

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології та
репродуктивної медицини

Завідувач кафедри професор Микола ДЗЕРЖИНСЬКИЙ

Протокол № ____ засідання кафедри

Від “ ____ ” _____ 2023 р.

**ВПЛИВ МЕЛАТОНІНУ НА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН
СІМ'ЯНИКІВ ТА ЇХ ПРИДАТКІВ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ОЖИРІННЯ**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю «091 Біологія»
Матюшенка Святослава Олександровича

Науковий керівник від кафедри
кандидат біологічних наук, доцент
Калиновський В.Є.

Робота виконана на кафедрі цитології, гістології та репродуктивної медицини
Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» під
керівництвом кандидата біологічних наук Калиновського Віталія
Євгенійовича

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

| | | |
|--------|---|---|
| АГ | - | артеріальна гіпертензія |
| АО | - | абдомінальне ожиріння |
| АпоВ | - | апопротеїн В |
| ВЖК | - | вільні жирні кислоти |
| ГГ | - | гіперглікемія |
| ГІ | - | гіперінсулінемія |
| ГтРГ | - | гонадотропін рилізінг гормон |
| ДЛ | - | дисліпідемія |
| Е-1 | - | ендотелін-1 |
| ЖТ | - | жирова тканина |
| ІМТ | - | індекс маси тіла |
| ІР | - | інсулінорезистентність |
| ЛГ | - | лютеїнізуючий гормон |
| ЛДНЩ | - | ліпопротеїни дуже низької щільності |
| ЛПВЩ | - | ліпопротеїни високої щільності |
| ЛПВЩ-Х | - | Ліпопротеїни високої щільності-холестерол |
| ЛПНЩ | - | ліпопротеїни низької щільності |
| МС | - | метаболічний синдром |
| MT1 | - | рецептор мелатоніну типу 1a |
| MT2 | - | рецептор мелатоніну типу 1b |
| РВ | - | репродуктивна вісь |
| СМ | - | скелетні м'язи |
| СПКЯ | - | синдром полікістозних яєчників |
| СРБ | - | С-реактивний білок |
| ССЗ | - | серцево-судинні захворювання |
| ТГ | - | тригліцериди |
| ФСГ | - | фолікулостимулюючий гормон |
| Ц2Т | - | цукровий діабет 2-го типу |

- цАМФ - циклічний аденозинмонофосфат
- IL-6 - інтерлейкін-6 (interleukin-6)
- MAP - протеїн кінази, що активуються мітогенами (mitogen-activated protein kinase)
- PI3K - фосфоінозитид-3-кіназний шлях (phosphoinositide 3-kinase pathway)
- TNF- α - фактор некрозу пухлин α (tumor necrosis factor α)

ЗМІСТ

| | |
|--|----|
| ВСТУП | 5 |
| РОЗДІЛ 1. Ожиріння та метаболічний синдром | 7 |
| 1.1 Загальна характеристика та епідеміологія ожиріння і метаболічного синдрому..... | 7 |
| 1.2 Історія розвитку поняття та класифікації метаболічного синдрому | 10 |
| 1.3. Інсулінорезистентність | 13 |
| 1.4. Жирова тканина як ключовий фактор патогенезу метаболічного синдрому | 15 |
| 1.5. Мелатонін та його протективні ефекти на організм при метаболічних порушеннях | 18 |
| РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи досліджень | 22 |
| 2.1. Схема експерименту та використані тварини..... | 22 |
| 2.2. Гістологічна обробка матеріалу..... | 24 |
| 2.3. Морфометричний аналіз | 25 |
| 2.4. Статистична обробка..... | 26 |
| РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення | 27 |
| 3.1 Загальна характеристика сім'яників та їх придатків як органів репродуктивної системи | 27 |
| 3.2. Результати..... | 32 |
| 3.3. Обговорення результатів..... | 38 |
| 3.3.1. Вплив ожиріння на репродуктивну систему | 39 |
| 3.3.2. Вплив ожиріння на морфо-функціональні параметри сім'яників та їх придатків..... | 42 |
| 3.3.3. Вплив мелатоніну при різних режимах введення на морфо-функціональні параметри сім'яників та їх придатків..... | 47 |
| ВИСНОВКИ | 50 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ | 51 |

ВСТУП

Наразі в світі прослідковується епідемія надмірної ваги та ожиріння. Це викликає стурбованість у вчених та медиків, оскільки дані стани часто супроводжуються метаболічними порушенням та значно підвищують ризики розвитку серцево-судинних захворювань. Підвищення частоти захворюваності на ожиріння пов'язують з легким доступом до їжі та зниженням якості самої їжі, малоактивним способом життя та погіршенням екологічного стану. Серед інших факторів виділяють куріння, вживання спиртних напоїв та стрес.

Серед метаболічних порушень, що супроводжують ожиріння, виділяють порушення функціонального стану ендокринних органів у обох статей, високий кров'яний тиск, порушення обміну ліпідів та вуглеводів в організмі та розвиток таких супутніх захворювань як цукровий діабет і синдром полікістозних яєчників. Основними органами та тканинами, що запускають патофізіологічні механізми є вісцеральна жирова тканина, скелетні м'язи та печінка. Однак, результатом розвитку ожиріння та метаболічного синдрому є порушення у функціонуванні судинної системи – надмірне звуження судин внаслідок вазоконстрикторного ефекту інсуліну та утворення атеросклеротичних бляшок, що призводить до підвищення артеріального тиску.

На разі існують різні методи корекції ожиріння, що включають ліпосакцію, фізичні навантаження, медикаментозне лікування та інші. Також, активно вивчаються механізми, що лежать в основі розвитку метаболічних порушень, оскільки вони носять системний характер. Одним з перспективних об'єктів при лікуванні ожиріння та метаболічного синдрому є мелатонін – який вважається плейотропним гормоном, що має значний вплив на циркадний ритм, імунну систему і навіть енергетичний обмін. Підвищена цікавість до мелатоніну зростає через його значні протизапальні та аналгетичні ефекти.

Метою цієї роботи є з'ясувати особливості впливу мелатоніну за різних режимів введення на морфо-функціональний стан сім'яників та їх придатків у щурів за умов індукованого ожиріння.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано ряд завдань:

1. Оцінити характер структурних і функціональних змін в сім'яниках та їх придатках за розвитку ожиріння;
2. Встановити особливості впливу різних режимів введення мелатоніну на сім'яники та їх придатки;
3. Дослідити морфо-функціональні зміни в сім'яниках та їх придатках за різних режимів введення мелатоніну на тлі ожиріння.

РОЗДІЛ 1

ОЖИРІННЯ ТА МЕТАБОЛІЧНИЙ СИНДРОМ

1.1 Загальна характеристика та епідеміологія ожиріння і метаболічного синдрому

На сьогодні у всьому світі простежується підвищення частоти людей, що мають зайву вагу або страждають на ожиріння. Це викликає стурбованість представників охорони здоров'я по всьому світу. Відомо, що надлишкова вага та ожиріння тісно пов'язані з ризиком розвитку низки захворювань, особливо порушень серцево-судинної системи (ССЗ) [1].

Ще за античності було зрозуміло, що такі хвороби як ожиріння та подагра є наслідком наднормового вживання їжі та спиртних напоїв, особливо у людей, які були більш заможні. Тим не менш, детальним вивченням проблеми надлишкової ваги та метаболічного синдрому почали активно займатись лише в першій половині 21-го століття. Так, Ланг Г.Ф у 1922 році виявив, що існує зв'язок між артеріальною гіпертензією, подагрою, ожирінням та порушенням обміну вуглеводів та ліпідів [2,3]. Згодом, лікар зі Швеції Kylin у 1923 році продемонстрував, що високі рівні глюкози в крові та подагра пов'язані з високим артеріальним тиском. На той момент ці патологічні стани об'єднали поняттям «гіпертензія-гіперурикемія-гіперглікемія» [4]. Пізніше, список цих взаємопов'язаних патологій доповнювався вченими з різних частин світу. Таким чином, до цього списку увійшли апное під час сну, дисліпідемія, надмірна вага, ожиріння та інсулінорезистентність.

З 80-х років минулого століття спостерігається подвоєння поширеності зайвої ваги серед населення. Наразі надмірною вагою чи ожирінням страждає близько третина популяції. Прослідковується підвищення рівнів захворюваності у чоловіків та жінок, а також у людей різних вікових груп, однак є певний зсув рівня захворюваності в сторону старших людей. Хоча цей

тренд наявний глобально, існує варіабельність в межах континентів, регіонів, країн, рас та різноманітних етнічних груп [5]. Раніше вважалось, що проблема надмірної ваги та ожиріння найбільш виражена у країнах, що мають високий рівень життя – Данія, Швеція, Сполучені Штати Америки, Норвегія, Австралія, Японія та Франція, однак серед дітей, що проживають у таких країнах, рівні поширеності надмірної ваги та ожиріння знизились або вийшли на плато на початку 21-го століття [6].

Прослідковується підвищення поширеності ожиріння та надмірної ваги серед популяцій країн, що мають низький або середній рівень життя, особливо це стосується великих міст. В дослідженні, що проводилось у Китаї, спостерігали протягом 22-ох років за 12 543 особинами і було виявлено, що рівні захворюваності на ожиріння зросли в обох статей з 2.15% до 14%, з 2.78% до 13,22% та з 1,46 до 15% у жінок та чоловіків відповідно [5]. Наявність надлишкової ваги серед дітей африканських країн у віці від п'яти років зростає на 24% порівняно з 2000-им роком. Відповідно до даних 2019 року, близько половини дітей країн Азії у віці до п'яти років мають надлишкову вагу або ожиріння [7].

Ожиріння зазвичай визначається Індексом Маси Тіла (ІМТ). Він обчислюється як маса тіла у кілограмах поділена на висоту у квадратних метрах ($\frac{\text{кг}}{\text{м}^2}$). Інші підходи включають також окружність талії, вагу центральної та периферичної жирової тканини, однак ІМТ наразі є широковживаним для класифікації ожиріння. Однак ІМТ не дає точне уявлення про склад тіла, наприклад про частину від маси тіла, що складається з жирової тканини, або про розподіл жиру в тілі. Таким чином ІМТ сам по собі не є індикатором того, що існує підвищений ризик того, чи іншого захворювання [8]. Ожиріння ускладнюється такими супутніми хворобами, як цукровий діабет 2-го типу (ЦДТ), стеатоз печінки, серцево-судинні захворювання, інсульт, дисліпідемія, гіпертензія, проблеми з жовчним міхуром, остеоартрит, апное уві сні та інші проблеми з диханням, а також певні типи раку (ендометрію, молочної залози,

яєчників, простати, печінки, жовчного міхура, нирок і товстої кишки), які можуть призвести до підвищеного ризику смертності [9]. Подібні стани характерні і для метаболічного синдрому. Патологічним ожирінням вважається ожиріння 3 чи 2 ступеню, які зазвичай і супроводжуються супутніми захворюваннями [10].

Згідно з ІМТ індивіда можна віднести до 5 різних категорій [11]:

1. $18.5-24.9 \frac{\text{кг}}{\text{м}^2}$: нормальний діапазон
2. $25.0-29.9 \frac{\text{кг}}{\text{м}^2}$: надлишкова вага
3. $30.0-34.9 \frac{\text{кг}}{\text{м}^2}$: ожиріння 1-го ступеню
4. $35-39.9 \frac{\text{кг}}{\text{м}^2}$: ожиріння 2-го ступеню
5. $40 < \frac{\text{кг}}{\text{м}^2}$: ожиріння 3-го ступеню

Метаболічний синдром (МС) – це стан, що включає кластер факторів ризику, характерних для серцево-судинних захворювань. Кластер метаболічних факторів включає абдомінальне ожиріння, високий кров'яний тиск, порушення рівня глюкози натщесерце, високий рівень тригліцеридів і низький рівень холестерину ЛПВЩ [3,12]. Ключовим моментом в патогенезі цього синдрому є порушення вуглеводного обміну, що проявляється у зниженні чутливості до інсуліну периферичними тканинами – скелетними м'язами, печінки та жирової тканини. Це призводить до розвитку гіперінсулінемії (ГІ), інсулінорезистентності (ІР), артеріальної гіпертензії (АГ) та дисліпідемії (ДЛ) і зазвичай супроводжується появою надлишкової ваги внаслідок гіпертрофії та гіперплазії жирової тканини. Внаслідок взаємопов'язаного патогенезу вищезгаданих станів у особини розвивається ожиріння [2,12]. Подібно до ожиріння, існує варіабельність в поширеності МС серед статей, рас, етносу, місцевості, країни та континенту в якому проживає особа. В Сполучених Штатах Америки метаболічний синдром наявний приблизно в чверті населення, у Китайській Народній республіці – близько 10%, а у Російській Федерації – близько 21% населення страждає на МС

[2,13,14]. Відповідно до результатів дослідження INTERHEART приблизно 26% дорослих у світі страждає на метаболічний синдром. Цікавим є те, що поширеність МС серед населення країн Південної Азії в 2.5 рази вища, ніж серед країн Європи. Метаболічний синдром нерідко супроводжує або стає наслідком ожиріння. Так в 49% випадків у людей з ожирінням також виявляють і МС [12,15]. Поширеність метаболічного синдрому в популяції європеоїдів становить 21.8%, у латино-американців – 31.9%, у афро-американців – 22.71% [16]. Відомо, що чоловіки мають вищу схильність до МС, ніж жінки [12]. Причиною цього слугує наявність різних типів ожиріння: андроїдним або центральним для чоловіків, та гіноїдним – для жінок. Наразі вважається, що саме центральне ожиріння пов'язане з МС [2,4,16]. Відомо, що при ожирінні чоловічого типу ризику розвитку ССЗ значно зростають, порівняно з жіночим типом ожиріння. Серед них ризик розвитку ішемічної хвороби серця зростає в 3-4 рази, інсульту – в 5-7 разів, а інфаркту – в 7-9 разів [4]. Однак варто відмітити, що під час менопаузи ризик розвитку метаболічного синдрому жінок підвищується [17]. Також, відомо, що МС є пов'язаним з віком людини. Близько 10% людей у віці 20-29 років страждають на МС, у віці від 40 до 49 років рівень захворюваності підвищується до 20% та стає критичним у похилих людей, де 45% осіб віком від 60 до 69 страждають на МС [12].

1.2 Історія розвитку поняття та класифікації метаболічного синдрому

Після відкриття та дослідження МС протягом тривалого часу не було консенсусу щодо його назви та властивих йому патофізіологічних порушень. В минулому метаболічний синдром мав різні назви: синдром X, потім синдром Z, «смертельний квартет» та синдром інсулінорезистентності. Отже, основною проблемою було визначення супровідних порушень, що виникають при МС та встановлення остаточної та загальноновизнаної назви.

Перше визначення метаболічного синдрому на офіційному рівні було оприлюднено в 1998 році. Через рік воно було доповнено експертами з Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ). Особливу увагу у визначенні вони приділили факторам, котрі сприяють підвищенню розвитку серцево-судинних захворювань – ІМТ, АГ, ДЛ та ІР, при чому саме інсулінорезистентність стала обов'язковим критерієм. Для пацієнтів з Ц2Т дозволялось використовувати метаболічний синдром як діагноз [13,18].

В 1999 році, після ВООЗ, Європейська група по вивченню інсулінорезистентності (EGIR) надала свої рекомендації по МС. Так, аналогічно до ВООЗ, присутність ІР була обов'язковою для визначення МС, однак необхідна була наявність двох з чотирьох критеріїв. Серед них виділяли: ДЛ, АГ гіперглікемію та абдомінальне ожиріння (АД). На відміну від визначення ВООЗ, EGIR заключила, що використання МС для пацієнтів з Ц2Т не є припустимим [14].

Після цього Національною освітньою програмою по холестерину США (NCEP-АТР III; далі АТР III) було запропоновано простіше визначення, однак замість терміну «метаболічний синдром» вирішили використовувати «синдром інсулінорезистентності». Щоб поставити такий діагноз, у людини повинні бути наявні три з п'яти наступних критеріїв [16,19]:

- Окружність талії ≥ 102 см. у чоловіків, ≥ 88 см. у жінок
- Рівень тригліцеридів у крові (ТГ) ≥ 150 мг/дл
- Ліпопротеїни високої щільності-холестерол (ЛПВЩ-Х) < 40 мг/дл у чоловіків, < 50 мг/дл у жінок
- Кров'яний тиск $\geq 130/85$ мм. рт. ст.
- Глюкоза > 110 мг/дл

Тим не менш, пацієнти що мали Ц2Т не виключались з діагнозу, хоча, на відміну від EGIR, ІР було визнано необов'язковим критерієм [20].

Наступна спроба визначити МС та його критерії була здійснена в 2003 році Американською асоціацією клінічних ендокринологів (ААСЕ).

Відповідно до їх визначення, кожен клініцист мав сам вирішувати щодо того, які з критеріїв є важливими для постановки діагнозу. Експертами ААСЕ до супутніх порушень МС було додано неалкогольних стеатоз печінки та синдром полікістозних яєчників. Також, вони вирішили, що у випадку встановлення діагнозу Ц2Т зникає доцільність вживання МС, як діагнозу [13.21].

Таким чином, було здійснено декілька спроб встановити критерії та концепцію МС, через що виникали розбіжності між експертами з різних груп. У зв'язку з цим, члени Міжнародної федерації діабету (IDF) разом з Американською кардіологічною асоціацією (АНА) і Національним інститутом серця, легені і крові спробували надати універсальне визначення метаболічного синдрому. Обов'язковим критерієм стало АО та зникла потреба у лабораторному визначенні ІР. Інші критерії були схожі до тих, що зазначили експерти з АТР III [13]. В основному, членами IDF та АНА розглядалися лабораторні та антропометричні показники, а також патофізіологія МС [18]. Окрім цього, розглядалися, але не були внесені до фінального визначення, наступні показники: рівні адипонектину, С-реактивного білку (СРБ) та фібриногену [22].

Для уніфікації критеріїв та діагностики метаболічного синдрому представниками АНА, NHLBI, Всесвітньої кардіологічної федерації (WHF), Міжнародного товариства атеросклерозу (IAS), Міжнародної асоціації по вивченню ожиріння (IASO) та IDF в 2009 році було оприлюднено заключення [23], де зазначалось, що АО не є обов'язковим критерієм. Були надані рекомендації для визначення АО у вигляді антропометричних показників, які відрізнялись для обох статей і різних рас. Отже, щоб поставити діагноз метаболічний синдром потрібна була наявність трьох із п'яти наступних критеріїв:

- АО (ІМТ для чоловіків, жінок та рас відрізнявся);
- Рівень тригліцеридів ≥ 150 мг/дл;

- Знижений рівень ЛПВЩ-Х: менше 40 мг/дл у чоловіків, менше <50мг/дл у жінок, або медикаментозна дисліпідемія
- Підвищений тиск крові $\geq 130/85$ мм. рт. ст. або прийом антигіпертензивної терапії пацієнтом з артеріальною гіпертензією в анамнезі;
- Підвищений рівень глюкози натщесерце 100 мг/дл або прийом цукрознижувальної терапії.

Однак визначення метаболічного синдрому від 2009 було переглянуто та проаналізовано експертами з Всесвітньої організації охорони здоров'я [24], після чого вони дійшли до висновку, що діагноз «метаболічний синдром» має невисоку практичну цінність. Експертами з ВООЗ було зазначено, що необхідно надалі вивчати епідемологію метаболічного синдрому, а також продовжувати вивчення патофізіологічних механізмів розвитку інсулінорезистентності при Ц2Т.

Наразі, МС присвоєно діагностичний код – E88.81 в Міжнародній класифікації хвороб десятого перегляду (МКБ-10) [25], який є актуальним у виданні 2021 року. У розділі ендокринних, харчових та метаболічних порушень в Міжнародній класифікації хвороб одинадцятого перегляду (МКБ-11) МС відноситься до рубрики 5A44, куди входять IP синдроми [26]. Метаболічний синдром має свій ID (D024821) у медичних предметних рубриках (MeSH) та входить до розділу «харчові та метаболічні порушення (C18) [27].

1.3. Інсулінорезистентність

Інсулін – це основний гормон, що виробляється β -клітинами підшлункової залози ссавців у відповідь на високі рівні цукру в крові. Основною функцією цього гормону є зниження глюкози в крові. Основними

місцями утилізації глюкози є скелетні м'язи (СМ), печінка та жирова тканина (ЖТ) [28]. Утилізація глюкози в СМ і ЖТ під дією інсуліну відбувається внаслідок транслокації переносника глюкози GLUT4 з цитоплазми клітини на плазмалему. Окрім цього інсулін пригнічує ліполіз в жировій тканині, через що зменшується продукція глюкози. В клітинах печінки та СМ під дією інсуліну посилюється глікогенез та інгібується глікогеноліз. Також, інсулін в печінці інгібує утворення глюкози. Таким чином, у відповідь на гіперглікемію інсулін, що виділяється, зменшує рівні глюкози в крові за рахунок прямої дії на периферичні тканини та на печінку, внаслідок чого глюкоза активно транспортується всередину клітини, індукується глікогенез і ліпогенез, та інгібується ліпогенез і глюконеогенез.

Під час патологічних станів, таких як ожиріння чи метаболічний синдром, відбувається розвиток ІР через неадекватну реакцію периферичних тканин та печінки на інсулін, внаслідок чого гіперглікемічний стан не зникає [29]. Інсулін діє на клітини через рецептор з тирозин кіназною активністю. Після зв'язування з його рецептором запускається каскад реакцій, першим етапом якого є фосфорилування субстратів. Внаслідок цього активуються два паралельні шляхи. Перший – це фосфоінозитид-3-кіназний шлях (PI3K). За цього метаболічного шляху відбувається активація синтази азоту в ендотелії судин, а в жировій тканині та скелетних м'язах рецептор GLUT4 транслокується до плазмалеми. Другий шлях – це шлях протеїн кіназ, що активуються мітогенами (MAP), результатом активації якого є секреція ендотеліну-1 (E-1) ендотелієм судин. E-1 чинить вазоконстрикторну дію на судини, а також спричиняє надекспресію E-селектину і молекул клітинної адгезії VCAM-1. Відомо, що ці молекули мають здатність підвищувати взаємодію лейкоцитів з клітинами ендотелію [12]. Виявлено, що за резистентності до інсуліну відбувається порушення лише PI3K шляху, результатом чого є зниження активності синтази азоту. Внаслідок цього розвивається запальний стан і виникає дисфункція судин. Також, одним із наслідків порушення цього шляху є зниження темпів транслокації GLUT4 до

плазмалеми, через що страждає транспорт глюкози у клітинах ЖТ та СМ. Крім цього, оскільки MAP продовжує функціонувати, то клітини ендотелію продовжують виділяти E-1 та VCAM. Отже на фоні втрати вазодиларної функції оксиду азоту, надмірної вазоконстрикції через виділення E-1 та експресії факторів клітинної адгезії стрімко зростає тиск у судинах, що в решті решт призводить до АГ [14,28,29]. Було показано [29], що під час ІР спостерігається зниження утилізації глюкози на 40% внаслідок низьких рівнів ендотеліального оксиду азоту. На фоні вищезгаданих патофізіологічних порушень в ЖТ відбувається індукція ліполізу, через що в крові стрімко зростає рівень вільних жирних кислот (ВЖК). Самі ВЖК пригнічують антиліполітичний ефект інсуліну та проявляють інгібуючу дію на протеїнкінази СМ. Однак у печінці ВЖК чинять індукуючий вплив на протеїнкінази, внаслідок чого вони активуються та запускають ліполіз та глюконеогенез. Результатом цих патологічних взаємодій є зниження поглинання глюкози компетентними тканинами та органами, на фоні чого відбувається значне підвищення секреції інсуліна підшунковою залозою. Тобто виникає компенсаторний ефект – ГІ, який з часом послаблюється та зрештою зникає [14]. Крім цього, було показано, що ВЖК негативно впливають на β -клітини острівців підшлункової, а саме проявляють ліпотоксичний ефект [30]. Також, високі рівні ВЖК в крові спричиняють звуження судин [31].

1.4. Жирова тканина як ключовий фактор патогенезу метаболічного синдрому

Відомо, що ЖТ являє собою гетерогенну тканину, яка містить в собі як жирові клітини та їх попередники – стромальні преадипоцити, так і імунні та ендотеліальні клітини. Основними властивостями адипоцитів є запасання ліпідів у вигляді краплин. Крім цього їм притаманна гіперплазія та гіпертрофія у випадку наднормового споживання їжі [12]. В цілому ЖТ рівномірно

розподілена по організму, однак можна виділити місця, де відбувається її накопичення – під шкірою нижньої та верхньої частин тіла, а також навколо черевних органів, так звана вісцеральна або інтраперитонеальна жирова тканина. Також, вісцеральну та підшкірну ЖТ верхньої частини тіла зазвичай об'єднують у поняття жирова тканина верхньої частини тіла. Надмірне відкладення жиру в цьому регіоні називають абдомінальним ожирінням. Варто відмітити, що відкладення ЖТ у чоловіків та жінок відбувається по-різному: у жінок під шкірою, в особливості у нижній частини тіла, у чоловіків як під шкірою, особливо у верхній частині тіла, так і навколо черевних органів [32]. Абдомінальне ожиріння характеризується [2]: високими рівнями кортизолу, інсуліну та норадреналіну та зниженням продукції соматотропного гормону у обох статей, підвищенням продукції андростендіону і тестостерону та зниженням прогестерону у жінок, зниженням рівня тестостерону у чоловіків

Відомо, що ключову роль при розвитку метаболічних порушень відіграє вісцеральна ЖТ, в особливості це стосується розвитку резистентності до інсуліну [2,8,14,28,29]. Окрім функції своєрідного депо поживних речовин, ЖТ також є важливим ендокринним органом, оскільки в ній відбувається синтез та секреція різноманітних біоактивних сполук. Так, ЖТ продукує адипокіни, куди включають лептин, адипонектин, фактор некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкін-6 (IL-6), та резистин [12,28]. Крім цього, ЖТ є місцем активації для ренін-ангіотензинової системи (РАС).

Серед імунних клітин в ЖТ присутні макрофаги, котрі виділяють TNF- α . Було виявлено, що концентрація цього цитокіна підвищується разом з підвищенням маси ЖТ [2]. TNF- α діє паракринно та здатен знижувати чутливість жирових клітин до інсуліну [12]. Окрім цього, цей цитокін сприяє розвитку дисфункції β -клітин підшлункової залози та здійснює модуляторний вплив на метаболізм ліпідів [28], пригнічує секрецію та продукцію адипонектину та чинить індуктивну дію на ліполіз, результатом чого є підвищення рівня ВЖК в крові [14]. Більш того, наднормові рівні TNF- α пов'язують з АО, ІР [28] та зниженням ЛПВЩ-Х [29].

Серед інших цитокінів, що секретуються імунними клітинами ЖТ виділяють цитокін ІЛ-6, який має як протизапальну, так і прозапальну дію. Окрім імунних клітин, його здатні продукувати і адипоцити. Подібно до TNF- α концентрація ІЛ-6 підвищується зі збільшенням маси ЖТ, тому ці дві молекули є перспективними в якості маркерів МС [14,33]. ІЛ-6 активує РАС в ЖТ, через що зростає продукція фібриногену та VCAM ендотелієм, що сприяє протромботичному стану судин. При ожирінні та МС підвищується рівень СРБ, який вважається незалежним та надійним критерієм для передбачення розвитку ССЗ [2,12,14]. Було продемонстровано [34], що рівні СРБ та ІЛ-6 знижуються при зниженні маси тіла на фоні виконання фізичних вправ.

Іншим адипокіном є лептин, рецептори якого наявні в стовбурі мозку та гіпоталамусі. Цей гормон відповідає за відчуття голоду та насичення в людини. Окрім цього, відомо, що лептин грає роль у регуляції енергетичного гомеостазу [3,12]. В організмі лептин виробляється адипоцитами у відповідь на підвищення концентрації інсуліну після прийому їжі [4]. Було показано, що люди з генетичним дефектом гену лептину значно переїдають, результатом чого стає надмірна вага або ожиріння [32]. При АО прослідковується зниження чутливості гіпоталамуса до лептину [4,28], і хоча концентрація лептину в крові є високою через збільшення маси ЖТ організму, зниження апетиту не відбувається. Можливим поясненням цьому може бути порушення транспорту цього адипокіна через гемато-енцефалічний бар'єр [35]. Отже, при абдомінальному ожирінні виникає гіперлептинемія, яку, як і ІЛ-6 та СРБ, вважають незалежним критерієм розвитку ССЗ [12].

При АО та МС виникає порушення метаболізму ліпідів у організмі, що має назву дисліпідемія [12,28]. Основною причиною виникнення ДЛ наразі вважається ліполітична дія інсуліну яка виникає при вищезгаданих метаболічних порушеннях. Ключову роль в цьому грають ВЖК, які при утворенні з током крові потрапляють до печінки для утилізації. Вони є субстратом при синтезі ТГ, а також стабілізують утворення апопротеїну В (АпоВ) – головного компоненту ліпопротеїнів дуже низької щільності

(ЛДНЩ). За деградацію АпоВ відповідає інсулін, котрий також регулює активність ферменту ліпопротеїнліпази. Цей фермент приймає участь в утилізації ЛДНЩ та ТГ. Ліпопротеїни дуже високої щільності (ЛПВЩ) і ЛДНЩ – це основні молекули організму що відповідають за розподіл холестерину та тригліцеридів в організмі. Транспорт ТГ та ВЖК до периферичних тканин здійснюється ЛДНЩ, а забирання холестерину з периферичних тканин та доставка його до печінки для утилізації здійснюється ЛДВЩ. В крові відбувається обмін тригліцеридів з ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) на естери холестерину з ЛПВЩ. Відомо, що ЛПВЩ властива антиатеросклеротична дія, а ЛПНЩ сприяють розвитку атеросклерозу [4,36]. Через порушення функції інсуліну відбувається підвищення концентрації в крові ТГ, ЛДНЩ, ВЖК та зниження ЛПВЩ [28,29]. Таким чином, головним наслідком дисліпідемії, що виникає через метаболічні порушення пов'язані з інсуліном, є підвищення ризику появи атеросклерозу, що наразі вважається основною причиною коронарної хвороби серця [4].

Таким чином, жирова тканина є не тільки депо надлишкових речовин в організмі, а і важливим ендокринним органом. Патофізіологічні порушення, котрі виникають при АО та МС неодмінно викликають порушення інсулінової системи організму, результатом чого стає ІР. Тим не менш фінальною ціллю є судинна система, наслідком чого стає підвищення ризику ССЗ у людей що мають метаболічні порушення.

1.5. Мелатонін та його протективні ефекти на організм при метаболічних порушеннях

Мелатонін можна знайти практично в усіх організмів, починаючи від примітивних фотосинтезуючих бактерій, закінчуючи людиною. Він є

ендогенним гормоном, який приймає участь у різноманітних фізіологічних процесах. Мелатонін ритмічно синтезується в шишкоподібній залозі у хребетних і виконує потужні фізіологічні функції через рецептор мелатоніну. На даний момент мелатонін вважається плейотропним гормоном, який має значний вплив на циркадний ритм, імунну систему, онкологічні захворювання і навіть енергетичний обмін [37], а також може регулювати секрецію гонадотропін рилізінг гормону (ГТРГ), стимулювати секрецію прогестерону з гранульозних клітин та пригнічувати експресію рецепторів естрогену, таким чином впливаючи на різні системи організму [38].

Екзогенний мелатонін зазвичай призначають для лікування порушень циклу сон-неспанья, що пов'язані з порушенням циркадного ритму. Підвищена цікавість до мелатоніну зростає через його значні протизапальні та аналгетичні ефекти [39]. Усі ці процеси опосередковуються специфічним зв'язуванням мелатоніну з рецепторами, спряженими з G-білком, які широко експресуються в центральній нервовій системі (ЦНС) і різних периферичних органах; ці рецептори поділяються на два типи: рецептор мелатоніну типу 1a (MT1) і рецептор мелатоніну типу 1b (MT2). MT1 зазвичай експресується в шкірі та пов'язаний з інгібуванням утворення циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) разом із інгібуванням протеїнкінази A і фосфорилування транскрипційного фактору CREB (cAMP response element-binding protein). MT1 також може збільшувати фосфорилування мітоген-активованої протеїнкінази 1/2 (MAPK1/2), включаючи регульовану позаклітинним сигналом кіназу 1/2 (ERK1/2), а також провідність калію. Подібним чином, активація рецептора MT2 призводить до інгібування утворення цАМФ і циклічного гуанозин монофосфату (цГМФ), активації протеїнкінази C у супрахіазматичних ядрах і зниження кальційзалежного вивільнення дофаміну в сітківці. Активація рецепторів MT1 призводить до вазоконстрикції, тоді як активація рецепторів MT2 призводить до розширення судин, що вказує на те, що тонус судин по-різному регулюється рецепторами мелатоніну [40,41,42]. Крім того, мелатонін взаємодіє з

внутрішньоклітинними білками, такими як кальмодулін, кальретикулін і тубулін, що свідчить про те, що мелатонін може діяти як антипроліферативний агент при раку [43]. Що стосується імуномодулюючої дії мелатоніну, нещодавно було показано [44], що мелатонін модулює експресію та функцію сімейства ретиноїдних орфанних ядерних гормонів (RZR/ROR).

Було продемонстровано [45], що інтерлейкін 2 (IL-2) та IL-6, які є основними інтерлейкінами, котрі беруть участь в імунній та запальній відповідях, виробляються після активації ядерного рецептора мелатоніну RZR/ROR мононуклеарними клітинами периферичної крові людини. Крім того, мелатонін також широко використовувався [46] як антиоксидантний агент і поглинач вільних радикалів через його здатність стимулювати кілька антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза. Антиоксидантні властивості мелатоніну потенційно корисні в профілактиці запальних захворювань, таких як ураження печінки, легенів, серцево-судинних захворювань і раку [38].

Було доведено [47], що мелатонін є ефективним у покращенні стану організму при метаболічному синдромі та ожирінні завдяки своїй антигіперліпідемічній дії, протизапальній дії, модулюючій дії на синтез і вивільнення інсуліну, а також антиоксидантній дії. Так, мелатонін справляє сприятливий ефект у різних експериментальних моделях ожиріння, цукрового діабету 2 типу та гіпертензії. Його дія проявляється впливом [48] на гомеостаз глюкози, зниження маси тіла та вісцерального жиру, зниження гіперінсулінемії, рівнів лептину, тригліцеридів, ЛПДНЩ, неестерифікованих жирних кислот, С-реактивного білку, ендотеліальної дисфункції, резистентності до інсуліну та рівнів глюкози в крові натщесерце, а також підвищення рівня ЛПВЩ та адинопектину в плазмі, вмісту глікогену в печінці та м'язах. Крім усіх цих метаболічних дій, які здійснюються через рецептори мелатоніну MT1 і MT2, мелатонін, як ефективний антиоксидант, допомагає зменшити оксидативний стрес, який є частиною патофізіології метаболічного синдрому та ожиріння [47].

Враховуючи зростаючу частоту використання мелатоніну як у клінічному, так і в повсякденному житті, безпека мелатоніну для людей була широко досліджена. Багато експериментів і клінічних досліджень надали корисну інформацію про безпеку та ефективність мелатоніну окремо або в якості додаткового лікування. У дорослих короточасне застосування мелатоніну безпечно, за винятком вагітних і годуючих жінок, для яких відсутні клінічні дані. Немає досліджень, які б показували, що екзогенний мелатонін може викликати будь-які серйозні побічні ефекти; була доведена лише наявність легких побічних ефектів [37].

Мелатонін проявляє сприятливий вплив на регуляцію ліпідного профілю, резистентності до інсуліну та ожиріння у матері, що може бути пов'язано з його роллю в регуляції жирової тканини, циркадного ритму, кишкової мікробіоти, розладів сну, оксидативного стресу та запалення. Ці механізми дії є взаємодіючими, але не повністю незалежними. Таким чином, мелатонін є перспективним об'єктом дослідження, враховуючи його широкий спектр дії та низьку токсичність.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Схеми експерименту та використані тварини

Проведені на тваринах дослідження були виконані відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [49], з дотриманням етичних правил і норм роботи з тваринами в лабораторії та згідно з Законом 26 України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [50].

Проведення експерименту здійснювалось у віварії ННН «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка на базі лабораторії кафедри цитології, гістології та репродуктивної медицини. В експерименті було використано 60 самців білих нелінійних щурів вагою в 100-120 грам. Умови утримання щурів були стандартні з вільним харчуванням та доступом до води; режими температури та вологості були відповідні та не змінювались протягом експерименту. Добовий режим – по 12 годин світла та темряви; подання світла здійснювалось о 7-й годині ранку, а вимикання в 19:00.

Протягом першого тижня щури перебували на стандартній дієті, після чого їх рандомізовано розділили на 2 групи на 8-й день: досліджувана та контрольна групи. Щури з контрольної групи продовжували отримувати стандартну дієту (3,81 ккал/г), а досліджувана група отримувала дієту з високим вмістом калорій (5,35 ккал/г) – стандартний корм 60% від загального раціону, свинячого жиру 10%, вуглеводів у вигляді цукрів 9%, сухого молока 5% та олії рослинного походження 1%. Щоб відслідковувати вагу піддослідних тварин, їх зважували один раз на тиждень.

Після того, як піддослідна група набрала достовірну різницю в масі в 30% порівняно з контрольною, ці дві групи поділили ще на три групи, відповідно

до обраних режимів введення мелатоліну. Сам мелатонін (Alcon Biosciences, США) почали вводити за допомогою зонду перорально на шостому тижні після досягнення досліджуваною групою ожиріння у кількості 30 мг/кг за двох режимів протягом семи тижнів:

- 1-на година перед тим, як вимкнуть світло;
- 1-на година перед тим, як увімкнуть світло.

Отже, в результаті розподілу сформувалось 6 груп за різних режимів введення мелатоніну для перевірки його впливу на морфо-функціональний стан за умов ожиріння (табл. 2.1.).

Таблиця 2.1

Експериментальні групи тварин

| Група тварин | Дієта | Режим введення мелатоніну |
|----------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Контрольна | Стандартна | - |
| Ожиріння | Висококалорійна | - |
| Мелатонін зранку | Стандартна | 1-на година після подачі світла |
| Мелатонін ввечері | Стандартна | 1-на година перед вимкненням світла |
| Ожиріння+Мелатонін зранку | Висококалорійна | 1-на година після подачі світла |
| Ожиріння+Мелатонін ввечері | Висококалорійна | 1-на година перед вимкненням світла |

2.2. Гістологічна обробка матеріалу

З метою отримання досліджуваних органів – сім'яників та їх придатків, експериментальних тварин евтаназували декапітацією, попередньо наркотизувавши. Сама процедура забору органів відбувалась на заздалегідь підготованій робочій поверхні. Для отримання доступу до черевної порожнини було виконано розріз шкіри по білій лінії живота. В щурів сім'яники та їх придатки зазвичай перебувають в мошонці, тому для виведення їх у черевну порожнину було виконана легка пальпація мошонки у напрямку черевної порожнини. Досліджувані органи забрали та поклали у холодний фізіологічний розчин для промивки. Надалі сім'яники відділили від їх придатків та помістили у розчин Буена для фіксації на 72 години.

Після фіксації, для проведення зневоднення органів використовувався етиловий спирт висхідної концентрації: 70°, 80°, 90°, 96°. Ущільнення органів здійснювалось шляхом заключення у парафін. Для цього їх проводили через декілька розчинів: 1-3 години у суміші 96° етилового спирту з ксилолом в співвідношенні 1 до 1, 1-3 години витримки почергово у двох чистих ксилолах, далі в «гістологічній каші» – суміші парафіну з ксилолом в співвідношенні 1 до 1, після чого органи в розчині були поміщені до термостату при 37 °C на 2 години. Наступним етапом було поміщення органів у перший чистий парафін, який поміщали у термостати при температурі 54-56 °C на 1-2 години, та у другий чистий парафін за тих же умов витримки у термостаті, однак було бджолиний віск (2-5%).

Для підготовки до наступного етапу – нарізання зразків на мікротомі, органи, що були просочені парафіном, заливали в у спеціальні паперові форми, після чого було здійснено їх охолодження водою. В результаті цього було отримано парафінові блоки з органами всередині, котрі наліплювали на дерев'яні кубики та підсушували при кімнатній температурі на повітрі.

Виготовлення зрізів з парафінових блоків виконувалось на роторному мікротомі серії МПС-2 (СРСР). Товщина зрізів становила 10-15 мкм. Для

«розправлення» отриманих зрізів, їх поміщали у невеликий об'єм дистильованої води на заздалегідь підігрітому предметному скельці, на поверхню якого було нанесено суміш гліцерину та білку. Після такої процедури ми спостерігали розправлення зрізів, які природньо підсихали, через що відбувалась їх адгезія до предметного скельця.

Для фарбування зрізів використовувались наступні барвники – гематоксилін Бемера та еозин. Для забарвлення спочатку здійснювалась депарафінізація зрізів, шляхом проведення через ксилол на 3 хвилини та гідратація: у спиртах висхідної концентрації – 90°, 80°, 70° в кожному по 3 хвилини, після чого предметні скельця зі зрізами поміщались у дистильовану воду на 5 хв. Наступним етапом було забарвлення зрізів у гематоксиліні Бемера за допомогою прокапування з пастерівської піпетки протягом 7 хв, після чого зрізи ставили у проточну воду для промивки на 20 хв. Шляхом прокапування зрізів здійснювалось і забарвлення еозином, однак час витримки в даному барвнику становив 50 секунд. Після успішного фарбування зрізів виконувалась їх дегідратація у етиловому спирті зі зростаючою концентрацією: 70°, 80°, 90°, 96°, а також у діоксані, для кожного розчину по 3 хвилини. Просвітлення зрізів виконували шляхом занурення у ксилол на 3 хвилини, після чого заключали їх у бальзам та клали поверх зразків покривне скельце.

2.3. Морфометричний аналіз

Мікрофотографії препаратів були зроблені на камеру Olympus DP20 (Японія) після їх візуалізації на мікроскопі Olympus BX41 (Японія). Фотографії препаратів виконувались на об'єктивах зі збільшенням в x10 та x40, збільшення окуляра – x10. В якості референсного об'єкта був використаний круглий об'єкт мікрометр з діаметром 100 мкм.

Для оцінки морфо-функціональних змін сім'яників та їх придатків ми вимірювали такі параметри: діаметр сім'яних каналців, висота сперматогенного епітелію, площа перерізу ядер клітин Лейдіга, висота епітеліальних клітин придатків сім'яника та площа перерізу ядер цих клітин. Для виконання морфометричного аналізу параметрів була використана програма ImageJ (США). Перед вимірами, програму попередньо калібрували, використовуючи об'єкт мікрометр у вигляді круга діаметром в 100 мкм для вимірів на різному збільшенні. Діаметр сім'яних каналців вимірювався зі збільшенням $\times 10$, а висота сперматогенного епітелію, площа перерізу ядер клітин Лейдіга, висота епітеліальних клітин придатків сім'яника та площа перерізу ядер епітеліальних клітин придатку зі збільшенням $\times 40$ на мікрофотографіях препаратів.

2.4. Статистична обробка

Статистична обробка отриманих в результаті морфометричного аналізу даних включала в себе обрахунок середнього арифметичного значення та його похибки. Для перевірки вибірок параметрів, що досліджувались, на нормальність був використаний W-критерій Шапіро-Уїлка, за результатами якого виявилось, що вибірки в порівнюваних групах були розподілені за нормальним законом. Таким чином, щоб оцінити чи існує достовірна статистична відмінність між значеннями середнього арифметичного у досліджуваних групах, ми використовували t-критерій Стьюдента. Відмінності вважалися статистично достовірними при рівні значимості $p < 0,05$.

В процесі статистичної обробки ми порівнювали наступні групи: «Ожиріння», «Мелатонін зранку» та «Мелатонін ввечері» з «Контроль», «Ожиріння+Мелатонін зранку» та «Ожиріння+Мелатонін ввечері» з «Ожиріння».

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Загальна характеристика сім'яників та їх придатків як органів репродуктивної системи

Основним органом репродукції у самців є сім'яники. Головною функцією цього органу є сперматогенез – утворення чоловічих статевих клітин. Крім цього сім'яники є важливим ендокринним органом гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної вісі. Внаслідок інфекцій, хвороб та ушкоджень можуть виникати порушення у функціонуванні сім'яників, що призводять до зниження або втрати здатності до запліднення.

Головною функціональною одиницею сім'яників є звивисті сім'яні каналці, в яких відбуваються всі етапи сперматогенезу самців. Гістологічно каналці – це округлі порожнисті структури, вистелені сперматогенним епітелієм всередині якого містяться клітини Сертолі, котрі регулюють і підтримують сперматогенез. У міжканальцевому просторі містяться тестостерон-продукуючі клітини – клітини Лейдіга [51].

Чоловіча статеві клітина – сперматозоїд утворюється в результаті декількох послідовних поділів попередника, котрий має назву сперматогоній. Сперматогонії містяться на базальній мембрані сперматогенного епітелію [52]. Утворення чоловічої статевої клітини починається з диференціації первинних зародкових клітин у сперматогоніальні стовбурові клітини. Сперматогенез починається на базальній мембрані, у крайній частині клітин Сертолі, що вистилають сім'яні каналці, і просувається до просвіту каналців. Концентрація ретиноєвої кислоти (вітаміну А) вздовж сім'яних каналців є важливим фактором, що впливає на активацію та підтримку сперматогенезу [53,54]. Недиференційовані сперматогонії «А» розвиваються в диференційовані сперматогонії «В» через ряд спеціалізованих мітотичних

поділів. Остаточний мітотичний поділ призводить до утворення прелептотенових первинних сперматоцитів. Цей крок часто вважають точкою входу в мейоз. Потім первинні сперматоцити піддаються першому поділу мейозу з утворенням двох вторинних сперматоцитів. Нарешті, кожен вторинний сперматоцит ділиться на дві однакові гаплоїдні круглі сперматиди під час другого поділу мейозу. Ці круглі сперматиди зазнають конденсації, втрачають цитоплазму та подовжуються, щоб стати витягнутими сперматидами під час процесу, який називається сперміогенезом [53]. Коли ці клітини нарешті вивільняються з клітин Сертолі в просвіт сім'яних каналців, вони вважаються незрілими сперматозоїдами і надалі проходять через чоловічий репродуктивний тракт і там уже набувають здатності до запліднення овоцитів.

Найважливішим гормоном, який регулює та підтримує сперматогенез є тестостерон. Цей гормон синтезується з холестерину в клітинах Лейдіга. Клітини Лейдіга мають рецептори до лютеїнізуючого гормону, який після зв'язування проявляє стимулюючу дію та напряду регулює синтез тестостерону. Тим не менш, тестостерон за механізмами негативного зворотного зв'язку пригнічує виділення лютеїнізуючого гормону [55].

Чудово відомо, що сім'яникові сперматозоїди є незрілими та набувають рухливості і здатності до запліднення під час проходження через придаток сім'яника. Придаток сім'яника є трубчастим органом, який з'єднує сім'яник з сім'явиносною протокою. Він складається з 3 анатомічних регіонів: голівка, тіло та хвіст. Під час проходження через придаток сперматозоїди дозрівають внаслідок їх взаємодії з унікальним люмінальним середовищем кожного регіону придатку [56]. У людини, рептилій, птахів та всіх ссавців придаток є консервативною структурою. Суттєві зміни, які виникають під час транзиту сперматозоїдів через придаток є вивільнення та поглинання речовин, іонів, антиоксидантів, а також екзосом, які відомі під назвою епідидимосоми [57].

Є шість основних типів клітин присутніх у епітелій придатка сім'яника, деякі з цих клітин знаходяться в усіх регіонах придатка, а інші локалізовані в

його окремих частинах [52]. Загалом клітини придатка мають значну здатність до ендоцитозу, високі метаболічну та секреторну активність, які головним чином регулюються андрогенами. Андрогени також відповідають за регуляцію синтезу деяких, але не всіх, білків, які синтезуються та секретуються клітинами придатка [58]. Головні клітини є переважаючим типом клітин в епітелії придатка сім'яника і присутні уздовж усієї протоки органу. Залежно від ділянки, головні клітини складають від 65% до 80% епітелію. Ці клітини, головним чином, відповідають за поглинання та секрецію речовин у просвіт придатка і тому мають високу секреторну та ендоцитозну активність [52,59]. Крім того, головні клітини є місцем виробництва та вивільнення епідидимосом [60]. Апікальні клітини переважно розташовані в початковому сегменті епідидимального епітелію і також мають ендоцитозну активність. Вузькі клітини також існують виключно в межах початкового сегмента. Було показано, що ці клітини секретують іони H^+ у просвіт придатка та відповідають за ендоцитоз [59]. Прозорі клітини є іншим типом клітин з високою ендоцитозною активністю; однак ці клітини знаходяться виключно в ділянках головки, корпусу та хвоста придатку сім'яника і не розташовані в межах початкового сегмента. Прозорі клітини є основним типом клітин, відповідальним за поглинання цитоплазматичних крапель, які вивільняються з клітин сперматозоїдів під час дозрівання в просвіті органу. Вважається, що разом прозорі та вузькі клітини є основними клітинами, відповідальними за регуляцію рН просвіту [59]. Базальні клітини розташовані вздовж каналця і прилягають до базальної мембрани [52]. Ці клітини є невід'ємною частиною структури каналців, і було припущено, що вони можуть опосередковано впливати на середовище просвіту, регулюючи деякі основні клітинні функції [59,61]. Останнім типом клітин є гало-клітини, котрі існують по всьому епітелію придатка і є основними імунними клітинами [52]. Епідидимальний епітелій також оточений гладкою мускулатурою, яка є найтоншою в головці придатку і поступово потовщується до його хвоста.

Фактично, хвіст оточений двома унікальними шарами гладкої мускулатури, тоді як головка інкапсульована одним шаром [62].

Як орган чоловічої репродуктивної системи придаток сім'яника виконує такі функції:

1. Транспорт сперматозоїдів
2. Концентрація сперматозоїдів
3. Захист сперматозоїдів
4. Зберігання сперматозоїдів
5. Дозрівання сперматозоїдів та набуття ними рухомості

Загальний час транспорту сперматозоїдів через придаток складає 10-15 днів. Просування сперматозоїдів відбувається в основному за рахунок ритмічних скорочень гладеньких м'язів, що оточують придаток. Скорочення починаються частіше всього в голівці, однак найбільшу силу вони мають у хвості [52]. Також, припускається, що війки на поверхні епітеліальних клітин придатку можуть допомагати в спрямуванні сперматозоїдів під час їхнього проходження через просвіт [62].

Основним процесом, що відбувається у придатку, переважно в його початковому регіоні, є поглинання рідини епітеліальними клітинами. Еферентні каналці та початковий сегмент абсорбують приблизно 90% від усієї рідини, що виходить з сіточки сім'яника. Додаткове поглинання відбувається у інших регіонах придатку, через що концентрація сперматозоїдів стрімко зростає у хвості придатка, порівняно з сіточкою сім'яника [63]. В свою чергу, концентрація сперматозоїдів у еякуляті має важливе значення для чоловічої фертильності.

Додатковою функцією придатку можна вважати його захисний вплив на сперматозоїди, в основному від зовнішнього середовища [64]. Внаслідок того, що епітеліальні клітини придатка мають високу метаболічну активність, вони виділяють значну кількість активних форм кисню, які є шкідливими для сперматозоїдів. Щоб компенсувати цей негативний вплив, клітинами епітелію виділяються різноманітні форми антиоксидантних ферментів, які включають

супероксид димутаза, що активно нейтралізує активні форми кисню у просвіті придатка [65]. На додаток до цього, існує бар'єр між придатком та кров'ю, що захищає незрілі сперматозоїди від імунної системи та шкідливих речовин, котрі можуть перебувати у крові [52].

Ще однією функцією придатку є накопичення та зберігання функціонально зрілих сперматозоїдів перед еякуляцією [59]. У певний час, в залежності від виду, 50-80% сперматозоїдів є локалізованими у просвіті придатку в його хвостовій частині [52]. Епітеліоцити хвоста придатка секретують різні фактори, які підтримують сперматозоїди у стані спокою під час зберігання. Після еякуляції сперматозоїди виходять зі стану спокою, а їх метаболічна активність зростає в 3-5 разів, порівняно з активністю у хвостовій частині придатка [66].

Сім'яникові сперматозоїди вважаються нерухомими але, вони можуть посмикуватись. Тим не менш, виконати прогресивний рух такі сперматозоїди не можуть. До того часу, як сперматозоїди досягнуть хвоста придатка, переважна частина з них вже здатна до прогресивного руху. Хоча рухливість вважається притаманною рисою сперматозоїдів і може бути досягнена за спеціальних умов, однак саме просвіт придатка забезпечує найкращі умови для активації рухливості [67]. Плазматична мембрана сперматозоїдів під час їхнього проходження через придаток змінюється за складом, що спричиняє потоншення акросоми. Вважається, що зміни в складі мембрани викликані градієнтами концентрації специфічних ферментів і молекул вздовж просвіту каналця [59,67]. Крім того, цитоплазматична крапля, яка зрештою виділяється під час еякуляції, мігрує каудально вздовж сперматозоїдів під час транзиту в придатку сім'яника [67].

3.2. Результати

При мікроскопічному огляді препаратів сім'яників та їх придатків у щурів не було виявлено значних гістологічних змін у тканині: всі групи показали нормальну морфологію каналців, епітелію та сполучної тканини. У просвітах каналців було знайдено багаточисельні сперматозоїди.

Результати статистичної обробки даних, отриманих при вимірі діаметрів сім'яних каналців щурів представлені на рис. 3.1. При ожирінні діаметри каналців (261.99 ± 4.6) не відрізнялись від контрольної групи ($263,05 \pm 6,8$). При введенні мелатоніну групам тварин без ожиріння зранку ($236,97 \pm 3,2$) та ввечері ($248,76 \pm 4.0$) прослідковувалось достовірне зменшення діаметру порівняно з контролем ($p < 0,05$). У групах тварин з ожирінням, яким вводили мелатонін зранку ($242,35 \pm 4,1$) та ввечері ($248,13 \pm 3,1$), спостерігалось достовірне зменшення діаметру каналців порівняно з групою «Ожиріння» ($p < 0,05$).

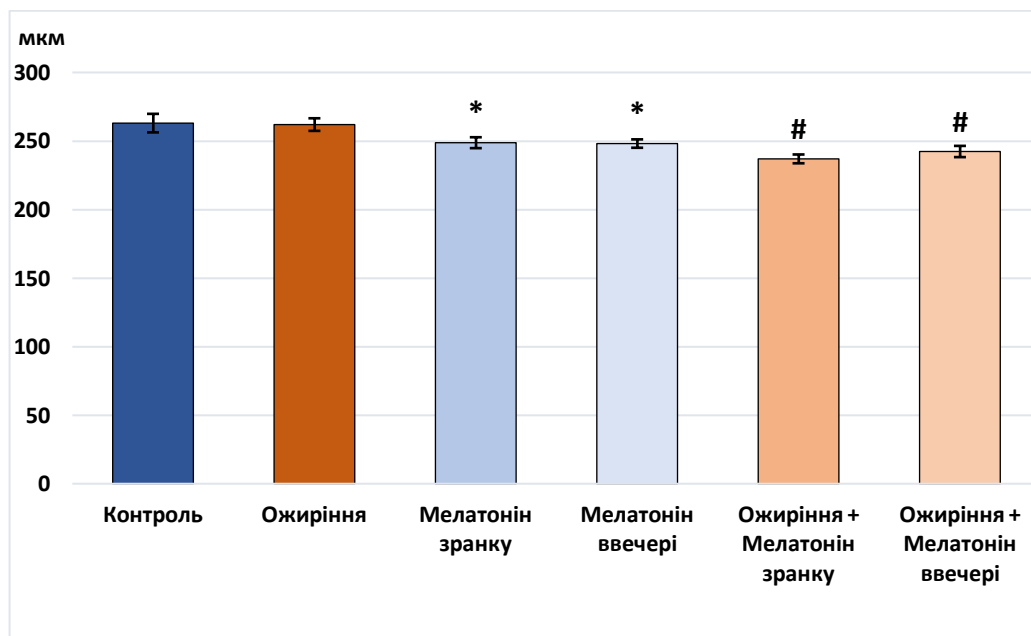


Рис. 3.1. Діаметр звивистих сім'яних каналців щурів різних експериментальних груп

* – відмінності від контрольної групи достовірні при $p < 0,05$;

– відмінності від групи «Ожиріння» достовірні при $p < 0,05$.

Результати статистичної обробки даних, отриманих при висоті сперматогенного епітелію сім'яників щурів представлені на рис. 3.2. При ожирінні ($57,76 \pm 0,9$) не спостерігалось достовірної зміни у висоті сперматогенного епітелію, порівняно з контролем ($60,57 \pm 1,3$). Висота сперматогенного епітелію у тварин без ожиріння, які отримували мелатонін зранку ($52,84 \pm 0,8$) та увечері ($53,94 \pm 0,9$) достовірно зменшилась порівняно з контролем ($p < 0,05$). Подібним чином змінилась висота сперматогенного епітелію і у груп «Ожиріння+Мелатонін зранку» ($49,35 \pm 0,7$) та «Ожиріння+Мелатонін ввечері» ($50,02 \pm 0,8$) порівняно з групою «Ожиріння» ($p < 0,05$).

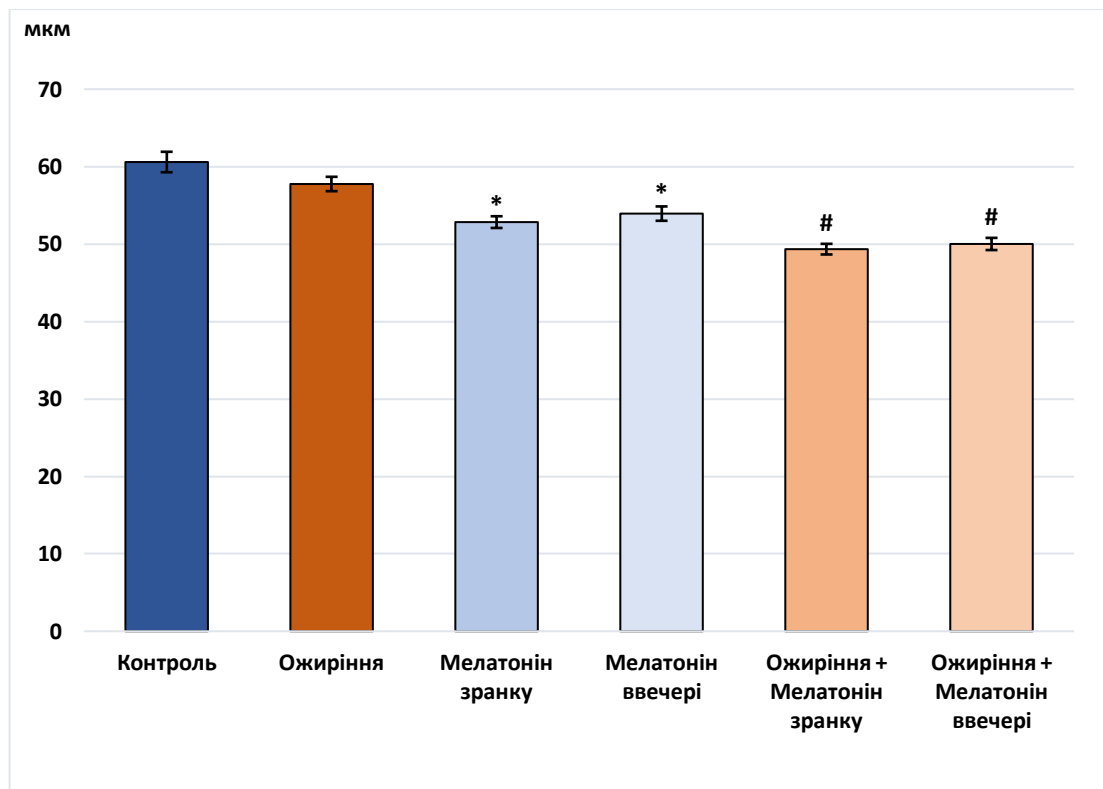


Рис. 3.2. Висота сперматогенного епітелію сім'яників щурів різних експериментальних груп

* – відмінності від контрольної групи достовірні при $p < 0,05$;

– відмінності від групи «Ожиріння» достовірні при $p < 0,05$.

Результати статистичної обробки даних, отриманих при вимірі площі перерізу ядер клітин Лейдіга щурів представлені на рис. 3.3. При ожирінні

($19,69 \pm 0,8$) не спостерігалось достовірної зміни площі перерізу ядер клітин Лейдіга, порівняно з контролем ($19,98 \pm 0,5$). Введення мелатоніну тваринам без ожиріння зранку ($23,79 \pm 0,7$) та ввечері ($29,08 \pm 1,0$) достовірно спричинило збільшення площі перерізу ядер ($p < 0,05$). Подібні зміни введення мелатоніну викликало і у груп «Ожиріння+Мелатонін зранку» ($21,29 \pm 0,6$) та «Ожиріння+Мелатонін ввечері» ($22,21 \pm 0,5$), порівняно з групою «Ожиріння» ($p < 0,05$).

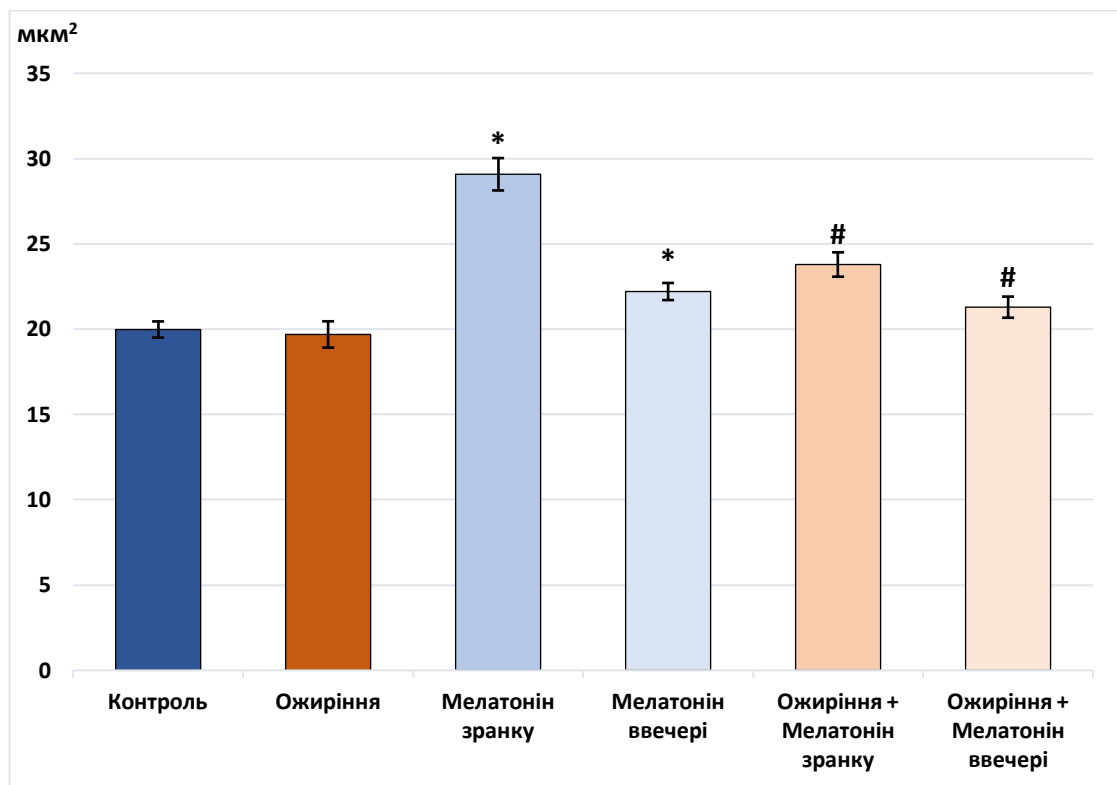


Рис. 3.3. Площа перерізу ядер клітин Лейдіга сім'яників щурів різних експериментальних груп

* – відмінності від контрольної групи достовірні при $p < 0,05$;

– відмінності від групи «Ожиріння» достовірні при $p < 0,05$.

Було виявлено [68], що під час ожиріння у щурів з'являються ділянки вакуолізації та розриву сперматогенного епітелію. В нашому дослідженні було виявлено, що щури групи «Ожиріння» мають ділянки вакуолізації, однак не було виявлення розривів у сперматогенному епітелії (рис 3.4).

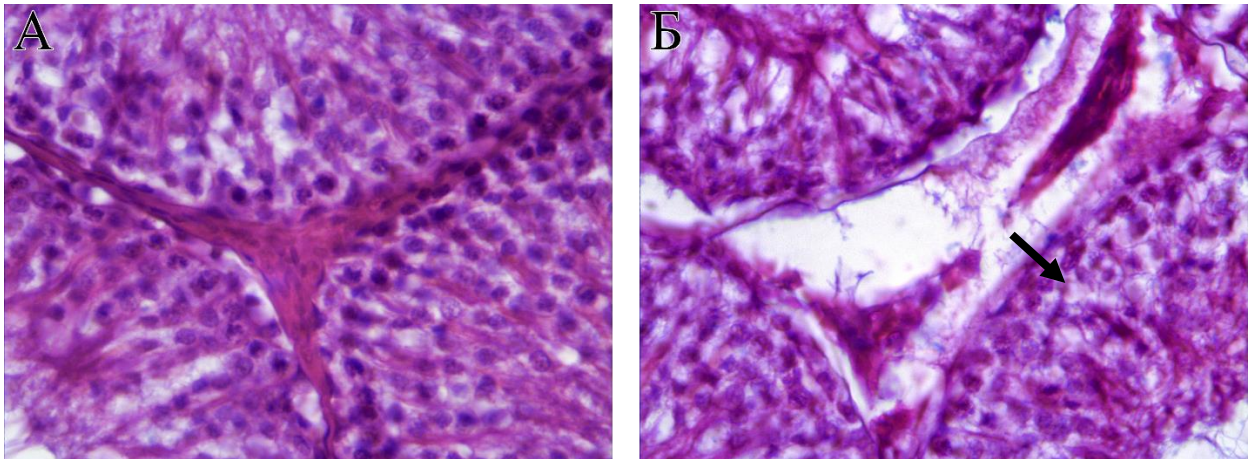


Рис. 3.4. Мікрофотографії звивистого сім'яного каналця щура групи «Контроль» (А) та «Ожиріння» (Б) . Чорною стрілкою позначена ділянка вакуолізації (збарвлення гематоксиліном Бемера та еозином; зб. $\times 400$).

При мікроскопічному огляді препаратів сім'яників щурів не було виявлено змін у інтерстиціальному просторі та морфології ядер клітин Лейдіга у таких груп, як «Контроль» та «Ожиріння». Групи, що отримували мелатонін, продемонстрували зміни у морфології ядер клітин Лейдіга, а саме спостерігалось їх просвітлення та збільшення (рис. 3.5.).

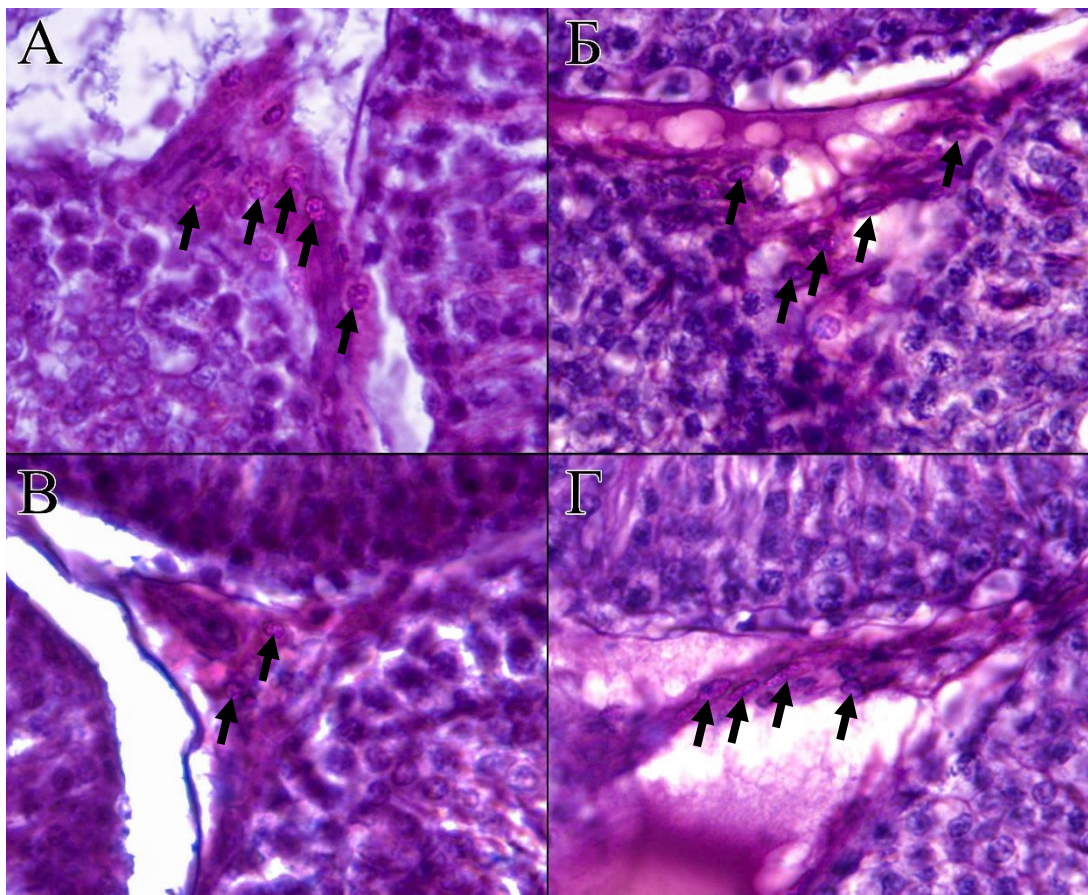


Рис. 3.5. Мікрофотографії інтерстиціального простору сім'яників щурів груп «Мелатонін зранку» (А), «Мелатонін ввечері» (Б), «Ожиріння + Мелатонін зранку» (В), «Ожиріння + Мелатонін зранку» (Г). Чорною стрілкою позначені ядра клітин Лейдіга (забарвлення гематоксином Бемера та еозином; зб. $\times 400$).

Результати статистичної обробки даних, отриманих при вимірі висоти епітеліальних клітин каналців придатка сім'яника щурів представлені на рис. 3.6. При ожирінні висота клітин епітелію придатка сім'яника ($16,15 \pm 0,2$) не відрізнялась від контрольної групи ($16,02 \pm 0,1$). При введенні мелатоніну групам тварин без ожиріння зранку ($17,11 \pm 0,2$) та ввечері ($16,57 \pm 0,2$) прослідковувалось достовірне збільшення висоти епітеліальних клітин порівняно з контролем ($p < 0,05$). У групах тварин з ожирінням, котрі отримували мелатонін зранку та ввечері, спостерігалось достовірне збільшення висоти епітелію каналців придатка порівняно з групою «Ожиріння» ($p < 0,05$).

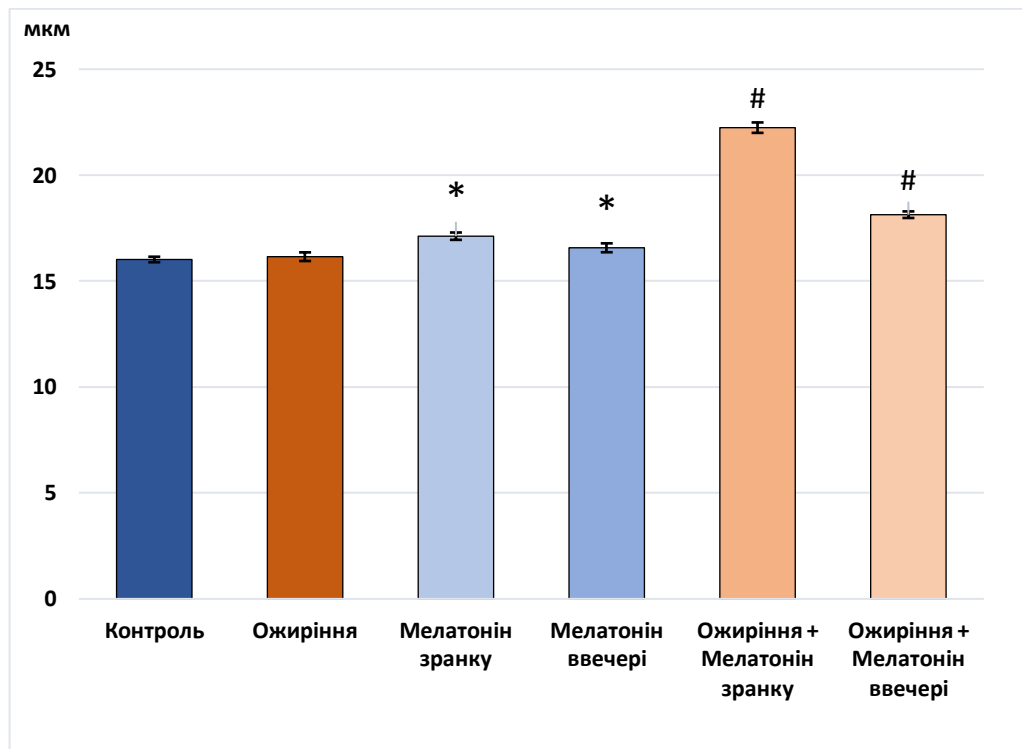


Рис. 3.6. Висота епітеліальних клітин каналців придатка сім'яника щурів різних експериментальних груп.

* – відмінності від контрольної групи достовірні при $p < 0,05$;

– відмінності від групи «Ожиріння» достовірні при $p < 0,05$.

Результати статистичної обробки даних, отриманих при вимірі площі перерізу ядер епітеліальних клітин каналців придатка сім'яника щурів представлені на рис. 3.7. У групах «Ожиріння» ($28,56 \pm 0,4$) та «Мелатонін зранку» ($27,18 \pm 0,4$) відбулось достовірне зменшення площі перерізу ядер порівняно з контролем ($31,7 \pm 0,6$) ($p < 0,05$). При цьому введення мелатоніну ввечері групі щурів без ожиріння не викликало достовірних змін у площі перерізу ядер клітин епітелію ($30,81 \pm 0,7$). У групах тварин з ожирінням, котрі отримували мелатонін зранку ($28,66 \pm 0,4$) та ввечері ($29,81 \pm 0,6$), не спостерігалось достовірних змін порівняно з групою «Ожиріння». При порівнянні груп тварин «Ожиріння+мелатонін зранку» та «Ожиріння+мелатонін ввечері» з контролем виявлено достовірне зменшення площі перерізу ядер. ($p < 0,05$).

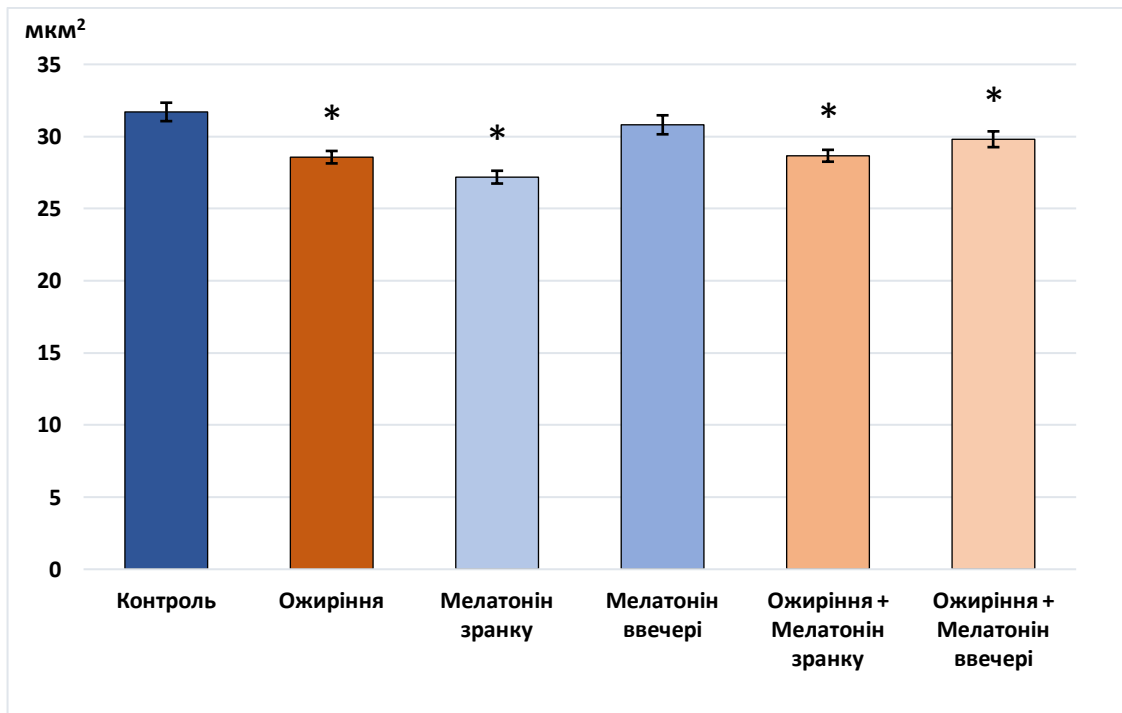


Рис. 3.7. Площа перерізу ядер епітеліальних клітин каналців придатку сім'яника щурів різних експериментальних груп.

* – відмінності від контрольної групи достовірні при $p < 0,05$;

У всіх груп з ожирінням в придатку сім'яника були виявлені апоптичні тільця (рис 3.3.), котрі розташовані у просвітах каналців, в той час як

контрольна група, та групи яким давали мелатонін зранку та ввечері таких змін не продемонстрували.

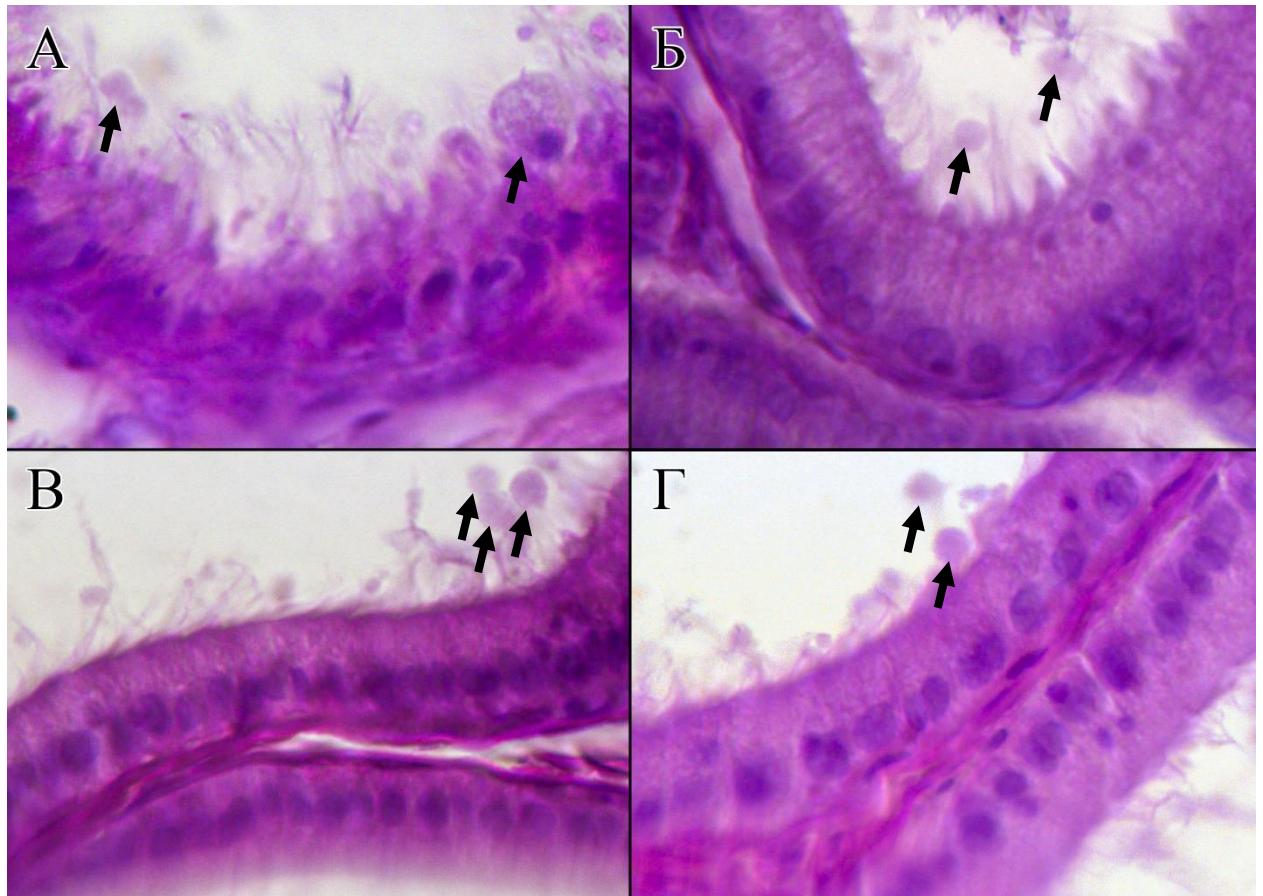


Рис. 3.2. Мікрофотографії придатків сім'яників щурів груп «Ожиріння» (А), «Ожиріння + Мелатонін ввечері» (Б), «Ожиріння + Мелатонін зранку» (В,Г). Чорною стрілкою позначені апоптичні тільця (збарвлення гематоксилином Бемера та еозином; зб. $\times 400$).

3.3. Обговорення результатів

За останні 60 років дослідження показали зниження якості еякуляту у людей, але досі немає чіткого пояснення, чому це відбувається. Припускається, що зниження параметрів еякуляту спричинено контактом зі зростаючою кількістю хімічних речовин з естрогенними, андрогенними або антиандрогенними властивостями, котрі містять в навколишньому середовищі.

Крім цього, на якість еякуляту можуть впливати спадковість, неправильний спосіб життя, травми сечостатевого тракту та хвороби [69].

Відомо, що під час статевого дозрівання відбувається формування вторинних статевих ознак. Для правильного проходження цього процесу критично важливим є злагоджена робота репродуктивної вісі (РВ). До неї входять такі структури головного мозку, як гіпоталамус та гіпофіз, а також периферичні органи – сім'яники та яєчники у чоловіків та жінок відповідно, тому іншою назвою РВ є гіпоталамо-гіпофізарно-гонадна вісь [70]. Було показано [71], що лептин, котрий є адипокіном, проявляє індукуючу дію на секрецію нейронів, що продукують кіспептин. Також, даний адипонектин здатний пригнічувати секрецію тестостерону клітинами Лейдіга [70]. Першою ланкою РВ вважається вищезгаданий кіспептин, дія якого полягає у стимулюванні виділення ГтРГ [72]. Під впливом ГтРГ гіпофізарні нейросекреторні клітини виділяють лютеїнізуючий (ЛГ) та фолікулостимулюючий (ФСГ) гормони. Ці гормони діють на статеві залози, стимулюючи секрецію відповідних статевих гормонів у сім'яниках або яєчниках [70].

3.3.1. Вплив ожиріння на репродуктивну систему

При метаболічних порушеннях організму, таких як ожиріння та метаболічний синдром, прослідковується порушення роботи РВ. Відомо, що пізнє статеве дозрівання у жінок пов'язане з понаднормовим зниженням маси тіла, а раннє статеве дозрівання є результатом надмірної ваги, в особливості у вигляді ЖТ. Надмірне відкладення ЖТ негативно впливає і на чоловіків, а саме спостерігається підвищення концентрації естрогенів в організмі. Це може призвести до такого патологічного стану, як вторинний гіпогонадизм [70].

При ожирінні низьку концентрацію тестостерону в чоловіків пов'язують з деякими патологічними станами, що супроводжують метаболічний синдром: апное уві сні, ішемічну хворобу серця, АГ, ДЛ та Ц2Т [73,74]. В нормі ФСГ здійснює непрямий стимулюючий вплив клітини Сертолі, котрі відповідальні за нормальне проходження сперматогенезу. Тим не менш, ФСГ напряду сприяє продукції та секреції інгібіну, який є негативний регулятором виділення ФСГ. Інший гіпофізарний гормон ЛГ має пряму індуктивну дію на продукцію стероїдних гормонів клітинами Лейдіга, результатом чого є викид тестостерону, дія якого проявляється у вигляді стимулюванні сперматогенезу через ядерні рецептори в клітинах Сертолі. Тестостерон та естроген є негативними регуляторами продукції та виділення кіспептину гіпоталамусом. Цікавим моментом є те, що було виявлено пригнічуючу дію кіспептину на ліпогенез, а також стимулюючу дію на ліполіз [72].

Гіперактивність ароматази в адипоцитах ЖТ в чоловіків пов'язана з високими рівнями перетворення тестостерону в естроген, результатом чого є зміна пропорцій естрогену до тестостерону в крові. На ряду з цим, було виявлено, що концентрація інгібіну також зменшується, через що виникає порушення зворотних зв'язків репродуктивної вісі. Результатом цього є дисфункція клітин Сертолі у сім'яниках [70,72].

Ожиріння супроводжується прозапальним станом організму, від чого відбувається порушення у функціонування клітин Лейдіга [72]. Так, було показано [75], що високі рівні цитокінів TNF- α та IL-6 при ожирінні та МС проявляють інгібуючу дію на стероїдогенез. Більш того, внаслідок ГІ у чоловіків зменшується концентрація глобуліну, що зв'язує статеві гормони, головною функцією яких є транспорт статевих гормонів до гонад [70].

Було виявлено [75], що під час ожиріння та метаболічного синдрому зростають рівні апоптозу сперматогоній A1. Більш того, спостерігається втрата цілісності гемато-тестикулярного бар'єру через порушення міжклітинних контактів між сперматогенними клітинами та клітинами Сертолі. Відомо також і про те, що у сперматозоїдів зростають рівні ДНК

фрагментації при ожирінні. Потенційним механізмом ушкодження ДНК є надмірна продукція реактивних форм кисню в ЖТ, що оточує сім'яник, та окиснення ВЖК в пероксисомах та мітохондріях [72]. Більш того, надмірне накопичення ЖТ навколо судин та сім'яників у мошонці спричиняє порушення охолодження гонад, що є критичним для утворення сперматоїдів [76]. Також, чоловіків, що страждають на ожиріння та метаболічний синдром, часто мають еректильну дисфункцію, що пов'язується з порушенням у функціонуванні судинної системи пеніса [75].

Відомо, що при МС та АО у жінок відбувається підвищення продукції та вивільнення андрогенів у яєчниках, хоча рівні естрогенів при цьому зростають внаслідок ароматазної активності адипоцитів. Через високі концентрації андрогенів у крові у жінок розвивається гіперандрогенізм, результатом чого стає загибель фолікулярних клітин яєчників. На фоні цього, високі рівні естрогенів з механізмом негативних зворотних зв'язків пригнічують секрецію гонадотропінів [70].

Ензимопатія, що найбільш часто зустрічається у жінок репродуктивного віку – це синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) [77]. Синдром полікістозних яєчників – клінічний синдром, що характеризується помірним ожирінням, нерегулярними менструаціями або аменореєю, ановуляцією та ознаками надлишку андрогенів. Більшість пацієнтів мають множинні кісти яєчників [77, 78]. Надлишок андрогенів виявляють у переважній більшості жінок, що страждають СПКЯ – 80-90% [78]. Патофізіологія СПКЯ схожа до такої при МС. Тобто, ознаками СПКЯ є АО, ДЛ, ІР та ГІ, хоча артеріальна гіпертензія зустрічається набагато рідше [77,79]. Відомо, що основну роль в патогенезі СПКЯ грає інсулін. Він стимулює виділення тестостерону клітинами теки фолікулів у яєчниках. Отже, гіперінсулінемія є причиною розвитку гіперандрогенії [79]. Тим не менш, близько 20-25% андрогенів у жінок з СПКЯ є надниркового походження [78]. Одним з прогностичних критеріїв СПКЯ є поява раннього адренархе – поява лобкового волосся у особин жіночої статі віком від 8 до 10 років. Причиною цього є надмірний рівень андрогенів у крові

внаслідок підвищеної концентрації інсуліну та ІР [77]. До інших проявів гіперандрогенії також відносять гірсутизм та вугри [78,79].

АО та МС у жінок супроводжуються збільшенням концентрація СРБ у рідині фолікулів та зниженням концентрації антимюллерового гормону у крові. Антимюллеровий гормон напряму пов'язаний з оваріальним запасом, а СРБ пов'язаний з прозапальним станом та окисним стресом організму. Вважається що такі зміни при АО та МС спричиняють порушення гаметогенезу у жінок [70]. Також, у жінок з МС відмічають зниження статевого потягу та нижчу статеву активність [80].

3.3.2. Вплив ожиріння на морфо-функціональні параметри сім'яників та їх придатків

Ми показали, що при ожирінні не прослідковується достовірних змін у висоті сперматогенного епітелію та діаметрі сім'яних каналців. Ці результати узгоджуються з результатами дослідження [68], де автори також не виявили змін у відповідних морфо-метричних параметрах. Більш того, аналогічно до наших результатів, автори дослідження також виявили ділянки вакуолізації у сперматогенному епітелії щурів з ожирінням, що може свідчити про надмірне накопичення ліпідів. Нижча вага сім'яників у щурів з ожирінням наряду з вакуолізацією сперматогенного епітелію спричинили зниження кількості сперматозоїдів у еякуляті молодих особин. Тим не менш, зменшення ваги сім'яників відбувається лише у молодих особин щурів і є наслідком затримки в розвитку органів цієї моделі ожиріння (Zucker rats). В дорослому віці вага сім'яників та показники сперми перебували в межах норми. Більш того, було показано [81], що висококалорійна дієта не впливає на зміну таких морфометричних параметрів клітин Лейдіга, як площа клітин та ядер, а також на ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Крім цього, не було виявлено

помітних змін у загальній гістології сім'яників та інтерстиціальної тканини. Це узгоджується з отриманими нами результатами. Тим не менш, авторами цього дослідження було виявлено погіршення функціональної активності клітин Лейдіга, що проявлялось у зниженні стероїдогенезу.

Дослідження [82], метою якого було визначити рівень продукції сперматозоїдів у сім'яниках та їх зберігання у придатку і час проходження через нього у щурів з ожирінням, індукованим глутаматом, показало значне зниження абсолютної та відносної ваги сім'яників, їх придатків, передміхурової залози та сім'яних пухирців. Крім цього, рівні тестостерону та ФСГ в плазмі крові були зниженими, як і кількість сперматозоїдів у сім'яниках та придатках. Також знизилась висота клітин сперматогенного епітелію та діаметр каналців, що суперечить отриманим нами результатам, однак імовірно такі зміни спричинені саме дією глутамату. Цікавим є те, що час перебування сперматозоїдів у придатках, в особливості у голівці придатку, знизився, а час їх проходження підвищився. Автори дійшли висновку, що таке пришвидшення в проходженні сперматозоїдів через придаток може порушити нормальний процес дозрівання сперматозоїдів та знизити кількість гамет у еякуляті, тим самим знижуючи фертильність самців з ожирінням. Ці зміни не залежали від епітелію, стромы та просвіту придатку сім'яника, оскільки на них не впливає ожиріння, індуковане глутаматом.

В іншому дослідженні [83], також перевірявся вплив ожиріння на репродуктивну функцію щурів. Автори не знайшли достовірних відмінностей у рівнях інсуліну, глюкози, холестерину, тригліцеридів. Тим не менш, значно зросли рівні циркулюючого лептину і естрадіолу у групи з ожирінням, а також відмічалось зменшення рівня тестостерону. У цієї ж групи був значно підвищений рівень пероксидації ліпідів та наявність апоптичних тілець у придатку та гірші сперматобіоскопічні параметри. Однак, не було виявлено жодних морфологічних змін у висоті сперматогенного епітелію та епітелію придатка сім'яника. Отримані нами результати не суперечать вищезгаданим дослідженням. У групи «Ожиріння» гістологія та морфологія придатку

сім'яника не зазнали змін. Також, аналогічно до цих досліджень, ми виявили апоптоз в каналцях придатка сім'яника у груп «Ожиріння», «Ожиріння та мелатонін зранку» і «Ожиріння та мелатонін ввечері». Наявність апоптозу свідчить про пошкодження клітин. Такі пошкодження можуть бути результатом підвищеного рівня окисного стресу, високою температурою мошонки або ж наслідком запалення організму, яке часто супроводжує ожиріння. Думки, щодо того чим викликані високі рівні апоптозу суперечливі. Жирова тканина, яка активно акумулюється навколо придатку сім'яника індукує вироблення реактивних форм кисню, які спричиняють підвищення рівня локальної пероксидації ліпідів [83]. Таким чином, можливі фізіопатологічні пояснення оксидативного стресу в придатку сім'яника можуть бути:

1. Через підвищення рівня лептину. Лептин це основний гормон, котрий секретується переважно жировою тканиною і залучений у процеси контролю ваги тіла через вплив на апетит та, відповідно, споживання їжі, а його рівень при ожирінні підвищується. Було показано, що лептин підвищує окиснення жирних кислот в ендотеліальних клітинах аорти. Це пояснювалось дозозалежною активацією протеїн кінази А [83]. Експерименти *in vitro* з ендотеліальними клітинами пупкової вени людини також продемонстрували вироблення реактивних форм кисню залежно від дози, пов'язаної з концентрацією лептину, що спричиняло активацію шляху NH₂-кінцевої c-Jun кінази/протеїнкінази, що активується стресом [85].
2. Через погіршення роботи ендогенної антиоксидантної системи, як є досить активною у придатку сім'яника. Внаслідок цього, знижується редокс потенціал глутатіон пероксидази у жировій тканині придатка, що спричиняє неспроможність елімінувати реактивні форми кисню [86].

3. Через стрес, як результат відкладення жиру. Надмірне відкладення жиру у мошонці підвищує температуру як у сім'яниках, так і у придатках сім'яників. Можливим поясненням такого стресу і апоптозу, як його наслідку, є індукція експресії генів *bax* та *BCL2*, які відомі своєю проапоптичною дією при гіпертермії у сім'яниках [87].

З іншого боку, автори дослідження показали [88], що під час ожиріння у щурів значно знижуються рівні тестостерону, спричиняючи оксидативний стрес, оскільки було показано, що тестостерон теж є антиоксидантом. Тим не менш, на фоні оксидативного стресу значно зростали рівні антиоксидантів: супероксид димутази, каталази та глутатіон пероксидази, які протидіють шкідливим ефектам оксидативного стресу. Так, автори виявили, що цілісність ДНК сперматозоїдів у сім'янику та придатку не змінилась порівняно з контролем. Оскільки сім'яники та їх придатки тестостерон-залежні органи – високі рівні апоптозу епітелію придатка, розриви та вакуолізація сперматогенного епітелію можуть бути викликані зниженням рівня тестостерону.

Враховуючи вищесказане, ми дійшли висновку, що найбільш ймовірним механізмом пошкодження епітеліальних клітин придатка сім'яників, що веде до апоптозу та утворення апоптичних тілець, є підвищення температури в придатку сім'яника, що спричиняє надекспресію проапоптичних генів *bax* та *BCL2*. В свою чергу, оксидативний стрес, викликаний зниженням рівня тестостерону та загальним запальним станом організму при ожирінні, компенсується збільшенням секреції антиоксидантних ферментів на локальному рівні у придатку сім'яника, а тому малоімовірно викликає пошкодження клітинних компонентів.

Єдиним морфометричним параметром, що зазнав змін в умовах ожиріння є площа перерізу ядер епітеліальних клітин придатка сім'яника. В літературі наразі не виявлено досліджень, які би перевіряли вплив ожиріння на цей параметр. Ймовірною причиною зниження площі перерізу ядер може бути

зміна експресії генів – надекспресія проапоптичних генів *bax* та *BCL2* та зниження експресії інших генів. Як ми і зазначали, основною функцією цих клітин є секреція та ендцитоз речовин щоб створити сприятливі умови для захисту, транспорту та дозрівання сперматозоїдів, а будь які зміни, в особливості зміна експресії генів, можуть негативно вплинути на функціональну активність придатку сім'яника як органу статевої системи. Оскільки при ожирінні відбувається пришвидшення проходження сперматозоїдів через придаток, ймовірним поясненням цьому може бути зниження екзоцитоз-ендоцитозної активності епітеліальних клітин каналців придатка.

Отже, опираючись на літературні дані та на отримані нами результати, можна стверджувати, що ожиріння негативно впливає на репродуктивну систему самців через порушення функціонування репродуктивної вісі, зниження ваги статевих органів, зниження стероїдогенезу в клітинах Лейдіга, що спричиняє порушення сперматогенезу та погіршує якість сперми. Крім цього зменшується час проходження сперматозоїдів через придатки, що негативно впливає на ступінь зрілості сперматозоїдів, результатом чого є зниження фертильності. Також при ожирінні відбувається відкладення жиру у мошонці що викликає оксидативний стрес в сім'яниках та експресію проапоптичних генів у придатках сім'яників. Це викликає вакуолізацію сперматогенного епітелію та апоптоз епітеліальних клітин придатків. Тим не менш, ці органи зберігають свою морфологію та гістологічну структуру, відсутні достовірні зміни у діаметрі сім'яних каналців, висоті клітин сперматогенного епітелію та епітелію каналців придатку, а також в площі перерізу ядер клітин Лейдіга при ожирінні. Достовірною зміною, можна вважати лише площу перерізу ядер епітеліальних клітин придатка, що може свідчити про зміну експресії генів цих клітин.

3.3.3. Вплив мелатоніну при різних режимах введення на морфо-функціональні параметри сім'яників та їх придатків

Численні види змінюють свою статеву активність в залежності від сезону, що залежить від тривалості фотоперіоду. У сезонних тварин функція РВ у самців зазнає циклічних змін, що складаються з періодів активації (під час статевого дозрівання і на початку сезону спарювання кожного року) та інактивації (під час періоду гібернації). Фотоперіод впливає на сезонних тварин через зміни у секреції мелатоніну епіфізом [89]. У довгоденних тварин, таких як хом'яки, миші та щури [90] тривалість добової секреції мелатоніну негативно корелює з кількістю годин, які тварина проводить на світлі, а тому світловий сигнал інтерпретується як про-гонадотропний [89].

Під впливом мелатоніну ми спостерігали зменшення висоти сперматогенного епітелію та діаметру звивистих сім'яних каналців, що свідчить про можливе порушення сперматогенезу в сім'яниках. Клітини Сертолі мають рецептори до мелатоніну, та було показано [91], що введення мелатоніну при досягненні концентрації в 0.1 мг/кг тіла достовірно знижує діаметр ЗСК у щурів. Більш того, автори дослідження відмічали, що ефект є часо- та дозозалежним. Окрім цього, про порушення сперматогенезу в даному дослідженні свідчила і відсутність верхніх шарів сперматогенного епітелію. Дані зміни викликані високою концентрацією екзогенного мелатоніну в крові, який, як відомо, є негативним регулятором секреції ФСГ та ЛГ, котрі регулюють сперматогенез.

На фоні ожиріння, групи щурів яким вводили мелатонін також показали зниження діаметрів ЗСК. Імовірно, це спричинено тим, що ЗСК вже були ушкоджені ожирінням. Ми не виявили ділянок вакуолізації сперматогенного епітелію на фоні ожиріння у щурів, що приймали мелатонін, імовірно через його антиоксидативну дію, що компенсувала оксидативний стрес в сім'яниках, викликаний надмірним відкладанням жиру в мошонці. Тим не менш, оскільки при ожирінні наявні високі рівні естрогенів, котрі негативно впливають на

виділення ФСГ та ЛГ, додаткове введення ще одного такого негативного регулятора – мелатоніну, може спричинити ще більше порушення тестикулярного сперматогенезу, що ми і виявили в нашому дослідженні.

Введення мелатоніну супроводжувалось збільшенням площі перерізу ядер клітин Лейдіга. Це спостерігалось як в групі «Ожиріння», так і в групах «Ожиріння+Мелатонін зранку» та «Ожиріння+Мелатонін ввечері». Відомо [91], що у клітин Лейдіга наявний рецептор до мелатоніну (MT1) на плазматичній мембрані. Існує декілька механізмів інгібування мелатоніном продукції тестостерону. Перший – через супресію ГТРГ-залежного викиду йонів кальцію з ендоплазматичної сітки в клітинах Лейдіга щурів. Інгібування продукції тестостерону мелатоніном по другому механізму відбувається за участі кортикотропін-рилізінг гормону (КРГ), який активно продукується клітинами Лейдіга. Більш того, ці клітини мають рецептор до КРГ. Загалом, КРГ проявляє інгібуючу дію на вироблення тестостерону, а мелатонін індукує вироблення КРГ клітинами Лейдіга. Внаслідок надмірної продукції КРГ відбувається аутокринне інгібування вироблення тестостерону цАМФ-залежним шляхом – інгібується експресія гену білка StAR, який є важливим для нормального проходження стероїдогенезу.

Відомо [92], що в клітинах Лейдіга існує цАМФ-незалежний шлях утворення тестостерону. Цей шлях активується такими молекулами як, ЛГ, інтерлейкін-1, пролактин, трансформуючий фактор росту альфа та епідермальний фактор росту, що можуть індукувати експресію StAR. Такий обхідний шлях синтезу андрогенів в клітинах Лейдіга є найбільш імовірним поясненням компенсаторного збільшення площі перерізу ядер на фоні введення мелатоніну.

Ми показали, що введення мелатоніну достовірно підвищує висоту клітин епітелію придатка сім'яника як у групах без ожиріння, так і у груп з ожирінням. Крім цього, ми виявили, що введення мелатоніну спричиняє достовірне зменшення площі перерізу ядер епітеліальних клітин придатка у всіх груп, яким його вводили, окрім групи «Мелатонін ввечері». Також, групи щурів з

ожирінням, що отримували мелатонін зранку та ввечері не мали достовірної різниці в площі перерізу ядер порівняно з групою «Ожиріння». Загалом збільшення висоти клітин свідчить про підвищену секреторну активність, а зменшення площі перерізу ядер свідчить про зниження експресії генів.

Наразі в літературі немає інформації, що пояснює вплив мелатоніну на морфо-функціональні параметри придатків сім'яників щурів, тому необхідне подальше вивчення ймовірних механізмів впливу мелатоніну на висоту та площу перерізу ядер епітеліальних клітин придатка. Тим не менш, було показано [93], що ці клітини мають рецептори до мелатоніну. Більш того, автори припускають, що нічна фізіологічна секреція мелатоніну стимулює проліферацію цих клітин.

Отже, введення мелатоніну спричиняє достовірне зменшення діаметрів сім'яних каналців та висоти сперматогенного епітелію у щурів. Такі результати свідчать про зниження інтенсивності сперматогенезу. Крім цього, було виявлено достовірне збільшення площі перерізу ядер клітин Лейдіга, що пояснюється цАМФ-незалежним шляхом експресії гену StAR для синтезу тестостерону, оскільки мелатонін блокує його синтез цАМФ-залежним шляхом. Також, на фоні введення мелатоніну збільшилась висота клітин епідидимального епітелію та знизилась площа перерізу ядер цих клітин. Наразі не відомо механізма, який би пояснив дані зміни у морфо-функціональних параметрах придатка сім'яника.

ВИСНОВКИ

1. Виявлено, що розвиток ожиріння спричиняє гістологічні зміни сперматогенного епітелію у вигляді його вакуолізації та розривів, що, однак не призводить до достовірних змін морфометричних параметрів сім'яників;

2. Введення мелатоніну, як за умов нормального раціону, так і висококалорійної дієти, призвело до пригнічення сперматогенезу, що проявлялось у достовірному зменшенні діаметру звивистих сім'яних канальців та висоти сперматогенного епітелію;

3. Виявлено пригнічення тестикулярного стероїдогенезу за введення мелатоніну, яке проявилось у компенсаторному зростанні площі перерізу ядер клітин Лейдіга;

4. Виявлено, що розвиток ожиріння спричиняє пригнічення функціональної активності придатків сім'яників щурів;

5. Введення мелатоніну як за умов нормального раціону, так і висококалорійної дієти, призвело до розвитку різнонаправлених змін морфо-функціонального стану епітелію придатків сім'яників.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Wang, Y. C., McPherson, K., Marsh, T., Gortmaker, S. L. & Brown, M. (2011) Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *The Lancet* 378 (9793), pp. 815-825.
2. Беленков Ю.Н., Привалова Е.В., Каплунова В.Ю., Зекцер В.Ю., Виноградова Н.Н., Ильгисонис И.С., Шакарьянц Г.А., Кожевникова М.В., Лишута А.С. (2018). Метаболический синдром: история развития, основные критерии диагностики. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии*, 14(5), стр. 757-764.
3. Урясьев О.М., Горбунова Д.Ю., Щербакова О.Н., & Пыко А.А. (2017). Метаболический синдром - нерешённая проблема медицины и современного общества. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*, 16 (1), стр. 160-164.
4. Красильников, А.В., & Азин, А.Л. (2011). Метаболический синдром: патогенез и гериатрические аспекты проблемы. *Практическая медицина*, (54), стр. 31-35.
5. Lin, X. & Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology* 12. [online]. Available at: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978>
6. Bentham, J. et al. (2017). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet (London, England)*, 390(10113), pp. 2627–2642.
7. Wariri, O., Alhassan, J. A. K., Mark, G., Adesiyan, O., & Hanson, L. (2021). Trends in obesity by socioeconomic status among non-pregnant women aged 15-49 y: a cross-sectional, multi-dimensional equity analysis of demographic and health surveys in 11 sub-Saharan Africa countries, 1994-2015. *International health*, 13(5), pp. 436–445.

8. Engin A. (2017). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Advances in experimental medicine and biology*, 960, pp. 1–17.
9. Mayoral, L. P., Andrade, G. M., Mayoral, E. P., Huerta, T. H., Canseco, S. P., Rodal Canales, F. J., Cabrera-Fuentes, H. A., Cruz, M. M., Pérez Santiago, A. D., Alpuche, J. J., Zenteno, E., Ruíz, H. M., Cruz, R. M., Jeronimo, J. H., & Perez-Campos, E. (2020). Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *The Indian journal of medical research*, 151(1), pp. 11–21.
10. Dixon, J. B., Zimmet, P., Alberti, K. G., Rubino, F., & International Diabetes Federation Taskforce on Epidemiology and Prevention (2011). Bariatric surgery: an IDF statement for obese Type 2 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 28(6), pp. 628–642.
11. Ashwell, M., Mayhew, L., Richardson, J., & Rickayzen, B. (2014). Waist-to-height ratio is more predictive of years of life lost than body mass index. *PLoS one*, 9(9) [online]. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103483>
12. Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology Research and Practice.* [online]. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/943162>
13. Учамприна, В. А., Романцова, Т. И., & Калашникова, М. Ф. (2012). Метаболический синдром: аргументы «За» и «Против». *Ожирение и метаболизм*, (2), стр. 17-27.
14. Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S. & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: Pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 11, pp. 215–225.
15. Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A., Eckel, R. H., Franklin, B. A., Gordon, D. J., Krauss, R. M., Savage, P. J., Smith, S. C., Jr, Spertus, J. A., Costa, F., American Heart Association, & National Heart, Lung, and Blood Institute (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, 112(17), pp. 2735–2752.

16. Bovolini, A., Garcia, J., Andrade, M. A. & Duarte, J. A. (2021). Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. *Int. J. Sports Med.* 42, pp. 199–214.
17. McCracken, E., Monaghan, M. & Sreenivasan, S. (2018). Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin. Dermatol.* 36, pp. 14–20.
18. Боцюрко В.І., Дідушко О.М., Костицька І.О. (2018). Чи потрібен діагноз «метаболічний синдром»? *Міжнародний ендокринологічний журнал* 14 (6), сс. 590-592.
19. Handelsman, Y. (2009). Metabolic syndrome pathophysiology and clinical presentation. *Toxicol. Pathol.* 37, pp 18–20.
20. Rosenzweig, J. L. *et al.* (2008). Primary prevention of cardiovascular disease and type 2 diabetes in patients at metabolic risk: An endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(10), pp 3671–3689.
21. Grundy, S. M., Cleeman, J. I. *et al* (2005, October 25). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation.* 112, pp. 2735–2752.
22. -, -. (2005). The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. *Obesity and Metabolism*, 2(3), pp. 47–49.
23. Alberti, K. G. M. M. *et al.* (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation*, 120, pp. 1640–1645.
24. Simmons, R. K. *et al.* (2010). The metabolic syndrome: Useful concept or clinical tool? Report of a WHO expert consultation. *Diabetologia*, 53(4), pp. 600–605.
25. 2021 ICD-10-CM Diagnosis Code E88.81: Metabolic syndrome. [online] Available at: <https://www.icd10data.com/ICD10CM/Codes/E00-E89/E70-E88/E88-/E88.81>.
26. ICD-11 - Mortality and Morbidity Statistics. [online] Available at <https://icd.who.int/browse11/l-m/en#/http://id.who.int/icd/entity/1736778>.

27. Metabolic Syndrome. MeSH Descriptor Data 2021. [online] Available at: <https://meshb.nlm.nih.gov/record/ui?ui=D024821>.
28. Bharti, A. & Kushwaha, A. (2020). Metabolic syndrome: Pathophysiology and Consequences. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 9, pp. 3723–3728.
29. Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 2, pp. 231–237.
30. Oh, Y. S., Bae, G. D., Baek, D. J., Park, E. Y. & Jun, H. S. (2018). Fatty acid-induced lipotoxicity in pancreatic beta-cells during development of type 2 diabetes. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 384.
31. Tripathy, D. *et al.* (2003). Elevation of Free Fatty Acids Induces Inflammation and Impairs Vascular Reactivity in Healthy Subjects. *Diabetes* 52(12), pp. 2882–2887.
32. Grundy, S. M. (2015). Adipose tissue and metabolic syndrome: Too much, too little or neither. *European Journal of Clinical Investigation*, 45, pp. 1209–1217.
33. Petersen, A. M. W. & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 98, pp. 1154–1162.
34. Paley, C. A. & Johnson, M. I. (2018). Abdominal obesity and metabolic syndrome: Exercise as medicine? *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation* 10. <https://doi.org/10.1186/s13102-018-0097-1>.
35. Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F. & Carreira, M. C. (2019) Leptin, obesity, and leptin resistance: where are we 25 years later? *Nutrients*, 11, p. 2704.
36. Klop, B., Elte, J. W. F. & Cabezas, M. C. (2013). Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients*, 5, pp. 1218–1240.
37. Guan, Q., Wang, Z., Cao, J., Dong, Y., & Chen, Y. (2021). Mechanisms of Melatonin in Obesity: A Review. *International journal of molecular sciences*, 23(1), p. 218.
38. Pivonello, C., Negri, M., Patalano, R., Amatrudo, F., Montò, T., Liccardi, A., Graziadio, C., Muscogiuri, G., Pivonello, R., & Colao, A. (2022). The role of melatonin in the molecular mechanisms underlying metaflammation and

- infections in obesity: A narrative review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 23(3), e13390
39. Carrascal, L., Nunez-Abades, P., Ayala, A., & Cano, M. (2018). Role of Melatonin in the Inflammatory Process and its Therapeutic Potential. *Current pharmaceutical design*, 24(14), pp.1563–1588.
 40. Cipolla-Neto, J., & Amaral, F. G. D. (2018). Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocrine reviews*, 39(6), pp. 990–1028.
 41. Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., & Hacimuftuoglu, A. (2016). A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. *The Eurasian journal of medicine*, 48(2), pp. 135–141.
 42. Dubocovich, M. L., Delagrange, P., Krause, D. N., Sugden, D., Cardinali, D. P., & Olcese, J. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacological reviews*, 62(3), pp. 343–380.
 43. Han, J. H., Chang, I. H., Myung, S. C., Lee, M. Y., Kim, W. Y., Lee, S. Y., Lee, S. Y., Lee, S. W., & Kim, K. D. (2012). A novel pathway underlying the inhibitory effects of melatonin on isolated rat urinary bladder contraction. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 16(1), 37–42.
 44. Lardone, P. J., Guerrero, J. M., Fernández-Santos, J. M., Rubio, A., Martín-Lacave, I., & Carrillo-Vico, A. (2011). Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *Journal of pineal research*, 51(4), pp. 454–462.
 45. Garcia-Mauriño, S., Gonzalez-Haba, M. G., Calvo, J. R., Rafii-El-Idrissi, M., Sanchez-Margalet, V., Goberna, R., & Guerrero, J. M. (1997). Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(2), pp. 574–581.

46. Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., & Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science*, 7(6), pp. 444–458.
47. Srinivasan, V., Ohta, Y., Espino, J., Pariente, J. A., Rodriguez, A. B., Mohamed, M., & Zakaria, R. (2013). Metabolic syndrome, its pathophysiology and the role of melatonin. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery*, 7(1), pp. 11–25.
48. Srivastava, R. K., & Krishna, A. (2010). Melatonin modulates glucose homeostasis during winter dormancy in a vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 155(3), pp. 392–400.
49. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей від 18.03.1986. https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text.
50. Про захист тварин від жорстокого поводження від 21.02.2006 № 3447-IV. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>.
51. Wing, T. -Y & Christensen, A. K. (1982). Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* 165, pp. 13–25.
52. Plant, T.M., Zeleznik, A.J., David Albertini, F., (2015). *Physiology of reproduction*. 4th ed. Academic Press
53. Griswold M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological reviews*, 96(1), pp. 1–17.
54. Jauregui, E. J., Mitchell, D., Topping, T., Hogarth, C. A., & Griswold, M. D. (2018). Retinoic acid receptor signaling is necessary in steroidogenic cells for normal spermatogenesis and epididymal function. *Development (Cambridge, England)*, 145(13), [online]. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.160465>
55. Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q., & He, Z. (2019). The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 76(14), pp. 2681–2695.

56. Richard E. Jones, Kristin H. Lopez. (2014). *Human reproductive biology*. 4th ed. Academic Press
57. James, E. R., Carrell, D. T., Aston, K. I., Jenkins, T. G., Yeste, M., & Salas-Huetos, A. (2020). The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International journal of molecular sciences*, 21(15), p. 5377.
58. Brooks D. E. (1983). Epididymal functions and their hormonal regulation. *Australian journal of biological sciences*, 36(3), pp. 205–221.
59. Cornwall G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*, 15(2), pp. 213–227.
60. Sullivan, R., & Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction (Cambridge, England)*, 146(1), pp. 21–35.
61. Leung, G. P., Cheung, K. H., Leung, C. T., Tsang, M. W., & Wong, P. Y. (2004). Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Molecular and cellular endocrinology*, 216(1-2), pp. 5–13
62. Elfgen, V., Mietens, A., Mewe, M., Hau, T., & Middendorff, R. (2018). Contractility of the epididymal duct: function, regulation and potential drug effects. *Reproduction (Cambridge, England)*, 156(4), pp. 125–141.
63. Turner T. T. (1984). Resorption versus secretion in the rat epididymis. *Journal of reproduction and fertility*, 72(2), pp. 509–514.
64. Hinton, B. T., Palladino, M. A., Rudolph, D., Lan, Z. J., & Labus, J. C. (1996). The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. *Current topics in developmental biology*, 33, pp. 61–102.
65. O'Flaherty C. (2019). Orchestrating the antioxidant defenses in the epididymis. *Andrology*, 7(5), pp. 662–668.
66. Jones R. C. (1999). To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *International journal of andrology*, 22(2), pp. 57–67.

67. Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), pp. 204–218.
68. Vendramini, V., Cedenho, A. P., Miraglia, S. M., & Spaine, D. M. (2014). Reproductive function of the male obese Zucker rats: alteration in sperm production and sperm DNA damage. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 21(2), pp. 221–229.
69. Virtanen, H. E., Jørgensen, N., & Toppari, J. (2017). Semen quality in the 21st century. *Nature reviews. Urology*, 14(2), pp. 120–130.
70. Michalakis, K., Mintziori, G., Kaprara, A., Tarlatzis, B. C., & Goulis, D. G. (2013). The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism: clinical and experimental*, 62(4), pp. 457–478.
71. Harter, C. J. L., Kavanagh, G. S., & Smith, J. T. (2018). The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism. *The Journal of endocrinology*, 238(3), pp. 173–183.
72. Leisegang, K., Sengupta, P., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia*, 53(1), [online]. Available at: <https://doi.org/10.1111/and.13617>.
73. Dimopoulou, C., Goulis, D. G., Corona, G. & Maggi, M. (2018). The complex association between metabolic syndrome and male hypogonadism. *Metabolism*, 86, pp 61-68.
74. Berg, W. T., & Miner, M. (2020). Hypogonadism and metabolic syndrome: review and update. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 27(6), pp. 404–410.
75. Leisegang, K., Henkel, R., & Agarwal, A. (2019). Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 82(5) [online]. Available at <https://doi.org/10.1111/aji.13178>.

76. Martins, A. D., Majzoub, A., & Agawal, A. (2019). Metabolic Syndrome and Male Fertility. *The world journal of men's health*, 37(2), pp. 113–127.
77. Vryonidou, A., Paschou, S. A., Muscogiuri, G., Orio, F., & Goulis, D. G. (2015). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Metabolic syndrome through the female life cycle. *European journal of endocrinology*, 173(5), pp. 153–163.
78. Delitala, A. P., Capobianco, G., Delitala, G., Cherchi, P. L., & Dessole, S. (2017). Polycystic ovary syndrome, adipose tissue and metabolic syndrome. *Archives of gynecology and obstetrics*, 296(3), pp. 405–419.
79. Pasquali R. (2018). Metabolic Syndrome in Polycystic Ovary Syndrome. *Frontiers of hormone research*, 49, pp. 114–130.
80. Di Francesco, S., Caruso, M., Robuffo, I., Militello, A., & Toniato, E. (2019). The Impact of Metabolic Syndrome and Its Components on Female Sexual Dysfunction: A Narrative Mini-Review. *Current urology*, 12(2), pp. 57–63.
81. Pinto-Fochi, M. E., Pytlowanciv, E. Z., Reame, V., Rafacho, A., Ribeiro, D. L., Taboga, S. R., & Góes, R. M. (2016). A high-fat diet fed during different periods of life impairs steroidogenesis of rat Leydig cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, 152(6), pp. 795–808.
82. Fernandes, G. S., Arena, A. C., Campos, K. E., Volpato, G. T., Anselmo-Franci, J. A., Damasceno, D. C., & Kempinas, W. G. (2012). Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 10, p. 105.
83. Viguera-Villaseñor, R. M., Rojas-Castañeda, J. C., Chávez-Saldaña, M., Gutiérrez-Pérez, O., García-Cruz, M. E., Cuevas-Alpuche, O., Reyes-Romero, M. M., & Zambrano, E. (2011). Alterations in the spermatid function generated by obesity in rats. *Acta histochemica*, 113(2), pp. 214–220.
84. Yamagishi, S. I., Edelstein, D., Du, X. L., Kaneda, Y., Guzmán, M., & Brownlee, M. (2001). Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by

- increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *The Journal of biological chemistry*, 276(27), pp. 25096–25100.
85. Bouloumie, A., Marumo, T., Lafontan, M., & Busse, R. (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(10), pp. 1231–1238.
 86. Galinier, A., Carriere, A., Fernandez, Y., Caspar-Bauguil, S., Periquet, B., Periquet, A., Penicaud, L., & Casteilla, L. (2006). Site specific changes of redox metabolism in adipose tissue of obese Zucker rats. *FEBS letters*, 580(27), pp. 6391–6398.
 87. Jara, M., Esponda, P., & Carballada, R. (2002). Abdominal temperature induces region-specific p53-independent apoptosis in the cauda epididymidis of the mouse. *Biology of reproduction*, 67(4), pp. 1189–1196.
 88. Ruiz-Valderrama, L., Posadas-Rodríguez, J., Bonilla-Jaime, H., Tarragó-Castellanos, M. D. R., González-Márquez, H., Arrieta-Cruz, I., González-Núñez, L., Salame-Méndez, A., Rodríguez-Tobón, A., Morales-Méndez, J. G., & Arenas-Ríos, E. (2022). Sperm Dysfunction in the Testes and Epididymides due to Overweight and Obesity Is Not Caused by Oxidative Stress. *International journal of endocrinology*, 2022, [online]. Available at: <https://doi.org/10.1155/2022/3734572>
 89. Frungieri, M. B., Calandra, R. S., & Rossi, S. P. (2017). Local Actions of Melatonin in Somatic Cells of the Testis. *International journal of molecular sciences*, 18(6), pp. 1170.
 90. Shinomiya, A., Shimmura, T., Nishiwaki-Ohkawa, T., & Yoshimura, T. (2014). Regulation of seasonal reproduction by hypothalamic activation of thyroid hormone. *Frontiers in endocrinology*, 5, p. 12.
 91. Rashed, R., Mohamed, I. & Ei-Alfy, S. (2010). Effects of two different doses of melatonin on the spermatogenic cells of rat testes: a light and electron microscopic study. *Egypt J Histol* vol. 33, pp. 819-835.

92. Steinbach, T. J., Maronpot, R. R. & Hardisty, J. F. (2015). Human Relevance of Rodent Leydig Cell Tumors. [online]. Available at: 10.1002/9781118834015.ch109
93. Shiu, S. Y., Li, L., Siu, S. W., Xi, S. C., Fong, S. W., & Pang, S. F. (2000). Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. *Biological signals and receptors*, 9(3-4), pp. 172–187.