

УДК 576.32136:5021504(045)

ЗМІНИ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ТА ПРОДУКТИВНОСТІ ГОНАД ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Єщенко Ю. В., Бовт В. Д., Романова М. Д.

*Запорізький національний університет
69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66*

vd.bovt@gmail.com

Дослідження присвячене впливу важких металів на морфофункціональний стан сім'яників щурів, вміст хелатоутворюючих Zn, Mg, Cu у сперматозоїдах і вплив їх на фертильність самців щурів. У дослідженнях використовувалися гістологічні, морфометричні та статистичні методи.

Отримані дані вказують на те, що в процесі сперматогенезу найбільш вразливою ланкою є стадія утворення сперматид. Вплив важких металів відображається зниженням індексу гаметогенезу та індексу релаксації (напруги сперматогенезу), що свідчить про зниження функціональної активності гонад та зниження фертильності. При дослідженні еякуляту було встановлено, що в щурів, які піддавалися впливу важких металів, була знижена кількість сперматозоїдів у еякуляті, а також їхня життєздатність. При порівняльному дослідженні вмісту хелатоутворюючих Zn, Mg, Cu у сперматозоїдах, які піддавались впливу важких металів, вміст цинку і магнію був значно знижений, а вміст купруму підвищений.

Ключові слова: фертильність, сперматозоїди, важкі метали, хелатоутворюючі Zn, Mg, Cu.

Ещенко Ю. В., Бовт В. Д., Романова М. Д. ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ И ПРОДУКТИВНОСТИ ГОНАД КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ / Запорожский национальный университет, 69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66 Исследование посвящено влиянию тяжелых металлов на морфофункциональное состояние семенников крыс, содержание хелатообразующих Zn, Mg, Cu в сперматозоидах, а также на фертильность крыс самцов. Используются гистологические, морфометрические и статистические методы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе сперматогенеза наиболее уязвимым звеном является стадия образования сперматид. Влияние тяжелых металлов приводит к снижению индекса сперматогенеза и индекса релаксации (напряжения сперматогенеза), что свидетельствует о снижении функциональной активности гонад и снижении фертильности. При исследовании эякулята крыс подвергавшихся влиянию тяжелых металлов было снижено количество сперматозоидов, а также их жизнеспособность. При сравнении содержания хелатообразующих металлов у крыс, подвергавшихся влиянию тяжелых металлов, и у контрольной группы, было установлено, что содержание цинка и магния снижено, а содержание меди повышено.

Ключевые слова: фертильность, сперматозоиды, тяжелые металлы, хелатообразующие Zn, Mg, Cu.

Eschenko Ju. V., Bovt V. D., Romanova M. D. MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF STAGE AND PRODUCTIVITY OF THE SEMINAL GLANDS MALE RATS UNDER THE INFLUENCE OF HEAVY METALS / Zaporizhzhya National University, 69600, Ukraine, Zaporizhzhya, Zhukovsky str., 66

Helatable elements, such as Zn, Mg, and Cu are important for reproduction health. This metals has intensively studied, there deficiency leads to gonadal dysfunction, decreases testicular weight and causes shrinkage of seminiferous tubules.

Zn, Mg, and Cu are necessary for reproduction, because the gonads are the most rapidly growing tissues in body and vital enzymes involved in nuclear acid and protein synthesis are metal enzymes.

These three cations (Zn, Mg, and Cu) stimulate or inhibit progressive motility of spermatozoids, depending of the concentration of each. If concentrations of metals are high, these elements individually or jointly impair fertility among the patricians with normal sperm density.

We studied the effects of heavy metals on seminal male rat's glands during the period of postnatal ontogenesis, and contents of helatable metals (Zn, Mg, and Cu) in spermatozoids. It was investigated with the help histological, morphometric and statistical research methods.

The data indicate that, in the process of gametogenesis is the most vulnerable link in the formation stage spermatids. There was a decrease index of spermatogenesis and the index of relaxation that testifies about decrease of functional activity of the testicular. Revealed a decrease in the concentration of spermatozoids in the ejaculate, and their viability.

There are conclusion: heavy metals negatively affect the morphofunctional state of gonads in male rats, causing deformation of the parenchyma and the stroma of the testicles, and leads to disruption of spermatogenesis; the influence of heavy metals on the body of rats causes the change of spermatozoa in the form of changes in the form of the head and its reduction, the total reduction in the neck and the increase in tail part of the sperm, which significantly impairs the function of fertility; the index of spermatogenesis and the index of relaxation under the influence of heavy metals are reduced, which causes a decrease in the functional activity of the testicles of rats; the productivity of the spermatogenic glands is reduced by the action of heavy metals, which manifests itself in reducing the concentration of sperm in the ejaculate, and also reduces their viability; the negative influence of heavy metals on the ratio of the content of chelating metals (Zn, Mg, Cu), the content of Zn, Mg decreases and the content of Cu increases, which uniquely disrupts the process of spermatogenesis, which in turn leads to a decrease in the function of fertility.

Key words: fertility, spermatozooids, heavy metals, chelatable metals, Cu, Zn, Mg.

ВСТУП

Незадовільний стан здоров'я населення за умов негативних демографічних процесів, що спостерігаються в Україні, створює загрозу національній безпеці, формуванню трудових, інтелектуальних, духовних ресурсів у найближчий період. У віддаленій перспективі питання репродуктивного здоров'я чоловіків набуває особливого значення, оскільки на безпліддя страждає близько мільйона подружніх пар, що становить 15-17 %, тоді згідно з ВООЗ 15 % є критичною величиною, при яких питання набуває державного значення [1-6].

Окремо слід наголосити, що серед прямих причин зниження репродуктивного здоров'я чоловіків займають несприятливі фактори навколишнього середовища, в тому числі виробничі фактори ризику [4, 6], за якими виділяються окремі професійні групи, серед інших найбільш несприятливою в цьому аспекті є праця робітників металургійних комбінатів. Ця робота важка і напружена, а технологія пов'язана з дією вібрації, шуму, пилу із вмістом токсичних металів [1, 5-8].

Отже, моделювання процесів, пов'язаних із репродуктивним здоров'ям чоловіків, – дуже актуальне питання.

Метою дослідження було моделювання впливу на чоловічу фертильність важких металів. Для досягнення мети самців щурів, що піддавались впливу важких металів в умовах утримування на металургійному підприємстві, досліджували морфофункціональні зміни гонад, сперматозоїдів та вмісту в сперматозоїдах хелатоутворюючих металів Zn, Mg, Cu.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проводили на 60 білих статевозрілих самцях щурів вагою 200-250 грамів. Тварини були поділені на 2 групи по 30 особин кожна: I контрольна група – утримувалася в умовах віварію, II група – утримувалася протягом 30 діб на території цехів металургійного комбінату “Запоріжсталь”.

Дослідження виконувалися відповідно до основного плану кафедри фізіології людини і тварини ЗНУ та держбюджетних тем “Стрес і клітинний метаболізм металів” (№ державної реєстрації 0103V0007230) та “Розробка та обґрунтування методів оцінки функціонального стану клітин за допомогою хелаторів-хромофорів” (№ державної реєстрації 0106V90083920). Дослідження також проводилися на базі приватного діагностичного центру ТОВ “Медлайф-Біо” на основі договору про співпрацю від 15 березня 2017 року № 2-С.

Тварини утримувались із дотриманням загальних принципів біоетики відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [9].

Після закінчення експерименту тварин умертвляли шляхом декапітації під легким наркозом.

Матеріалом для дослідження були сім'яники самців щурів та їхній еякулят у вигляді суспензії сперматозоїдів, що отримувались із каудальної частини придатку сім'яника, яку поздовжньо розтинали та вивільняли від жиру придатків сім'яника.

Для гістологічного дослідження зразки тканин сім'яних залоз фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, піддавали дегідратації та заливали в парафін за загально-прийнятою методикою.

Готували гістологічні поперечні зрізи сім'яних залоз товщиною 10-15 мкм, забарвлювали гематоксилін-еозином та досліджували за допомогою цифрового мікроскопа Axio Imager M із програмним забезпеченням Axio Vision S (64 Rel. 4.8.3 I Zen 2011).

Під час оглядової мікроскопії визначали такі показники: кількість звивистих сім'яних каналців в одному полі зору, площу поперечного розрізу звивистого каналця та його просвіт, площу сперматогенного епітелію та його товщину; кількість клітин Сертолі в сперматогенному епітелії звивистого сім'яного каналця, ширину базального та довжину апікальної частин клітин Сертолі, площу клітин і їхніх ядер, кількість сперматогенних клітин (сперматогонії, сперматоцити і сперматиди); кількість сперматозоїдів у просвіті звивистого сім'яного каналця, площу голови і ядра ширину шийки та довжину хвостової частини сперматозоїдів.

Морфометричні заміри проводили при збільшенні 10×10, 40×10 і 100×10.

Індекс сперматогенезу обчислювали за формулою [6, 10, 11]:

$$I_s = \Sigma a / N,$$

де а – кількість шарів у кожному каналці (перший шар – сперматогонії, другий сперматоцити, третій – сперматиди, четвертий – сперматозоїди), N – кількість порахованих каналців в полях зору.

Індекс релаксації (напруги сперматогенезу) розраховували по відношенню суми усіх порахованих статевих клітин до суми клітин Сертолі [6, 10, 11].

Вплив важких металів на продуктивність сім'яників щурів оцінювали за такими показниками: загальна концентрація сперматозоїдів в еякуляті; концентрація живих сперматозоїдів в еякуляті; концентрація мертвих сперматозоїдів в еякуляті; життєздатність сперматозоїдів (% живих клітин від загальної кількості) [6, 10, 11].

Для визначення перелічених показників суміш суспензії сперматозоїдів і фізіологічного розчину (1:40) забарвлювали трипановим синім на предметному склі і досліджували за допомогою автоматичного лічильника клітин Countes TM.

Вміст хелатоутворюючих металів у сперматозоїдах визначали забарвленням мазків сперматозоїдів, зафіксованих у парах формаліну. Для виявлення вмісту цинку мазки забарвлювали дитизоном, магнію – магнезоном і міді – дитіоксамідом. Усі методики розроблені Ю. В. Єщенко та співавторами [4]. Вміст металів у клітинах оцінювали напівкількісним методом.

Статистична обробка результатів: одержані результати досліджень перевіряли на нормальність розподілу за допомогою W-тесту. Імовірність похибки першого роду $p > 0,05$. При нормальному розподіленні порівняння вибірок проводилося за допомогою T-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. Результати наведено у вигляді $M \pm m$, n – кількість тварин у серії експериментів. Отримані дані статистично оброблені за допомогою комп'ютерної програми "STATISTICA 6.0".

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При морфологічному дослідженні визначаються зміни не тільки в паренхімі, яку ми кількісно оцінювали, але і в інтерстиції та оболонках сім'яників.

Під впливом важких металів виявлені такі зміни: білкова оболонка мала нерівномірну товщину, звивисті каналці деформувалися, та набули багатогранної форми замість овальної, вони перестали щільно прилягати один до одного, що свідчить про обезводнення тканин і втрату тургору; подібним чином деформована інтерстиція між каналцями; межа між

сперматогенним епітелієм та просвітом каналців; міоїдні клітини деформовані; клітини Сертолі зменшені в розмірах та деформовані сперматогонії зменшені, ранні та пізні сперматиди майже не відрізняються, вони деформовані, їхні ядра зміщені до центру клітини; стосовно сперматозоїдів, вони хаотично розташовані в полі зору, каналця їх головки зменшені, деформовані, у деяких полях зору можна виявити обриви хвостів та аглютинацію сперматозоїдів, у деяких сім'яних каналців сперматозоїди відсутні зовсім. Кількість клітин Лейдіга різко зменшена, розміщена поодиноці, а не групами, як у нормі.

Кількісну характеристику змін при морфологічному гістологічному дослідженні наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Морфометричні показники сім'яних залоз щурів у I контрольній та II дослідній групі

№ п/п	Показник	I група	II група
1	2	3	4
1	Кількість звивистих сім'яних каналців в одному полі зору	35,01 ± 0,75	26,22 ± 0,24*
2	Площа поперечного розрізу звивистого каналця, мкм ²	462298,71 ± 1721,69	53105,82 ± 2903,27**
3	Площа просвіту каналця, мкм ²	8793,24 ± 901,03	23135,91 ± 1085,35**
4	Площа сперматогенного епітелію, мкм ²	37204,0 ± 1305,83	32009,58 ± 2497,59**
5	Товщина сперматогенного епітелію, мкм	37,17 ± 2,01	27,97 ± 1,89*
6	Кількість клітин Сертолі в сперматогенному епітелію звивистого сім'яного каналця	24,12 ± 8,98	18,97 ± 5,21**
7	Площа клітин Сертолі, мкм ²	191,24 ± 19,14	150,02 ± 14,01**
8	Ширина базальної частини клітин Сертолі, мкм	12,96 ± 1,81	12,31 ± 1,75*
9	Висота апікальної частини клітин Сертолі, мкм	14,98 ± 5,32	17,61 ± 3,01*
10	Площа ядра клітин Сертолі, мкм ²	14,97 ± 0,93	11,02 ± 1,94**
11	Кількість сперматогоніїв в сперматогенному епітелії звивистого сім'яного каналця	51,92 ± 1,57	48,59 ± 1,91**
12	Площа сперматоцита, мкм ²	4,02 ± 0,89	2,98 ± 0,73**
13	Площа ядра сперматоцита, мкм ²	3,37 ± 0,91	2,75 ± 0,54**
14	Кількість сперматид в сперматогенному епітелії звивистого сім'яного каналця	35,01 ± 1,21	28,73 ± 1,43**
15	Площа сперматиди, мкм ²	33,01 ± 0,21	28,47 ± 4,57**
16	Площа ядра сперматиди, мкм ²	3,01 ± 0,97	2,07 ± 0,63**
17	Довжина джгутика пізніх сперматид, мкм	11,01 ± 2,84	12,57 ± 2,95**

1	2	3	4
18	Товщина джгутика пізніх сперматид, мкм	3,12 ± 0,81	2,38 ± 0,91**
19	Кількість сперматозоїдів у просвіті звивистого сім'яного каналця	298,97 ± 14,03	231,12 ± 28,01**
20	Площа головки сперматозоїда, мкм ²	18,02 ± 2,73	14,96 ± 0,97**
21	Ширина шийки сперматозоїда, мкм	3,01 ± 0,49	2,53 ± 1,73*
22	Довжина хвостової частини сперматозоїда, мкм	21,01 ± 0,24	22,15 ± 1,08*
23	Площа ядра сперматозоїда, мкм ²	1,92 ± 0,75	1,25 ± 0,97**

Примітка: * – різниця достовірна щодо контролю з $p < 0,05$; ** – різниця достовірна щодо контролю з $p < 0,01$.

Після проведення морфометричних досліджень було виявлено такі зміни у сім'яниках у тварин, що піддавались впливу важких металів порівняно із контрольною групою: зменшення кількості звивистих сім'яних каналців в одному полі зору на 24,12 % ($p \leq 0,05$); збільшення площі поперечного розрізу звивистих каналців і їх просвіту відповідно на 13,81 % ($p \leq 0,001$) і 57,91 % ($p \leq 0,001$); зменшення площі сперматогенного епітелію та його товщини відповідно на 13,57 % ($p \leq 0,001$) і 22,01 % ($p \leq 0,05$); зменшення площі та ширини базальної частини клітин Сертолі відповідно на 19,12 % ($p \leq 0,001$) і 7,4 % ($p \leq 0,050$); збільшення їхньої апікальної частини на 10,49 % ($p \leq 0,05$); зменшення площі ядер клітин Сертолі на 36,35 % ($p \leq 0,001$); зменшення кількості сперматогоніїв у сперматогенному епітелії звивистого сім'яного каналців, їх площі та їхніх ядер відповідно на 6,88 % ($p \leq 0,001$), 29,61 % ($p \leq 0,001$) і 34,21 % ($p \leq 0,001$); зменшення кількості сперматоцитів, їхньої площі та їхніх ядер відповідно на 8,39 % ($p \leq 0,001$), 20,01 % ($p \leq 0,001$) і 12,23 % ($p \leq 0,001$); зменшення кількості сперматид у сперматогенному епітелії звивистого сім'яного каналця, їхньої площі та їхніх ядер відповідно на 17,32 % ($p \leq 0,001$), 21,31 % ($p \leq 0,001$) і 28,71% ($p \leq 0,001$); збільшення довжини джгутиків пізніх сперматид на 19,99 % ($p \leq 0,005$) при одночасному зменшенні його товщини на 12,28 % ($p \leq 0,05$); зменшення кількості сперматозоїдів у розрізі звивистого сім'яного каналця, площі головки сперматозоїда і його ядра, а також ширини шийки відповідно на 27,03 % ($p \leq 0,001$), 12,54 % ($p \leq 0,001$), 25,01 % ($p \leq 0,001$), 10,13 % ($p \leq 0,05$); при цьому хвостова частина сперматозоїда стала довшою на 8,07 % ($p \leq 0,05$); також відмічене зниження індексу сперматогенезу з $3,28 \pm 0,19$ до $2,84 \pm 0,26$ м.е. на 10,25 % ($p \leq 0,001$), індексу релаксації з $18,21 \pm 1,79$ до $17,21 \pm 1,15$ м.е. на 4,46% ($p \leq 0,001$), що свідчить про зниження функціональної активності сім'яників у самців щурів.

При візуальній оцінці зразків еякуляту двох груп тварин було відзначено, що у I групі колір молочно-білий, густої консистенції, а у II групі колір світліший і менш густої консистенції.

Параметри, що характеризують фертильність самців щурів, наведено в таблиці 2.

Таблиця 2 – Кількісні та якісні показники продуктивності сім'яних залоз самців щурів у двох групах

№ п/п	Показник	I група	II група
1	2	3	4
1	Загальна концентрація сперматозоїдів в еякуляті, 10^7 /мл	8,01 ± 0,54	4,02 ± 0,19**

1	2	3	4
2	Концентрація живих сперматозоїдів в еякуляті, 10^7 /мл	$7,01 \pm 0,15$	$1,4 \pm 0,2^{**}$
3	Концентрація мертвих сперматозоїдів в еякуляті, 10^7 /мл	$0,87 \pm 0,12$	$2,3 \pm 0,2^{**}$
4	Життєздатність сперматозоїдів, %	$87,91 \pm 3,79$	$36,61 \pm 2,83^{**}$

Примітка: ****** – різниця достовірна щодо контролю з $p < 0,01$.

У дослідній II групі порівняно із контрольною I групою відмічене зменшення загальної концентрації сперматозоїдів в еякуляті на 50,54% ($p \leq 0,001$), концентрація живих сперматозоїдів на 82,58% ($p \leq 0,001$), а також зменшення їх життєздатності на 52,94% ($p \leq 0,001$), концентрація мертвих сперматозоїдів збільшилася на 61,08% ($p \leq 0,001$). Такі результати вказують про негативний вплив важких металів на фертильність самців щурів.

Зміни вмісту хелатоутворюючих металів (Zn, Mg, Cu) в сперматозоїдах щурів наведено в таблиці 3.

Таблиця 3 – Вміст хелатоутворюючих металів Zn, Mg, Cu в у сперматозоїдах у двох групах

№ п/п	Інтенсивність забарвлення, у. о.	I група	II група
1	Zn (дитизон)	$1,37 \pm 0,12$	$0,96 \pm 0,09^{**}$
2	Mg (магнезон)	$1,09 \pm 0,07$	$0,78 \pm 0,03^{**}$
3	Cu (купферон)	$0,47 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,05^*$

Примітка: * – різниця достовірна щодо контролю з $p < 0,05$; ** – різниця достовірна щодо контролю з $p < 0,01$.

Вплив важких металів змінював нормальне співвідношення хелатоутворюючих металів Zn, Mg, Cu в сперматозоїдах, знижував вміст Zn, Mg та підвищував вміст Cu, ця зміна порушує баланс металів у металовмісних ферментах, що своєю чергою негативно відображається на процесі сперматогенезу, та порушує процес сперматогенезу та знижує фертильність самців щурів [12].

Перспективи подальших досліджень: моделювання комплексної дії стресових чинників на чоловічу фертильність, як у тварин, так і у людини.

ВИСНОВКИ

1. Важкі метали негативно впливають на морфофункціональний стан гонад самців щурів, спричинюючи деформацію паренхіми та строми сім'яників, та призводить до порушення сперматогенезу.
2. Вплив важких металів на організм щурів спричиняє зміну сперматозоїдів у вигляді зміни форми головки та її зменшення, загального зменшення шийки та збільшення хвостової частини сперматозоїда, що значно порушує функцію фертильності.
3. Індекс сперматогенезу та індекс релаксації під впливом важких металів знижуються, що спричинює зниження функціональної активності сім'яників щурів.
4. Продуктивність сім'яних залоз знижується за дії важких металів, що проявляється у зменшенні концентрації сперматозоїдів у еякуляті, а також знижує їхню життєздатність.
5. Виявлено негативний вплив важких металів на співвідношення вмісту хелатоутворюючих металів (Zn, Mg, Cu), вміст Zn, Mg знижується а вміст Cu підвищується, що однозначно порушує процес сперматогенезу, що в свою чергу призводить до зниження функції фертильності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Keel B. A. Within- and between- subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil. Steril.*, 2006. 128 p.
2. Within- subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages / Francavillia F. et all. *Int. J. Androl.* 2007. Vol. 30. 174 p.
3. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters / Castilla J. A. et all. *Hum. Reprod.* 2006. 847 p.
4. Zalupus R. K., Koropatnich J. Cellular and molecular biology of metal. New York: CRC Press, 2010. 442 p.
5. Єщенко Ю. В. Стрес і метаболізм металів. Запоріжжя: ЗНУ, 2010. 268 с.
6. Jewuier A. M. Semen analysis: a new manual and its application to the understanding of semen and its pathology. *Asian J. Andrology.* 2010. Vol. 12. 11 p.
7. Tudor R., Zalewski P., Rathaike R. Zinc in health and chronic disease. *J Nutr. Health Aging*, 2005. Vol. 1. P. 31.
8. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria / Menkveld R. et all. *Human Reprod.* 1990. 586 p.
9. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, від 18 березня 1986 р.: відповідає офіц. тексту. Київ: Збірка договорів Ради Європи: Парламентське видавництво, 2000. URL: http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/994_137.
10. Yunagimachi R., Mastroianni G., Biggers J. D. Fertilization and embryonic development in vitro. New York: Plenum press, 1981. 81 p.
11. Thomas T. Chemical laboratory diagnosis. Frankfurt: Verlagsgesellschaft, 1998. 172 p.
12. Taravati A., Tohidi F. Association between seminal plasma zinc level and astenozoospermia: a meta-analysis study. *Andrologia*, 2015. DOI: 10.1111/and.12494.

REFERENCES

1. Keel B. A. Within- and between- subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil. Steril.*, 2006. 128 p.
2. Within- subject variation of seminal parameters in men with infertile marriages / Francavillia F. et all. *Int. J. Androl.*, 2007. Vol. 30. 174 p.
3. Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters / Castilla J. A. et all. *Hum. Reprod.*, 2006. 847 p.
4. Zalupus R. K., Koropatnich J. Cellular and molecular biology of metal. New York: CRC Press, 2010. 442 p.
5. Eshhenko Ju. V. Stres i metabolizm metaliv. Zaporizhzhja: ZNU, 2010. 268 s.
6. Jewuier A. M. Semen analysis: a new manual and its application to the understanding of semen and its pathology. *Asian J. Andrology*, 2010. Vol. 12. 11 p
7. Tudor R., Zalewski P., Rathaike R. Zinc in health and chronic disease. *J Nutr. Health Aging*, 2005. Vol. 1. P. 31
8. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria / Menkveld R. et all. *Human Reprod.*, 1990. 586 p.
9. Yevropejs'ka konvencija pro zahist hrebetnih tvarin, shho vikoristovujut'sja dlja doslidnih ta inshih naukovih cilej. Strasburg, vid 18 bereznja 1986 r.: vidpovidae ofic. tekstu. Kiyiv: Zbirka dogovoriv Radi Yevropi: Parlaments'ke vidavnictvo, 2000. URL: http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/994_137.
10. Yunagimachi R., Mastroianni G., Biggers J. D. Fertilization and embryonic development in vitro. New York: Plenum press, 1981. 81 p.
11. Thomas T. Chemical laboratory diagnosis. Frankfurt: Verlagsgesellschaft, 1998. 172 p.
12. Taravati A., Tohidi F. Association between seminal plasma zinc level and astenozoospermia: a meta-analysis study. *Andrologia*, 2015. DOI: 10.1111/and.12494.