



УКРАЇНА

(19) UA (11) 33253 (13) U
(51) МПК (2006)
G09B 23/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ПОРУШЕННЯ СОМАТОСТАТЕВОГО РОЗВИТКУ САМЦІВ

1

2

(21) u200802445

(22) 25.02.2008

(46) 10.06.2008, Бюл.№ 11, 2008 р.

(72) БРЕЧКА НАТАЛІЯ МИХАЙЛІВНА, UA, КОРЕ-
НЄВА ЄВГЕНІЯ МИХАЙЛІВНА, UA, СИРОТЕНКО
ЛАРИСА АНАТОЛІЙВНА, UA, КАРАЧЕНЦЕВ ЮРІЙ
ІВАНОВИЧ, UA, БОНДАРЕНКО ВОЛОДИМИР
ОЛЕКСАНДРОВИЧ, UA, ЗАЙЧЕНКО ГАННА ВО-
ЛОДИМИРІВНА, UA, БОЖКО ТЕТЯНА СТЕПАНІВ-
НА, UA, ЩЕРБАК ОЛЕНА ВАЛЕНТИНІВНА, UA(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРО-
БЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИ-
ЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇ-
НИ" (ДУ ІПЕП), UA(57) Спосіб моделювання порушення соматоста-
тевого розвитку самців за допомогою ендокринних
деструкторів, який відрізняється тим, що новона-
родженим самцям щурів одноразово на третю до-
бу після народження вводять підшкірно ретаболіл
у дозі 1 мг/кг маси тіла.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до андрології і може бути використана для вивчення порушень соматостатевого розвитку самців.

Особливе місце у структурі всіх порушень чоловічої статеві системи належить затримці статеві розвитку, яка негативно впливає на стан здоров'я та фертильність чоловіків. Можливість затримки статеві розвитку трансформуватися у чоловічий інфантилізм та гіпофертильність диктує необхідність нових підходів до прогнозування та профілактики цих порушень. Відомо про існування взаємозв'язку між репродуктивним статусом у дорослих та перебігом раннього критичного періоду статеві диференціації (людина III триместр вагітності, що відповідає 3-7 добі після народження у щурів, які є незрілонароджуваними самцями). Для експериментального вивчення порушень соматостатевого розвитку використовують різні моделі: неонатально вводять тестостерон та естрадіол [1-2], антиандрогени [4], глютамат натрію [4], пропілтіоурацил [5-6], тощо.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб моделювання пригнічення сперматогенезу у дрібних тварин за допомогою ендокринних деструкторів. В експерименті щурам внутрішньочеревинно вводять екзотоксиканти протягом 46 днів. Спосіб дозволяє проводити багаторазове введення екзотоксикантів не кожен день, а по мірі повного всмоктування із черевної порожнини. При достатній дозі екзотоксикантів гарантується стійкий позитивний результат [7].

Основним недоліком цього способу є те, що частина екзотоксиканту після всмоктування потра-

пляє в систему портальної вени і далі в печінку, де більшість його інактивується. Друга частина всмоктується і попадає через систему нижньої порожнинної вени в загальний кровообіг, в тому числі в сім'яники тварин. Співвідношення цих частин невідомо. Тому вказана модель є нестабільною. Недоліком є й ризик виникнення перитоніту внаслідок проколу кишків голкою шприца для внутрішньочеревного введення екзотоксиканту або місцевої дії токсиканту. Потреба у багаторазовому введенні екзотоксиканту також ускладнює спосіб.

Задача корисної моделі - розробка простої у виконанні, стабільної та патогенетичної моделі порушення соматостатевого розвитку самців.

Поставлена задача вирішується тим, що новонародженим самцям щурів одноразово на третю добу після народження вводять підшкірно ретаболіл у дозі 1 мг/кг маси тіла.

Технічний результат - розширення арсеналу експериментальних моделей для вивчення порушення чоловічого соматостатевого розвитку.

Для здійснення способу новонародженим самцям щурів на третю добу після народження вводять підшкірно ретаболіл у дозі 1 мг/кг маси тіла. В статевозрілому віці (100 доба) досліджуються такі показники як маса тіла, маса вентральної передміхурової залози (ВПЗ), сім'яних пухирців (СП), статеві члену (СЧ). Репродуктивна функція самців оцінюється за показниками генеративної та інкреторної функції сім'яників, для цього у всіх піддослідних тварин досліджують морфо-функціональні характеристики сперматозоїдів, які вимивають з епідидимісів. Для характеристики стану репродуктивної системи вивчається стан інкреторної функ-

(13) U

(11) 33253

(19) UA

ції сім'яників, який оцінюють за концентрацією в сироватці периферичної крові тестостерону (Т) та естрадіолу (Е₂) імуноферментним методом з використанням стандартних наборів. Визначається вміст фруктози (за методом Бокуняєвої) в СП, синтез якої є андрогензалежним процесом і залежить не тільки від кількості андрогенів, але й від стану чутливості клітин-мішеней до них. Реалізацію дії Т визначають за співвідношенням фруктоза/Т у еквівалентних одиницях.

Для мікроскопічного дослідження зразки яєчок та ВПЗ щурів різних експериментальних груп фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, обезводнювали у спиртах зростаючої міцності, заливали у целоїдин-парафін. Мікротомовані зрізи завтовшки 3-4мкм забарвлювали гематоксиліном та еозином. Морфологічний стан яєчок оцінювали кількісно за стандартною методикою [8-9]. На серійних зрізах підраховували за чотирьохкільною системою індекс сперматогенезу: фіксували у сі-

м'яних канальцях наявність сперматогоній, сперматоцитів I та II-го порядку, сперматид та сперматозоїдів. Індекс сперматогенезу визначали за формулою:

$$I = \frac{\sum A}{100},$$

де А - число стадій в кожному канальці,
100 - кількість підрахованих канальців.

Дослідження проводилися відповідно до національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985) [10].

Вилучали вказані органи, зважували.

Дані щодо впливу неонатальної обробки ретаболілом на стан показників статевих розвинутих наведені у таблиці.

Таблиця 1

Вплив ретаболілу на показники спермограми 100-добових щурів, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Група, кількість тварин	Стат. показник	Кількість спермій, млн/мл	Патологічні форми, %	Рухливість спермій, %	
				рухомі	нерухомі
1. Контроль, n=8		77,6±2,4	9,3±0,7	90,1±1,3	9,9±1,1
2. Неонатально розчинник, n=8	P ₁₋₂	69,4±8,3 >0,1	13,2±3,2 >0,1	78,0±3,5 <0,01	22,0±0,48 <0,001
3. Неонатально ретаболіл, n=8	P ₁₋₃	0 <0,001	0 <0,001	0 <0,001	0 <0,001

Наведені дані в табл.1 свідчать, що неонатальне застосування ретаболілу викликало стерилізацію самців щурів у віці 100 діб.

За даними гістологічного дослідження видно, що в сім'яних канальцях практично була відсутня клітинна диференціація епітеліальних клітин. Сперматогенез у цих тварин зупинявся на стадії сперматоцитів I порядку, а в поодиноких канальцях - на стадії сперматогоній. В сім'яних канальцях відмі-

чено збільшення кількості сперматогоній. В низці канальців сперматоцити були розташовані не рядами, а хаотично. Самі сім'яні канальці були дрібні, просвіт їх невеликий, іноді отвір не спостерігався зовсім (Фіг.1 та Фіг.2). Індекс сперматогенезу дорівнював 1,99 бала. Інтерстиціальні ендокринні дрібні, нечисленні, ядра їх часто були пікнотичні. Підтримуючих клітин було небагато.

Таблиця 2

Вміст фруктози в сім'яних пухирцях та вміст статевих гормонів в сироватці крові у 100-добових піддослідних тварин, що отримували неонатально ретаболіл, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Група, кількість тварин	Стат. показник	Фруктоза в СП, ммоль/орган	Співвідношення фруктоза/тестостерон	Т, нмоль/л	Е ₂ , нмоль/л	Співвідношення Т/Е ₂
1. Контроль, n=8		0,85±0,09	7,20±0,66	11,79±1,18	0,24±0,01	47,7±1,2
2. Неонатально розчинник, n=8	P ₁₋₂	0,75±0,08 >0,1	6,81±0,42 >0,1	10,96±0,36 >0,1	0,21±0,01 <0,001	52,3±0,9 <0,01
3. Неонатально ретаболіл, n=8	P ₁₋₃ P ₂₋₃	0,43±0,02 <0,001 <0,001	7,31±0,23 >0,1 >0,1	5,76±0,52 <0,001 <0,001	0,12±0,01 <0,001 <0,001	46,7±0,9 >0,1 <0,01

Встановлено, що у статевозрілих самців щурів, які неонатально отримували ретаболіл, спо-

стерігається зниження вмісту в крові як Т, так і Е₂ (табл.2) Це зниження відбувалося синхронно, про

що свідчить відповідний нормі рівень співвідношення Т/Е₂. На фоні зниження маси СП вміст фруктози в них знижувався синхронно з недостатністю продукції статевих гормонів. Співвідношення фру-

ктоза/тестостерон (показник реалізації андрогенної дії) залишалося в межах контрольних даних (див. табл.2).

Таблиця 3

Маса андрогензалежних органів самців щурів у віці 100 діб, яким у неонатальному періоді вводили ретаболіл, ($\bar{X} \pm S\bar{X}$)

Група, кількість тварин	Стат. показник	Маса, мг		
		вентральна частина передміхурової залози	сім'яні пухирці	Статевий член
1. Контроль, n=8		102,6±7,6	239,5±28,3	195,4±7,9
2. Неонатально розчинник, n=8	P ₁₋₂	108,8±7,5 >0,1	264,5±20,6 >0,1	197,4±7,5 >0,1
3. Неонатально ретаболіл, n=8	P ₁₋₃ P ₂₋₃	19,9±1,1 <0,001 <0,001	26,5±1,3 <0,001 <0,001	81,9±2,3 <0,001 <0,001

Неонатальна обробка ретаболілом викликала істотне зниження маси андрогензалежних органів у статевозрілому віці. Так, маса ВПЗ була нижчою у п'ять разів, а маса СП - майже в 10 разів, СЧ - в 3 рази за контрольні показники (табл.3).

Ці дані дозволяють стверджувати, що основним фактором порушення програми статевих органів розвитку, викликаного введенням ретаболілу у неонатальному періоді, є зниження синтезу статевих гормонів при збереженні механізмів андрогенізації організму та реалізації дії Т. Останнє дозволяє зробити висновки, що неонатальна модуляція анаболічних процесів введенням ретаболілу призводить до розвитку гіпогормональної моделі патології соматостатевого розвитку.

Література:

1. Influence of neonatal androgenization on the testicular steroidogenesis in the adult rat / H. Vanderstichele, W. Eechaute, E. Lacroix, I. Leusen // J. Steroid Biochem. - 1987. - Vol.28, №4. - P.421-427.
2. Никитин А.И. Гормоноподобные ксенобиотики и репродуктивная система // Пробл. репрод. - 2002. - №2. - С.5-15.
3. Influence of neonatal androgenization on the testicular steroidogenesis in the adult rat / H. Vanderstichele, W. Eechaute, E. Lacroix, I. Leusen // J. Steroid Biochem. - 1987. - Vol.28, №4. - P.421-427.

4. Lamperti A., Blaha G. Further observation on the effect of neonatally administered monosodium glutamate on the reproductive axis hamster // Biol. Reprod. - 1980. - Vol.22, №3. - P.687-693.

5. Cooke P., Meisami E. Early hypothyroidism in rat causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels // Endocrinology. - 1991. - Vol.129, №1. - P.237-243.

6. De Franca L., Hess R., Cooke P. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rat treated with propylthiouracil: Evidence that the Sertoli cell controls testis growth // Anat. Rec. - 1995. - Vol.242, №1. - P.57-69.

7. И.Н. Андрусишина Морфофункциональные изменения сперматогенеза при воздействии свинца и кадмия на самцов белых крыс. // Соврем. проблемы токсикологии. - 1999. - №2. - с.22-26.

8. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин: Метод, рекомендації / М-во охорони здоров'я України; Укладачі: І.П. Барилляк, Л.В. Неумержицька, Т.Ф. Бишовець та ін. - К., 2000. - 24с.

9. Морфологічні дослідження на етапі доклінічного вивчення лікарських засобів: Метод, рекомендації / М-во охорони здоров'я України; Укладачі: А.В. Матвієнко, Л.В. Степанова. - К., 2001. - 19с.

10. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. - 2003. - Т.8, №1. - С.142-145.

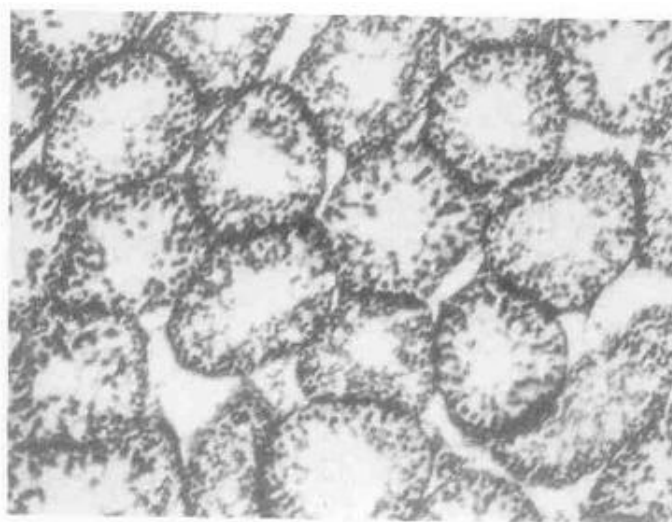


Fig.1

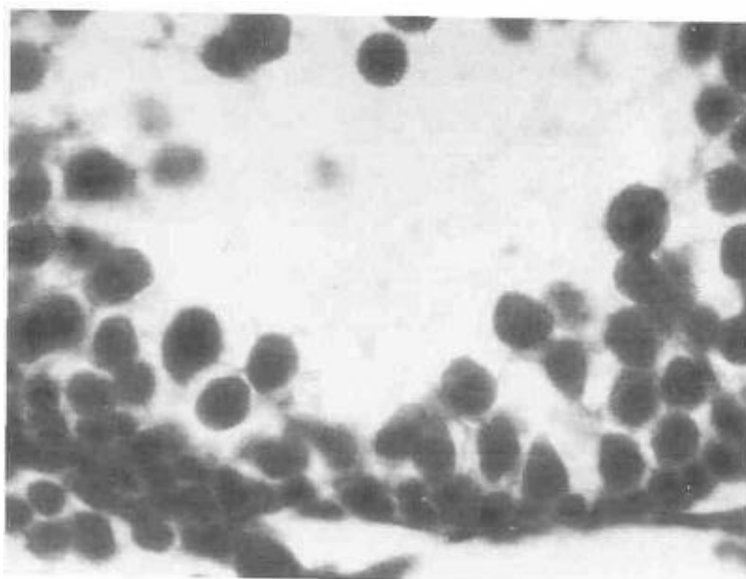


Fig.2