

UDC 618.46:612.592:616.441-008.64:612.6:616-092.9

Н.Г. Малова¹, І.В. Комарова¹, Л.А. Сиротенко¹,
Н.М. Бречка¹, Ю.С. Курилко^{1*}, Т.Є. Комісова¹, А.М. Гольцев²

Коригування рівня тиреоїдних гормонів у щурів під впливом кріоекстракту плаценти

UDC 618.46:612.592:616.441-008.64:612.6:616-092.9

N.G. Malova¹, I.V. Komarova¹, L.A. Sirotenko¹,
N.M. Brechka¹, Yu.S. Kurilko^{1*}, T.E. Komisova¹, A.M. Goltsev²

Placental Cryoextract Corrects the Level of Thyroid Hormones in Rats

Реферат: У роботі на 50 самцях щурів із мерказоліловим гіпотиреозом вивчено ефективність застосування кріоконсервованого плацентарного препарату «Кріоекстракт плаценти» для коригування розладів репродуктивної системи, які виникають на тлі низького рівня тиреоїдних гормонів. За допомогою стандартних тест-систем для тварин проведено визначення рівня загальних і вільних форм тиреоїдних гормонів, загального тестостерону та естрадіолу. За стандартною методикою оцінено морфологічний стан сперматозоїдів (кількість, рухомість, патологічні форми). Показано, що введення біопрепарату (у дозі 50–150 мкл/кг) відновлювало функціональну активність щитоподібної залози тварин, причому ефективнішою була найнижча доза. Також препарат «Кріоекстракт плаценти» проявляв дозозалежний ефект на репродуктивну систему тварин із гіпотиреозом: найбільш ефективною була доза 150 мкл/кг, яка максимально сприяла відновленню морфологічних показників сперматозоїдів і приводила до стимуляції утворення тестостерону та нормалізації індексу співвідношення Тс/Е₂. Кріоконсервований екстракт плаценти може розглядатися як потенційний препарат для коригування гіпотиреозу та репродуктивних розладів ендокринного ґенезу у самців щурів.

Ключові слова: експериментальний гіпотиреоз, щитоподібна залоза, тиреоїдна система, репродуктивна система, кріоконсервований біопрепарат плаценти.

Abstract: Effectiveness of cryopreserved placental product 'Placental cryoextract' to correct the reproductive system disorders, occurring against the background of low levels of thyroid hormones, was studied in 50 male rats with mercazolyl hypothyroidism. Using standard test systems for animals, the level of total and free forms of thyroid hormones, total testosterone and estradiol was determined. The morphofunctional state of sperm (number, motility, pathological forms) was traditionally assessed. It was shown that the introduction of the biological product (at a dose of 50–150 µl/kg) restored the functional activity of the thyroid gland of animals, and the lowest dose was more effective. Placental cryoextract also had a dose-dependent effect on the reproductive system of animals with hypothyroidism: the most effective dose was 150 µl/kg, which maximally restored the morphofunctional parameters of sperm and stimulated testosterone production as well as normalized the Ts/E₂ ratio. Cryopreserved placenta extract can be considered as a potential drug for the correction of hypothyroidism and reproductive disorders of endocrine origin in male rats.

Key words: experimental hypothyroidism, thyroid gland, thyroid system, reproductive system, cryopreserved placental biological product.

На сьогодні з'являється все більше свідчень про негативний вплив наслідків дисфункції щитоподібної залози (ЩЗ) на різні ланки ендокринної системи. Недостатність тиреоїдних гормонів спричиняє цілий ряд важких ускладнень, зокрема розладів репродуктивної функції. Відомо, що перенесений у дитинстві маніфестний гіпотиреоз може викликати порушення функції гонад у дорослому віці [10, 13, 20, 23]. Гіпофункція ЩЗ призводить до зміни синтезу, транспорту та периферичного ефекту статевих гормонів.

Today, there is growing evidence of negative effects of thyroid dysfunction on various parts of the endocrine system. Deficiency of thyroid hormones causes a number of serious complications, including disorders of reproductive function. It is known that the manifested in childhood hypothyroidism can lead to gonadal disorders in adulthood [3, 14, 17, 22]. The thyroid gland (TG) hypofunction results in the changes of the synthesis, transport and peripheral effect of sex hormones. Disorders of thyroid hormone metabolism impair sexual func-

¹ ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМНУ», м. Харків

² Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: ukurilko1@gmail.com

Надійшла 11.11.2020

Прийнята до друку 19.10.2021

¹ SI 'V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine', Kharkiv, Ukraine

² Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: ukurilko1@gmail.com

Received 11, November, 2020

Accepted 19, October, 2021

Розлади метаболізму тиреоїдних гормонів погіршують статеву функцію, а саме: знижують лібідо, призводять до порушення ерекції, еякуляції та оргазму. Недостатність тиреоїдних гормонів викликає порушення стероїдогенезу в сім'яниках, в результаті чого зменшується секреція тестостерону (Тс) та підвищується рівень естрадіолу (E_2). Обумовлений гіпотиреозом дефіцит тестостерону супроводжується патологічними змінами сперматогенезу у вигляді оліго- та астенозооспермії. Крім того, на фоні гіпофункції щитоподібної залози у чоловіків можуть спостерігатися явища гіперпролактинемії та гіпогонадизму, а у випадках важкого первинного гіпотиреозу також може розвиватися гіпопітуїтаризм, зумовлений гіперплазією гіпофіза [9, 17, 22, 24].

Відомо, що показники безпліддя в світі коливаються від 9 до 29%, а показник 15% є демографічно небезпечним. В Україні нараховується близько мільйона безплідних пар. Відповідно до загальноприйнятої класифікації чоловічого безпліддя основне місце займає дискореляційне секреторне безпліддя, тобто гіпогонадизм у пацієнтів з ендокринопатією [1, 5, 12, 26].

Із урахуванням вищевказаного актуальність пошуку ефективних засобів для лікування більш розповсюджених ендокринопатій (пов'язаних, зокрема, із гіпофункцією щитоподібної залози, – репродуктопатій) є важливою проблемою сучасної ендокринології. Під час розробки нових підходів до коригування тиреоїдної патології слід враховувати і можливість відновлення не тільки тиреоїдної функції, а й супутньо виниклих патологічних станів, зокрема розладів статевої системи.

На сьогодні заходи відновлювальної терапії клітинними й тканинними кріоконсервованими біопрепаратами природного походження (зокрема, плаценти) розглядаються як перспективна альтернатива замісної гормональної терапії ендокринних захворювань. Активною речовиною плацентарних препаратів є класичні біостимулятори, які утворюються в тканинах. Механізм дії ґрунтується на зберіганні в кріоконсервованій тканині метаболічно активних речовин природного походження, які коригують імунологічний статус людини і мають поліфармакологічні властивості специфічної й неспецифічної спрямованості, а також направлені на регуляцію процесів регенерації, проліферації та диференціювання [4, 7, 16, 18].

Багаторічні клінічні дослідження виявили виражений терапевтичний ефект використання екстракту плаценти під час лікування цілого ряду

tion, namely: reduce libido, lead to erectile ejaculation and orgasm dysfunctions. Deficiency of thyroid hormones disorders steroidogenesis in testes, resulting in decreased secretion of testosterone (Ts) and increased levels of estradiol (E_2). Hypothyroidism-induced testosterone deficiency is accompanied by pathological changes in spermatogenesis in the form of oligo- and asthenozoospermia. In addition, in male hypothyroidism, hyperprolactinemia and hypogonadism may occur, and in cases of severe primary hypothyroidism the hypopituitarism may also develop due to pituitary hyperplasia [6, 5, 15, 24].

It is known that the infertility rates worldwide range from 9 to 29%, and 15% of them is demographically dangerous. There are about a million infertile couples in Ukraine. According to the traditional classification of male infertility the main place is occupied by discorrelated secretory infertility, *i. e.* hypogonadism in endocrinopathies [2, 10, 20, 21].

Assuming the above, the urgency of finding more effective treatments for more common endocrinopathies (associated, in particular, with hypothyroidism and reproductive disorders) is an important task of modern endocrinology. When developing new approaches for the correction of thyroid pathology the possibility of restoring not only thyroid function, but also concomitant pathologies, in particular, the reproductive system disorders should be taken into account.

Today, measures of restorative therapy with cryopreserved cell and tissue biological products of natural origin (including placenta) are considered as a promising alternative to hormone replacement therapy of endocrine diseases. The active agents of placental drugs are classic biostimulants, which are formed in tissues. The mechanism of action is based on storage in cryopreserved tissue of metabolically active substances of natural origin, which correct human immunological status and have polypharmacological properties of specific and non-specific orientation, as well as aimed at regulating regeneration, proliferation and differentiation [9, 12, 16, 26].

Lon-term clinical studies have shown a distinct therapeutic effect of the use of placental extract in treatment of a number of somatic diseases, including those of endocrine system [4, 18, 19, 27]. In clinical practice, in treatment of disorders of spermatogenesis and sexual dysfunction as well as during miscarriage, the subcutaneous administration of fragments and extracts of cryopreserved placenta is used quite effectively [1, 11, 13].



соматичних захворювань, зокрема ендокринної системи [21, 11, 25, 27]. У клінічній практиці для лікування порушень сперматогенезу та статевої дисфункції та під час невиношування вагітності достатньо ефективно використовується метод підшкірного введення фрагментів та екстрактів кріоконсервованої плаценти [6, 8, 19].

Таким чином, доцільність вивчення впливу кріоекстракту плаценти на відновлення репродуктивної функції, розлад якої розвивається на тлі нестачі тиреоїдних гормонів, не підлягає сумніву.

Мета роботи – експериментальне визначення ефективності застосування кріоконсервованого плацентарного препарату «Кріоекстракт плаценти» для коригування розладів репродуктивної системи, які виникають внаслідок зниження функції щитоподібної залози.

Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006) з дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [14].

У дослідженні вивчався вплив різних доз кріоконсервованого препарату плаценти на репродуктивну та тиреоїдну систему щурів за умов зниженої функції ЩЗ. Експерименти проведено на 50 статевозрілих самцях щурів популяції Вістар із масою тіла 250–300 г із гіпотиреозом, який викликали шляхом внутрішньошлункового введення протягом двох місяців суспензії мерказолілу в дозі 10 мг/кг маси тіла у 2%-му розчині крохмалю за допомогою зонда [15]. Після цього введення препарату припиняли. Вивчення ефективності дії кріоконсервованого плацентарного препарату «Кріоекстракт плаценти» (КЕП) (ДП «МНЦ ІПКіК НАН, МОЗ, АМН України») проводили в трьох дозах: 50, 100 та 150 мкл/кг. Введення КЕП розпочинали через тиждень після припинення введення мерказолілу.

Щури, які знаходилися в однакових умовах та отримували той самий харчовий раціон, були розподілені на п'ять груп: 1 – еутиреоїдний контроль (інтактні тварини); 2 – тварини, яким вводили мерказоліл; 3 – тварини з ін'єкціями (парентерально із розрахунку 10 ін'єкцій через добу, у дозі 50 мкл/кг маси тіла) кріоконсервованого екстракту плаценти після припинення

Thus, the advisability of studying the effect of the placental cryoextract on restoration of reproductive function, the disorder of which caused by a lack of thyroid hormones, is beyond doubt.

The research aim was to experimentally determine the effectiveness of applying the cryopreserved placental product 'Placental cryoextract' to correct the disorders of reproductive system, caused by a reduced thyroid function.

Materials and methods

The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of 21.02.2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, consistent with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986)[23].

The study examined the effect of different doses of cryopreserved placenta on the reproductive and thyroid system of rats with of reduced thyroid function. The experiments were performed in 50 adult Wistar male rats weighing 250–300g with hypothyroidism induced by intragastric injection of a suspension of mercazolyl at a dose of 10 mg/kg body weight in 2% starch solution by gavage [25]. Afterwards, the drug injection was discontinued. The effectiveness of the cryopreserved placental drug 'Placental cryoextract' (PCE) (SE 'Interdepartmental Center of the National Academy of Sciences, Ministry of Health and Academy of Medical Sciences of Ukraine') was studied in three doses: 50, 100 and 150 µl/kg. PCE injection was started one week after cessation of mercazolyl injection.

Rats that were kept under similar conditions and received the same diet were divided into five groups: 1 – euthyroid control (intact animals); 2 – animals injection with mercazolyl; 3 – animals injected with (parenterally at the rate of 10 injections per day, at a dose of 50 µl/kg body weight) cryopreserved placental extract after discontinuation of mercazolyl with verification of hypothyroidism; 4 – animals with confirmed hypothyroidism, which was injected with cryopreserved placental extract at a dose of 100 µl/kg body weight according to a protocol similar to group 3; 5 – animals treated with placenta extract at a dose of 150 µl/kg body weight according to the protocol (similar to groups 3 and 4).

Animals were removed from the experiment 7 days and one month after the end of the injection



введення мерказолілу з верифікацією гіпотиреоїдного стану; 4 – тварини з підтвердженим гіпотиреозом, яким вводили кріоконсервований екстракт плаценти в дозі 100 мкл/кг маси тіла за схемою, аналогічною групі 3; 5 – тварини, яким вводили екстракт плаценти в дозі 150 мкл/кг маси тіла за схемою, аналогічною групам 3 та 4.

Виведення тварин із експерименту проводили через 7 діб та через місяць після закінчення курсу ін'єкцій шляхом швидкого перерізання хребта в основі черепа з використанням легкого ефірного наркозу. Відбір зразків крові в усіх групах тварин здійснювали одночасно та за однаковою схемою.

Проводили макроскопічне дослідження стану внутрішніх органів тварин. Органи репродуктивної системи (сім'яники та їх придатки, вентральна передміхурова залоза, сім'яні пухирці) виділяли та зважували. Гормональні дослідження (визначення вмісту тиреоїдних гормонів – загальних T_3 та T_4 , вільного T_4 , а також загального Tc і E_2 у сироватці крові піддослідних щурів) здійснювали за допомогою стандартних комерційних тест-наборів для імуноферментного аналізу («Гранум», Україна) з відповідними реагентами («Хема», Україна). У роботі використовували мікропланшетний імуноферментний аналізатор «Stat Fax 3200» (Awareness Technology inc., США). Зважування органів проводили на електронних вагах «ТВЕ-0,6» («Техноваги», Україна). У суспензії придатків сім'яників за допомогою камери Горяєва оцінювали показники морфофункціонального стану сперматозоїдів (кількість, рухливість, патологічні форми) за загальноприйнятою методикою [15].

Отриманий цифровий матеріал обробляли математично методами параметричної та непараметричної статистики з використанням програми «Excel» («Microsoft», США). Перевірку на нормальний розподіл здійснювали з використанням W -критерію Шапіро-Вілка. Порівняння груп із нормальним розподілом ознак проводили за допомогою критерію Стьюдента (t). Для порівняння двох груп із розподілом ознак, відмінних від нормального, використовували непараметричний U -критерій Мана-Вітні. Розходження вважали статистично значущими при $p \leq 0,05$ [3].

Результати та обговорення

Введення мерказолілу щурам протягом двох місяців призводило до значного пригнічення тиреоїдної функції (стабільного стану гіпотиреозу). У тварин, які отримували тиреостатик, спостерігалось значне падіння вмісту загального та вільного T_4 і загального T_3 . Ця закономірність збері-

course by rapid incision of the spine at the base of the skull using light ether anesthesia. Blood in all groups of animals was sampled simultaneously and according to the same protocol.

There was performed a macroscopic study of the internal organs of animals. Organs of the reproductive system (testes and their appendages, ventral prostate, seminal vesicles) were isolated and weighed. Hormonal studies (determination of the content of thyroid hormones – total T_3 and T_4 , free T_4 , as well as total Tc and E_2 in the serum of experimental rats) were performed using standard commercial test kits for enzyme-linked immunosorbent assay (Granum, Ukraine) with appropriate reagents (Hema, Ukraine). We used a microplate enzyme-linked immunosorbent assay 'Stat Fax 3200' (Awareness Technology inc., USA). Organs were weighed with electronic scales 'TVE-0.6' (Technovagi, Ukraine). In the suspension of the epididymis by means of Goryaev's chamber, the indices of the morphofunctional state of sperm (number, motility, pathological forms) were evaluated according to the generally accepted method [25].

The obtained digital material was processed mathematically by methods of parametric and non-parametric statistics using the 'Excel' software (Microsoft, USA). Normal distribution was verified with the Shapiro-Wilk W -test. The groups with normal trait distribution were compared performed using Student's t test (t). The nonparametric Mann-Whitney U -test was used to compare the two groups with a distribution of features other than normal. The differences were considered significant at $p \leq 0.05$ [8], the indices of morphofunctional state of sperm (amount, motility, pathological forms) were evaluated according to the generally accepted method [25].

Results and discussion

Injection of mercazolyl to rats for two months resulted in significant suppression of thyroid function (stable hypothyroidism). In animals receiving thyrostatics, there was a notable decrease in the content of total and free T_4 and total T_3 . This pattern persisted in group 2 a month after the end of the introduction of PCE, which confirmed the adequacy of the selected model of hypothyroidism and indicated the effectiveness of long-term injection of this drug during designing the model of thyroid hypofunction (Figs. 1 and 2).

When studying the effect of PCE on the functional activity of the thyroid gland of rats, it was shown that a more dynamic response was manifested in the T_4 index. One week after the end of the PCE introduction in almost all experimental groups a significant increase in the fractions of total and free



галася в групі 2 через місяць після закінчення введення КЕП, що підтверджувало адекватність вибраної моделі гіпотиреозу і вказувало на ефективність довготривалого введення цього препарату під час створення моделі гіпофункції ЩЗ (рис. 1 та 2).

При вивченні впливу КЕП на функціональну активність ЩЗ щурів було показано, що динамічніша відповідь проявлялася у показника T_4 . Через тиждень після закінчення введення КЕП практично в усіх експериментальних групах проявлялося значне зростання фракцій загального і вільного тироксину. Найвиразнішими ці зміни були в групі 3. Ця закономірність зберігалася і через місяць після експерименту (рис. 1 та 2).

Відсутність значущих змін показника загального T_3 в усіх групах дослідження порівняно з групою 2 свідчила про те, що КЕП, який діє безпосередньо на біосинтез тироксину у тиреоїдній паренхімі, практично не впливав на периферичний метаболізм конверсії T_4 у T_3 у нирках і печінці, в яких утворюється переважна його кількість.

Паралельно з оцінкою впливу КЕП на функціональну активність ЩЗ проводилося вивчення стану репродуктивної системи самців щурів в умовах змодельованого гіпотиреозу та його подальшого коригування.

Виявлено, що у тварин, які отримували мерказоліл, відбувалося значне зниження маси вентральної передміхурової залози (ВПЗ) на 20%. Це може пояснюватися пов'язаним із гіпофункцією ЩЗ гіпоандрогенним станом самців, оскільки маса передміхурової залози безпосередньо залежить від рівня статевих гормонів. Змін інших органів репродуктивної системи самців щурів на тлі змодельованого гіпотиреозу не спостерігалось (табл. 1).

Через тиждень після введення КЕП паралельно з підвищенням рівня тиреоїдних гормонів у сироватці крові щурів із гіпотиреозом відновлювалася і маса ВПЗ, що вказувало на підвищення рівня андрогенів. У даному випадку спостерігався дозозалежний ефект: у групі 5 відмічався максимальний приріст маси ВПЗ. Можна припустити, що нормалізація андрогенного статусу у піддослідних тварин, окрім фактора відновлення тиреоїдного профілю, значною мірою також обумовлена безпосереднім впливом багатьох біологічно активних гонадотропін-подібних речовин, які містять КЕП.

Через місяць після закінчення введення КЕП у жодній групі не спостерігали значущих відмінностей у масі органів репродуктивної системи самців щурів (порівняно з групою 1).

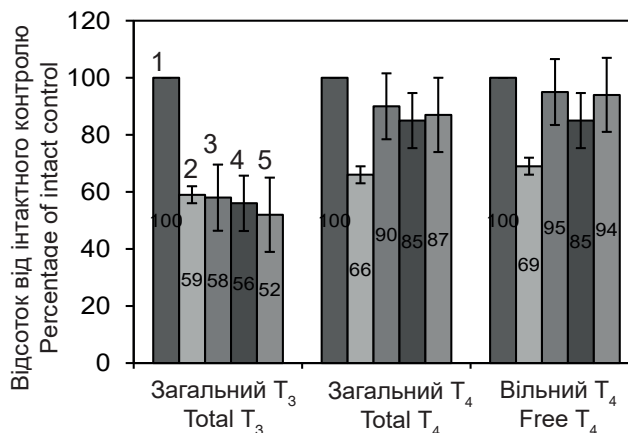


Рис. 1. Вплив різних доз КЕП на рівень тиреоїдних гормонів, 7 днів після введення (% від інтактного контролю): 1 – інтактний контроль; 2 – мерказоліловий контроль; 3 – КЕП-50; 4 – КЕП-150; 5 – КЕП-100.

Fig. 1. Effect of different PCE doses on level of thyroid hormones, 7 days after injection (% of intact control): 1 – intact control; 2 – mercazolyl control, 3 – PCE-50; 4 – PCE-150; 5 – PCE-100.

thyroxine was shown. These changes were most pronounced in group 3. This pattern persisted after a month of the experiment (Figs. 1 and 2).

The absence of strong changes in total T_3 for all the groups studied if compared with group 2 indicated that PCE, directly affecting the thyroxine biosynthesis in the thyroid parenchyma, had little effect on the peripheral metabolism of T_4 conversion to T_3 in the kidneys and liver, in which the predominant amount of the latter.

In parallel with the assessment of the influence of PCE on functional activity of thyroid gland, the state of reproductive system of male rats in the simulated hypothyroidism and its subsequent adjustment was studied.

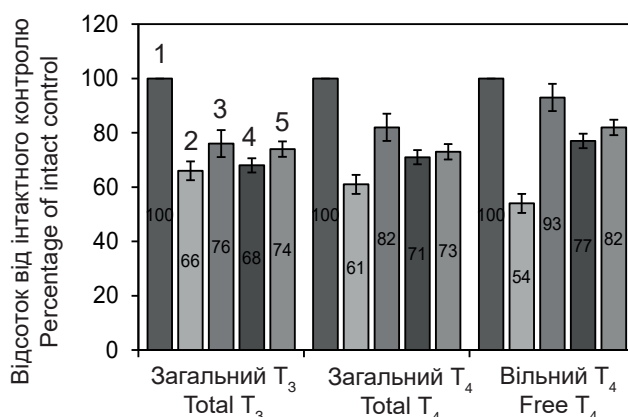


Рис. 2. Вплив різних доз КЕП на рівень тиреоїдних гормонів, місяць після введення (% від інтактного контролю): 1 – інтактний контроль; 2 – мерказоліловий контроль; 3 – КЕП-50; 4 – КЕП-150; 5 – КЕП-100.

Fig. 2. Effect of different PCE doses on level of thyroid hormones, a month after injection (% of intact control): 1 – intact control; 2 – mercazolyl control, 3 – PCE-50; 4 – PCE-150; 5 – PCE-100.

Таблиця 1. Вплив різних доз КЕП на масу органів репродуктивної системи щурів-самців із гіпотиреозом, $n = 5$
Table 1. Effect of different PCE doses on mass of organs of a reproductive system of male rats with hypothyroidism, $n = 5$

Група тварин Group of animals	Маса органа, мг Organ mass			
	Сім'яники Testes	Вентральна частина передміхурової залози Prostate ventral part	Сім'яні пухирці Seminal vesicles	Придатки яєчок Testicular appendages
Тиждень після закінчення введення КЕП One week after PCE discontinued introduction				
1	1933,3 ± 44,1	678,3 ± 14,8	1833,3 ± 88,2	616,7 ± 16,7
2	1970,0 ± 43,6	542,0 ± 22,7*	1910,0 ± 182,4	630,0 ± 25,5
3	1896,0 ± 27,7	600,3 ± 27,4 [#]	1680,0 ± 116,8	624,0 ± 11,2
4	1810,0 ± 76,5	670,0 ± 62,4 [#]	1860,0 ± 144,4	619,0 ± 11,7
5	1800,0 ± 41,8	770,0 ± 51,5 [#]	1850,3 ± 154,1	630,0 ± 25,5
Місяць після закінчення введення КЕП One month after PCE discontinued introduction				
1	2180,3 ± 115,7	800,0 ± 13,8	2110,0 ± 118,7	710,7 ± 29,1
2	2190,0 ± 100,6	770,0 ± 51,6	2070,0 ± 87,5	740,0 ± 29,2
3	2096,0 ± 177,9	764,0 ± 61,8	1990,0 ± 84,3	720,0 ± 33,9
4	2270,0 ± 152,9	746,0 ± 36,1	2106,0 ± 57,7	732,0 ± 21,8
5	2066,0 ± 193,0	754,0 ± 58,9	2000,0 ± 158,9	696,0 ± 50,7

Примітка: * – відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control, $p < 0,05$.

Гіпотиреоїдний стан щурів супроводжувався порушеннями сперматогенезу (табл. 2): у тварин відбувалося майже двократне зменшення кількості сперматозоїдів та їх рухливості, зростання патологічно змінених форм спермійів не спостерігалось. Як відомо, кількість сперматозоїдів у еякуляті відображає рівень поділу сім'яного епітелію, а рухливість – ступінь їх функціональної готовності та життєзабезпечення (гаметоматурація), тому на підставі отриманих даних можна зробити висновок, що тиреоїдна недостатність негативно впливала на різні ланки утворення та дозрівання чоловічих статевих клітин, що у подальшому може призводити до зниження фертильності. Це цілком узгоджується з літературними даними про те, що гіпотиреоз супроводжується порушенням сперматогенезу та падінням рівня тестостерону [1, 2].

It was found that in animals treated with mercazolyl, there was a significant decrease in the mass of the ventral prostate gland (VPG) by 20%. This may be due to the hypoandrogenic condition of males associated with thyroid hypofunction, as prostate mass is directly dependent on sex hormone levels. Changes in other organs of the reproductive system of male rats on the background of simulated hypothyroidism were not observed (Table 1).

One week after the introduction of PCE, in parallel with the increase in the level of thyroid hormones in the serum of rats with hypothyroidism, the mass of VPG was restored, which indicated an increase in the level of androgens. In this case, there was a dose-dependent effect: in group 5 there was a maximum increase in the mass of VPG. It can be assumed that the normalization of androgenic status in experimental animals, in addition to the



Таблиця 2. Вплив різних доз КЕП на морфофункціональні показники сперматозоїдів щурів із експериментальним гіпотиреозом (Me, min; max, n = 5)

Table 2. Effect of different PCE doses on morphofunctional parameters of sperm in rats with experimental hypothyroidism (Me, min; max, n = 5)

Група тварин Group of animals	Кількість сперматозоїдів, млн/мл Spermatozoa number, million/ml	Патологічні форми, % Pathological forms, %	Рухливість спермій, % Spermatozoa motility, %
Тиждень після закінчення введення КЕП One week after PCE discontinued introduction			
1	38,00 (36,00 ; 39,00)	24,00 (23,00 ; 25,00)	69,00 (68,00 ; 72,00)
2	20,00 (18,00 ; 21,00) *	21,00 (18,00 ; 22,00)	47,00 (34,00 ; 48,00) *
3	20,00 (20,00 ; 24,00) *	25,00 (21,00 ; 25,00)	45,00 (41,00 ; 45,00) *
4	26,00 (24,00 ; 27,00) * #	26,00 (20,00 ; 28,00)	61,00 (59,00 ; 63,00) #
5	32,00 (28,00 ; 35,00) #	26,00 (26,00 ; 27,00)	60,00 (60,00 ; 66,00) #
Місяць після закінчення введення КЕП One month after PCE discontinued introduction			
1	57,00 (54,00 ; 60,00)	20,00 (17,00 ; 23,00)	75,00 (71,00 ; 77,00)
2	39,00 (38,00 ; 41,00) *	21,00 (20,00 ; 26,00)	52,00 (48,00 ; 54,00) *
3	57,00 (55,00 ; 68,00) #	22,00 (18,00 ; 25,00)	49,00 (48,00 ; 52,00) *
4	62,00 (59,00 ; 63) #	23,00 (20,00 ; 23,00)	68,00 (66,00 ; 70,00)
5	60,00 (59,00 ; 61,00) #	20,00 (19,00 ; 22,00)	68,00 (68,00 ; 71,00)

Примітка: значуще відхилення показника відносно груп інтактного (*) та мерказолітового (#) контролю, $p < 0,05$.

Note: * – significant deviation relative to group of intact (*) and mercazole (#) control, $p < 0.05$.

Через тиждень після введення КЕП у дозі 100 та 150 мкл/кг (групи 4 і 5 відповідно) кількість статевих клітин і рухливість спермій значуще збільшувалася порівняно з групою 2 (табл. 2).

Через місяць у групі 2 значущого зростання кількості спермій та їх рухливості порівняно з групою 1 не спостерігалось. Водночас у тварин усіх дослідних груп із введенням КЕП відбувалося відновлення показників морфофункціонального стану сперматозоїдів (окрім показника рухливості спермій у групі 3) практично до значень групи 1. У групі 3 проаналізовано показники впродовж усього експерименту були найменшими, що свідчило про дозозалежний ефект.

Під час дослідження рівня статевих гормонів у самців щурів зі змодельованим гіпотиреозом та на тлі його коригування виявлено, що стійкий гіпотиреоз призводив до понад двократного зниження рівня тестостерону та значущого (на 76,9%, $p < 0,05$) підвищення концентрації естрадіолу (табл. 3). Ці дані узгоджувалися з клінічними проявами розладів репродуктивної системи у хворих на гіпотиреоз. Як було вказано вище, в стані гіпотиреозу у чоловіків спостері-

factor of the thyroid profile restoring, is largely due to the direct influence of many biologically active gonadotropin-like substances contained in PCE.

One month after the end of PCE, no significant differences in reproductive mass of male rats were found in any group compared with group 1.

Hypothyroidism in rats was accompanied by disorders of spermatogenesis (Table 2): in animals there was almost a twofold decrease in the amount of sperm and their motility, the growth of pathologically altered forms of sperm was not observed. It is known that the amount of sperm in the ejaculate reflects the level of division of the seminal epithelium, and motility does the degree of their functional readiness and life support (gamete maturation), so based on the data presented we can conclude that thyroid failure has negatively affected various stages of formation and maturation of male cells, that can further result in a reduced fertility. This is in line with the published reports that hypothyroidism is accompanied by impaired spermatogenesis and a drop in testosterone levels [2, 7].

One week after the introduction of PCE at a dose of 100 and 150 $\mu\text{l} / \text{kg}$ (groups 4 and 5, respectively),



гається гіпогонадізм, зниження лібідо, гінекомастія, підвищення рівня пролактину.

Через тиждень після введення препарату плаценти у дозах 100 та 150 мкл/кг відмічалися зростання вмісту Тс у сироватці крові. Отримані дані корелювали з відновленням маси ВПЗ у щурів груп 4 і 5. Слід зазначити, що доза 50 мкл/кг

the number of germ cells and sperm motility increased significantly compared with group 2 (Table 2).

One month later, in group 2, a significant increase in sperm counts and motility compared to group 1 was not observed. At the same time, in all experimental groups with the introduction of PCE there was a restoration of morphofunc-

Таблиця 3. Вплив різних доз КЕП на рівень статевих гормонів у сироватці крові самців щурів із гіпотиреозом (Me, min; max, n = 5)

Table 3. Effect of different PCE doses on morphofunctional parameters of sperm in rats with experimental hypothyroidism (Me, min; max, n = 5)

Група тварин Group of animals	Тиждень після закінчення введення КЕП One week after PCE discontinued introduction			Місяць після закінчення введення КЕП One month after PCE discontinued introduction		
	Тс, нмоль/л Тс nmol/l	Е ₂ , нмоль/л Е ₂ , nmol/l	Тс/Е ₂	Тс, нмоль/л Тс nmol/l	Е ₂ , нмоль/л Е ₂ , nmol/l	Тс/Е ₂
1	32,70 (29,20 ; 33,00)	0,13 (0,13 ; 0,15)	251,50 (175,30 ; 253,80)	38,50 (37,40 ; 0,20)	0,13 (0,12 ; 0,14)	267,10 (245,10 ; 268,00)
2	11,80 (11,10 ; 12,40)*	0,23 (0,20 ; 0,24)*	51,60 (48,20 ; 62,10) *	16,20 (15,70 ; 17,80)*	0,24 (0,22 ; 0,26)*	73,60 (65,40 ; 84,70)*
3	19,50 (18,80 ; 20,70)*	0,19 (0,19 ; 0,21)*	98,60 (93,10 ; 98,90) *	29,40 (27,60 ; 30,80) #	0,24 (0,23 ; 0,27)	127,80 (102,20 ; 137,90)* #
4	21,50 (20,80 ; 22,50) #	0,18 (0,18 ; 0,21)	114,70 (108,50 ; 119,40) * #	33,70 (31,80 ; 35,50) #	0,12 (0,11 ; 0,12) #	295,80 (255,00 ; 306,30) #
5	32,80 (30,20 ; 35,40) #	0,15 (0,14 ; 0,16) #	208,20 (205,00 ; 217,10) #	39,50 (37,80 ; 40,10) #	0,13 (0,12 ; 0,14) #	303,00 (300,00 ; 307,80) #

Примітка: значуще відхилення показника порівняно з групами 1 (*) та 2 (#), $p < 0,05$.

Note: * – significant deviation of the index compared with groups 1 (*) and 2 (#), $p < 0.05$.

хоч і не призводила до значущого зростання рівня андрогену у піддослідних тварин, однак сприяла відновленню маси ВПЗ, що могло вказувати на екзогенний безпосередній вплив КЕП (див. табл. 1).

Через місяць після введення усіх досліджених доз КЕП спостерігалось відновлення рівня андрогену та естрогену в усіх групах до контрольних значень інтактних тварин.

Отже, виявлено, що низький рівень тиреоїдних гормонів в організмі супроводжувався негативними змінами репродуктивної системи самців щурів. Введення КЕП в усіх дозах приводило до стимуляції тиреоїдогенезу, причому максимальною ефективною була мінімальна концентрація КЕП. На відміну від тиреоїдної функції, під час впливу КЕП на систему репродукції спостерігався дозозалежний ефект: був відмічений максимальний приріст маси ВПЗ та індексу співвідношення Тс/Е₂ у групі 5.

Згідно з отриманими даними можна припустити, що КЕП позитивно впливає на спермато-

tional status of sperm (exception was sperm motility in group 3) almost to the values of group 1. In group 3, the indices analyzed throughout the experiment were the lowest, indicating a dose-dependent effect.

During the study of sex hormone levels in male rats with simulated hypothyroidism and on the background of its correction, it was found that persistent hypothyroidism led to more than a twofold decrease in testosterone levels and a significant (76.9%, $p < 0.05$) increase in estradiol concentration. These data were consistent with the clinical manifestations of reproductive system disorders in the patients with hypothyroidism.

As mentioned above, in male hypothyroidism hypogonadism, decreased libido, gynecomastia, increased prolactin levels were found.

One week after injection of the drug to the placenta at doses of 100 and 150 $\mu\text{l/kg}$, there was an increase in the content of Ts in serum. The data obtained correlated with the restoration of the mass of VPG in rats of the groups 4 and 5. It should



генез та баланс статевих гормонів самців щурів із низьким рівнем тиреоїдних гормонів не тільки за рахунок відновлення тиреоїдного профілю, а й завдяки широкому спектру біологічно активних сполук.

Висновки

1. Використані дози КЕП у діапазоні 50–150 мкл/кг проявляли стимулювальну дію на функціональну активність ЩЗ щурів із мерказоліл-індукованим гіпотиреозом: впливали переважно на механізми утворення тироксину і практично не позначалися на метаболізмі трийодтироніну. Більш ефективною виявилася найменша з досліджених доз – 50 мкл/кг.

2. У самців щурів гіпотиреоз призводив до гіпоандрогенного стану: спостерігалось значуще зниження вмісту тестостерону в сироватці крові з одночасним підвищенням рівня естрадіолу.

3. Показано, що КЕП як безпосередньо, так і опосередковано (за рахунок зростання рівня тиреоїдних гормонів) позитивно впливав на функціональний стан репродуктивної системи самців щурів.

4. Виявлено дозозалежний ефект КЕП на репродуктивну систему щурів із гіпотиреозом: найбільш ефективною була доза 150 мкл/кг, яка максимально сприяла відновленню морфофункціональних показників сперматозоїдів і привела до зростання рівня тестостерону у сироватці крові та нормалізації співвідношення тестостерон/естрадіол.

5. Кріоконсервованний екстракт плаценти може розглядатися як потенційний препарат для коригування ряду ендокринопатій, зокрема гіпофункції щитоподібної залози та індукованих гіпотиреозом репродуктивних розладів.

Література

1. Бондаренко ВО. Эндокринные аспекты мужского бесплодия В: Українська школа ендокринології: матеріали 61-ї науково-практичної конференції; 2017 червня 1–2; Харків. Харків: 2017. с. 25–8.
2. Гаврилюк АМ, Чоляк ВВ, Наконечный АИ, Курпиш М. Мужской фактор в патогенезе женского бесплодия. Медицинские аспекты здоровья мужчины. 2012; 3(1): 42–8.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика; 1998. 459 с.
4. Гольцев АН, Юрченко ТН. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение. Харьков: Бровин АВ; 2013. 318 с.

be noted that the dose of 50 $\mu\text{l}/\text{kg}$, although did not lead to a significant increase in androgen levels in experimental animals, but contributed to the restoration of the mass of VPG, which could indicate exogenous direct effects of PCE (see Table 1).

One month after the introduction of all studied doses of PCE, there was a restoration of androgen and estrogen levels in all groups to the control values of intact animals.

Thus, it was found that low levels of thyroid hormones in the body were accompanied by negative changes in the reproductive system of male rats. The introduction of PCE in all doses led to the stimulation of thyroidogenesis, and the most effective was the minimum concentration of CPE. In contrast to thyroid function, during the effect of PCE on the reproductive system, a dose-dependent effect was observed: the maximum increase in the mass of VPG and the Ts/E_2 ratio in group 5 was observed.

Our findings suppose that PCE positively affects the spermatogenesis and balance of sex hormones in male rats with low levels of thyroid hormones not only by restoring the thyroid profile, but also due to a wide range of biologically active compounds.

Conclusions

1. Used doses of PCE in the range of 50–150 $\mu\text{l}/\text{kg}$ had a stimulating effect on functional activity of the thyroid gland of rats with mercaptozyl-induced hypothyroidism: they affected mainly the mechanisms of thyroxine formation and slightly affected triiodothyronine metabolism. The lowest of the studied dose, *i. e.* 50 $\mu\text{l}/\text{kg}$ was the most effective.

2. In male rats, hypothyroidism led to a hypoandrogenic state: there was a significant decrease in testosterone in the serum with a simultaneous increase of estradiol levels.

3. It is shown that PCE both directly and indirectly (due to the increase in the level of thyroid hormones) had a positive effect on functional state of the reproductive system of male rats.

4. The dose-dependent effect of PCE on reproductive system of rats with hypothyroidism was revealed: the most effective dose was 150 $\mu\text{l}/\text{kg}$, which maximally restored the morphofunctional parameters of sperm and led to an increase in serum testosterone levels and normalization of testosterone / estradiol ratio.

5. Cryopreserved placental extract can be considered as a potential drug to correct a number of endocrinopathies, including hypothyroidism and hypothyroidism-induced reproductive disorders.



5. Горпинченко ИИ, Нуриманов КР, Порошина ТВ. Проблемы идиопатического мужского бесплодия. *Здоровье мужчины*. 2016; (4): 133–6.
6. Грищенко ВИ, Геродес АГ, Алипова ЕК. Трансплантация криоконсервированной плацентарной ткани при нарушениях сперматогенеза у мужчин. *Проблемы криобиологии*. 2001; (3): 91–2.
7. Грищенко ВИ, Гольцев АН. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения. *Проблемы криобиологии*. 2002; (1): 54–64.
8. Грищенко ВИ, Лазуренко ВВ, Прокопюк ОС. Использование криоконсервированной плацентарной ткани в лечении невынашивания беременности. *Проблемы криобиологии*. 2003; (1): 76–80.
9. Есина ММ. Система репродукции при гипотиреозе. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева*. 2017; 4 (2): 77–83.
10. Калинин СЮ, Тюзиков ИА. *Практическая андрология*. Москва: Практическая медицина; 2009. 399 с.
11. Луценко НС, Грицай АВ, Карпенко ВГ. Применение гетеротопической трансплантации криоконсервированной ткани плаценты в комплексном лечении женщин с дисфункцией нервной системы на фоне гипозострогении. *Проблемы криобиологии*. 2004; (3): 86–92.
12. Нікітін ОД. Чоловічий фактор безплідного шлюбу в Україні (епідеміологічні особливості). *Здоровье мужчины*. 2013; (3): 12–5.
13. Приступлюк ОМ. Гіпотиреоз: ушкодження органів та систем. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2011; 4 (36): 86–91.
14. Резніков ОГ. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. *Ендокринологія*. 2003; 8 (1): 142–5.
15. Стефанов ОВ. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 528 с.
16. Сукач АН, Семенченко АЮ, Петренко АЮ. Изучение биохимического состава криоконсервированных препаратов эмбриональных тканей человека. *Проблемы криобиологии*. 2001; (3): 61–2.
17. Шелковникова ТВ, Догадин СА. Современные представления о взаимосвязи гормонов щитовидной железы и гонад у мужчин. *Сибирское медицинское обозрение*. 2013; (1): 9–14.
18. Юрченко ТН, Прокопюк ОС, Ломако ВВ. Клеточная и тканевая трансплантация. Биопрепараты. Харьков: ИПКИК НАН Украины, МНЦ криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МЗ Украины; 2003. 67 с.
19. Bertone C, Sgro LC. Clinical data on topical application in gynaecology of polydeoxiribonucleotide of human placenta. *Tissue React*. 1982; (4): 165–7.
20. Carani C, Isidori A, Granata A. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; (90): 6472–9.
21. Chakraborty PD, Bandyopadhyay S, Bhattacharyya D. Human aqueous placental extract as a wound healer. *Journal Wound Care*. 2009; (18): 462–7.
22. Donnelly P, White C. Testicular dysfunction in men with primary hypothyroidism; reversal of hypogonadotrophic hypogonadism with replacement thyroxine. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 52(2): 197–201.
23. Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res*. 2005; (322): 133–40.
24. Honbo KS, Van Herle AJ, Kellett KA. Serum prolactin levels in untreated primary hypothyroidism. *Am J Med*. 1978 May; 64(5):782–7.
25. Kim JK, Kim TH, Park SW. Protective effects of human placenta extract on cartilage degradation in experimental osteoarthritis. *Biol Pharm Bull*. 2010; (33): 1004–10.

References

1. Bertone C, Sgro LC. Clinical data on topical application in gynaecology of polydeoxiribonucleotide of human placenta. *Int J Tissue React*. 1982 ; 4(2): 165–7.
2. Bondarenko VO. [Endocrine aspects of male infertility]. In: *Ukrainian school of endocrinology: materials of 61st materials of sciences-practice. conference*; 2017 Jun. 1-2; Kharkiv. Kharkiv; 2017. p. 25–8. Russian.
3. Carani C, Isidori AM, Granata A, et al. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec; 90 (12):6472–9.
4. Chakraborty PD, Bandyopadhyay S, Bhattacharyya D. Human aqueous placental extract as a wound healer. *Journal Wound Care*. 2009; (18): 462–7.
5. Donnelly P, White C. Testicular dysfunction in men with primary hypothyroidism; reversal of hypogonadotrophic hypogonadism with replacement thyroxine. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 52 (2):197–201.
6. Esina MM. [Reproduction system for hypothyroidism]. *Arhiv akusherstva i ginekologii im. V.F. Snegireva*. 2017; 4 (2): 77–83. Russian.
7. Gavryljuk AM, Chopjak VV, Nakonechnyyj AY, Kurpysh M. [The male factor in the pathogenesis of female infertility]. *Medytskie aspekty zdorov'ja muzhchiny*. 2012; 3(1): 42–8. Russian.
8. Glants C. [Biomedical statistics]. *Moskva: Praktika*; 1998. 459 p. Russian.
9. Goltsev AN, Yurchenko TN. *Placenta: cryopreservation, clinical application*. Kharkiv; 2013. 317 p.
10. Gorpichenko YY, Nurimanov KR, Poroshina TV. [Problems of idiopathic male infertility]. *Zdorov'e muzhchiny*. 2016; (4): 133–6. Russian.
11. Grischenko VI, Gerodes AG, Alipova EK. et al. Transplantation of cryopreserved placental tissue at the disorders of spermatogenesis in males. *Problems of Cryobiology*. 2001; (3): 91–2.
12. Grischenko VI, Goltsev AN. Transplantation of products of embryofetoplacental complex. From understanding of effect mechanism to arise in application efficiency. *Problems of Cryobiology*. 2002; (1): 54–84.
13. Grischenko VI, Lazurenko VV, Prokopyuk OS, Aralov ON. Usage of cryopreserved placental tissue when treating pregnancy failure. *Problems of Cryobiology*. 2003; (1): 76–80.
14. Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res*. 2005; (322): 133–40.
15. Honbo KS, van Herle AJ, Kellett KA. Serum prolactin levels in untreated primary hypothyroidism. *Am J Med*. 1978; 64(5): 782–7.
16. Yurchenko TN, Prokopyuk OS, Lomako VV. [Cell and tissue transplantation. Biological products]. Kharkiv IPCC NASU, ISC Cryobiology and Cryomedicine of the NAS, AMS and the Ministry of Health of Ukraine; 2003. 67 p. Russian.
17. Kalynchenko SJu, Tjuzykov YA. [Practical andrology]. *Moscow: Prakticheskaja medicina*. 2009. 399 p. Russian.
18. Kim JK, Kim TH, Park SW. Protective effects of human placenta extract on cartilage degradation in experimental osteoarthritis. *Biol. Pharm. Bull*. 2010; (33): 1004–10.
19. Lutsenko NS, Hrytsai AV, Karpenko VG. Application of heterotopic transplantation of cryopreserved placenta tissue in combined treatment of women with nervous system dysfunction at hypoestrogeny background *Problems of Cryobiology*. 2004; (3): 86–92.
20. Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, et al. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *ISA, ISSAM, and EAU recommendations*. *Eur Urol*. 2005; 48(1):1–4.
21. Nikitin OD. [Male factor of infertile marriage in Ukraine (epidemiological features)]. *Zdorov'e muzhchiny*. 2013; (3): 12–5. Ukrainian.



26. Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, et al. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *Eur Urol.* 2005; 48(1):1–4.
27. Yeom MJ, Lee HC, Kim GH. Therapeutic effects of Hominis placenta injection into an acupuncture point on the inflammatory responses in subchondral bone region of adjuvant-induced polyarthritic rat. *Biol Pharma Bull.* 2003; (26): 1472–7.
22. Prystupniuk OM. [Hypothyroidism: damage to organs and systems]. *Mizhnarodnyi endokrynolohicnyi zhurnal.* 2011; 36 (4): 104–9.
23. Reznikov OG. [General ethical principles of experiments on animals]. *Endokrynolohiia.* 2003; 8 (1): 142–5.
24. Shelkovnikova TV, Dogadin SA. [Modern ideas about the relationship of thyroid hormones and gonads in men]. *Sibirskoe medicinskoe obozrenie.* 2013; (1): 9–14. Russian.
25. Stefanov OV. [Pre-clinical research of drugs: methodical recommendations]. Kyiv: Avitsena; 2001. 528 p. Ukrainian.
26. Sukach AN, Petrenko AY, Plachinta M.S. Cryopreservation of rat embryonic neuronal cells using DMSO. *Problems of Cryobiology;* 2001; (3): 61–2.
27. Yeom MJ, Lee HC, Kim GH. Therapeutic effects of Hominis placenta injection into an acupuncture point on the inflammatory responses in subchondral bone region of adjuvant-induced polyarthritic rat. *Biol Pharma Bull.* 2003; (26): 1472–7.