

УДК 612.616.31

О. Г. Резніков, В. М. Демченко, О. В. Нищименко

ВПЛИВ АНТИТЕСТИКУЛЯРНОЇ ЦИТОТОКСИЧНОЇ СИРОВАТКИ НА УТВОРЕННЯ ТЕСТОСТЕРОНУ В СІМ'ЯНИКАХ ЩУРІВ В НОРМІ ТА ПРИ ГІПОГОНАДИЗМІ, ЗУМОВЛЕНОМУ ВВЕДЕННЯМ ХЛОРИДУ КАДМІЮ

Раніше проведеними дослідженнями встановлено стимулюючий вплив малих доз антитестикулярної цитотоксичної сироватки (АТЦС) на обмінні процеси в сім'яниках старих щурів і гонадотропну функцію гіпофіза, що призводить до відновлення сперматогенезу та запліднювальної здатності [1, 3, 4, 9]. У чоловіків з різними формами імпотенції АТЦС (протестикулін) нормалізує добову екскрецію з сечею нейтральних 17-кетостероїдів та естрогенів [2, 6, 7, 8].

Патофізіологічні механізми терапевтичного ефекту АТЦС остаточно не з'ясовані. Одним з найважливіших факторів цього впливу, певно, є зростання функціональної активності клітин Лейдига. Підвищення продукції головного андрогенного гормона сім'яників — тестостерону могло б бути вірогідним критерієм впливу АТЦС на гормоноутворення в гонадах. Однак відомості про це в літературі відсутні.

Ми вивчали вплив стимулюючих доз АТЦС на вміст тестостерону і активність одного з ключових ферментів стероїдогенезу — стероїд- Δ^5 - 3β -ол-дегідрогенази в сім'яниках щурів, а також рівень кортикостерону плазми крові за нормальних умов та при експериментальному гіпогонадизмі, викликаному ураженням гонад хлоридом кадмію.

Методика досліджень

АТЦС з титром 1:320—1:400 в реакції зв'язування комплементу одержано у відділі імунології та цитотоксичних сироваток Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця шляхом імунізації кроликів гомогенатами сім'яників щурів 10—12 місячного віку [5]. Вплив АТЦС на гормональні та біохімічні показники вивчали в лабораторії нейрогормональної регуляції розмноження Київського інституту ендокринології та обміну речовин.

Досліди проведені на 216 щурах-самцях вагою 235—400 г, яких розподілили на шість однакових груп по 36 тварин у кожній. У частини щурів викликали гіпогонадизм одноразовою підшкірною ін'єкцією 0,03 М водного розчину хлориду кадмію (CdCl_2) в дозі 0,055 мг на 100 г ваги тварин за три тижні перед початком введення сироваток.

Строки дослідження і оптимальна доза CdCl_2 , що забезпечує значне пригнічення андрогенної функції поряд з мінімальними морфологічними змінами в клітинах Лейдига були обрані нами в результаті попередніх дослідів. При розробці експериментальної моделі гіпогонадизму ми виходили з властивості CdCl_2 у великих дозах викликати вибірковий некроз сім'яників у щурів [13].

АТЦС у розведенні 1:10 фізіологічним розчином вводили у хвостову вену в кількості 0,0005 мл цільної сироватки на 100 г ваги тіла — нормальним тваринам і 0,001 мл — тваринам з гіпогонадизмом. Курс експериментальної терапії складався з трьох ін'єкцій з дводобовими інтервалами між ними. Дослідження провадили через 24 год і 10 діб після останньої ін'єкції АТЦС. Для порівняння в аналогічних умовах вивчали дію нормальної кролячої сироватки (НКС).

Вміст тестостерону в сім'яниках визначали за методом, розробленим О. Г. Резніковим і В. Н. Демченко. У кожному аналізі використовували залози трьох щурів.

Метод складається з екстракції стероїдів етилацетатом, очищення екстракту від ліпідів, ізоляції тестостерону за допомогою двомірної тонкошарової хроматографії в системах «хлороформ-ацетон» (96 : 4) і «хлороформ-етанол» (98 : 2) на пластинках «Silufol UV₂₅₄». Елюцію тестостерону здійснювали метанолом, кількість стероїду визначали флюориметричним методом [11]. Розрахунок провадили зважаючи на вихід тестостерону—C¹⁴, який додавали до гомогенату сім'яників перед екскрецією. Радіоактивність вимірювали на β -спектрометрі Isoscap-300 («Nuclear—Chicago, США»).

Активність стероїд- Δ^5 -3 β -ол-дегідрогенази визначали модифікованим спектрофотометричним методом [10]. Цей метод ґрунтується на вимірюванні кількості андростендіону, що утворюється в гомогенаті тестикулярної тканини з дегідроепіандростерону в присутності НАД. Вміст андростендіону визначали по світопоглинанню на хвилі 240 нм. Активність ферменту виражали у мкг андростендіону, утвореного за 90 хв інкубації, з розрахунку на цілий сім'яник, грам залози і мг білка. Вміст білка в гомогенатах визначали за методом Лоурі.

Концентрацію кортикостерону плазми крові вимірювали за допомогою флюориметрії [12].

Результати досліджень та їх обговорення

Концентрація тестостерону в сім'яниках через 24 год після закінчення курсу ін'єкцій АТЦС виявила помітну тенденцію до зростання — на 50% у порівнянні з контрольним рівнем при розрахунку на 1 г залози. Таку саму спрямованість змін показників встановлено й для питомої активності стероїд- Δ^5 -3 β -ол-дегідрогенази (табл. 1). Проте збільшення цих показників не досягло необхідного рівня вірогідності.

Таблиця 1

Вага сім'яників, вміст тестостерону і активність стероїд- Δ^5 -3 β -ол-дегідрогенази в сім'яниках нормальних щурів після введення АТЦС і НКС

Група тварин	Стат. показники	Вага двох сім'яників (мг)	Вміст тестостерону (нанограми)		Активність стероїд- Δ^5 -3 β -ол-дегідрогенази		
			на 1 г залози	на сім'яник	на мг білка	на 1 г залози	на сім'яник
Через 24 години							
НКС	<i>M</i>	2345	43,0	157	5,9	384	426
	$\pm m$	156	7,4	22	0,4	34	57
АТЦС	<i>M</i>	2138	61,1	199	6,8	426	425
	$\pm m$	151	9,1	24	0,6	28	53
	<i>p</i>	<0,2	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Через 10 діб							
НКС	<i>M</i>	2560	77,2	289	6,4	401	466
	$\pm m$	112	12,8	36	0,8	46	38
АТЦС	<i>M</i>	2680	77,2	295	5,7	376	463
	$\pm m$	136	13,2	31	0,6	36	30
	<i>p</i>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Через 10 діб після останньої ін'єкції АТЦС спостерігався практично повний збіг величин, що відбивають вміст тестостерону та ензимну активність в сім'яниках дослідних і контрольних тварин.

Отже, при введенні АТЦС нормальним статевозрілим щурам, незначна стимулююча дія цієї сироватки в порівнянні з НКС виявляється лише в ранній строк після цитотоксичного подразнення. Такий помірний вплив АТЦС на утворення андрогенів в умовах непорушеної функції сім'яників узгоджується з уявленням щодо реактивуючого характеру біологічної активності сироватки [1].

Беручи до уваги, що стимулюючий вплив АТЦС на гормоногенез у гонадах має бути більш помітний на фоні зниженої андрогенної активності, а також з метою наблизитись до умов клінічного застосування, ми проводили наступні дослідження на моделі експериментального гіпогонадізму, що виникає у щурів після інтоксикації хлоридом кадмію. Для підсилення ефекту дози сироваток були збільшені вдвоє. У цих дослідках одержано значно демонстративніші результати, ніж у попередніх (табл. 2).

Таблиця 2

Вага сім'яників, вміст тестостерону і активність стероїд- Δ^5 - 3β -ол-дегідрогенази в сім'яниках щурів в нормі і при експериментальному гіпогонадізмі після введення АТЦС і НКС

Група тварин	Стат. показники	Вага двох сім'яників (мг)	Вміст тестостерону (нанограми)		Активність стероїд- Δ^5 - 3β -ол-дегідрогенази		
			на 1 г залози	на сім'яник	на мг білка	на 1 г залози	на сім'яник
Через 24 години							
Контроль (норма)	<i>M</i>	3260	59,1	266	3,27	242	412
	$\pm m$	88,1	8,7	41	0,33	17	38
CdCl_2	<i>M</i>	2550	16,9	69	4,05	314	362
	$\pm m$	81,1	2,9	7,3	0,3	33	30
$\text{CdCl}_2 + \text{НКС}$	p_1	$<0,01$	$<0,01$	$<0,001$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
	<i>M</i>	2440	41,5	131	3,02	219	237
	<i>m</i>	236,0	6,1	23	0,27	22	24
$\text{CdCl}_2 + \text{АТЦС}$	p_2	$>0,2$	$<0,01$	$>0,02$	$<0,01$	$<0,05$	$<0,01$
	<i>M</i>	2600	64,5	218	3,25	246	275
	<i>m</i>	153,1	11,9	35	0,47	40	45
	p_3	$>0,5$	$>0,1$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
	p_2	$>0,5$	$<0,01$	$<0,001$	$>0,1$	$>0,1$	$>0,1$
Через 10 діб							
Контроль (норма)	<i>M</i>	3100	87,0	239	3,38	252	357
	<i>m</i>	70,3	7,7	56	0,33	15	22
CdCl_2	<i>M</i>	2370	25,6	68	3,75	269	236
	<i>m</i>	231,9	5,5	10,4	0,95	61	58
$\text{CdCl}_2 + \text{НКС}$	p_1	$<0,02$	$<0,001$	$<0,02$	$>0,05$	$>0,05$	$=0,05$
	<i>M</i>	2400	67,0	210	3,39	250	297
	<i>m</i>	176,6	9,5	24	0,65	57	62
$\text{CdCl}_2 + \text{АТЦС}$	p_2	$>0,5$	$<0,01$	$<0,001$	$>0,2$	$>0,2$	$>0,2$
	<i>M</i>	2780	90,2	317	3,23	207	328
	<i>m</i>	126,9	14,3	54	0,52	48	63
	p_3	$>0,1$	$>0,2$	$>0,1$	$>0,05$	$>0,05$	$>0,05$
	p_2	$>0,2$	$<0,001$	$<0,001$	$>0,2$	$>0,2$	$>0,2$

Примітка. p_1 —вірогідність у порівнянні з контролем, p_2 —у порівнянні з тваринами, що одержували CdCl_2 ; p_3 —у порівнянні з тваринами, що одержували $\text{CdCl}_2 + \text{НКС}$.

Хлорид кадмію викликав гострий запалювальний процес у гонадах, після закінчення якого в них виникали стійкі функціональні порушення. Загальний стан тварин залишався задовільним, зберігався нормальний приріст ваги тіла. При цьому вага сім'яників через 28 днів після ін'єкції CdCl_2 знижувалась у середньому на 22%, а через 28 днів — на 24%,

що відповідає 24 год і десятиденному строкам після закінчення курсу ін'єкцій АТЦС і НКС.

Введення хлориду кадмію призводило до значного ослаблення процесів біосинтезу андрогенів в сім'яниках, що позначалось на вмісті тестостерону, який зменшувався понад три рази, та різкому зниженні загальної стероїддегідрогеназної активності. Через 38 діб активність ферменту падала до 66% від нормального.

Загальна ензимна активність зменшувалась, незважаючи на деяке зростання її в розрахунку на міліграм білка і грам залози, що можна розглядати як прояв компенсаторної реакції на токсичну дію хлориду кадмію і розвиток гіпогонадізму. Однак це зростання не може повністю компенсувати зменшення маси залозистої тканини. Порівняння ферментної активності з вмістом тестостерону в гонадах дає змогу твердити, що ослаблення андрогенної функції сім'яників при інтоксикації хлоридом кадмію є наслідком пригнічення процесів біосинтезу тестостерону.

Внаслідок експериментальної терапії гіпогонадізму ін'єкціями АТЦС вдалося досягти повної нормалізації андрогенної функції тестикул. Проявом цього було збільшення загального вмісту тестостерону та його концентрації до рівня, спостережуваного в контрольній групі інтактних щурів, причому ступінь такого підвищення мало чим відрізнявся через 10 днів у порівнянні з першим днем.

Слід відзначити, що однаковий за спрямованістю та значно менш виражений вплив на вміст тестостерону здійснює і НКС.

Не виявлено певної кореляції між змінами рівня тестостерону і стероїддегідрогеназної активності під впливом сироваток. Активність ферменту залишалась низькою через 24 год після закінчення курсу експериментальної терапії. Проте через 10 діб вона помітно підвищувалась до нормального рівня.

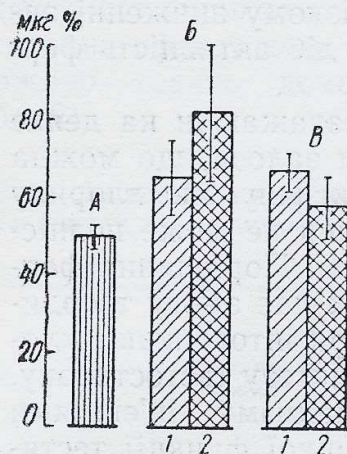
Ці дані про відсутність паралелізму у змінах вмісту тестостерону й активності стероїд- Δ^5 -3 β -ол-дегідрогенази не суперечать одне іншому. Сумнівно, щоб стимулююча дія АТЦС була вибірково спрямована на той чи інший фермент стероїдогенезу. АТЦС містить антитіла проти багатьох антигенних структур статевих залоз. Подразнюючи в малих дозах клітини, вона викликає, очевидно, загальну активацію обміну речовин у них. При цьому активність кожного з ферментів стероїдогенезу може незначно підсилюватись. Сумація ж цих невеликих зрушень на протязі багатоступінчастого процесу біосинтезу стероїдів призводить до помітного збільшення кількості кінцевого продукту — тестостерону.

Отже, нами вперше одержано прямі докази стимулюючого впливу малих доз АТЦС на утворення тестостерону в сім'яниках. Це є новим підтвердженням доцільності застосування АТЦС для лікування гіпогонадізму у чоловіків.

Оцінюючи механізми стимулюючого ефекту цитотоксичної сироватки, треба, мабуть, мати на увазі, що крім основного діючого джерела — антитіл, вона містить такі біологічно активні речовини як лімфокіни, гістамін, тощо. Присутність цих субстанцій може підсилювати специфічну дію АТЦС за рахунок неспецифічної активації метаболізму і стресового впливу. Як видно з одержаних нами даних, концентрація кортикостерону в плазмі крові нормальних щурів, що одержували АТЦС, значно превалює над нормальними показниками і помітно вища, ніж після введення НКС (див. рисунок). Підвищення функціональної активності кори надниркових залоз може також бути наслідком взаємодії антитіл з антигенами, що є загальними для сім'яників і надниркових залоз.

Стимулюючий вплив малих доз АТЦС на гормоноутворення в гонадах складається, певно, з специфічного (зумовленого присутністю анти-

тестикулярних антитіл) і неспецифічного компонента. Це припущення підкріплюється здатністю НКС здійснювати помітно менш виражений вплив, як щодо сім'яників, так і кори надниркових залоз. Сама лише процедура повторних ін'єкцій, які супроводжуються больовим відчуттям, теж має певне значення в активації секреції кортикостероїдів. Не виключено, що деяка роль у впливі НКС на сім'яники належить присутності в ній нормальних антитестикулярних антитіл.



Вплив НКС (1) і АТЦС (2) на вагу надниркових залоз і рівень кортикостерону плазми крові нормальних щурів ($M \pm m$).

По вертикалі — вміст кортикостерону в мкг %. А — норма, Б — через 24 год, В — через 10 діб.

Висновки

1. Застосування малих доз АТЦС у щурів з нормальною андрогенною функцією сім'яників викликає незначне і короткочасне підвищення вмісту тестостерону і питомої активності стероїд- Δ^5 -3 β -ол-дегідрогенази в сім'яниках в порівнянні з НКС. Це супроводжується активацією кори надниркових залоз.

2. Введення АТЦС тваринам з гіпогонадізмом, що виникає після інтоксикації хлоридом кадмію, призводить до нормалізації утворення тестостерону в сім'яниках.

3. Вплив НКС на гормональну функцію сім'яників і надниркових залоз нагадує за своєю спрямованістю АТЦС, але виражений меншою мірою.

Література

1. Барченко Л. И. Действие стимулирующих доз антитестикулярной и антиовариальной цитотоксической сыворотки на эксплантаты половых желез животных разного возраста.— Бюлл. exper. биол. и мед., 1968, 65, 3, 106—108.
2. Борисенко Ю. А., Нищименко О. В. Влияние стимулирующих доз антитестикулярной цитотоксической сыворотки на экскрецию половых гормонов при импотенции.— Врачебное дело, 1974, 6, 119—123.
3. Зеленская Т. М. Влияние антиовариальной и антитестикулярной цитотоксической сыворотки на функциональное состояние и морфологическую структуру яичников и семенников крыс в возрастном аспекте. Автореф. канд. дисс., Киев, 1967.
4. Зеленська Т. М., Нищименко О. В. Зміни гонадотропної функції гіпофіза старих щурів в умовах введення стимулюючих доз антитестикулярної цитотоксичної сироватки. Фізіол. журн. АН УРСР, 1969, 3, 396—399.
5. Нищименко О. В. Влияние иммунной антитестикулярной цитотоксической сыворотки на мужские половые железы при нарушении их гормональной функции. Автореф. канд. дисс., Киев, 1970.
6. Нищименко О. В., Гоноровський А. Г. Актуальні питання цитотоксикотерапії порушень функції статевих залоз.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1974, т. XX, 5, 621—627.
7. Нищименко О. В., Ильевич Н. В., Борисенко Ю. А. Лечебная эффективность протестикулина у больных с эндокринной формой импотенции.— Врачебное дело, 1975, 6, 33—35.
8. Спасокукоцький Ю. О., Нищименко О. В. Про функціональний стан деяких ендокринних залоз у хворих на спінальну і ендокринну форми порушення статевої функції у віковому аспекті.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1973, 1, 69—73.
9. Спасокукоцький Ю. О., Зеленська Т. М., Нищименко О. В. Взаємовідношення між статевими залозами і передньою часткою гіпофіза у старих самців

- журів при введенні малих доз (реактивуючих) антитестикулярної цитотоксичної сироватки.— *Фізіол. журн. АН УРСР*, 1970, 6, 741—744.
10. Coldman A. S. Production of congenital adrenocortical hyperplasia in rats by estradiol-17- β and inhibition of 30-hydroxy-steroid dehydrogenase.— *J. Clin. Endocrin. a Metabol.*, 1968, 28, 2, 231—238.
 11. Hübner W., Scholler K. Die fluorometrische bestimmung von testosterone, epitestosterone und androst-4-en-3,17-dion nach dünschichtchromatographischer isolierung and dem harn.— *Acta endocrinologica*, 1968, 58, 3, 353—363.
 12. Moor de P., Steeno O., Raskin M., Hendrix A. Fluorimetric determination of the plasma 11-hydroxycorticosteroids in man.— *Acta endocrinol. (Kbh)*, 1960, 33, 297—307.
 13. Webb M. Biochemical effects of cadmium chloride injury in the rat and mouse testis.— *J. Reprod. and Fert.*, 1972, 30, 1, 93—98.

Лабораторія нейрогормональної регуляції розмноження
Київського інституту ендокринології та обміну речовин;
відділ імунології та цитотоксичних сироваток

Надійшла до редакції
27.II 1976 р.

Інституту фізіології
ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ

A. V. REZNIKOV, V. V. DEMCHENKO, O. V. NISHCHIMENKO

EFFECT OF ANTITESTICULAR CYTOTOXIC SERUM ON FORMATION OF TESTOSTERON IN RAT TESTICLES UNDER NORMAL CONDITION WITH HYPOGONADISM INDUCED BY CADMIUM CHLORIDE

Summary

Direct evidence is obtained for a stimulating effect of the antitesticular cytotoxic serum (ATCS) on formation of testosterone in the rats testicles. In the rats with the normal androgenic function of the testicles application of ATCS small doses causes a slight and short-term increase in the content of testosterone and in specific activity of steroid- Δ^5 -3 β -ol-dehydrogenase in the testicle as compared to the normal rabbit serum (NRS). Administration of ATCS to animals with hypogonadism induced by cadmium chloride normalizes formation of testosterone in the testicles. NRS produces in the animals similar with ATSS effect on the hormonal function of testicles and adrenals but it is pronounced to considerably less extent.

Laboratory of Neurohumoral Regulation of Reproduction,
Institute of Endocrinology and Metabolism;
Department of Immunology and Cytotoxic Sera,
the A. A. Bogomoletz
Institute of Physiology, Academy of Sciences,
Ukrainian SSR, Kiev