

## МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЗВИВИСТИХ СІМ'ЯНИХ КАНАЛЬЦІВ СІМ'ЯНИКІВ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ВПЛИВУ БІГУАНІДУ ТА КЛОСТИЛБЕГІТУ

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця  
(м. Київ, Україна)

**Анотація.** Метою роботи було дослідити морфо-функціональний стан звивистих сім'яних каналців сім'яників щурів за умов 6-тижневого впливу метформіну, кломіфену та їх комбінації. Експеримент проведено на 20 статевозрілих щурах, рандомізованих на чотири групи: інтактну (I), групу метформіну (MET), групу кломіфену (КЛО) та комбіновану групу (MET+КЛО). Препарати вводили перорально у вигляді розчинів протягом 6 тижнів. Після завершення експерименту сім'яники вилучали для гістологічного та морфометричного аналізу. На гістологічних зрізах, забарвлених гематоксилін-еозином, визначали площу та периметр звивистих сім'яних каналців, а також кількість мітотично активних клітин. Після проведення морфометричного аналізу, результати дослідження свідчать про різноспрямований ефект метформіну та кломіфену на структуру й функціональний стан звивистих сім'яних каналців, а також про відсутність підсилювального ефекту при їх одночасному застосуванні. Отримані дані можуть бути важливими для подальшого вивчення фармакологічних взаємодій препаратів, що впливають на чоловічу репродуктивну систему.

**Ключові слова:** чоловіча статеві система, сім'яники, звивисті сім'яні каналці, метформін, кломіфен.

**Abstract.** The aim of the work was to investigate the morpho-functional state of the convoluted seminiferous tubules of rat testes under conditions of 6-week exposure to metformin, clomiphene and their combination. The experiment was conducted on 20 sexually mature rats, randomized into four groups: intact (I), metformin group (MET), clomiphene group (CLO) and combined group (MET+CLO). The drugs were administered orally in the form of solutions for 6 weeks. After the experiment, the testes were removed for histological and morphometric analysis. The area and perimeter of the convoluted seminiferous tubules, as well as the number of mitotically active cells, were determined on histological sections stained with hematoxylin-eosin. After conducting morphometric analysis, the results of the study indicate a multidirectional effect of metformin and clomiphene on the structure and functional state of the convoluted seminiferous tubules, as well as the absence of an enhancing effect when they are used simultaneously. The obtained data may be important for further study of pharmacological interactions of drugs that affect the male reproductive system.

**Key words:** male reproductive system, testes, convoluted seminiferous tubules, metformin, clomiphene.

### Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом НДР «Вивчити тканинні реакції різних відділів нервової системи та внутрішніх органів на ураження різного ґенезу, та їх модуляцію. Педагогічні аспекти викладання гістології» (номер державної реєстрації 0120U102691).

#### Вступ.

Морфо-функціональний стан звивистих сім'яних каналців сім'яників є критичною складовою фертильності самців, оскільки саме тут відбуваються проліферація, диференціація та дозрівання сперматогенних клітин. Порушення в структурі або функції цих каналців може призвести до зниження сперматогенезу та якості сперми, що створює загрозу репродуктивній здатності. У зв'язку з цим вивчення впливу фармакологічних агентів, здатних модулювати метаболічні та гормональні параметри організму, є важливим для розуміння механізмів регуляції сперматогенезу [1].

В останні десятиліття спостерігається зростання поширеності метаболічних захворювань. Нездоровий спосіб життя, недостатня фізична активність, зростання стресових факторів, незбалансоване харчування, зловживання алкоголем – приводить до розвитку до однієї з важливих проблем охорони здоров'я – метаболічного синдрому. Достатньо вагомих відсоток чоловічого безпліддя на сьогоднішній

день пов'язано з метаболічним синдромом, надмірною вагою тіла та цукровим діабетом 2го типу [2]. Метаболічний синдром відноситься до потенційних факторів, що впливають на чоловічу репродуктивну систему, зокрема сприяє зниженню якості сперми, як наслідок призводить до чоловічого безпліддя [3]. Метаболічні порушення системно впливають на чоловічу репродуктивну систему, що проявляються дисрегуляцією глюкозного метаболізму, оксидативним стресом, хронічним запаленням та гормональними змінами, які можуть порушувати функцію клітин Сертолі та Лейдига, а також порушувати бар'єрну цілісність сім'яників [4, 5]. Саме тому моделювання таких станів на тваринних моделях та вивчення фармакологічної корекції є надзвичайно важливими.

Препарати групи бігуанідів (метформін) впливають на інсулінові рецептори м'язів, які є основним місцем метаболізму глюкози, таким чином покращують її утилізацію та прибирають гіперінсулінемію [1], гальмують транспорт електронів дихального ланцюга мітохондрій, і як наслідок – зниження концентрації внутрішньоклітинної АТФ па посилення гліколізу [6]. В результаті активується надходження глюкози із позаклітинного простору в клітини, збільшується виділення пірувату і лактату у тканинах ряду внутрішніх органів [7].

Гормональна регуляція сім'яників має важливе значення для їх правильного функціонування та під-

тримки чоловічого репродуктивного здоров'я [8]. Вісь гіпоталамус-гіпофіз-гонади (ГПГ) відіграє ключову роль у регуляції вироблення тестостерону та сперматогенезу [9]. Застосування клостилбегіту (кломіфену) пояснюється здатністю специфічно зв'язуватися з рецепторами естрогенів у гіпоталамусі. У малих дозах препарат посилює секрецію гонадотропних гормонів (пролактину, фолікулоstimулюючого та лютеїнізуючого). У великих дозах препарат гальмує секрецію гонадотропінів [10, 11].

Вивчення впливу метформіну та кломіфену на чоловічу статеву систему, зокрема на морфо-функціональний стан звивистих сім'яних каналців потребує додаткових досліджень та може надати нове розуміння взаємодії метаболічних і гормональних механізмів у регуляції сперматогенезу.

### **Мета дослідження.**

Дослідити морфо-функціональний стан звивистих сім'яних каналців сім'яників у щурів за умов впливу бігуаніду та клостилбегіту.

### **Об'єкт і методи дослідження.**

Дослідження здійснили на самцях щурів лінії Wistar масою 180-220 г на початку експерименту. Тварин утримували на збалансованому раціоні виварію НМУ імені О. О. Богомольця при стандартному світловому режимі (12 годин – день, 12 годин – ніч). Дослідження проводили відповідно до Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1985), Експериментальні тварини були поділені рандомно на 4 групи по 5 щурів. Перша група (I) – інтактні тварини, друга – (MET), тварини отримували метформін, третя – (КЛО), тварини отримували кломіфен та четверта – (MET+КЛО), тварини отримували комбінацію препаратів метформіну та кломіфену. Експериментальні тварини на протязі 6 тижнів перерально отримували розчини кломіфену цитрату, метформіну гідрохлориду та їх комбінацію. Для перорального введення лікарського засобу тваринам у дозуванні 20 мг/кг маси тіла готували розчин для годування, що містив 8,5 мл молочних вершків 10% та 0,5 мл робочого розчину метформіну гідрохлориду (МЕТАФОРА® (METAFORA®), 500мг, виробник Київський вітамінний завод ПАТ (Україна, Київ)). Для перорального введення лікарського засобу тваринам у дозуванні 1,5 мг/кг маси тіла готували розчин для годування, що містив 8,5 мл молочних вершків 10% та 0,5 мл робочого розчину кломіфену цитрату (Clostilbegyt®, 50 мг, Egis Pharmaceutical Ltd, Hungary). Для введення комбінації лікарських засобів готували вихідні робочі розчини препаратів. З метою отримання розчину для годування брали 8 мл молочних вершків 10%, 0,5 мл робочого розчину метформіну гідрохлориду та 0,5 мл робочого розчину кломіфену цитрату. Тваринам перорально вводили по 0,5 мл кожного розчину для годування. Розчин для годування готували у розрахунку на 5 тварин. Залишки викидали.

Сім'яники для досліджень забиралися через 6 тижнів від початку експерименту, після введення тваринам надмірної дози тіопенталу натрію (200 мг/кг). Матеріал після вилучення, фіксували у 10% забуференому формалін рН 7,4 охолоджений до 4°C. Фіксація тривала 48 години при t 4°C. Після стандартних гістологічних маніпуляцій фіксації, зневоднення,

ущільнення та виготовлення гістологічних блоків, виготовлялися гістологічні зрізи товщиною 4 мкм, які забарвлювалися гематоксилін-еозинном.

Отримані препарати вивчали й фотографували за допомогою мікроскопу Olympus BX53 з цифровою камерою Olympus C3040ZOOM і програмним забезпеченням Olympus DP-Soft 3.2. На цифрових зображеннях (x1000; 240x180 мкм; 1224x920 пікселів RGB) сім'яників При морфометричному дослідженні на гістологічних зрізах, забарвлених гематоксилін-еозинном, вимірювали площу, периметр звивистих каналців та кількість клітин з мітотичним поділом за допомогою програми ImageJ (США).

Отримані числові дані обробляли стандартними статистичними методами з розрахунком середнього арифметичного, стандартного відхилення та стандартної помилки середнього. Точний критерій Колмогорова-Смирнова показав, що всі дані експериментальних вимірювань не протирічають нормальному розподілу. Для оцінки значущості міжгрупових відмінностей використовували t-критерій Стюдента; при P<0,05 останні вважалися статистично значущими.

### **Результати дослідження та їх обговорення.**

Проведені дослідження показали, що у контрольній групі (інтактні тварини) звивисті сім'яні каналці мали звичайну будову, чіткі контури та щільно прилягали один до одного. Базальна мембрана добре візуалізувалася, не мала ознак розшарування, на якій розташовувався сперматогенний епітелій. Підтримуючі клітини Сертолі розташовувалися між сперматогенними клітинами. Площа та периметр каналців були стабільними та перебували у фізіологічних межах. У більшості каналців виявлялася значна кількість клітин з мітотичними фігурами, що відображало нормальну активність сперматогенного процесу.

У групи тварин, які протягом 6 тижнів отримували метформін, виявлено помірні, але типові зміни структури сім'яних каналців. Відмічалось зменшення площі та периметру звивистих сім'яних каналців яєчка та при цьому спостерігалось збільшення сперматогенних клітин з мітотичним поділом у порівнянні з інтактними тваринами та зниження кількості мітотично активних клітин тваринами які отримували кломіфен. Отримані дані відображають відомий метаболічний вплив метформіну, зокрема можливе пригнічення синтезу тестостерону та зниження енергетичної активності клітин. Отримані дані відображають відомий метаболічний вплив метформіну, зокрема можливе пригнічення синтезу тестостерону та зниження енергетичної активності клітин. Подібні зміни можуть вказувати на часткове уповільнення сперматогенезу без вираженої дегенерації тканини.

Показники периметру і площі звивистих сім'яних каналців у групи щурів, які отримували кломіфен були достовірно більшими ніж у тварин, які отримували метформін та недостовірними – у порівнянні з інтактними показниками (рис. 1 та рис. 2). Кількість клітин з мітотичними фігурами суттєво вища, що свідчить про посилену проліферацію сперматогенного епітелію, який характеризувався високою щільністю клітинних елементів, наявністю всіх стадій сперматогенезу та збільшеною кількістю зрілих форм у просвіті каналців. Це цілком узгоджується з механізмом

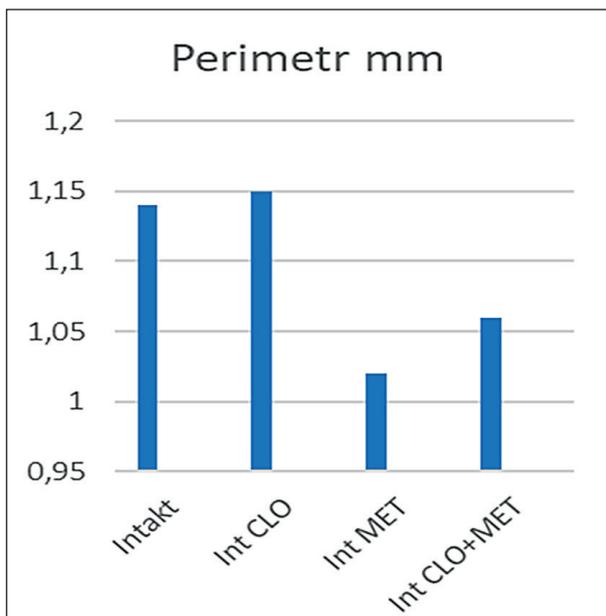


Рисунок 1 – Периметр звивистого сім'яного каналця.

дії кломіфену як селективного модулятора естрогенових рецепторів, який підвищує секрецію ФСГ і ЛГ, стимулюючи відповідно активність клітин Сертолі та Лейдіга.

У групи тварин при комбінованому застосуванні метформіну і кломіфену спостерігалось вирівнювання всіх досліджуваних показників. Площа та периметр звивистих сім'яних каналців часто не досягали показників групи КЛО, інколи наближаючись до контрольних значень або до показників групи MET (рис. 1, рис. 2). Кількість клітин з мітотичними фігурами була зниженою порівняно з показниками групи КЛО, хоча вища ніж у групі метформіну та контрольній групі. Також спостерігалася нерівномірна стратифікація сперматогенного епітелію, помірна десквамація або зменшення кількості зрілих статевих клітин у просвіті частини звивистих сім'яних каналців. Такі результати свідчать про можливу антагоністичну взаємодію між препаратами. Попри те що кломіфен стимулює гонадотропну вісь, вплив метформіну може частково обмежувати енергетичний потенціал клітин і гормональну відповідь, що знижує силу стимулюючого ефекту. Відсутність синергії й наявність змішаних морфологічних реакцій вказують на складний механізм взаємодії бігуаніду з кломіфеном.

Таким чином, отримані результати вказують на те, що при супутньому застосуванні бігуанідів із препаратами, які впливають на гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь, можливе ослаблення очікуваного стимулюючого ефекту на сперматогенез. Це має важливе значення для подальшого вивчення фарма-

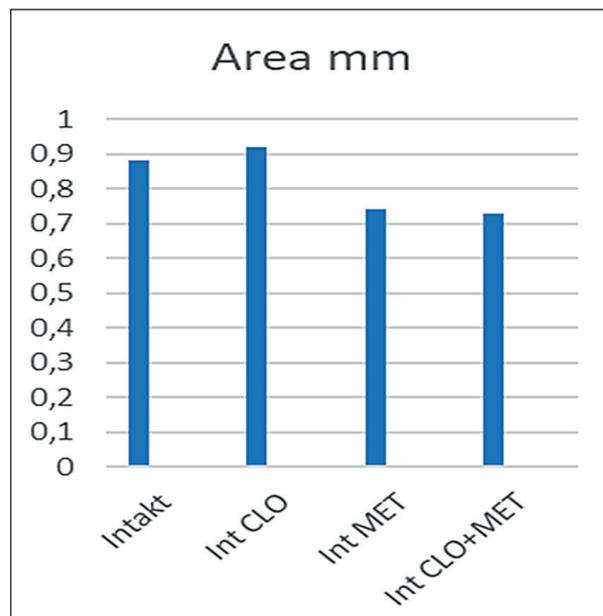


Рисунок 2 – Площа звивистого сім'яного каналця.

кологічних взаємодій та оптимізації схем корекції порушень репродуктивної функції.

#### Висновки.

Застосування бігуанідів (Метформіну) викликає зменшення морфометричних показників звивистих сім'яних каналців, що відповідає пригніченню сперматогенезу

Застосування клостілбегіту (Кломіфену гідрохлорид) значно покращує морфо-функціональний стан каналців, збільшує їх площу, периметр і клітинну активність. В результаті складних біохімічних реакцій покращується вироблення лютеїнізуючого та фолікулостимулюючого гормону, що, у свою чергу, активізує вироблення тестостерону в організмі.

Комбінація метформіну та кломіфену має антагоністичний характер, що призводить до зниження ефективності кломіфену.

Морфометричні показники чітко відображають різноспрямованість фармакологічних ефектів та підтверджують доцільність обережного використання комбінацій препаратів, що впливають на гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь.

#### Перспективи подальших досліджень.

Подальше дослідження можуть бути важливими для подальшого вивчення фармакологічних взаємодій препаратів, що впливають на чоловічу репродуктивну систему, а саме на з'ясування молекулярних механізмів впливу метформіну та клостілбегіту на клітини Сертолі й Лейдіга, а також на оцінку їх комбінованої дії та довготривалих наслідків для сперматогенезу і фертильності.

### Література

- Rindone GM, Dasso ME, Centola CL, Sobarzo CM, Galardo MN, Meroni SB, et al. Effect of metformin on Sertoli cell fatty acid metabolism and blood –testis barrier formation. *Biology*. 2024;13(5):330. DOI: [10.3390/biology13050330](https://doi.org/10.3390/biology13050330).
- Shaiakhmetova HM, Tkachenko OYe, Kovalenko VM. Porushennia cholovichoї reproduktyvnoї funktsii za metaboličnogo syndromu ta pidkrody do farmakolohichnoi korektsii. *Farmakolohiia ta likarska toksykolohiia*. 2023;17(1):12-33. [in Ukrainian].
- Mulya IC, Hasan MA, Iqhrammullah M. Impact of metabolic syndrome factors on sperm DNA fragmentation in males from infertile couples: A systematic review and meta-analysis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2024;53(8):102807. DOI: [10.1016/j.jogh.2024.102807](https://doi.org/10.1016/j.jogh.2024.102807).
- Kozopas NM, Maksymiuk HV, Lapovets LYe, Odnorih LO. Metaboličnyi syndrom ta choloviche bezpliddia: suchasnyi pohliad na problemu. *Visnyk problem biolohii i medytsyny*. 2018;2(144):26-30. [in Ukrainian].
- Herrero-Aguayo V, Jiménez-Vacas JM, Sáez-Martínez P, Gómez-Gómez E, López-Cánovas JL, Garrido-Sánchez L, et al. Influence of obesity in the miRNome: miR-4454, a key regulator of insulin response via splicing modulation in prostate. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(2):e469-e484. DOI: [10.1210/clinem/dgaa580](https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa580).

6. Liu D, Han X, Zou W, Yang Z, Peng J, Li Y, et al. Probiotics combined with metformin improves sperm parameters in obese male mice through modulation of intestinal microbiota equilibrium. *Reprod Sci.* 2025;32(1):116-130. DOI: [10.1007/s43032-024-01748-9](https://doi.org/10.1007/s43032-024-01748-9).
7. Modarres SZ, Daneshjou D, Mehranjani MS, Ali Shariatzadeh SM. Comparative evaluation of metformin & sitaformin in classic PCOS patients undergoing intracytoplasmic sperm injection: A randomized controlled pilot study. *Indian J Med Res.* 2023;157(1):66-73. DOI: [10.4103/ijmr.IJMR\\_2139\\_20](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2139_20).
8. Sizar O, Leslie SW, Schwartz J. *Male hypogonadism.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
9. Sharma A, Jayasena CN, Dhillo WS. Regulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis: pathophysiology of hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2022;51(1):29-45. DOI: [10.1016/j.ecl.2021.11.010](https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.11.010).
10. Huijben M, Lock MTWT, de Kemp VF, Beck JJH, de Kort LMO, van Breda HMK. Clomiphene citrate: a potential alternative for testosterone therapy in hypogonadal males. *Endocrinol Diabetes Metab.* 2023;6(3):416. DOI: [10.1002/edm2.416](https://doi.org/10.1002/edm2.416).
11. Huijben MM, Tycho Lock MTWT, Vincent de Kemp VF, Laetitia de Kort LMO, van Breda HMK. Clomiphene citrate a first step to improve idiopathic male infertility: a retrospective analysis. *Andrologia.* 2023;2023:8743882. DOI: [10.1155/2023/8743882](https://doi.org/10.1155/2023/8743882).