

УДК 612.616.31.084:612.825:615.832.9-615.361:611.018.5:618.48]:57.086.13

I.I. Lomakin^{1*}, O.V. Kudokotseva¹, V.G. Babiichuk¹, Ye.V. Kryshtal²

Вплив краніоцеребральної гіпотермії та кріоконсервованої кордової крові на репродуктивну функцію самців щурів із хронічною алкогольною інтоксикацією

UDC 612.616.31.084:612.825:615.832.9-615.361:611.018.5:618.48]:57.086.13

I.I. Lomakin^{1*}, O.V. Kudokotseva¹, V.G. Babiichuk¹, Ye.V. Kryshtal²

Impact of Craniocerebral Hypothermia and Cryopreserved Cord Blood on Reproductive Function of Male Rats with Chronic Alcohol Intoxication

Реферат: У роботі розглянуто питання впливу хронічної алкогольної інтоксикації (ХАІ) на репродуктивну функцію самців щурів. Показано, що тривале зловживання алкоголем призводить до значущого зниження як показників вираженості статевої активації та рівня тестостерону в сироватці крові самців щурів із ХАІ після пред'явлення репродуктивної самки, так і складу їх сім'яної рідини. Поєднане застосування ритмічної краніоцеребральної гіпотермії (рКЦГ) і введення кріоконсервованого лейкоконцентрату кордової крові (кЛККК) більшою мірою сприяє динаміці відновлення функціональної повноцінності зміненої в результаті ХАІ репродуктивної системи самців щурів, ніж самостійне застосування кожного з вищевказаних методів. Авторами висувається гіпотеза активації за допомогою рКЦГ і кЛККК гіпоталамо-гіпофізарної системи, що впливає на синтез тестостерону та стимуляцію сперматогенезу.

Ключові слова: хронічна алкогольна інтоксикація, ритмічна краніоцеребральна гіпотермія, кріоконсервований лейкоконцентрат кордової крові, репродуктивна функція, щури.

Abstract: In this work, we have studied the impact of chronic alcohol intoxication (CAI) on reproductive function in male rats. Prolonged alcohol abuse has been shown to significantly reduce the manifestation rate of sexual activation and testosterone level in blood serum of male rats with CAI following exposure to a receptive female, as well as to change their seminal fluid composition. The rhythmic craniocerebral hypothermia (rCCH), combined with the administration of cryopreserved cord blood leukoconcentrate (cCBL) ensured to a greater extent the dynamics of functional integrity recovery of the CAI-altered reproductive system in male rats, if compared to each of these methods used solely. The authors have hypothesized the rCCH and cCBL to activate the hypothalamic-pituitary system, affecting thereby the testosterone synthesis and spermatogenesis stimulation.

Key words: chronic alcohol intoxication, rhythmic craniocerebral hypothermia, cryopreserved cord blood leukoconcentrate, reproductive function, rats.

Сучасне життя в умовах постійного стресу і високих психоемоційних навантажень все частіше призводить до зниження лібідо як у жінок, так і у чоловіків. Спроби усунення виниклих проблем за допомогою алкоголю ще більше обтяжує перебіг хвороби, переводячи її з рамок функціональної патології в органічну.

На даний час алкоголізм офіційно визнано хворобою (F10.2–F11), яка змінює фізичний та психічний стан. Вперше поняття «алкогольна хвороба» запропонував М. Huss (1849 р.). Воно відображало системне захворювання, яке розглядалося як наслідок токсичного ураження етанолом внутрішніх органів (головного мозку, печінки, серця, шлунка, підшлункової залози, кишків-

A reduced sex drive can affect both women and men due to a constant stress and high psycho-emotional loading in modern lifestyle. The attempts to solve this problem with alcohol intake, worsen this state even more, by transferring it from functional pathology into organic.

Currently, the alcoholism is officially recognized as a disease (F10.2–F11), which alters the physical and mental state. For the first time, the term of 'alcoholic disease' was proposed by M. Huss (1849), as the reflection of a systemic disease, that he considered to be a result of toxic ethanol damage to internal organs (brain, liver, heart, stomach, pancreas, intestines, etc.) [27]. To date, a damaging effect of ethanol has been reported [1, 6, 9] as caused by

¹Відділ кріофізіології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

² Харківська медична академія післядипломної освіти, м. Харків

¹Department of Cryophysiology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

*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: 2ilomakin53@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: 2ilomakin53@gmail.com

Надійшла 30.03.2020

Прийнята до друку 09.11.2020

Received March, 30, 2020

Accepted November, 09, 2020

© 2020 I.I. Lomakin, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ника тощо) [27]. На сьогодні показано [13–15], що ушкоджуючий ефект етанолу обумовлений впливом не тільки на метаболічні процеси, а й на функціональний стан інтеграційних систем (нервової, ендокринної, імунної, репродуктивної). Одним із серйозних наслідків, пов'язаних зі зловживанням алкоголем, є статеві розлади. Неспроможність у статевому житті є значною психологічною травмою для чоловіка будь-якого віку [5].

За літературними даними частота сексуальних порушень у осіб із алкоголізмом становить до 83,0% [16, 18, 26]. Хронічна алкогольна інтоксикація (ХАІ) може стати основною причиною чоловічого безпліддя алкогольного генезу в високому відсотку випадків (96%). Це пов'язано з функціональним станом ендокринних залоз (алкоголь перешкоджає вивільненню тестостерону (Тс) із клітин Лейдіга) [14] і порушенням нейроендокринної регуляції ранніх етапів сперматогенезу, зниженням загальної кількості зрілих сперматозоїдів, наростанням патоспермії та астенозооспермії [19].

Встановлено, що ХАІ впливає на репродуктивну систему як прямим шляхом (надає токсичний ефект), так і опосередковано (модулює функціональний стан гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної системи) [15, 21], викликає тривалу нейроадаптацію, змінює нейропередачу та синаптичну пластичність [13]. Тому відновлення функціональної повноцінності репродуктивної системи вимагає активного впливу на нейроендокринні системи для забезпечення адекватної активності нейроендокринних функцій. Терапія гіпоталамічного нейроендокринного синдрому потребує нетрадиційних методів лікування, які дозволяють здійснювати контрольований спрямований вплив на комплекс структур центральної нервової системи (ЦНС), що забезпечують повноцінність функціональних реакцій системи епіфіз-гіпоталамус-гіпофіз. До таких методів, на нашу думку, можна віднести ритмічну краніоцеребральну гіпотермію (рКЦГ) [7, 8].

Одержані в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАН України) результати показали, що ритмічні холодові впливи дозволяють отримати терморегуляторну реакцію, яка виражається в адекватній відповіді нейрогуморальних процесів гіпоталамо-гіпофізарної системи в умовах періодичного розширення меж температурного гомеостазу. Ця терморегуляторна реакція сприяє зміні спрямованості нейротрансмітерних процесів, нейрогуморальних і вегетативних реакцій протягом тимчасового інтервалу впливу [7, 8].

the impact on not only metabolic processes, but functional state of integrated systems (nervous, endocrine, immune, reproductive) as well. One of the major consequences, associated with alcohol abuse is sexual dysfunction. Men of all ages experience sexual dysfunction as a serious psychological trauma [7].

According to the reported data, the frequency of sexual dysfunction in people suffering from alcoholism is up to 83.0% [10, 14, 22]. Chronic alcohol intoxication (CAI) can be the main cause of male infertility associated with alcohol abuse in most cases (96%). This is due to a functional state of endocrine glands (alcohol interferes with testosterone (Ts) release from Leydig cells) [6] and the neuroendocrine regulation impairment of the early stages of spermatogenesis, a decrease in total number of mature spermatozoa and increasing pathospermia and asthenozoospermia [15].

The CAI was established to affect the reproductive system both directly (via a toxic effect) and indirectly (by modulating a functional state of the hypothalamic-pituitary-gonadal system) [9, 18], to cause a prolonged neuroadaptation, and alter the neurotransmission and synaptic plasticity [1]. Therefore, restoring the functional integrity of reproductive system necessitates an active influence on neuro-mediator systems in order to ensure an adequate activity of neuroendocrine functions. The therapy of hypothalamic neuroendocrine syndrome should include the non-standard methods, enabling to control targetedly the complex of central nervous system (CNS) structures, which provide the integrity of functional responses of the pineal gland-hypothalamus-pituitary system. We suggested the rhythmic craniocerebral hypothermia (rCCH) as likely referred to these methods [11, 12].

The findings, obtained at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (IPCC of NAS of Ukraine) have demonstrated the rhythmic cold exposures to enable obtaining a thermoregulatory response, expressed as an adequate reaction of neurohumoral processes of hypothalamic-pituitary system. This thermoregulatory response ensured a change in the direction of neurotransmitter processes, neurohumoral and autonomic responses in dynamics of exposure [11, 12].

The studies implemented at the IPCC of NAS of Ukraine have also shown an efficient application of cryopreserved cord blood (cCB) to correct various disorders of body's functional systems, especially neuroendocrine and reproductive ones [2, 4, 13].

To date, of topicality are the social and medical problem of CAI and the possibility of rCCH to



Наукові дослідження, проведені в ІПКіК НАН України, також довели ефективність використання кріоконсервованої кордової крові (кКК) для корекції різних порушень функціональних систем організму, зокрема нейроендокринної та репродуктивної [1, 3, 17].

На сьогодні актуальними є соціально-медична проблема ХАІ і можливість рКЦГ підвищувати прояв центральних (парадоксальних) ефектів системно введених лікарських препаратів і потенціювати їх дію, а також можливість застосовувати рКЦГ і кКК у терапії спровокованих токсичною дією ХАІ порушень репродуктивної сфери [7, 8]. Тому метою даного дослідження було визначення дії рКЦГ, кріоконсервованого лейкоконцентрату кордової крові (кЛККК) та їх поєднаного застосування на порушену внаслідок ХАІ репродуктивну функцію самців щурів.

Матеріали та методи

Дослідження виконували на статевозрілих 12-місячних щурах-самцях. Експерименти були проведені на базі наукових підрозділів ІПКіК НАН України відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження (№ 3447 – IV від 21.02.2006 р.) при дотриманні вимог Комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1986).

Інтактні тварини знаходилися в умовах віварію ІПКіК НАН України на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до їжі та води.

Хронічну алкогольну інтоксикацію щурів починали з 3-місячного віку [4] та продовжували протягом усього періоду експерименту.

Тварин було поділено на 5 груп ($n = 15$ у кожній): 1 – інтактні щури; 2 – щури з ХАІ (контроль ХАІ); 3 – щури з ХАІ, яким проводили процедуру рКЦГ (рКЦГ); 4 – щури з ХАІ, яким вводили кЛККК (кЛККК); 5 – щури з ХАІ, до яких застосовували поєднані методи впливу (рКЦГ + кЛККК).

Для проведення рКЦГ використовували апарат «АТГ-01» (Росія), який забезпечує переривчасту подачу холодного повітря з температурою 4–6°C при частоті впливу 0,05–0,2 Гц. Ритмічну КЦГ проводили одноразово, при цьому ректальна температура не опускалася нижче 35°C [1].

Готову кріоконсервовану суспензію лейкоцитарних клітин (лейкоконцентрат) кордової крові людини [12] отримували в кріобанку ІПКіК НАН України.

enhance the manifestation of central (paradoxical) effects of systemically administered drugs and to potentiate their action, as well as the feasibility to apply rCCH and cCBL in therapy of reproductive disorders, induced by toxic CAI effect [11, 12]. Therefore, we aimed here to determine the influence of rCCH, cryopreserved cord blood leukoconcentrate (cCBL) and their combined use on the CAI-injured reproductive function in male rats.

Materials and methods

The study was performed in adult 12-month-old male rats. The experiments were conducted at the scientific departments of the IPCC of NAS of Ukraine in accordance with the Law of Ukraine ‘On the Protection of Animals Against Cruelty’ (№ 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the IPCC of NAS 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).

The intact animals were housed in the animal facility with a standard diet ad libitum.

The rats were chronically intoxicated with alcohol starting from 3-month age [5] and during the entire experimental period.

The animals were divided into 5 groups ($n = 15$ in each): the group 1 comprised the intact rats; the group 2 was the rats with CAI (CAI control); the group 3 consisted of the rats with CAI, received the rCCH procedure (rCCH); the rats with CAI, with administered cCBL (cCBL) were in the group 4; the rats with CAI, who underwent the combined methods of exposure (rCCH + cCBL) were included in the group 5.

The rCCH were done with the Fluidokranioterm ATG-01 device (Russia), which ensured an intermittent supply of cold air (4–6°C) at an exposure frequency of 0.05–0.2 Hz. The rhythmic CCH was conducted once, and a rectal temperature did not fall below 35°C [2].

The cryopreserved suspension of leukocyte cells (leukoconcentrate) derived from human cord blood [26] was provided by the Cryobank of the IPCC of NAS of Ukraine (Ukraine).

The post-thaw cCBL samples were administered once intraperitoneally at a dose of $(3–5) \times 10^7$ cells / kg of body weight.

The rCCH and cCBL were administered together, observing the following order: the rCCH procedure was performed first, then a day later the animals were injected with the cCBL.

The rats were sacrificed to day 30 after the last procedure.



Розморожені зразки кЛККК вводили одноразово внутрішньочеревно в дозі $(3-5) \times 10^7$ кл / кг маси тіла.

У наступному порядку тваринам застосували рКЦГ і кЛККК: спочатку проводили процедуру рКЦГ, потім через добу вводили кЛККК.

Щурів виводили з експерименту на 30-ту добу після останньої процедури впливу.

Статеву мотиваційну поведінку самців щурів досліджували у вечірній час із приглушеним світлом у стандартній пластиковій клітці ($52 \times 33 \times 20$ см), яка була розділена на 2 відсіки прозорою перфорованою перегородкою, через яку можуть відбуватися нюхові та зорові контакти між тваринами. Реєстрували час активного дослідження самцем перегородки і кількість його підходів до перегородки [2, 11]. Тестування протягом 10 хв проводили за умов відсутності самки за перегородкою (спонтанна активність), у присутності самки в сусідньому відсіку (стимульована активність). Рецептивність самок підтверджували виразністю лордозної реакції у день тесту вагінальним мазком.

В умовах, які виключають контакт між тваринами (рецептивна самка відокремлена від самця прозорою перфорованою перегородкою), оцінюється вираженість статевої мотивації за поведінкою самців протягом 10 хв, а також за рівнем тестостерону (Тс) у сироватці крові, підвищення якого відбувається у щурів на 20–40-й хвилині після пред'явлення рецептивної самки [2].

Для оцінки гормональної складової статевої поведінки (рівень Тс) проводили забір крові з хвоста, обрізаючи 3–4 мм його кінчика під легким (протягом хвилини) ефірним наркозом. Забір крові здійснювали в звичайних умовах (вихідний рівень гормону) і на тлі статевої активації (через 20 хв після пред'явлення в сусідній відсік рецептивної самки). Вміст Тс у сироватці крові визначали методом імуноферментного аналізу за допомогою стандартних комерційних наборів «Тестостерон-ІФА» («ХЕМА Со. Ltd.», Росія) за методиками виробника.

Для оцінки сперматогенезу визначали показники сперматозоїдів (їх загальну кількість в еякуляті, відсоток живих рухливих, мертвих і дефектних сперматозоїдів). Еякулят досліджували під світловим мікроскопом у камері Горяєва, результати виражали в процентах.

Еякулят для досліджень отримували у щурів методом окситоцинової стимуляції (внутрішньочеревно в кількості 0,2 мл/тварину) [6]. Краплю еякуляту (≈ 50 мкл) збирали за допомогою очної піпетки або шприца без голки об'ємом 1 мл. Отриманий еякулят розводили фізіологічним розчи-

Sexual motivational behavior of male rats was studied in the evening at low lights in the standard plastic cage ($52 \times 33 \times 20$ cm), divided into 2 compartments by a transparent perforated barrier, through which the olfactory and visual contacts between animals could occur. The time, during which the male actively examined the barrier and a number of its approaches to it, were recorded [3, 25]. A 10-min testing was performed when no female was present behind the barrier (assessment of a spontaneous activity) and while a receptive female was in the adjacent compartment (evaluation of a female-stimulated male activity near the barrier).

Under conditions, when any contact between animals was excluded (receptive female was separated from male by a transparent perforated barrier), we assessed the pronouncement of sexual motivation by male behavior within 10 min, as well as by hormonal activation of testosterone (Ts) level in blood serum, which increased in rats on the 20th–40th min following exposure to a receptive female [3].

To evaluate a hormonal component of sexual behavior (Ts level), the blood was sampled from tail, by cutting off 3–4 mm of its tip under light (for a minute) ether anesthesia. Blood was sampled under sexual activation (20 min after exposure to a receptive female at an adjacent compartment) and without it (baseline hormone level). The Ts content in blood serum was determined with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the Testosterone-IFA standard commercial kits (XEMA Co. Ltd., Russia) according to the manufacturer's techniques.

For spermatogenesis assessment, there were determined the spermatozoa parameters (their total number in ejaculate, percentage of living motile, dead and defective spermatozoa). The ejaculate was examined with light microscope in Goryaev's chamber, the results were expressed as a percentage.

The ejaculate for study was collected from rats by oxytocin stimulation (intraperitoneally, 0.2 ml / animal) [8]. A drop of ejaculate ($\approx 50 \mu\text{l}$) was taken using a 1 ml eye pipette or syringe without needle. The resulting ejaculate was diluted with saline of 37°C up to 2 ml volume, then placed in a thermostat at 37°C for 30 min. Afterwards, 0.1 ml of diluted ejaculate was supplemented to the vial, containing 0.9 ml of saline [8, 23].

The findings were statistically processed using the Excel software (Microsoft, USA). The obtained digital data were presented as the mean (M) and the mean error (m). In a multiple comparison, Student's t-test with Bonferroni corrections was used. The differences were considered significant at $p < 0.05$.



ном із температурою 37°C до об'єму 2 мл, поміщали в термостат при температурі 37°C на 30 хв. Потім 0,1 мл розведеного еякуляту додавали в пробірку, яка містила 0,9 мл фізіологічного розчину [6, 24].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм «Excel» («Microsoft», США). Отримані цифрові дані представляли у вигляді середньої арифметичної величини (M) і похибки середньої арифметичної величини (m). При множинному порівнянні використовували t -критерій Стьюдента з поправкою Бонферроні. Відмінності вважали значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Статева поведінка належить до біологічно релевантних форм поведінки та реалізується у вигляді певної послідовності поведінкових актів. Самці щурів у підготовчій (пошуковій) фазі, яка дозволяє тварині досягти контакту з об'єктом мети, демонструють такі форми поведінки: самець переміщується вздовж перегородки, обнюхує самку, встає на задні лапи, торкаючись перегородки двома лапами або однією передньою, засовує ніс в отвори або гризе їх краї у спробах подолати перегородку та проникнути до самки. Подібна поведінка є основною поведінковою характеристикою статевої мотивації, а число підходів до перегородки здебільшого відображає рухову активність і загальне збудження тварини [2, 11]. Слід зазначити, що така статева мотивація притаманна й чоловікам [22].

Результати аналізу складових статевої мотиваційної поведінки самців щурів із ХАІ свідчать про те, що показники залицьальної поведінки (кількість наближень до перегородки та тривалість цих наближень) значно відрізнялися від показників інтактних тварин при незмінній спонтанній активності (72 і 56,25% відповідно) (табл. 1). Таким чином, довготривале вживання алкоголю істотно ($p < 0,05$) зменшує інтерес до осіб протилежної статі, викликаючи так званий ефект «нейтралізації статі».

Ймовірно, що причиною порушень статевої поведінки щурів із ХАІ може бути зміна у метаболізмі статевих гормонів, які створюють фон для повноцінного функціонування центрів регуляції статевої поведінки [22]. Зменшення концентрації основного гормону чоловічої статевої системи (Тс) у сироватці крові призводить до зниження сексуальної та статевої активності [24].

Як видно з табл. 1, реєстрований нами вихідний рівень Тс у самців групи 2 (ХАІ) був на 46,16% ($p < 0,05$) нижче, ніж у інтактного конт-

Results and discussion

Sexual behavior is among the biologically relevant behaviors, realized as a certain sequence of behavioral acts. Male rats in the preparatory (search) phase, which allowed the animal to achieve the contact with the target object, demonstrated the following behaviors: the male moved along the barrier, sniffed the female, got up on its hind legs, touched the barrier with one or both forelegs, poked its nose into the holes or gnawed their edges in an attempt to get over the barrier and find its way to the female. This behavior is the basic behavioral feature of sexual motivation, and a number of approaches to the barrier mostly reflects the motor activity and general arousal of animal [3, 25]. Notably that a sexual motivation is inherent in men as well [20].

The results of component analysis of sexual motivational behavior in male rats with CAI demonstrated the indices of courtship behavior (a number of approaches to barrier and their duration) to significantly differ from those in intact animals with constant spontaneous activity (72 and 56.25%, respectively) (Table 1). Thus, a long-term alcohol consumption significantly ($p < 0.05$) reduced the interest to the opposite-sex species, by causing the so-called 'sex neutralization' effect.

The disorders in sexual behavior in CAI rats were likely the result of an altered metabolism of sex hormones, which formed the background for proper functioning of regulation centers of sexual behavior [20]. A reduced concentration of the primary male sex hormone (Ts) in blood serum entailed a decrease in sexual activity [23].

Table 1 showed the baseline Ts level we recorded in males of group 2 (CAI) to be 46.16% ($p < 0.05$) lower vs. the intact control, while after exposure to a receptive female, the stimulated Ts rate was 73.81% lower as compared with this index in group 1.

The performance of rCCH session significantly increased the manifestation rate of sexual motivation in experimental males if compared with the group 2 (CAI). For example, the time of active examination of barrier by male and a number of its approaches to it in group 3 (+rCCH) exceeded the control indices of group 2 by 98 and 57%, respectively (Table 1). Herewith, the indices of baseline and stimulated Ts in males differed from similar indices in CAI rats by 28.57 and 72.72%, respectively.

The cCBL administration significantly enhanced the sexual behavior of experimental animals as well, by increasing the time of barrier examination and a number of approaches to it by 83.93 and 42.86%, respectively, if compared with the similar indices in CAI rats. The level of baseline and stimulated Ts

Таблиця 1. Вплив рКЦГ і кЛККК на показники статевої активності та рівень тестостерону в сироватці крові самців щурів із ХАІ після пред'явлення рецептивної самки

Table 1. Impact of rCCH and cCBL on sexual activity rate and testosterone level in blood serum of male rats with CAI following exposure to a receptive female

Групи Groups	Показники статевої активності Sexual activity rates				Рівень Тс, нг/мл Ts level, ng/ml	
	Час біля перегородки Time near barrier		Число підходів до перегородки Number of approaches to barrier		Спонтанна Spontaneous	Стимульована Stimulated
	Спонтанна Spontaneous	Стимульована Stimulated	Спонтанна Spontaneous	Стимульована Stimulated		
1	5 ± 1	200 ± 12	7 ± 2	16 ± 2	1,3 ± 0,1	4,2 ± 0,3
2	6 ± 2	56 ± 3 ¹	5 ± 1	7 ± 1 ¹	0,7 ± 0,1 ¹	1,1 ± 0,1 ¹
3	5 ± 1	111 ± 9 ^{1,2}	5 ± 1	11 ± 2 ^{1,2}	0,9 ± 0,1 ¹	1,9 ± 0,2 ^{1,2,4}
4	5 ± 1	103 ± 8 ^{1,2}	6 ± 1	10 ± 1 ^{1,2}	1,1 ± 0,1 ²	2,8 ± 0,2 ^{1,2,3}
5	4 ± 1	156 ± 11 ^{1,2,3,4}	4 ± 1	14 ± 1 ^{1,2,4}	1,1 ± 0,1 ²	3,4 ± 0,3 ^{1,2,3}

Примітки: відмінності значущі порівняно з групою інтактних щурів (1), групою щурів із моделлю ХАІ (2). Групи 4 і 5 порівнювали з групою 3 (3), групи 3 і 5 – з групою 4 (4); $p < 0,05$.

Notes: differences are significant as compared with the group of intact rats (1), group of rats with CAI model (2), groups 4 and 5 vs. group 3 (3), groups 3 and 5 compared with group 4 (4); $p < 0.05$.

ролю, у той час як після пред'явлення самцям рецептивної самки показник стимульованого Тс був нижче за такий у групі 1 на 73,81%.

Проведення сеансу рКЦГ порівняно з групою 2 (ХАІ) значуще підвищувало вираженість статевої мотивації у експериментальних самців. Так, показник часу активного дослідження самцем перегородки і число його підходів до перегородки в групі 3 (рКЦГ) перевищували контрольні показники групи 2 на 98 і 57% відповідно (табл. 1). При цьому рівень вихідного та стимульованого Тс у самців відрізнявся від такого у щурів із ХАІ на 28,57 і 72,72% відповідно.

Введення кЛККК також значуще активізувало статево поведінку експериментальних тварин, збільшуючи час дослідження перегородки на 83,93% і число підходів до перегородки на 42,86% в порівнянні з аналогічними показниками у щурів із ХАІ. Рівень вихідного і стимульованого Тс також значуще підвищувався після введення кЛККК (на 57,14 і 154,54% відповідно) (табл. 1).

Найбільш виражені зміни статевої активності щурів із ХАІ спостерігали після поєднаного застосування рКЦГ і введення кЛККК (група 5). У самців цієї групи на 30-у добу після проведення рКЦГ та клітинної терапії показники статевої мотивації були значуще вищими порівняно

was significantly augmented after cCBL introduction (by 57.14 and 154.54%, respectively) (Table 1).

The most pronounced alterations of sexual activity in CAI rats were observed after administering both rCCH and cCBL (group 5). To day 30, after rCCH and cell therapy performance, the males from this group displayed significantly higher rates of sexual motivation than in group 2, *i. e.* the time of barrier examination and approach number to it were 178.57 and 100% higher, respectively, wherein the stimulated Ts level exceeded the corresponding comparison index by 209% (Table 1).

Thus, a combined application of rCCH and cCBL ensured an increase in manifestation rate of sexual activation and Ts level in blood serum of male rats with CAI after exposure to a receptive female.

Some authors considered [6, 16] the analysis of seminal fluid of male rats as able to reflect the severity of pathological alterations in sexual sphere. Quantitative and qualitative changes in ejaculate parameters in rats could be a crucial criterion for adaptation and maladaptation, occurring in a body when affected by various therapeutic measures.

We have demonstrated a number of viable motile spermatozoa in ejaculate from intact males to average 93%, while the CAI leads to significant



з групою 2 на 178,57% (час дослідження перегородки) і 100% (число підходів до перегородки), при цьому рівень стимульованого Тс перевищував відповідний показник порівняння на 209% (табл. 1).

Таким чином, поєднане застосування рКЦГ і кЛККК сприяє підвищенню показників вираженості статевої активації та рівня Тс у сироватці крові самців щурів із ХАІ після пред'явлення рецептивної самки.

Аналіз сім'яної рідини самців щурів, на думку деяких авторів [9, 14], може відображати глибину патологічних зрушень у статевій сфері. Кількісні та якісні параметри зміни еякуляту у щурів можуть служити значущим критерієм адаптаційних і дезадаптаційних процесів, що відбуваються в організмі під впливом різних за своєю природою терапевтичних заходів.

Нами показано, що в еякуляті інтактних самців кількість життєздатних рухливих сперматозоїдів складає в середньому 93%, в той час як ХАІ призводить до значних змін кількісних і якісних показників стану сім'яної рідини. Під впливом ХАІ у експериментальних тварин (група 2) розвивається олігозооспермія (у щурів визначається зниження загальної кількості сперматозоїдів на 59%), некроспермія (кількість мертвих статевих клітин зростає до 33,7%) та тератозооспермія (істотне збільшення морфологічно дефектних сперматозоїдів) (табл. 2).

Застосування рКЦГ або введення кЛККК значуще змінювали всі досліджувані параметри сім'яної рідини щурів. Поєднане застосування рКЦГ і кЛККК продемонструвало переваги над використанням цих методів поодиноці у вигляді самостійного впливу (табл. 2). Так, у групі 4 показано значущі зміни показників (порівняно з групами 2 і 3), які характеризують рухливість сперматозоїдів і їх морфологічну повноцінність. Це можна інтерпретувати як позитивну динаміку в зниженні токсичного впливу алкоголю на репродуктивну функцію самців щурів.

Отримані результати свідчать про те, що аналіз сперми самців щурів може відображати глибину патологічних зрушень у статевій сфері в умовах ХАІ і вираженість процесів, які відбуваються в організмі під впливом алкоголю, рКЦГ і введення кЛККК.

Таким чином, поєднане застосування рКЦГ і кЛККК сприяє підвищенню всіх досліджуваних показників репродуктивної активності самців щурів із ХАІ, що виражалось в підвищенні їх статевої активності та рівня Тс в сироватці крові після пред'явлення рецептивної самки, а також в значному поліпшенні стану сперматозоїдів в еякуляті.

alterations in quantitative and qualitative indices of seminal fluid state. Under CAI effect, the experimental animals (group 2) showed the development of oligozoospermia (total sperm count was decreased by 59%), necrospermia (a number of dead gametes increased up to 33.7%) and teratozoospermia (significant increase in morphologically defective spermatozoa) (Table 2).

Either rCCH or cCBL administration significantly altered all the studied parameters of seminal fluid in rats. A combined use of rCCH and cCBL demonstrated the advantages over the application of these methods solely as an independent exposure (Table 2). For example, the group 4 demonstrated the significant changes in the indices (compared with groups 2 and 3), which characterized the spermatozoa motility and their morphological integrity. This can be interpreted as a positive dynamics in reducing a toxic alcohol effect on reproductive function in male rats.

These findings implied that the sperm analysis in male rats could reflect the severity of pathological shifts in sexual sphere under CAI and serve as a significant criterion for the processes, occurring in a body under alcohol, rCCH and cCBL impacts.

Thus, a combined use of rCCH and cCBL ensured an increase in all the studied indices of reproductive activity in male rats with CAI, showing the enhancement of their sexual activity and Ts level in blood serum following exposure to a receptive female, and a considerable improvement of sperm quality in ejaculate, collected from experimental animals.

To date, the recognizing of alcoholism as a brain disease is undeniable. Like other chronic diseases, it manifests with a complex of behavioral disorders, resulting from interaction of genetic, biological, psychosocial factors and environmental impacts [17, 20, 24]. Chronic alcohol intoxication provokes a constant additional release of neurotransmitters, causes their functional deficiency, threatens the body's vital functions and as a result, entails the development of deep impairments in emotional sphere, memory and behavior.

The sexual dysfunction under CAI effect we determined during the experiment, are also specific to men. Some authors [22, 23] described the manifestations of low libido and erectile dysfunction up to the introitus failure together with a sharp decrease in Ts level under alcohol abuse. These effects might be a result of impact of ethanol and various impurities in alcoholic beverages on 'pre-testicular' regulatory level of reproductive system.

It is known, that ethanol within the strong alcoholic drinks belongs to biologically active substances of broad pharmacological spectrum. But, as not an



На даний час незаперечне визначення алкоголізму як захворювання мозку, що подібне за своїм перебігом до інших хронічних хвороб і проявляється комплексом поведінкових порушень, які є результатом взаємодії генетичних, біологічних, психосоціальних факторів і впливу навколишнього середовища [20, 23, 25]. Хронічна алкогольна інтоксикація провокує постійне додаткове вивільнення нейромедіаторів, викликає функціональний дефіцит нейротрансмітерів, що загрожує життєдіяльності організму і, як наслідок, призводить до розвитку глибоких порушень емоційної сфери, пам'яті та поведінки.

Розлади сексуальних реакцій під впливом ХАІ, які були визначені нами в експерименті, притаманні й чоловікам. У деяких роботах [24, 26] описано прояви зниження лібідо та ослаблення ерекції аж до неможливості інтроїтусу на тлі різкого зниження рівня Тс внаслідок зловживання алкоголем. Дані ефекти можуть бути обумовлені впливом етанолу та різних домішок, які містяться в алкогольних напоях, на «передтестикулярний» рівень регуляції репродуктивної системи.

Відомо, що етиловий спирт, який входить до складу міцних алкогольних напоїв, належить до біологічно активних речовин широкого фармакологічного спектру дії. Однак він не є чужорідним організму субстратом, а тому практично безперешкодно проникає в мозок і виявляється там майже в такій концентрації, як і в крові, що й обумовлює його безпосередній вплив на ЦНС [20, 25]. Відомо також, що вищою ланкою регуляції статевої функції є кора головного мозку, за допомогою якої зорові, слухові та нюхові подразники формують у підкіркових центрах процеси проеректильної спрямованості. Головною в забезпеченні статевої функції є підкоркова зона – гіпоталамо-гіпофізарний і лімбіко-ретікулярний комплекс [24].

Перспективним напрямком клінічної медицини слід вважати моделювання неспецифічних захисних механізмів головного мозку, спрямованих на роз'єднання патологічних зв'язків, тобто на створення умов для саморегуляції головного

Таблиця 2. Стан сперматозоїдів в еякуляті щурів із моделлю ХАІ після проведення рКЦГ і введення КЛККК

Table 2. Spermatozoa state in CAI rat ejaculate after rCCH and cCBL administration

Група Groups	Показники сперматозоїдів Spermatozoa indices			
	загальна кількість, $\times 10^6$ /мл Total number, $\times 10^6$ /ml	дефектні, % defective, %	рухливі, % motile, %	мертві, % dead, %
1	5,6 \pm 0,3	5,2 \pm 0,7	93,0 \pm 7,5	1,8 \pm 0,6
2	2,3 \pm 0,2 ¹	45,2 \pm 5,1 ¹	21,1 \pm 0,1 ¹	33,7 \pm 4,5 ¹
3	3,4 \pm 0,4 ^{1,2}	31,5 \pm 3,7 ^{1,2}	43,4 \pm 5,4 ^{1,2}	25,1 \pm 3,1 ^{1,2}
4	4,1 \pm 0,4 ^{1,2}	32,8 \pm 3,6 ^{1,2}	51,7 \pm 4,2 ^{1,2}	15,5 \pm 2,9 ^{1,2}
5	4,4 \pm 0,5 ^{1,2,3}	20,1 \pm 1,6 ^{1,2,3,4}	65,3 \pm 6,7 ^{1,2,3,4}	14,6 \pm 1,9 ^{1,2,3}

Примітки: відмінності значущі порівняно з групою інтактних щурів (1), групою щурів із моделлю ХАІ (2). Групи 4 і 5 порівнювали з групою 3 (3), групи 3 і 5 з групою 4 (4); $p < 0,05$.

Notes: differences are significant as compared with the group of intact rats (1), group of rats with CAI model (2), groups 4 and 5 vs. group 3 (3), groups 3 and 5 compared with group 4 (4); $p < 0.05$.

alien substrate for living organisms, it can almost freely get into the brain, and be found there in virtually the same concentration as in blood, stipulating thereby its direct effect on CNS [17, 24]. The cerebral cortex, through which the pro-erectile processes are formed by visual, auditory and olfactory stimuli in subcortical centers, is also well known to be the highest link in sexual function regulation. The subcortical area, *i. e.* hypothalamus-pituitary and limbic-reticular complexes, is primary in sexual function ensuring [23].

The simulation of non-specific protective mechanisms of the brain, aimed to separate the pathological connections, namely a bioadaptive regulation of homeostatic processes, *i. e.* creating the conditions for brain self-regulation, recovery of energy resources, should be considered as a promising trend in clinical medicine. The ways of cold exposures, wherein the hypothalamus as the center of neurotransmitter regulatory mechanisms of emotions and mental behaviors, is also a morphofunctional center of thermoregulatory system, may be relevant and advanced in this direction. The rCCH is one of the therapeutic methods of cold exposure. It enabled a successful targeted regulation of the blood-brain barrier permeability to correct the neurotransmitter processes in the CNS. The therapeutic effects observed in rCCH may be stipulated by body's



мозку, відновлення його енергетичних ресурсів. Актуальними та перспективними в цьому напрямку можуть бути способи холодових впливів, за яких гіпоталамус, як центр нейромедіаторних регуляторних механізмів емоцій і психічних форм поведінки, є також морфофункціональним центром системи терморегуляції. Одним із терапевтичних методів холодового впливу є рКЦГ. За його допомогою вдало реалізовано можливості спрямованої регуляції проникності гематоенцефалічного бар'єра для корекції нейротрансмітерних процесів у ЦНС. Лікувальні ефекти, які спостерігаються при рКЦГ, можуть бути пов'язані з тим, що організм реагує на вплив холоду не тільки системою терморегуляції, а й усіма можливими адаптаційними механізмами з урахуванням гіпоталамо-гіпофізарно-адrenalової, імунної та ендокринної систем. До найбільш важливих аспектів фізіологічної дії холоду при рКЦГ належать зміни діяльності вищих вегетативних центрів і систем нейроендокринної регуляції, що безпосередньо відповідають за температурний гомостаз організму [7, 8].

З огляду на численні наукові публікації та проведені клінічні дослідження [3, 10] значним є інтерес до клітин кордової крові та можливості їх клінічного застосування. Зокрема, раніше нами показано вплив кКК на процеси корекції ЦНС і структур головного мозку щурів, схильних до ХАІ. Також було відзначено значні переваги поєданого застосування методів рКЦГ і введення кКК [1].

Фізіологічні особливості реакцій організму та його функціональних систем припускають не тільки самостійне застосування методів рКЦГ та введення кКК, але й поєднане. У такому випадку можливе взаємне потенціювання дії з урахуванням можливостей і особливостей кожного методу впливу і структури патологічного процесу.

Можна вважати, що поєднане застосування рКЦГ і кКК у наших експериментах приводить до активації гіпоталамо-гіпофізарної системи: підвищення секреції гонадотропін-релізуючого та викиду в кров фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормонів. Це викликає активацію синтезу Тс, посилення метаболізму клітин Сертолі та стимуляцію сперматогенезу.

Таким чином, метод поєданого застосування рКЦГ і введення кКК має великий потенціал і перспективу в корекції патологічних станів різного генезу і ступеня вираженості.

Висновки

1. Під впливом хронічної алкогольної інтоксикації у експериментальних щурів значуще зни-

response to cold exposure not only through the thermoregulatory system, but via all the possible adaptive mechanisms as well, including the hypothalamic-pituitary-adrenal, immune and endocrine systems. The most important aspects of cold physiological effect in rCCH include the changes in activity of the higher autonomic centers and neuroendocrine regulation, directly responsible for body's temperature hemostasis [11, 12].

Considering the numerous reports and clinical studies [4, 19], of great interest are the cord blood cells and possibilities for their clinical application. In particular, previously, we have shown the cCBL impact on correction of CNS and brain structures in the CAI-addicted rats. Significant advantages of combining the rCCH and cCBL administration were also noted [2].

Physiological features of body and its functional systems' responses to rCCH and cCBL administration suggest not only their independent use, but the combination as well. In this case, a mutual potentiation of the effect may be achieved, if taking into account the scope and characteristics of each exposure, as well as the structure of pathological process.

So, in this study, we can assume a combined use of rCCH and cCBL to activate the hypothalamic-pituitary system, *i. e.* to increase the gonadotropin-releasing hormone secretion and release of follicle-stimulating and luteinizing hormones into blood. This resulted in the Ts synthesis activation, enhancement of Sertoli cells metabolism and spermatogenesis stimulation.

Thus, the combination of rCCH and cCBL has a great potential and prospects to correct the pathological states of different genesis and severity.

Conclusions

1. Under chronic alcohol intoxication, the experimental rats revealed a significant decrease in the baseline and stimulated testosterone levels (by 46.1 and 73.81%, respectively), and in total spermatozoa number as well (by 59%), while a number of morphologically defective and dead spermatozoa in ejaculate was increased (by 40 and 31.9%, respectively), thereby significantly reduced the manifestation rate of sexual activation.

2. The rCCH and cCBL combination contributed to a greater extent the dynamics of restoring the functional integrity of CAI-altered reproductive system in male rats, if compared to each of the above exposures used solely, as evidenced by a significant rise in their sexual activity and testosterone level in blood serum following expo-



жувалися вихідний та стимульований рівні тестостерону (на 46,1 та 73,81% відповідно) та загальна кількість сперматозоїдів (на 59%), при цьому зростала кількість морфологічно дефектних (на 40%) та мертвих (на 31,9%) статевих клітин в еякуляті, що призводило до значущого зниження показників вираженості статевої активації.

2. Поєднане застосування рКЦГ і введення кЛККК більшою мірою сприяло динаміці відновлення функціональної повноцінності зміненої в результаті ХАІ репродуктивної системи самців шурів, ніж окреме використання кожного з вищевказаних методів впливу. Про що свідчило значне підвищення статевої активності та рівня тестостерону в сироватці крові після пред'явлення щурам рецептивної самки (на 209%), а також покращення стану сперматозоїдів в еякуляті (загальна кількість клітин зростала на 91,3%, відсоток рухливих клітин – на 44,2%).

Література

1. Айдарова ВС, Бабийчук ВГ, Кудокоцева ОВ, и др. Экспериментальное обоснование применения лечебной гипотермии и клеточной терапии при дисциркуляторной энцефалопатии у крыс линии SHR. Часть 2. Структурные изменения в ткани головного мозга. Проблемы криобиологии і криомедицини. 2019; 29(1): 58–72.
2. Амстиславская ТГ, Осипов КВ. Половая активация самцов крыс: поведение и гормональный ответ. Бюллетень Сибирского отделения Российской Академии медицинских наук. 2003; (3): 112–4.
3. Гольцев АН, Калининченко ТА. Пуповинная кордовая кровь человека как источник гемопоетических клеток для клинического применения. Часть 1. Характеристика гемопоетического потенциала. Проблемы криобиологии. 1998; (1): 3–24.
4. Грищенко ВИ, Ковалев ГА, Петренко АЮ, и др. Регенеративно-пластическая терапия алкогольных висцеропатий. Киев: Наук. Думка; 2010. 152 с.
5. Кришталь ЕВ, Марченко ВГ, Кришталь ТВ. Мотивационный тренинг как одна из составляющих психотерапевтической коррекции нарушений здоровья семьи при задержке психосексуального развития у мужчин. Медична психологія. 2013; (3): 14–9.
6. Крылова ЕВ, Потемина ТЕ, Корягин АС, Нестеров ГД. Профилактическое действие маточного молочка пчел на показатели сперматогенеза крыс при остром тепловом стрессе. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2011; 6(1): 138–43.
7. Ломакин ИИ. Обоснование методов лечебного охлаждения в терапии хронического алкоголизма. Проблемы криобиологии. 2008; 18(3): 383–5.
8. Ломакин ИИ, Бабийчук ГА. Применение методов лечебного охлаждения в терапии хронической алкогольной интоксикации. Проблемы криобиологии. 2012; 22(3): 355.
9. Потемина ТЕ, Кузнецова СВ, Ляляев ВА. Изменение параметров семенной жидкости самцов белых крыс при различных видах экспериментального стресса. Современные технологии в медицине. 2009; (2): 23–6.

sure to a receptive female (by 209%), and the sperm quality improvement in ejaculate (total cell number and percentage of motile cells increased by 91.3 and 44.2%, respectively).

References

1. Abrahao KP, Salinas AG, Lovinger DM. Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits. *Neuron*. 2017; 96 (6):1223–38.
2. Aidarova VS, Babiichuk VG, Kudokotseva OV, et al. Experimental substantiation of therapeutic hypothermia and cell therapy application at dyscirculatory encephalopathy in SHR rats. Part 2. Structural changes in brain tissue. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019; 29(1): 58–72.
3. Amstislavskaya TG, Osipov KV. [Sexual arousal in the male rat: behavioral and hormonal response]. *Byulleten' Sibirskogo Otdeleniya Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2003; (3): 112–4. Russian.
4. Goltsev AN, Kalinichenko TA. Human umbilical cord blood as the source of hemopoietic cells for clinical application. Part 1. Characteristics of hemopoietic potential. *Problems of Cryobiology*. 1998; (1): 3–24.
5. Grishchenko VI, Koval'ov GA, Petrenko AYU, et al. [Regenerative-plastic therapy of alcoholic visceropathies]. *Kyiv: Naukova Dumka*; 2010. Russian. 152 p.
6. Herman M, Lee S, Kang SS, James P. Systemic administration of alcohol to adult rats inhibits leydig cell activity: time course of effect and role of nitric oxide. *Alcoholism. Clin Exp Res*. 2006; 30(9): 1479–91.
7. Krishtal EV, Marchenko VG, Krishtal TV. [Motivational training as one of the components of psychotherapeutic correction of family health at psychosexual development retardation in men]. *Medychna Psykhohiia*. 2013; (3): 14–9. Russian.
8. Krylova EV, Potemina TE, Koryagin AS, Nesterov GA. [Preventive effect of bee royal jelly on rat spermatogenesis indices during acute heat stress]. *Bulletin of the Nizhny Novgorod University N.I. Lobachevsky*. 2011; 6(1): 138–43. Russian.
9. Lasek AW. Effects of ethanol on brain extracellular matrix: implications for alcohol use disorder. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016; 40(10): 2030–42.
10. Lee ACK, Ho LM, Yip AWC, et al. The effect of alcohol drinking on erectile dysfunction in Chinese men. *Int J Impot Res*. 2010; 22: 272–8.
11. Lomakin II. Substantiation of medical cooling methods in therapy of chronic alcoholism. *Problems of Cryobiology*. 2008; 18(3): 383–5.
12. Lomakin II, Babiychuk GA. Use of medical cooling methods against chronic alcohol intoxication. *Problems of Cryobiology*. 2012; 22(3): 355.
13. Martynova YuV, Babiychuk VG, Sirotenko LA, et al. Neurohumoral changes in rats of different age groups on the background of injection of cryopreserved cord blood nucleated cells. *Adv Gerontol*. 2016; 6(4): 304–10.
14. Pendharkar S, Mattoo SK, Grover S. Sexual dysfunctions in alcohol-dependent men: a study from north India. *Indian J Med Res*. 2016; 144(3): 393–9.
15. Ponizovsky AM. Clinical and psychosocial factors associated with quality of life in alcoholdependent men with erectile dysfunction. *J Sex Med*. 2008; 5(10): 2347–58.
16. Potyomina TE, Kuznetsova SV, Lyalyaev VA. [Alteration of the white rat male seminal fluid parameters at different types of experimental stress]. *Sovremennyye Tekhnologii v Meditsine*. 2009; (2): 23–6. Russian.



10. Романов ЮА, Романов АЮ. Ткани перинатального происхождения – уникальный источник клеток для регенеративной медицины. Часть I. Пуповинная кровь. Неонатология: новости, мнения, обучение. 2018; 6(2): 64–77.
11. Тихонова МА, Амстиславская ТГ. Использование модели половой активации для фенотипирования самцов линий мышей и крыс с закрепленными селекцией нарушениями поведения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015; 19(4): 413–9.
12. Цуцаева АО, Грищенко ВІ, Кудокоцева ОВ, та ін. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування гемопоетичних клітин кордової крові людини [методичні рекомендації]. Методичні рекомендації. Харків, 2000. 16 с.
13. Abrahao KP, Salinas AG, Lovinger DM. Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits. *Neuron*. 2017; 96(6):1223–38.
14. Herman M, Lee S, Kang SS, James P. Systemic administration of alcohol to adult rats inhibits leydig cell activity: time course of effect and role of nitric oxide. *Alcoholism. Clin Exp Res*. 2006; 30(9): 1479–91.
15. Lasek AW. Effects of ethanol on brain extracellular matrix: implications for alcohol use disorder. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016; 40(10): 2030–42.
16. Lee ACK, Ho LM, Yip AWC, et al. The effect of alcohol drinking on erectile dysfunction in Chinese men. *Int J Impot Res*. 2010; 22: 272–8.
17. Martynova YuV, Babychuk VG, Sirotenko LA, et al. Neurohumoral changes in rats of different age groups on the background of injection of cryopreserved cord blood nucleated cells. *Adv Gerontol*. 2016; 6(4): 304–10.
18. Pendharkar S, Mattoo SK, Grover S. Sexual dysfunctions in alcohol-dependent men: A study from north India. *Indian J Med Res*. 2016; 144(3): 393–9.
19. Ponizovsky AM. Clinical and psychosocial factors associated with quality of life in alcoholdependent men with erectile dysfunction. *J Sex Med*. 2008; 5(10): 2347–58.
20. Rachdaoui N, Sarkar DK, Phil D. Pathophysiology of the effects of alcohol abuse on the endocrine system. *Alcohol Res*. 2017; 38(2): 255–76.
21. Rasmussen DD, Wilkinson CW, Raskind MA. Chronic daily ethanol and withdrawal: long-term changes in plasma testosterone regulation, but no effect on GnRH gene expression or plasma LH concentrations. *Endocrine*. 2003; 22(2): 143–50.
22. Roney JR, Lukaszewski A.W, Simmons ZL. Rapid endocrine responses of young men to social interactions with young women. *Horm Behav*. 2007; 52(3): 326–33.
23. Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, et al. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2018 Jan 18 [cited 2020 Jun 11]; 16(1): 3. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-018-0320-7>
24. Schill WB, Comhaire FN, Hargreave TB. *Andrology for the clinician*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2011. 800 p.
25. Shim J-H, Kim Y-T, Kim S, Baek H-M. Volumetric reductions of subcortical structures and their localizations in alcohol-dependent patients. *Front Neurol*. [Internet]. 2019 Mar 19 [cited 2020 Jun 11]; 10: 247. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2019.00247/full>
26. Siembida J, Frończuk P, Moryłowska-Topolska J, et al. An overlooked issue: sexual dysfunctions in men addicted to alcohol. *Curr Probl Psychiatry* 2018; 19(2): 112–24.
27. Weber MF, Smith DP, O'Connell DL, et al. Risk factors for erectile dysfunction in a cohort of 108 477 Australian men. *Med J Aust*. 2013; 199: 107–11.
17. Rachdaoui N, Sarkar DK, Phil D. Pathophysiology of the effects of alcohol abuse on the endocrine system. *Alcohol Res*. 2017; 38(2): 255–76.
18. Rasmussen DD, Wilkinson CW, Raskind MA. Chronic daily ethanol and withdrawal: long-term changes in plasma testosterone regulation, but no effect on GnRH gene expression or plasma LH concentrations. *Endocrine*. 2003; 22(2): 143–50.
19. Romanov YuA, Romanov AYu. [Tissues of perinatal origin is a unique source of cells for regenerative medicine. Part I. Cord blood]. *Neonatology: News, Opinions, Training*. 2018; 6(2): 64–77. Russian.
20. Roney JR, Lukaszewski AW, Simmons ZL. Rapid endocrine responses of young men to social interactions with young women. *Horm Behav*. 2007; 52(3): 326–33.
21. Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, et al. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2018 Jan 18 [cited 2020 Jun 11]; 16(1): 3. Available from: <https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-018-0320-7>
22. Siembida J, Frończuk P, Moryłowska-Topolska J, et al. An overlooked issue: sexual dysfunctions in men addicted to alcohol. *Curr Probl Psychiatry* 2018; 19(2): 112–24.
23. Schill WB, Comhaire FN, Hargreave TB. *Andrology for the clinician*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2011.
24. Shim J-H, Kim Y-T, Kim S, Baek H-M. Volumetric reductions of subcortical structures and their localizations in alcohol-dependent patients. *Front Neurol*. [Internet]. 2019 Mar 19 [cited 2020 Jun 11]; 10: 247. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2019.00247/full>
25. Tikhonova MA, Amstislavskaya TG. [Phenotyping the males of mouse and rat strains with genetically defined behavioral disturbances in a model of sexual activation]. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*. 2015; 19(4): 413–9. Russian.
26. Tsutsaeva AO, Grischenko VI, Kudokotseva OV, et al. [Procurement, cryopreservation and clinical application of hemopoietic cells of human cord blood]. *Methodical Recommendations*. Kharkiv; 2000. Russian. 16 p.
27. Weber MF, Smith DP, O'Connell DL, et al. Risk factors for erectile dysfunction in a cohort of 108 477 Australian men. *Med J Aust*. 2013; 199: 107–11.

