

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПЕРВИЧНОГО МУЖСКОГО ГИПОГОНАДИЗМА

Куликова П.А.^{1,2}, Филюшкин Ю.Н.², Куликов Д.А.^{2,3}, Федулов А.В.², Машков А.Е.², Куликов А.В.³

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;

119192, г. Москва, Ломоносовский пр., 31/5, Российская Федерация

²ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт

им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ); 129110, г. Москва, ул. Щепкина, 61/2, Российская Федерация

³ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук;

142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3, Российская Федерация

Актуальность. Разработка новых методов лечения первичного мужского гипогонадизма – актуальная медицинская проблема, для решения которой необходима удобная экспериментальная модель заболевания.

Цель – создание экспериментальной модели первичного мужского гипогонадизма.

Материал и методы. Исследование проводили на крысах-самцах Wistar, гипогонадизм инициировали путем временного наложения лигатуры на дистальную часть семенного канатика.

Основные результаты. Лигирование семенного канатика в течение трех суток приводит к стойкому нарушению репродуктивной и гормонообразующих функций. При меньших сроках воздействия нарушения самопроизвольно обратимы.

Заключение. Созданная модель первичного мужского гипогонадизма характеризуется стойким нарушением гормонообразующей и репродуктивной функций, технической доступностью, отсутствием токсического эффекта на другие органы и системы. Наличие модели открывает новые возможности для разработки подходов к лечению заболеваний репродуктивных органов у мужчин.

Ключевые слова: гипогонадизм, экспериментальная модель, тестикулы, тестостерон, ишемия, инфертильность.

EXPERIMENTAL MODEL OF THE PRIMARY MALE HYPOGONADISM

Kulikova P.A.^{1,2}, Filyushkin Yu.N.², Kulikov D.A.^{2,3}, Fedulov A.V.², Mashkov A.E.², Kulikov A.V.³

¹Lomonosov Moscow State University; 31/5 Lomonosovskiy prospekt, 119192 Moscow, Russian Federation

²Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI); 61/2 Shchepkina ul., 129110 Moscow, Russian Federation

³Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS; 3 Institutskaya ul., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Background: Development of the new methods of treatment of primary male hypogonadism is an urgent medical problem. Its solution requires a suitable experimental model of the disease.

Aim: The creation of new experimental model of primary male hypogonadism.

Materials and methods: The study was conducted on the male Wistar rats, hypogonadism was modeled by temporary ligation of the distal part of the spermatic cord.

Results: It was shown that three-day ligation of the spermatic cord led to persistent disturbance of the testosterone-producing and reproductive functions. These manifestations were reversible at shorter duration of the exposure.

Conclusion: The created model of primary male hypogonadism is characterized by the persistent testosterone-producing and reproductive functions disturbance, technical availability, non-toxicity to the other organs and systems. Availability of the model provides new opportunities for the development of approaches to treating diseases of the reproductive organs in men.

Keywords: hypogonadism, experimental model, testicles, testosterone, ischemia, infertility.

ВВЕДЕНИЕ

Мужской гипогонадизм – патологическое состояние, обусловленное уменьшением уровня андрогенов в организме или снижением чувствительности к ним. Первичный гипогонадизм вызван нарушением функции половых желез [1].

Андрогены играют ключевую роль не только в поддержании репродуктивной и сексуальной функций мужского организма. Прослеживается взаимосвязь между снижением уровня андрогенов и деминерализацией костей, саркопенией, нарушением метаболизма жиров, депрессией, повышен-

ной утомляемостью, угасанием когнитивных функций и пр. [2, 3]. Имеются данные о том, что снижение уровня тестостерона и увеличение 17β -эстрадиола коррелируют с повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний и сердечно-сосудистой смертности [4].

На сегодняшний день основным методом лечения первичного мужского гипогонадизма остается заместительная терапия андрогенами, которая имеет ряд противопоказаний и побочных эффектов. Успешно устраняя некоторые симптомы андрогенодефицита, экзогенный тестостерон подавляет сперматогенез и лишь усугубляет такое значимое проявление гипогонадизма, как мужская инфертильность [5]. Согласно европейским рекомендациям, в рамках лечения мужского бесплодия заместительная терапия тестостероном строго противопоказана [6].

Таким образом, существует потребность в поиске новых подходов к лечению первичного мужского гипогонадизма, нацеленных на восстановление собственного андроген-продуцирующего аппарата. Для исследований в этой области необходимо использование удобной экспериментальной модели первичного гипогонадизма. В литературе нами были найдены описания нескольких моделей, но каждая из них имеет свои недостатки: самопроизвольное восстановление функции (модель абдоминального крипторхизма [7]), токсичность для всего организма (бусульфановая модель [8, 9]), потребность в высокой технической оснащённости лаборатории, существенные временные и финансовые затраты (выведение линий животных с синдромом Клайнфельтера [10]) и т.д.

Целью нашей работы стало создание экспериментальной модели первичного мужского гипогонадизма, отвечающей следующим требованиям: стойкое нарушение гормонообразующей и репродуктивной функций, техническая доступность, отсутствие

токсического эффекта на другие органы и системы. Поставлена задача исследования ишемического воздействия на тестикулы как фактора, инициирующего гипогонадизм. Нарушение кровоснабжения семенников представляется нам актуальным для изучения, так как в научной литературе имеются данные о значимых морфологических изменениях и снижении антиоксидантного статуса даже при кратковременном ишемическом воздействии [11]. Еще одной задачей стал подбор оптимального срока ишемического воздействия, необходимого для инициации стойких нарушений функции семенников.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на крысах-самцах Wistar (n=153), возраст два месяца (соответствует массе 200-220 г). Ишемическое воздействие на тестикулы осуществляли путем временного наложения лигатуры на дистальную часть семенного канатика (*funiculus spermaticus*), что приводило к частичной окклюзии яичковой артерии (*arteria testicularis*). Данную манипуляцию проводили при помощи хирургической иглы и нити (Vicryl Plus, Johnson & Johnson).

Для определения минимального срока воздействия на семенники, приводящего к стойким нарушениям, накладывали лигатуру на правый семенной канатик на сроки одни, двое, трое, четверо суток (четыре группы животных). На разных сроках после снятия лигатуры проводили оценку массы и линейных размеров семенников, подвергнутых ишемии, в сравнении с контралатеральными интактными семенниками.

После определения необходимого срока ишемического воздействия новой группе экспериментальных животных проводили перевязку обоих семенных канатиков на установленный срок. Исследовали массу, линейные размеры семенников и уровень тестостерона через 48, 120, 134, 263 суток после инициации гипогонадизма. Также проводили тест на

Куликова Полина Александровна – лаборант лаборатории медико-физических исследований МОНИКИ, студентка факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова. **Филюшкин Юрий Николаевич** – науч. сотр. отделения детской хирургии МОНИКИ. **Куликов Дмитрий Александрович** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории медико-физических исследований МОНИКИ, науч. сотр. лаборатории изотопных исследований ИТЭБ РАН. **Федулов Александр Владимирович** – клинический ординатор отделения детской хирургии МОНИКИ. **Машков Александр Евгеньевич** – д-р мед. наук, профессор, руководитель детского хирургического отделения МОНИКИ. **Куликов Александр Владимирович** – д-р биол. наук, зав. сектором экспериментальной трансплантологии, ученый секретарь ИТЭБ РАН.

Для корреспонденции: Куликова Полина Александровна – 142290, Московская обл., г. Пущино, мкр «Д», 8-26, Российская Федерация. Тел.: +7 (915) 208 96 53. E-mail: polinikul@mail.ru

Kulikova Polina Aleksandrovna – laboratory worker of the Laboratory of Medical and Physics Research, MONIKI; student of the Faculty of Fundamental Medicine, MSU. **Filyushkin Yuriy Nikolaevich** – scientific worker, researcher of the Pediatric Surgery Department, MONIKI. **Kulikov Dmitry Aleksandrovich** – PhD, senior researcher of the Laboratory of Medical and Physics Research, MONIKI; researcher of the laboratory of Isotopic Investigations, ITEB of RAS. **Fedulov Aleksandr Vladimirovich** – Resident Medical Practitioner of the Pediatric Surgery Department, MONIKI. **Mashkov Aleksandr Evgen'evich** – MD, PhD, Professor, Head of the Pediatric Surgery Department, MONIKI. **Kulikov Aleksandr Vladimirovich** – MD, PhD, Head of the Experimental Transplantology Department, Scientific secretary, ITEB of RAS.

Correspondence to: Kulikova Polina Aleksandrovna – 26/8 "D", 142290 Pushchino, Moscow Region, Russian Federation. Tel.: +7 (915) 208 96 53. E-mail: polinikul@mail.ru

фертильность, для чего одного самца через 48 суток после инициации подсаживали к пяти половозрелым самкам (всего исследовали 5 самцов и 25 самок). Оценивали количество покрытых самок [12].

Измерение тестостерона проводили на иммуноферментном автоматическом анализаторе НТИ BioChem Analette. Все хирургические манипуляции выполняли под общей анестезией (Золетил и Ксилазин). Для забора крови и выделения семенников с целью взвешивания осуществляли эвтаназию экспериментальных животных путем введения летальной дозы анестетика – 200 мг/кг массы тела.

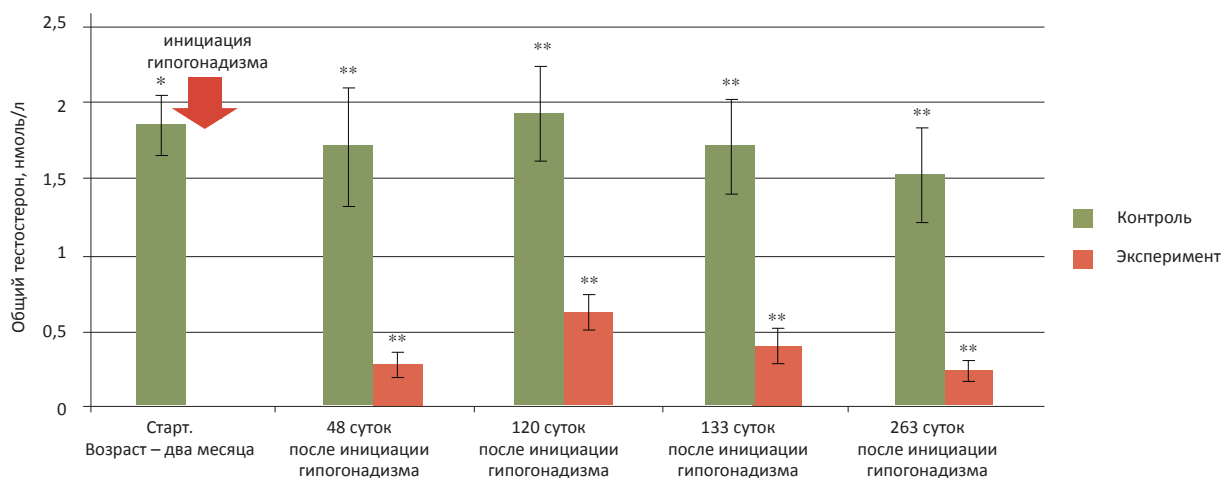
Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 21-23 °С. Они получали сбалансированный гранулированный корм, свободный доступ к питьевой воде. Исследования проводили по протоколам, одобренным Комиссией по этике Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН. Работа выполнена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС), в Приказе Минздрава СССР №755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Statistica 6.0, Microsoft Office Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через месяц после временного ишемического воздействия (одно-, двух-, трех-, четырехсуточная ишемия) у животных всех экспериментальных групп наблюдалось значимое уменьшение массы и линейных размеров исследуемых органов в сравнении с ин-

тактными семенниками – в 1,5-7 раз ($p < 0,05$). Минимальный срок окклюзии, после которого не отмечалось восстановления массы и размеров семенников на отдаленных сроках после инициации гипогонадизма (два месяца и более), – трое суток. Значимого снижения концентрации тестостерона не наблюдали ни в одной группе животных, что, вероятно, обусловлено воздействием только на один семенник. У животных, подвергнутых одно- и двухсуточной перевязке, уменьшение массы и линейных размеров семенников оказалось обратимым. Таким образом, в качестве минимально необходимого срока частичной окклюзии *a. testicularis* нами было принято трехсуточное воздействие. При такой длительности воздействия ни в одном из случаев не наблюдали некротических изменений тканей.

Дальнейшее изучение модели проводилось на животных, перенесших наложение лигатуры на семенной канатик на срок трое суток. Было показано, что масса и линейные размеры семенников крыс, перенесших двустороннюю перевязку семенного канатика, в 2-5 раз меньше, чем у интактных самцов того же возраста, на всех исследуемых сроках (через 48, 120, 134, 263 суток) после инициации гипогонадизма ($p < 0,05$). Однако очевидно, что масса семенников при изучении гипогонадизма является косвенным параметром, и основной интерес представляет уровень тестостерона исследуемых животных. Измерение общего тестостерона показало, что уровень этого гормона у экспериментальных животных значимо ниже такового у группы интактного контроля на всех исследуемых сроках – через 48, 120, 134, 263 суток после инициации гипогонадизма ($p < 0,05$) (см. рисунок). Тест на фертильность был отрицательным – ни одна из самок, подсаженных к экспериментальным животным, не дала потомства.



Уровень тестостерона на разных сроках после инициации гипогонадизма

Примечание: * n=10, ** n=5.

ОБСУЖДЕНИЕ

Помимо *a. testicularis* в состав семенного канатика входят другие важные анатомические структуры (семявыносящий проток, артерия семявыносящего протока, венозное лозовидное сплетение, нервы, лимфатические сосуды, остатки влагаллищного отростка). В настоящий момент мы не можем утверждать, что повреждение семенников в результате временной перевязки семенного канатика обусловлено исключительно нарушением кровотока по яичковой артерии. Тем не менее мы предполагаем, что при исследуемых кратковременных сроках воздействия именно ишемия семенников приводит к инициации гипогонадизма.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований создана модель первичного мужского гипогонадизма, характеризующаяся стойким снижением гормонпродуцирующей функции, инфертильностью, отсутствием токсического воздействия на организм экспериментальных животных, технической доступностью. Разработана методика лигирования семявыносящего протока, подобран минимальный срок, необходимый для инициации стойких нарушений функции семенников, показано негативное влияние временного лигирования семенного канатика на функционирование семенников. Наличие модели открывает новые возможности для разработки подходов к лечению заболеваний репродуктивных органов у мужчин.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» 2013 и 2014 гг., программы «УМНИК».

Литература

1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Фадеев В.В. Эндокринология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. [Dedov I.I., Mel'nichenko G.A., Fadeev V.V. Endocrinology. Moscow: GEOTAR-Media; 2007 (in Russian)].
2. Dohle G.R., Arver S., Bettocchi C., Kliesch S., Punab M., de Ronde W. Guidelines on male hypogonadism. Arnhem (The Netherlands): European Association of Urology; 2012.
3. Huhtaniemi I. Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment. *Asian J Androl* 2014;16(2):192-202.
4. Corona G., Rastrelli G., Monami M., Guay A., Buvat J., Sforza A., Forti G., Mannucci E., Maggi M. Hypogonadism as a risk factor for cardiovascular mortality in men: a meta-analytic study. *Eur J Endocrinol* 2011;165(5):687-701.
5. Kliesch S. Testosterone and infertility. *Urologe A* 2010; 49(1):32-6.
6. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R., Giwercman A., Kopa Z., Tournaye H., Krausz C. Guidelines on male infertility. Arnhem (The Netherlands): European Association of Urology; 2013.
7. Sukhikh G.T., Kamalov A.A., Poltavtseva R.A., Zarakii E.I., Plotnikov E.Y., Kirpatovskii V.I., Efremov E.A., Orlova E.V., Pavlova G.V., Okhobotov D.A. Effect of xenotransplantation of cell cultures enriched with stem and progenitor cells on hormonal profile of rats with abdominal cryptorchism. *Bull Exp Biol Med* 2008;146(4):517-21.
8. Zhang Z., Shao S., Meistrich M.L. Irradiated mouse testes efficiently support spermatogenesis derived from donor germ cells of mice and rats. *J Androl* 2006;27(3):365-75.
9. Meistrich M.L. Male gonadal toxicity. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53(2):261-6.
10. Swerdloff R.S., Lue Y., Liu P.Y., Erkkilä K., Wang C. Mouse model for men with klinefelter syndrome: a multifaceted fit for a complex disorder. *Acta Paediatr* 2011;100(6):892-9.
11. Yuluğ E., Türedi S., Karagüzel E., Kutlu O., Mentese A., Alver A. The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Surg* 2014;49(3):484-9.
12. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Киев: Выща школа, 1974. [Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakhariya E.A. Laboratory animals. Kiev: Vyscha shkola; 1974 (in Russian)].