середнє арифметичне значення та стандартна похибка;

3) Me (LQ; UQ) – медіана (нижній та верхній кватилі).



**Рис. 3.** Морфологічний стан канальців сім'яників щурів віком 6 міс. (а – нормальний стан сім'яних канальців), 12 міс.; (б – нормальний стан сім'яних канальців), 18 міс.; (в – нормальний стан сім'яних канальців, г – дрібні групи спустошених канальців серед незмінених канальців), 21 міс.; (д – різні генерації статевих клітин у стінці сім'яних канальців, і – спустошені канальці серед незмінених канальців), 26 міс.; (к – редукція рядів статевих клітин, л – злушення статевих клітин у просвіт канальців).

З метою оцінки механізмів та швидкості розвитку вікових порушень функціонування репродуктивної системи щурів самців з віком було проведено гістологічне вивчення тканин сім'яників. Проведене дослідження показало, що у сім'яниках щурів у процесі старіння виникають структурні зміни сперматогенного епітелію та ендокринного апарату. Виразність перебудов у значній мірі індивідуальна і в той же час корелює з віком тварин. Інволюційні зміни сперматогенного епітелію характеризуються зниженням активності сперматогенезу від відсутності статевих клітин у окремих групах сім'яних канальців до повного асперматогенезу у поодиноких самців (рис. 3).

Вікові перебудови ендокринного апарату проявляються у зменшенні функціонально активних гормонотворюючих клітин Лейдіга, появи проліфератів дрібних незрілих форм цих клітин.

Аналізуючи морфометричні показники сперматогенезу (табл. 2), ми встановили порушення гаметогенезу у 18 місячних самців, у той час як у 6- та 12-місячних самців усі показники відповідають фізіологічній нормі. Індекс сперматогенезу, який характеризує сукупність усіх стадій сперматогенезу у канальцях сім'яників, а також кількість канальців, у яких спостерігається мітотичний поділ, статистично значуще знижувались у всіх групах старих тварин.

Таблиця 2

**ЗМІНИ МОРФОМЕТРИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРОЦЕСУ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ У ЩУРІВ САМЦІВ ПРИ СТАРІННІ (n = 6-8)**

Вікові категорії тварин	Кількість нормальних сперматогоній	Індекс сперматогенезу, бали	Кількість канальців з 12-ою стадією мейозу,%	Кількість канальців зі злущеним епітелієм,%
	M ± m <sup>1</sup>			
6 місяців	61,0 ± 0,4	3,34 (3,33; 3,35)	4,0 (3,5; 4,5)	0,0 (0,0; 1,0)
12 місяців	60,4 ± 1,2	3,33 (3,33; 3,34)	4,0 (4,0; 4,0)	0,0 (0,0; 1,0)
18 місяців	59,7 ± 1,1	3,21* (3,01; 3,33)	3,0 (3,0; 4,0)	0,0 (0,0; 1,0)
21 місяць	53,4 ± 6,4	3,21* (2,67; 3,40)	3,0* (2,0; 3,0)	0,0 (0,0; 0,0)
26 місяців	37,6 ± 12,5 *	3,29* (3,07; 3,30)	3,0* (2,0; 3,0)	2,0 <sup>p=0,09</sup> (1,0; 2,0)

Примітки:

1)\* – відмінності статистично значущі при порівнянні з групою 6-місячних тварин (критерій Ньюмена-Кейлса<sup>1</sup>, Манна-Уїтні<sup>2</sup>, p < 0,05);

2) M ± m – середнє арифметичне значення та стандартна похибка;

3) Me (LQ; UQ) – медіана (нижній та верхній кватилі).

рин – 18, 21 та 26 місяців. Кількість нормальних сперматогоній майже не змінюється у самців 12 та 18 місяців, невелике та статистично незначуще зниження відбувається у віці 21 місяць та значне зниження у 1,6 рази у самців віком 26 місяців. Відсоток канальців зі злущеним епітелієм підвищувався також лише у самців 26 місяців.

### ВИСНОВКИ

Встановлено, що у щурів самців згасання репродуктивної функції спостерігається, починаючи з 18 місячного віку. Результати спермограми показують зниження концентрації сперматозоїдів і їх рухливості, що підтверджено морфологічно зниженням індексу сперматогенезу. Зменшується масова частка органів статеві системи. Тварини віком 21 місяць мали найбільш виразні зміни за показниками спермограми та МК статевих органів, що виділяє цей вік як період найбільш виразної гормональної перебудови у функціональному стані статеві системи щурів самців. Подальше старіння до 26 міс. супроводжується адаптивними процесами та відносною стабілізацією деяких показників функціонування репродуктивної системи, хоча як показало гістологічне дослідження стан сім'яних канальців у 26 місячних самців має прогресуючі інволюційні зміни як сперматогенного епітелію, так і ендокринного апарату.

Виразені зміни згасання репродуктивної системи у 18-26-місячних тварин корелюють зі збільшенням вмісту загального та вільного N-АцГА у сироватці крові та зі зменшенням вмісту N-АцГА у сім'яниках, що вказує на наявність взаємозв'язку між віком щурів та динамікою показників сперматогенної функції та вмістом N-АцГА.

Отримані результати вказують на те, що при старінні відбувається уповільнення синтетичних процесів та накопичення вільної фракції глюкозаміну, тобто включення його в матрикс сполучної тканини сповільнюється. При старінні відбувається зниження інтенсивності біотрансформації N-АцГА та уповільнення включення його до глікозаміногліканів простати, сім'яників та сперматозоїдів, що призводить до зниження показників репродуктивної функції: інволюцію органів статеві системи, активності процесу сперматогенезу.

Таким чином, отримані результати підтверджують важливість рівня N-АцГА для підтримання активного стану репродуктивної системи при старінні. Отже, перспективним є дослідження шляху вирішення проблеми передчасного старіння репродуктивної системи за допомогою застосуванням екзогенного глюкоз-

аміну. Полівалентна фармакодинаміка – наявність мембранопротекторної, протизапальної, антиоксидантної, антиагрегантної, хондропротекторної, гепатозахисної та ін. видів фармакологічної дії (С. В. Мисюрьова, 2001; А. Н. Семенов, 2001; Н. В. Бездітко, 2003; І. А. Зупанець зі співавт., 2002, 2004) та низька токсичність глюкозаміну дозволяють передбачити високу ефективність його в терапії багатьох хвороб, у тому числі і відносно вікового згасання чоловічої репродуктивної системи.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. – 356 с.
2. Барияк І. Р., Неумержицька Л. В., Бишовець Т. Ф., Даниленко В. С. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин. // В кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіценна, 2001. – С. 139-152.
3. Гуськова Т. А. Токсикология лекарственных средств. – М.: Изд. дом «Русский врач», 2003. – 154 с.
4. Западнюк М. П., Западнюк В. И., Захария Е. А. Лабораторные животные. Использование в эксперименте. – К.: Высш. шк., 1983. – 382 с.
5. Зупанець І. А. Уніфікація методів кількісного визначення ендогенного глюкозаміну в біологічному матеріалі / І. А. Зупанець, С. К. Шебеко // Фармаком. – 2005. – № 4. – С. 56-61.
6. Комплексний демографічний прогноз України на період до 2050 р. (колектив авторів) / За ред. чл.-кор. НАНУ, д.е.н., проф. Е. М. Лібанової. – К.: Укр. центр соціальних реформ, 2006. – 138 с.
7. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд.: [учебник] / А. А. Халафян. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.
8. Abstracts of the 5-th World congress of the Aging Male. In: The Aging Male. – 2006. – Vol. 9, № 1.
9. Brucato S. Regulation of glypican-1, syndecan-1 and syndecan-4 mRNAs expression by follicle-stimulating hormone, cAMP increase and calcium influx during rat Sertoli cell development / S. Brucato, J. Bocquet, C. Villers // Eur. J. Biochem. – 2002. – Vol. 269, № 14. – P. 3461-3469.
10. Grudet N. Role of proteoglycans on testosterone synthesis by purified Leydig cells from immature and mature rats / N. Grudet, P. J. Bonnamy, D. Le Goff, S. Carreau // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 68, № 3-4. – P. 153-62.

**УДК 547.455.623'233.1:612.694:612.69-008.6:612.617****Л. В. Яковлева, Е. А. Ковалева, О. Ю. Кошева****ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ N-АЦЕТИЛГЛЮКОЗАМИНА НА ФОНЕ СТАРЕНИЯ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ КРЫС САМЦОВ**

Исследование посвящено экспериментальному изучению зависимости уровня эндогенного N-АцГА от возрастных изменений репродуктивной системы крыс самцов. Установлено, что инволюция репродуктивной системы наблюдается уже с возраста 18 месяцев, наиболее выраженные изменения функциональных показателей были у 21-месячных животных, но необратимые изменения морфоструктуры наблюдали у 26-месячных самцов. Угасание репродуктивной функции у 18-26-месячных крыс самцов коррелирует с увеличением содержания общего и свободного N-АцГА в сыворотке крови и с уменьшением содержания N-АцГА в семенниках, что указывает на наличие взаимосвязи между возрастом, динамикой показателей сперматогенной функции и содержанием N-АцГА.

**Ключевые слова:** старение; репродуктивная функция; самцы крыс

**UDC 547.455.623'233.1:612.694:612.69-008.6:612.617****L. V. Yakovleva, I. O. Kovalyova, O. Yu. Koshova****DYNAMICS OF CONTENT N-ACETYLGLUCOSAMINE IN AGING MALE RATS REPRODUCTIVE SYSTEM**

This research is devoted to the experimental study of the relationship of endogenous N-AtsGA age-related changes of the reproductive system of male rats. It was found that the involution of the reproductive system has been observed from the age of 18 months, the most pronounced changes in functional parameters were in 21-month-old animals, but irreversible changes in the morphological structure was observed in 26-month-old male rats. Extinction of reproductive function in 18-26-month-old male rats correlates with an increase of total and free N-AtsGA in serum and with decreasing N-AtsGA in the testes, what indicates a relationship between age, performance dynamics of spermatogenic function and the content of N-AtsGA.

**Key words:** aging; reproduction; male rats

*Адреса для листування:*

61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

E-mail: janekovaleva@mail.ru.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції

10.03.2015 р.