

Передбачуваний винахід відноситься до галузі експериментальної медицини, а саме до андрології і пов'язаний з проблемою дослідження порушень сперматогенезу у ссавців в експерименті. Відомо декілька способів моделювання порушень сперматогенезу у дрібних лабораторних тварин (щурів, мишей).

Відомий спосіб моделювання порушень сперматогенезу у щурів-самців шляхом інгаляції свинець-містячого пилу в дозах 0,1мг або 1,0мг (по кількості Pb в 1м<sup>3</sup> повітря) протягом 4-х місяців. За цих умов автори спостерігали "зупинку" сперматогенезу в дозі 1,0мг/м<sup>3</sup> (Хван П.А. Структурно-функциональное состояние гонад крыс при воздействии свинец содержащей пыли // 2 Всесоюзн. конф. "Эндокринные системы и органы, и вредные факторы внешней среды. Тезис, доклад. - Л. - 1983. - С.163). Недоліком способу є складні технічні умови його виконання - необхідність спеціальної газової камери та інше, недоліком є і невизначеність отриманої дози екзотоксиканту інгаляційним шляхом кровотоку твариною. Невідома також частина екзотоксиканту яка проходить легеневий бар'єр і попадає в загальний кровообіг і в тому числі в тканини сім'яників.

Відомий спосіб моделювання порушень сперматогенезу експериментальних тварин сукупною дією шкідливих факторів гірnodобувної промисловості (хрому, міді, малих доз радіації), шляхом знаходження тварин на робочих місцях шахтарів по 8 годин на добу 5 днів на тиждень протягом 5 або 10 тижнів. Автори знайшли значні порушення сперматид, а також значне зменшення відносної площини клітин Лейдига (Лютько О.В. та співавт. Морфометрична характеристика сім'яників експериментальних тварин при дії шкідливих факторів гірничодобувної промисловості // Урологія - 2002. - №3 - с.90-97). Спосіб обумовлює надходження екзотоксикантів з повітрям - пилом, їжею, питною водою. Недоліком способу є неможливість визначити дозу окремих шкідливих факторів які проникли в тканини тварин. Яка частина цих факторів знешкоджена в печінці, а яка проникла в загальний кровообіг, в тому числі в сім'яники, також невідомо. Це зменшує цінність моделі.

Відомий спосіб моделювання порушень сперматогенезу та фертильності щурів-самців шляхом щоденного внутрішньо шлункового введення екзотоксикантів, зокрема карбофурану по 0,1мг/кг маси тіла протягом 12-16 тижнів. За цих умов автори отримали стійку модель олігозооспермії, та зменшення фертильності щурів-самців, що підтверджено показниками запліднення інтактних самок (Шепельська Н.Р., Петрашенко Л.П., Сапожнікова С.Д. Вплив інсектициду на функцію гонад та фертильність щурів Wistar // Совр. пробл. токсикологии. - 2001. - №3 - с.40-45). Недоліком способу є невизначеність дози екзотоксиканту, яка всмоктувалася в кишечнику, і дози яка видалася з випорожненнями. Невідомо також, яка кількість екзотоксиканту, який всмоктувався в кишечнику знешкоджується, а яка проходить через печінковий бар'єр, попадає в загальний кровообіг і доходить до гонад.

Відомий спосіб моделювання токсичного враження сім'яників у щурів-самців екзотоксикантами шляхом їх внутрішньовенного введення. Екзотоксикант, як правило ксенобіотик, вводять одноразово у максимально переносимій дозі при подальшому спостереженню за тваринами протягом одного, трьох і шести місяців. Дослідники підтвердили, що виявлений стійкий токсичний ефект на гонади, який був вираженим в кінці першого місяця, зменшувався в кінці третього місяця. Тільки через шість місяців структура сім'яників відновлювалася повністю (Гольберг Е.Д., Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Скороходова М.Г., Смирнова М.Е. Отдаленные эффекты повреждающего действия антибиотиков антрациклинового ряда на репродуктивную систему крыс. // Бюл. exper. биол. и мед. - 1996. - №1. - с.55-58). Недоліком способу є дуже короткочасна дія максимальної дози екзотоксикантів на сперматогенний епітелій та сперматиди, які в цей час знаходяться на різних етапах розвитку. Депо екзотоксикантів при внутрішньовенному введенні не створюється.

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб моделювання пригнічення сперматогенезу у дрібних тварин (щурів) в експерименті шляхом внутрішнього очеревиного введення екзотоксикантів протягом 46 днів. Спосіб не складний за умовами виконання, дозволяє проводити багаторазове введення екзотоксикантів, навіть не кожний день, а по мірі повного всмоктування екзотоксикантів із черевної порожнини. При достатній дозі екзотоксикантів гарантує стійкий позитивний результат (И.Н. Андрусишина Морфофункциональные изменения сперматогенеза при воздействии свинца и кадмия на самцов белых крыс. // Соврем. проблемы токсикологии. - 1999. - №2. - с.22-26).

Основним недоліком способу є те, що частина екзотоксиканту після всмоктування очеревиною кишок потрапляє в систему порталної вени і далі в печінку, де більшість його інактивується. Друга частина всмоктується парієтальною очеревиною і попадає через систему нижньої порожнинної вени в загальний кровообіг в тому числі в сім'яники тварин. Співвідношення цих частин невідомо. Тому вказана модель є не стабільною. Другим недоліком є ризик виникнення перитоніту внаслідок проколу кишок голкою шприца для внутрішнього очеревиного введення екзотоксиканту або місцевої дії токсиканту.

В основу винаходу поставлене завдання створити спосіб моделювання порушень сперматогенезу (патозооспермії) з зовнішніх причин, а саме дії водорозчинних екзотоксикантів, у дрібних дорослих лабораторних тварин (ссавців), який дозволить отримувати стабільні моделі враження сім'яників різними водорозчинними екзотоксикантами на протязі часу дозрівання сперматозоїдів у тварин від 22 до 46 днів.

Поставлене завдання вирішують створенням моделювання порушень сперматогенезу (патозооспермії) у дрібних лабораторних ссавців (щурів, мишей), що включає введення водорозчинних екзотоксикантів в організм тварин, який, згідно винаходу, відрізняється тим, що розчин екзотоксиканту вводять внутрішньоплеврально, об'ємом 0,2-0,5мл багаторазово. Загальна доза екзотоксиканту дорівнює 50% летальній дозі (ЛД<sub>50</sub>). Тривалість дії екзотоксиканту повинна бути не меншою за період початку і повного дозрівання сперматид у конкретних видів ссавців (мишей - 22, щурів - 46 днів). Частота внутрішньо плеврального введення часток екзотоксиканту буде залежати від швидкості всмоктування його із плевральної порожнини, але не частіше 1-2 раз на тиждень. Багаторазове введення екзотоксиканту дозволяє збільшити об'єм розчину який вводять тваринам, а значить зменшити концентрацію розчину. Це є дуже важливим при вживанні слабо розчинних екзотоксикантів.

Спосіб здійснюють слідуючим чином. У дорослих лабораторних ссавців в день початку експерименту (затравки) екзотоксиканти у вигляді водного розчину, або розчину в 10% водному розчині диметилсульфоксиду вводять внутрішньоплеврально об'ємом для щурів 0,5мл, а для мишей - 0,2мл. Усю дозу екзотоксиканту розділяють при затравці щурів на 7 рівних частин і вводять на 1, 8, 15, 22, 29, 36 і 42 день від початку експерименту. При затравці мишей усю дозу екзотоксиканту (ЛД<sub>50</sub>) розділяють на 8 рівних частин та вводять їх в

плевральну порожнину на 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 день від початку експерименту. Передбачається, що повне всмоктування екзотоксину із плевральної порожнини відбувається у щурів за 7 днів, а у мишей - за 3 дні.

Приклади конкретного використання способу.

1. Щурам-самцям, яким передбачено провести затравку оцетною сіллю свинцю визначаємо 50% летальну дозу ( $LD_{50}$ ) для щурів. Для оцетної солі свинцю це складає 250мг/кг маси (И.Н. Андрусишина, 1999). Вага щурів в середньому дорівнює 200-230г. Робимо розрахунок загальної дози для кожного піддослідного щура, вона складає в середньому 50-65мг. Цю дозу поділяємо на сім рівних частин, для семікразового введення екзотоксиканту щурам інтраплевральню. Розводимо її у 3,5мл дистильованої води, і таким чином отримуємо 2,03-2,12% розчин. Ця концентрація набагато нижча за максимальну розчинність екзотоксиканту у воді при 25°C. В перший день, а потім 1 раз на тиждень внутрішню плевральню вводимо по 0,5мл 2,03-2,12% розчину ацетату свинцю, а саме 6 тижнів (7 разів). Термін дії препарату повинен бути 49 днів. Він включає час розвитку сперматозоїдів до зрілих форм в сім'яниках (46) та час дозрівання сперматозоїдів в придатках сім'яника та їх міграції в сім'явиносячу протоку (3 дні). На 42 день щурам під наркозом проводимо лапаротомію, перев'язуємо праву сім'явиносячу протоку. Рану живота зашиваємо 1-2 швами. На 43 день щурів-самців підсаджуємо до двох самок для їх запліднення. З 49 дня щурів-самців виводимо із експерименту. Під наркозом після зміщення шийних хребців, видаляємо придатки сім'яників з сім'явиносячими протоками (правою і лівою). Ступінь порушень сперматогенезу (патозооспермії) досліджуємо спеціальними функціональними, морфологічними та біохімічними методами. Вона складає при вживанні даного способу 97,5%.

2. Мишам-самцям, яким передбачено провести затравку новим пестицидом "Клопіралід" (3,6-дихлор-2-пиридинкарбоновa кислота) визначаємо його 50% летальну дозу ( $LD_{50}$ ). Для мишей в середньому вона складає 40-50мг. Робимо розрахунок загальної дози для кожної піддослідної миші. Цю дозу поділяємо на вісім частин. Для восьмикразового введення цю дозу маємо розвести в 1,6мл розчиннику. При загальній дозі 40-50мг на мишу, це має бути 2,5% розчин. Максимальна розчинність Клопіраліду у воді при 25°C дорівнює 0,1г на 100мл, тобто 1% розчин, таким чином розвести необхідну кількість клопіраліду у воді при 25°C не можна. Тому для розчинення екзотоксиканту ми використовуємо 10% водний розчин диметилсульфоксиду. Розчинність клопіраліду в ньому в 250 разів є вищою за розчинність у воді і значно перевищує необхідну концентрацію (2,5%). В перший день, а потім 2 рази на тиждень внутрішню плевральню вводимо по 0,2мл 2,5% розчину клопіраліду, а саме 8 разів - 24 дні. Термін 24 дні складає час дозрівання сперматозоїдів в сім'яниках (22), переміщення і дозрівання їх в придатку і сім'явиносячих протоках (2). На 21 день мишам-самцям проводимо нижню лапаротомію, перев'язуємо праву чи ліву сім'явиносячі протоку. Рану живота зашиваємо 1 швом. На 22 день мишей-самців підсаджуємо до двох самок для їх запліднення. З 24 дня мишей-самців виводимо із експерименту. Під наркозом після зміщення шийних хребців, видаляємо придатки сім'яників з перев'язаною та неперев'язаною сім'явиносячою протокою. Ступінь порушень сперматогенезу (патозооспермії) з обох придатків та сім'явиносячих проток досліджуємо спеціальними методами. Стан сперматозоїдів в придатках з перев'язаною та неперев'язаною протокою був однаковим. В той же час кількість сперматозоїдів була значно більшою в придатку з перев'язаною сім'явиносячою протокою. Це дає можливість більш детального їх морфологічного та біохімічного дослідження. Частота патозооспермії у щурів за таким методом складає 96,7%.