

ВПЛИВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВАРИКОЦЕЛЕ НА АДГЕЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ НЕРВОВИХ КЛІТИН

О.В. Люлько¹, А.Л. Суварян^{1,2}, Г.О. Ушакова³

*Дніпропетровська державна медична академія¹
Дніпропетровська обласна клінічна лікарня ім. І.І. Мечникова²
Дніпропетровський національний університет ім. О. Гончара³*

Проблема репродуктивного здоров'я пов'язана зі значною кількістю безплідних шлюбів і поступовим їх зростанням. Однією із причин безпліддя є варикоцеле. Варикоцеле характеризується розширенням, застоєм і високим тиском у венах лавозидного сплетіння [1]. Зустрічається, за даними різних авторів, у 3,9-39,6% в дорослій чоловічій популяції, у хлопчиків до 15 років – в 0,7-16,2% [2-4]. В наших дослідженнях ця величина склала 12% [5]. Порушення сперматогенезу у дорослих хворих на варикоцеле виявлено у 20-83% спостережень [6,7]. Серед чоловіків, які страждають на безпліддя, хворі на варикоцеле складають від 19 до 41% [8,9]. Корекція варикоцеле призводить до покращення параметрів сперми у 50-80% хворих [10,11]; частота настання вагітності 31-71% [12,13]; значно збільшується частота випадків вагітності й народжуваності при внутрішньоматковій інсемінації [14]. У світлі цих даних, вважається, що варикоцеле впливає на народжуваність і є найбільш важливою причиною безпліддя, яку можна лікувати хірургічним шляхом. Механізми розвитку варикоцеле, які призводять до прогресивного погіршення сперматогенної, і в подальшому, гормональної функції яєчок, до цих пір невідомі. Поряд з безпосередніми факторами, такими як порушення тестикулярного кровотоку, підвищення температури, гіпоксія й оксидативний стрес, апоптоз, аутоімунні дефекти, рефлюкс і токсичний вплив метаболітів нирок або надниркових залоз, у порушенні сперматогенезу та гормональної функції яєчок важливу роль відіграє центральна нервова система (ЦНС), зокрема гіпоталамо-гіпофізарна система, котра є головним регулятором сперматогенезу й продукції тестостерону. Розвиток та фізіологічні функції чоловічої статеві системи знаходяться під контролем гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної (ГГГ) вісі. Визначення гонадотропінів та

тестостерону, як секреторних продуктів гіпофізу і статевих залоз, відповідно є першим кроком в діагностиці чоловічої репродуктивної системи [15]. На сьогодні є багатий арсенал експериментальних та клінічних даних в галузі нейроендокринології, але молекулярні механізми впливу варикоцеле на різні структури головного мозку залишаються невивченими.

За умов розвитку варикоцеле порушується функція клітин Лейдіга, а це призводить до зниження продукції тестостерону. Під час розвитку експериментального варикоцеле у собак на 8 тижні радіоімунний аналіз показав зниження рівня тестостерону й збільшення концентрації пролактину в сироватці крові [16]. Зниження концентрації тестостерону в обох яєчках виявили при створенні експериментального варикоцеле (ЕВ) зліва у щурів [17], у той час, як інше дослідження продемонструвало зниження тестостерону лише в одному яєчку [18]. При створенні одностороннього ЕВ у щурів Rajfer та співавтори [1] спостерігали рівномірне та двостороннє зниження тестостерону в яєчках, а також двох ферментів, що приймають участь в біосинтезі тестостерону (17,20-десмолаза та 17 α -гідроксилаза). Ці дані свідчать про те, що зниження концентрації тестостерону в сироватці крові тварин з експериментальним варикоцеле може бути обумовлено зниженням його синтезу. Раніше було зроблено припущення, що зниження тестостерону в яєчках при експериментальному варикоцеле у кролів може бути частково пояснено виснажуючою реакцією рівня тестостерону в сироватці крові після стимуляції хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ) [19], і зменшенням чутливості клітин Лейдіга до ХГЛ у щурів при ЕВ [20]. При мультицентричному дослідженні ВОЗ, що вивчає вплив варикоцеле на фертильність, було відзначено, що концентрація тестостерону у чоловіків з варикоцеле у

віці більше 30 років значно нижча, ніж у більш молодших чоловіків з варикоцеле; ця тенденція не спостерігалась у чоловіків без варикоцеле [21]. Дані результати вказують на детермінований, часозалежний вплив варикоцеле на функцію клітин Лейдіга. У нормі концентрація тестостерону має двофазну відповідь на ХГЛ з початковим піком на 1-4 год. та другим – на 36-96 год. Одне дослідження показало, що на початку пік тестостерону може бути незначним у чоловіків з варикоцеле, за рахунок пошкодження ферментів синтезу тестостерону, можливо, на рівні 17,20-ліази, що призводить до накопичення високої концентрації 17 α -гідроксипрогестерону у пацієнтів з варикоцеле після стимуляції з ХГЛ [22]. Зниження концентрації циркулюючого вільного тестостерону, підвищення естрадіолу, й підвищення рівня стероїд-зв'язуючого глобуліну спостерігали у пацієнтів з варикоцеле у порівнянні з контрольною групою [23]. Загалом ці дані вказують на те, що порушення концентрації вільного статевих стероїдів може бути результатом внутрішнього дефекту в яєчках деяких чоловіків з варикоцеле. Однак, причина виникнення ендокринопатії або ефекту зниження сперматогенезу у пацієнтів з варикоцеле залишається незрозумілою. Не дивлячись на статистично значуще зниження тестостерону у деяких хворих з варикоцеле, багато дослідників повідомляють, що фактичне значення знаходиться у межах норми. Це може бути пов'язано з гіперплазією клітин Лейдіга, яка компенсує зниження синтезу тестостерону цими клітинами [24,25]. Інші дослідники повідомляють про відсутність суттєвих відмінностей в концентрації ФСГ, ЛГ, тестостерону та естрадіолу в периферичній і тестикулярній венозній крові у чоловіків з і без варикоцеле [26-28]. Крім того, зворотність гормональної дисфункції після варикоцеле залишається спірною. Деякі дослідники показали, що ніяких суттєвих відмінностей в концентрації тестостерону в перед- і післяопераційному періоді не виявлено [29,30]. Інші повідомляють про значні зміни в концентрації тестостерону в сироватці крові, особливо у пацієнтів з низьким рівнем перед операцією [31,32]. У деяких дослідженнях показують, що для визначення функціональних здібностей клітин Лейдіга тест стимуляції гонадотропінів гонадотропін релізінг гормоном (ГРГ) більш чутливий, ніж стимуляція ХГЛ. У чоловіків з варикоцеле має місце надмірне реагування ЛГ і ФСГ

за умов інфузії 4г ГРГ [33]. Виразна реакція була встановлена у чоловіків з олігозооспермією, у котрих концентрація сперматозоїдів була від 11 до 30x10⁶/мл. Дуже важливо ще й те, що у чоловіків з виразною гонадотропною відповіддю на ГРГ покращилися параметри сперми після варикоцелектомії, незалежно від ступеня олігозооспермії. Hudson та співавтори [34] показали, що нормалізація відповіді ЛГ на ГРГ після варикоцелектомії є прогностичним фактором у підвищенні народжуваності після операції: тобто нормалізація корелює з більш високою частотою вагітності. Ці дані свідчать про те, що варикоцеле впливає на гіпоталамус-гіпофіз-гонадальну систему, і що у чоловіків з варикоцеле й порушеною функцією клітин Лейдіга при варикоцелектомії більш виражені покращення.

На сьогодні особливо цікавими є дослідження взаємовідносин між концентрацією статевих гормонів в плазмі крові та індукованою активністю мозку. Стероїди, шляхом регулювання діяльності нейронів, мають чисельний вплив на функції головного мозку. Показано, що естрогени, прогестерони й андрогени впливають на ріст і функціонування нейронів *in vitro* [35]. Крім впливу на постсинаптичні рецептори, стероїди модулюють продукцію медіаторів, таких як глутамат, ГАМК, ацетилхолін, норадреналін, дофамін та 5-НТ [36]. Такі чисельні ефекти відбуваються в ділянках мозку, які відповідають за процеси навчання, пам'яті, емоцій, мотивації, руху та пізнання. У попередніх дослідженнях встановлений позитивний зв'язок рівня пролактину та тестостерону в плазмі крові з діяльністю мозку (особливо мозочку) під час розвитку сексуальної поведінки [37-39]. Рівень андрогенів у крові забезпечує регуляцію підтримки нормальної структури гіпокампу. Дослідження на щурах і мавпах показали, що видалення яєчка знижує щільність синаптичних контактів на дендритних шипиках CA1 пірамідних нейронів, що впливає на когнітивні функції й стан настрою [40,41]. Велика кількість робіт проведена в рамках дослідження впливу статевих гормонів під час критичних періодів розвитку мозку [42-46], визначені головні механізми, за допомогою яких стероїдні гормони викликають постійні зміни в структурі та функціонуванні мозку під час статевої диференціації.

Однак, на сьогодні немає інформації про те, яким чином розвиток варикоцеле впливає на рівень адгезивних білків у різних відділах мозку

щурів за умов експериментального варикоцеле, зокрема, в гіпоталамо-гіпофізарній системі, як головному регуляторі сперматогенезу й продукції тестостерону.

Адгезія клітин є винятково важливою в процесах формування і розвитку живих організмів у нормі й при патологічних змінах. Взаємозв'язок між нейронами в центральній нервовій системі (ЦНС) відбувається за допомогою нейрональних молекул клітинної адгезії (НМКА, neural cell adhesion molecule – NCAM), що відносяться до імуноглобулінового суперсімейства і здійснюють кальційнезалежну адгезію [47]. МКА, у тому числі нейрональні, відіграють ключову роль у процесах морфогенезу і розвитку організму. НМКА виявлена на плазматичних мембранах нейронів і астрогліальних клітин [48]. Експресія НМКА виявлена також на міоцитах у зоні нервово-м'язового контакту, на лімфоцитах, органах ендокринної, репродуктивної систем. Рівень НМКА зростає при патологічних станах різного генезу [49]. Молекула адгезії нервових клітин відіграє важливу роль у синаптичній пластичності не тільки ембріонального, але і дорослого мозку. Доведена участь цього білку у таких важливих процесах як міграція, диференціація нервових клітин та відростання нейритів. Завдяки своїм адгезивним властивостям НМКА здатна регулювати розмір синаптичної щілини, що, в свою чергу, є одним з чинників, який визначає ефективність передачі нервового імпульсу. Останнім часом також приділяється велика увага здатності НМКА (зокрема його розчинних форм) впливати на процеси пластичності через запуск каскадів внутрішньоклітинних подій [49]. Нейроспецифічний білок клітинної адгезії існує у вигляді трьох основних ізоформ з молекулярними масами 180, 140 та 120кДа. Розподіл білка адгезії нервових клітин у структурах головного мозку дорослого організму є нерівномірним. Найвищий вміст цього білка виявлений в гіпокампі та смугастому тілі, найнижчий – у середньому мозку та варолієвому мості. Рівень та внутрішньоклітинний розподіл НМКА у структурах головного мозку щурів залежить від статі тварин (у корі великих півкуль самок вміст мембранної форми є вищим у 2,9 рази). Дані про статеві відмінності у розподілі НМКА свідчать про існування механізму гормональної регуляції адгезивних взаємодій клітин ЦНС [50].

Нейрон-гліальні, гліально-нейрональні і

гліально-гліальні взаємодії залучені до модуляції активності нейронів і синаптичної передачі, що мають відношення до репродуктивної системи. Гліальні клітини відіграють важливу роль у нейроендокринному регулюванні та беруть участь у статевій диференціації нейронів мозку, що відповідає за контроль нейроендокринної репродуктивної продукції. У період статевого дозрівання, зміни в морфології та хімії астроцитів та таніцитів в гіпоталамусі впливають на дозрівання нейронів, що контролюють секрецію гоналіберину. Статеві гормони регулюють гліальну пластичність прямих та зворотних ефектів та інші ендокринні сигнали за допомогою адгезивних молекул, які впливають на функції глії та гліально-нейрональну взаємодію [51].

Окрім нейрональних молекул клітинної адгезії важливу роль відіграє фібронектин – глікопротеїд клітинних мембран. Адгезивні білки позаклітинного матриксу, до яких відноситься фібронектин, звичайно містять домени зі специфічними сайтами зв'язування з іншими макромолекулами матриксу, а також рецепторами на клітинній поверхні. Фібронектин – димерний філаментний глікопротеїн, який складається з двох майже ідентичних субодиниць із загальною молекулярною масою 440кДа. Розрізняють три форми фібронектину: білок плазми (розчинна форма), білок клітинної поверхні (олігомерна форма), позаклітинний філаментний білок (полімерна форма) [52]. У людини утворюється близько 20 різних мРНК фібронектину, кожні з яких кодують різні субодиниці, у складі яких є домени, що відповідають за зв'язування з різними макромолекулами позаклітинного матриксу (наприклад, колагену, гепарину), а також зі специфічними рецепторами на поверхні різних типів клітин (основним елементом рецептор-зв'язуючих повторів є RGD-последовність). Альтернативний сплайсинг дозволяє клітині також утворювати найбільш необхідну для даної тканини та даного етапу розвитку форму фібронектину [53,54].

Фібронектин також знайдений у сім'яній рідині. У еякулятах, відібраних від різних чоловіків, концентрація широко варіює (від 0,0079 до 1,4886мг/мл). Передбачено, що фібронектин продукують статеві залози, але його роль, функції, ефект на сперматозоїди та на фертильність залишаються невідомими. Імунофлюоресценцією і мікроскопією виявили відносно великий вміст фібронектину на головах сперматозоїдів. Фібро-

нектин в спермі знаходили між 0.8 і 1000мкг/мл у пацієнтів з безпліддям. Була істотна зворотня кореляція між рухливістю сперми й фібронектином у хворих на оліго-астено-тератозооспермію. Очищений плазмовий фібронектин додавався в різних концентраціях до підготовлених живих сперматозоїдів. У концентраціях з 0,18 до 0,5мг фібронектину на мг еякуляту – жодних рухливих сперматозоїдів не знайдено. Причина патологічно високого рівня фібронектину не визначена. Припускають, що збільшення фібронектину пов'язане з запальним процесом. Проте, фібронектин, як білок гострої фази, систематично визначається і не обов'язково свідчить про захворювання уrogenітального тракту. Високі показники фібронектину (0,29мг/мл) підвищують можливість запалення, але зміни концентрації фібронектину може сприяти ряд різних факторів. Результати досліджень показали, що на функцію сперми, ймовірно, впливають дві функціонально різні форми фібронектину. З одного боку, фібронектин локалізований у пост-акросомальному регіоні в екваторіальній групі фібронектину. Вона входить до складу мембран статевих клітин, що розвиваються протягом сперматогенезу і є передумовою для спермояєчкової взаємодії. З іншого боку, фібронектин, що досліджувався, був продуктом секреції статевих залоз і потім взятий зі сперми після еякуляції. Аналізи показали, що концентрація фібронектину у пацієнтів з варикоцеле не підвищилась, тому фібронектин може бути виключеним, як причина безпліддя пацієнтів. Висока концентрація фібронектину у сімені пов'язана зі зменшенням рухливості сперматозоїдів. У випадках варикоцеле, концентрація фібронектину у сім'яній рідині не є основною причиною порушення функції сперми, але вимір фібронектину може бути рекомендований, як додатковий діагностичний тест для пацієнтів із нез'ясованими причинами безпліддя [55,56].

Метою цієї роботи є дослідження молекулярного рівня адгезивних білків у різних відділах мозку та тканинах щурів за умов експериментального варикоцеле.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для створення моделі варикоцеле ми використовували 40 самців щурів лінії Вістар масою 160-320г. Тварини утримувалися в умовах постійної температури (24С), вологості і світла (12 год. – світло, 12 год. – темрява). Під час

операції дотримувалися вимог асептики й антисептики. Для загальної анестезії використовували внутрішньочеревне введення тіопенталу натрія із розрахунку 40мг\кг ваги тіла.

Із 40 тварин – 5 щурів склали контрольну групу (1), 5 щурам була проведена псевдооперація (тільки виділена вена без перев'язки) (2). 30 щурам викликали експериментальний варикоцеле шляхом часткової перев'язки лівої ниркової вени за рекомендаціями Turner [57]. Із цієї групи 10 щурів були виведені із експерименту через 6 тижнів (3), 10 – через 12 тижнів (4), 10 – через 18 тижнів (5). По закінченні відповідного терміну, тварини виводилися із експерименту під легким наркозом. Надалі для дослідження були отримані сироватка крові та білкові фракції з різних відділів мозку (гіпокамп, таламуса/гіпоталамуса, мозочка) та органів (яєчок, придатків, лівої та правої нирки, лівої й правої надниркової залози) піддослідних щурів. Усі процедури проводили при температурі +40С.

Кількісне визначення НМКА у фракціях тканин проводили згідно зі стандартною методикою конкурентного твердофазного імуноферментного аналізу з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл до НМКА та відповідних стандартів [58]. Концентрація НМКА представлена в мкг в 1мл дослідної фракції, що була отримана із 100мг тканини. Визначення концентрації тестостерону в сироватках крові дослідних тварин проводили за допомогою набору реагентів для ІФА (АлкорБіо, Санкт-Петербург, Росія).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм Statwin та Excel, використовуючи t-критерій Ст'юдента та U-критерій Уілкоксона (Манна-Уїтні). Вірогідним вважали результати, якщо $p < 0,05$ [59].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження рівня тестостерону в сироватці крові досліджених тварин свідчать про те, що після 6 тижнів з часу проведення операції, під час розвитку варикоцеле відбувається вірогідне зниження рівня тестостерону (рис. 1).

Зменшення синтезу тестостерону пов'язане з порушенням функцій клітин Лейдига. А також із зниженням синтезу ФСГ, який опосередковано впливає на продукцію тестостерону.

Тестостерон

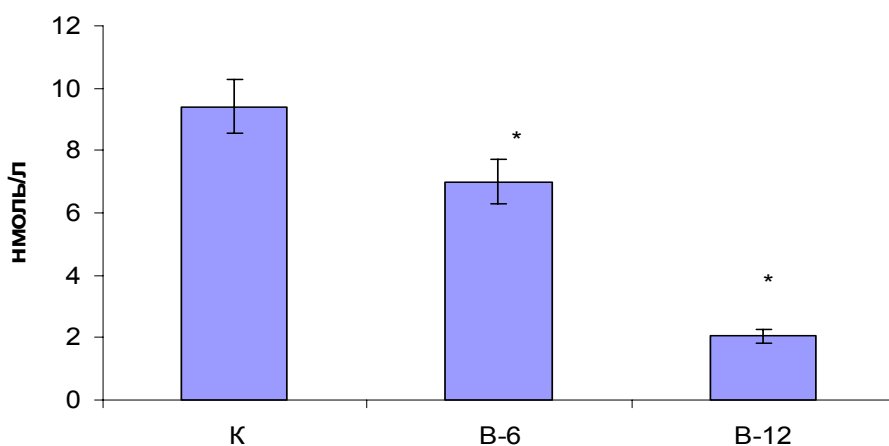


Рис. 1. Вміст тестостерону в сироватці крові щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (К – контрольна група; В-6 – 6 тижнів після операції (перев'язка лівої ниркової вени); В-12 – 12 тижнів після операції; n= 10; * - p<0,001)

Дослідження розподілу нейрональної молекули клітинної адгезії в мозочку (відділу мозку, що контролює процеси руху та орієнтації у просторі) щурів, у котрих розвивалося варикоцеле показало достовірне підвищення роз-

чинної форми НМКА у період 12-18 тижнів після операції відповідно 1,3мкг/мл – на 12 тижні після операції й 1,6мкг/мл – на 18 тижні після операції у порівнянні з контролем – 0,8мкг/мл (рис. 2).

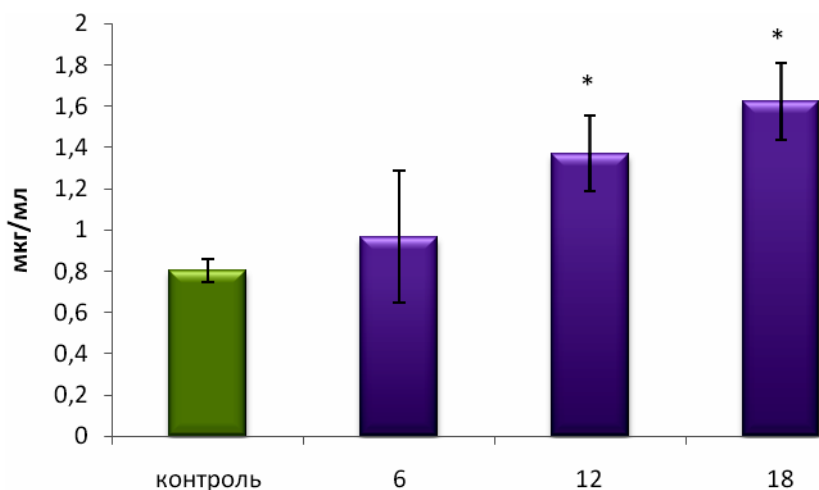


Рис. 2. Вміст розчинної форми НМКА у мозочку щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- p<0,05; n=10), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

Можливо, підвищення вмісту розчинної форми НМКА є наслідком процесів протеолізу, а на функціональному рівні пов'язане з необхідністю підвищення пулу розчинної НМКА, як сигнальної молекули. Розчинна форма НМКА здатна впливати на процеси пластичності через

запуск каскадів внутрішньоклітинних подій та бере участь у процесах трансдукції сигналу.

Слабка достовірність зниження вмісту мембранної форми НМКА (p<0,3) від контрольного значення 53,3мкг/мл до 31,5мкг/мл у період 6 тижнів після операції може бути викликана

підвищенням окисного стресу та відповідно зниженням синаптичної пластичності (рис. 3). У

період 12-18 тижнів вірогідних змін мембранної форми НМКА у мозочку не було зареєстровано.

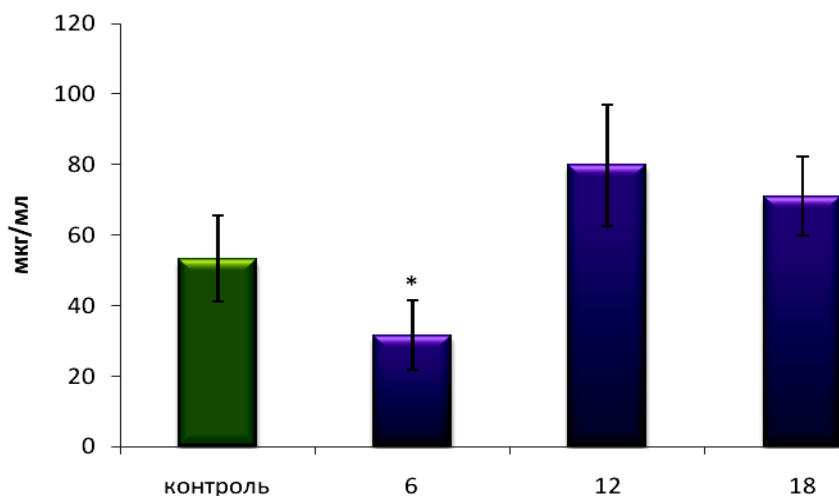


Рис. 3. Вміст мембранної форми НМКА у мозочку щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- $p < 0,3$; $n=10$), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

У гіпокампі (що контролює процеси навчання, пам'яті, емоції) також спостерігається підвищення низької достовірності розчинної форми НМКА у період 12-18 тижнів після операції від 0,6мкг/мл до 1,6мкг/мл – 12 тижнів після операції та 0,9мкг/мл – 18 тижнів після операції (рис. 4). Підвищення вмісту мембранної форми є високо достовірним та зростає від 61,7мкг/мл, що є контрольним значенням, до 178,5мкг/мл – 12 та 150,1мкг/мл – 18 тижнів після операції

(рис. 5). Кластери молекул НМКА активно пересуваються вздовж мембрани нейронів гіпокампа. Активний транспорт кластерів НМКА вздовж нейронів сприяє швидкому накопиченню молекул НМКА в зонах первинних контактів між нейронами, що є важливою умовою формування функціонально активних синапсів. Підвищення вмісту НМКА, можливо, пов'язане із компенсаторним механізмом утримання синаптичних контактів за умов дефіциту статевих гормонів.

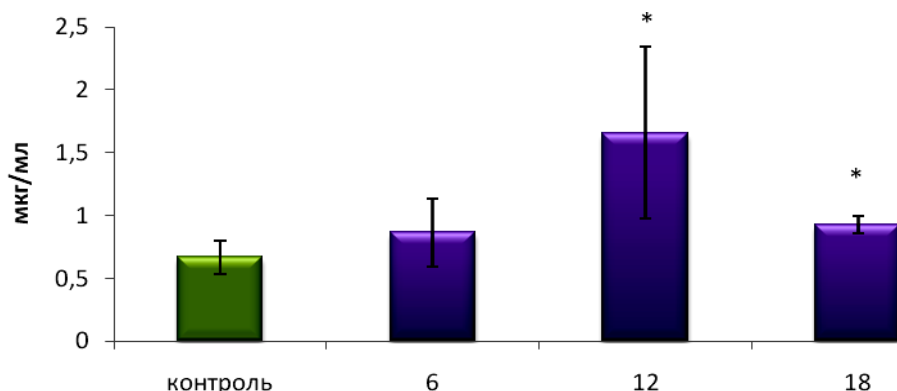


Рис. 4. Вміст розчинної форми НМКА у гіпокампі щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- $p < 0,3$; $n=10$), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

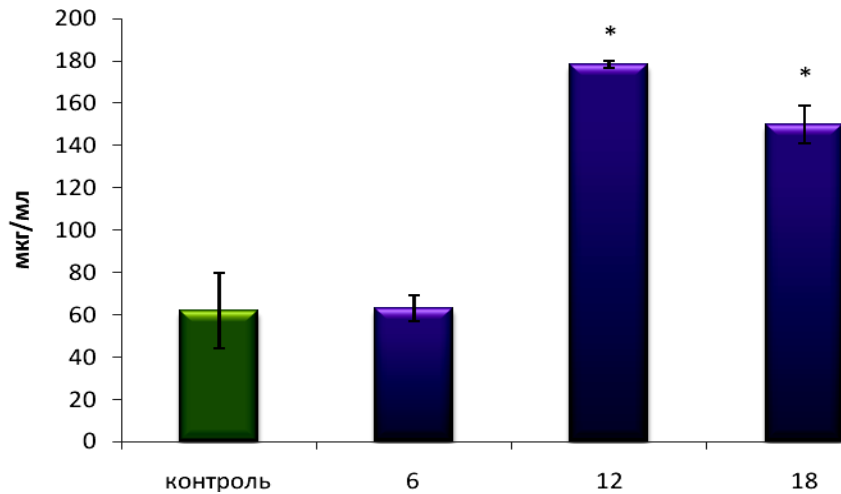


Рис. 5. Вміст мембранної форми НМКА у гіпокампі щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- $p < 0,03$; $n = 10$), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

У таламусі/гіпоталамусі, навпаки, спостерігається достовірне зниження розчинної форми НМКА (від 2,3 мкг/мл (контроль до 1,5 мкг/мл) – 12 та 1,6 мкг/мл – 18 тижнів після операції) та значне підвищення мембранної (від 57,6 мкг/мл (контроль до 155,6 мкг/мл) – 12 та 134,3 мкг/мл –

18 тижнів після операції), що може свідчити про перерозподіл загальної кількості білка між розчинною та мембранною формами НМКА у бік мембранної, яка відповідає за адгезивні процеси (рис. 6,7).

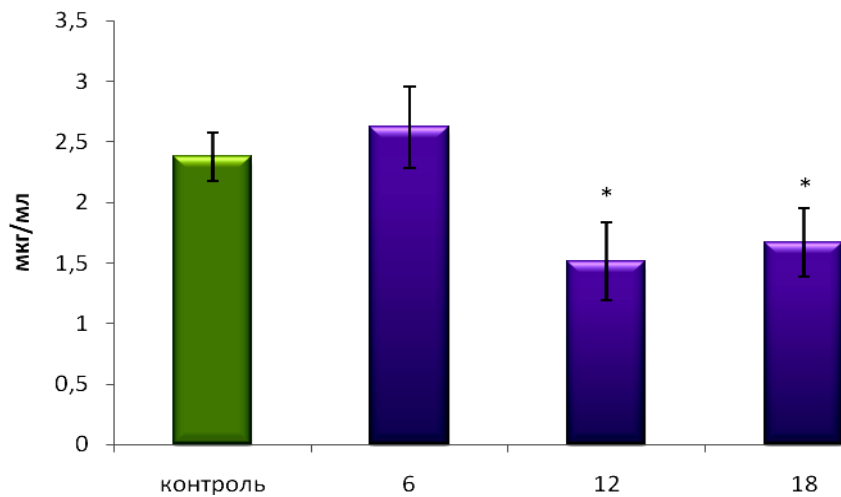


Рис. 6. Вміст розчинної форми НМКА у таламусі/гіпоталамусі щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- $p < 0,09$; $n = 10$), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

НМКА регулює розмір синаптичної щільності, що є чинником ефективності передачі нервового імпульсу. Гіпоталамус пов'язує нервову систему з ендокринною, а таламус контролює вироблення гормонів гіпофізом. За умов розвитку варикоцеле порушується синтез тестостерону, збільшення мембранної форми НМКА

вказує на формування дуже щільних контактів у таламусі/гіпоталамусі при дефіциті тестостерону, що можливо забезпечує регулювання пластичності нервової тканини за умов зниження синтезу нейропептидів, що контролюється стероїдами.

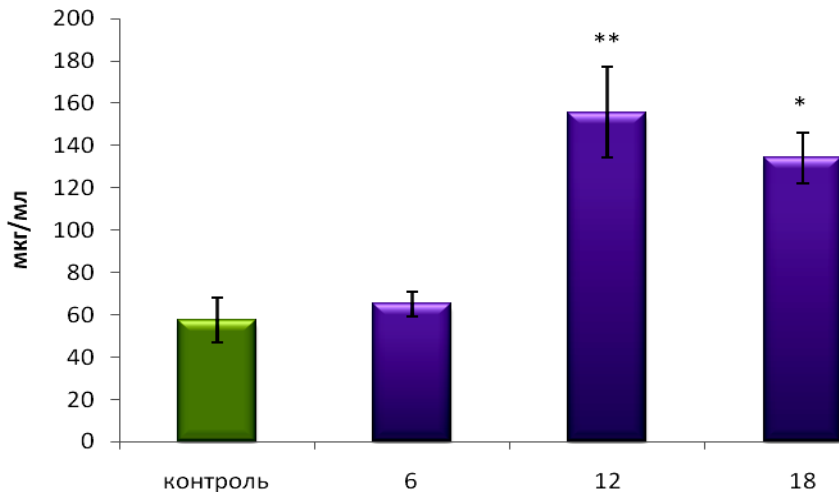


Рис. 7. Вміст мембранної форми НМКА у таламусі\гіпоталамусі щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- $p < 0,005$; ** - $p < 0,02$; $n=10$), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

Концентрація розчинної форми нейрональних молекул клітинної адгезії дуже низька у периферійній нервовій системі, що не дає змогу достовірно визначити її. Тому у периферійних органах проводилось визначення кількості тільки мембранної форми НМКА, що реєструвалося імуноферментним аналізом. НМКА міститься в нервових сплетеннях та нервових волокнах навколо органів репродуктивної системи. Статеві гормони впливають на формування синапсів в тих ділянках нервової системи, які беруть участь у регуляції репродуктивної поведінки, а також в ділянках, які регулюють синтез і виділення гормонів. Катехоламіни в тестикулярному руслі підсилюють циркуляторні розлади яєчка, збільшують проникність капілярів і разом з серотоніном пригнічують секрецію тестостерону. Дос-

товірно та досить сильне зниження синтезу тестостерону впливає на функціонування яєчок [60].

Так як від статевих гормонів залежить кількість дендритів і їх розгалужень в нейроні й кількість синаптичних зв'язків, які виникають між нейронами, можна припустити, що шляхом підвищення синтезу НМКА у лівому яєчку від контрольного значення – 0,18мкг/мл до 0,27мкг/мл по закінченні 6 тижнів після операції, створюються умови для більш ефективної передачі нервового імпульсу (рис. 8). НМКА призводить до активації внутрішньоклітинних шляхів передачі сигналу. Це пояснює залежність підвищення мембранної форми НМКА, як у таламусі\гіпоталамусі, так і у лівому яєчку у період 6 тижнів після операції.

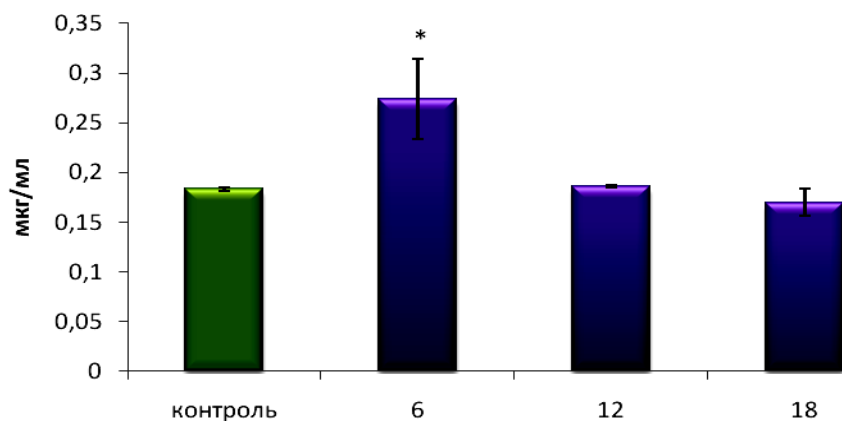


Рис. 8. Вміст мембранної форми НМКА у лівому яєчку щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- $p < 0,2$; $n=10$), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

Функціонування яєчок тісно пов'язане з наднирковими залозами. Так як останні теж виробляють тестостерон, то рецептори яєчок при варикоцеле, приймаючи високий рівень гормону з надниркових залоз, знижують свою функцію, не тільки з вироблення гормонів, а й з вироблення сперматозоїдів.

Гіперсекреція стероїдних гормонів надниркових залоз при нестабільній нирковій гіпертензії здійснюється циклічно. Падіння тиску в системі ниркових вен призводить до зниження звільнення стероїдів. Залежно від цього рівень тестостерону, кортизолу, прогестерону, ФСГ, ЛГ і інших гормонів у периферичній крові, як і в тестикулярній вені, постійно змінюється аж до нормальної концентрації. При стабільній гіпертензії вміст стероїдних гормонів не підвищений, оскільки вони з надниркових залоз відразу потрапляють в печінку, де інактивуються. Крім того, включаються й інші механізми компенсації,

зокрема змінюється активність правої надниркової залози. Порушень сперматогенезу в таких випадках не спостерігається. Сперматогенна функція яєчок також не змінюється у випадках, коли виникнення варикоцеле не пов'язано з нирковою гіпертензією. Таким чином, етіопатогенез цього захворювання повністю зв'язується з обструктивними ураженнями лівої ниркової вени [61].

НМКА впливає на регулювання та підтримку структурних змін. Зниження рівня мембранної форми НМКА у надниркових залозах від контрольного значення, яке сягає 0,51мкг/мл до 0,44мкг/мл (рис. 9) по закінченні 6 тижнів після операції може бути викликано підвищенням окисного стресу і змінами синаптичної пластичності, а також уповільненням процесів метаболізму. Але з часом рівень НМКА у надниркових залозах стабілізується.

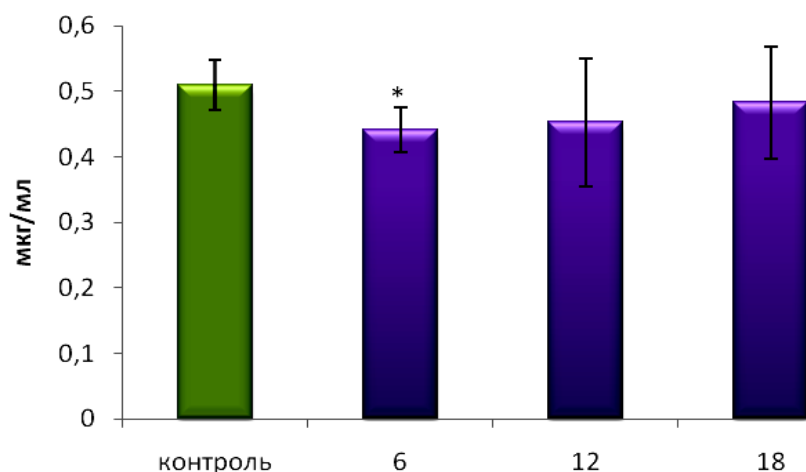


Рис. 9. Вміст мембранної форми НМКА в надниркових залозах щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- $p < 0,3$; $n = 10$), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

Проведений аналіз нейрональних молекул клітинної адгезії у сироватці крові дослідних щурів вказує на неможливість диференціювати різницю між контрольними та експериментальними тваринами, тому що залишковий рівень цих білків не змінювався.

Додатково були проведені дослідження рівня плазменого фібронектину за умов розвитку експериментального варикоцеле у щурів. Спостерігалось достовірне підвищення вмісту фібронектину у період 6-12 тижнів після операції від контрольного рівня 226,22мкг/мл до 302,47мкг/мл – 6 тижнів після операції та 309,46мкг/мл – 12 тижнів після операції, що

пов'язано із застоєм крові при варикоцеле (рис. 10).

Вміст фібронектину може бути показником формування тромбу, початку внутрішнього судинного згортання крові [62]. Також фібронектин відіграє важливу роль у розвитку патологічних процесів та діагностиці багатьох захворювань [63]. Важливе значення при цьому надається опсонічній функції цього білку та його участі в репарації сполучної тканини [64]. Виходячи з цього, підвищення фібронектину також обумовлено і тим, що фібронектин бере участь у процесах загоєння [63]. Дослідження зміни складу та кількості фрагментів фібронектину проводилося за допомогою імуноблотингу (рис. 11).

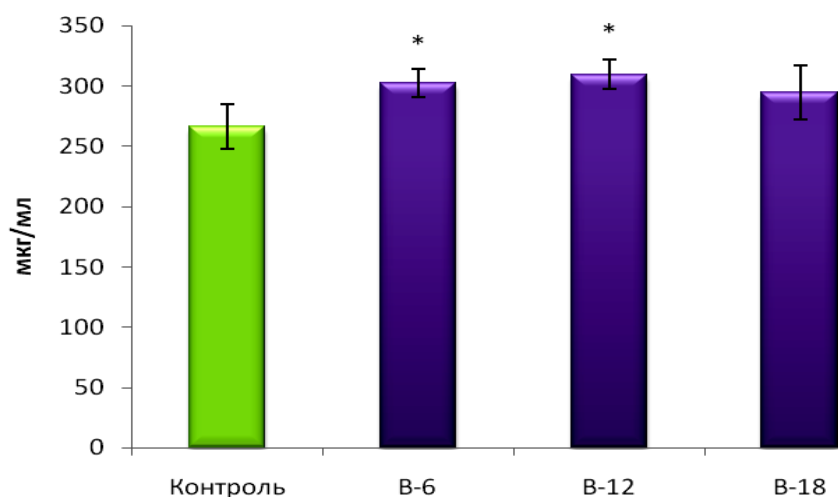


Рис. 10. Вміст фібронектину в сироватці крові щурів за умов розвитку експериментального варикоцеле (*- $p < 0,2$; $n = 10$), 6-18 – тижні розвитку варикоцеле після операції

В порівнянні з контролем, у період 6 тижнів після операції з'являється фрагмент вагою 96кДа, а фрагмент 105кДа – зникає. У період 12 тижнів після операції з'являється фрагмент вагою 215кДа. У період 18 тижнів після операції зникають фрагменти 90кДа, 110кДа, 135кДа, у порівнянні з контролем, а також фрагмент вагою 96кДа, у порівнянні з групою, яку вивели з експерименту після 6 тижнів з моменту проведення операції. З'являється фрагмент вагою 200кДа. Збільшується кількість фрагментів вагою 215кДа від 1 до 3 у період від 12 до 18

тижнів після операції. Розглядаючи біологічну роль фрагментів фібронектину, треба відзначити, що вони в цілому здатні зв'язувати ті ж ліганди, що й домени в складі цих фрагментів. Інакше кажучи, фрагменти зберігають деякі функції нативного фібронектину, але в багатьох випадках продукти протеолізу фібронектину не тільки зберігають функції, що притаманні окремим доменам, але й набувають нових функцій, що не властивими для інтактної молекули фібронектину [63].

Фрагменти ФН кДа	90	96	99	105	110	119	135	160	200	205	215	220
Контроль	2		1	2	1	2	1	2		3		4
В-6	2	1	2		3	1	2	1		3		3
В-12	1		1	2	1	2	1	3		2	1	4
В-18			2	1		2		3	1	2	3	4

Рис. 11. Зміни складу фрагментів плазменого фібронектину в умовах розвитку експериментального варикоцеле у щурів

ВИСНОВКИ

1. За умов розвитку варикоцеле розподіл розчинної форми нейрональної молекули клітинної адгезії (НМКА) у структурах головного мозку є нерівномірним. Підвищення розчинної форми НМКА у мозочку в 1,7 рази на 12 тиждень після операції та в 2 рази – на 18 тиждень, в гіпокампі в 2,4 рази на 12 та в 1,4 рази

– на 18 тиждень після операції обумовлено протеолітичними процесами, що, в свою чергу, може бути пов'язано з необхідністю підвищення пулу НМКА, як сигнальної молекули в плані контролю синаптичної пластичності.

2. За умов експериментального варикоцеле у щурів відбувається перерозподіл у мозку загальної кількості НМКА між розчинною та

мембранною формами, що забезпечує більшу ефективність передачі сигналу при порушенні гіпоталамо-гіпофізарної осі при зниженні синтезу тестостерону.

3. Експериментальний варикоцеле призводить до підвищення мембранної форми НМКА в лівому яєчку та до зниження рівня цього білка у надниркових залозах на 6 тижнів після операції, що вказує на функціональну взаємозалежність цих органів в залежності від вмісту тестостерону.

4. Порушення синтезу тестостерону впливає на метаболізм адгезивних білків ЦНС у таламусі/гіпоталамусі, що беруть участь у регуляції репродуктивної функції та регулюють виділення гормонів гіпофізом.

5. Застій крові при варикоцеле призводить до підвищення вмісту плазменого фібрoneктину, пов'язаного з запальним процесом та можливістю формування тромбу.

Список літератури

1. Rajfer J. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicoceles in rats// Rajfer J., Turner T.T., Rivera F. et al. Biol.Reprod. - 1987. -V. 36. - P. 933-937.
2. Таневский В. Э. Сравнительный анализ эффективности различных методов лечения варикоцеле у суб(ин-)фертильных пациентов// Таневский В. Э. Андрология и генитальная хирургия.- 2001, N 1, С. 25 – 33.
3. Щеплев П. А. Сравнение эффективности двух оперативных методов лечения варикоцеле у пациентов с нарушением фертильности// Щеплев П. А., Таневский В.Э. Андрология и генитальная хирургия.-2003, N 1, С. 32 – 40.
4. Першуков А.И. Варикоцеле и некоторые вопросы мужского бесплодия.- Киев.- 2002.- С. 179 – 187.
5. А.В. Люлько. Состояние терморегуляции мошонки у больных с варикоцеле// А.В. Люлько, П.С. Кондрат, А.Л. Суварян. Урология.-2009.- Т.12, №2.- С.32-38.
6. Равник Л. Варикоцеле как причина субфертильности и его оперативное лечение // Л. Равник. Урология и нефрология.- 1974, №5.- С.48-51.
7. Sayfan J. Varicocele treatment: prospective randomized trial of 3 methods // Sayfan J., Soffer Y., Orda R. J.Urol.- 1992.- Vol.148.- P.1447-1449.
8. Hendry W.F. Investigation and treatment of the subfertile male// Hendry W.F., Sommerville I.F., Hall R.R. et al.Br. J. Urol. - 1973. - V. 45. - P. 684-692.
9. Cockett A.T.K. The varicocele // Cockett A.T.K., Takihara H., Constantino M.J.Fertil. Steril.-. 1984. - V. 41. - P. 5-11.
10. Lome L.G. Varicolectomy and infertility// Lome L.G., Ross L. Urology. - 1977. -. V. 9. - P. 416-118.
11. Marks J.L. Predictive parameters of successful varicocele repair// Marks J.L., McMahon R., Lipshultz L.I. J. Urol. - 1986. - V. 136. - P. 609-612.
12. Scott L.S. D. Varicocele: a study of its effect on human spermatogenesis and of the results produced by spermatic vein ligation// Scott L.S., Young D. Fertil. Steril. - 1962. - V. 13. - P. 325-334.
13. Madgar I. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men// Madgar I., Weissenberg R., Lunenfeld, B. et al. Fertil. Steril. - 1995. - V. 63. - P. 120-124.
14. Dailch J.A. Varicolectomy improves intrauterine insemination success rates among men with varicoceles// Dailch J.A., Bedaiwy M.A., Pasqualotto E.B. et al. J. Urol - 2000. - V. 165. - P. 1510-1513.
15. M.U. De Martino. Fabbri. Dynamic testing in the evaluation of male gonadal function// M.U. De Martino, R. Pastore, M. Caprio et al. J. Endocrinol. Invest.- 2003.- V.26, Suppl. 7.- P. 107-113.
16. Shafik A. Experimental model of varicocele// Shafik A., Wali M.A., Abdel Azis Y.E. et al. Eur. Uro. - 1989. - V. 16. - P. 298-303.
17. Turner T.T. Testicular blood flow in peripubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to the unilateral lesion// Turner T.T. and Lopez T.J. J. Urol. - 1990. - V.144. - P. 1018-1021.

18. Ghosh P.K. Changes in testicular testosterone and acid and alkaline phosphatase activity in testis and accessory sex organs after induction of varicocele in Noble rats// Ghosh P.K. and York J.P. J. Surg. Res. - 1994. - V. 56. - P. 271-276.
19. Sofikitis N. Bilateral effect of unilateral varicocele on testicular metabolism in the rabbit// Sofikitis N. and Miyagawa I. Int. J. Fertil Menopausal Stud. - 1994. - V. 39. - P. 239-247.
20. Kazama T. Effect of experimental varicocele on rat Leydig cell function// Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi. - 1995. - V.86. - P. 308-315.
21. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics// Fertil. Steril. -1992. - V. 57. - P. 1289-1292.
22. Scholler R. Testicular secretion of conjugated and unconjugated steroids in normal adults and in patients with varicocele. Baseline levels and time-course response to Hcg administration// Scholler R., Nahoul K., Castanier M. et al. J. Steroid Biochem. - 1984. - V. 20. - P. 203-215.
23. Hudson R.W. Free sex steroid and sex hormone-binding globulin levels in oligospermic men with varicoceles// Fertil. Steril. - 1996. - V. 66. - P. 299-304.
24. Sirvent J.J. Leydig cell in idiopathic varicocele// Sirvent J.J., Bernat R., Navarro M.A. et al. Eur. Urol. - 1990. - V. 17. - P. 257-261.
25. Su L. The effects of varicocelectomy on serum testosterone levels in infertile men with varicoceles// Su L., Goldstein M. and Schlegel P.N. J. Urol. - 1995. - V. 154. - P. 1752-1755.
26. Swerdloff R.S. Pituitary and gonadal hormones in patients with varicocele// Swerdloff R.S. and Walsh P.C. Fertil Steril. - 1975. - V. 26. - P. 1006-1012.
27. Schiff I. Serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone responses to gonadotropin-releasing factor in males with varicoceles// Schiff I., Wilson E., Newton R. et al. Fertil. Steril. - 1976. - V. 27. - P. 1059-1061.
28. Hudson R.W. The gonadotropin release of men with varicoceles to gonadotropin-releasing hormone// Hudson R.W. and McKay D.E. Fertil. Steril. - 1980. - V. 33. - P.427-432.
29. Hudson R.W. The gonadotropin response of men with varicoceles to a four-hour infusion of gonadotropin-releasing hormone// Hudson R.W., Crawford V.A. and McKay D.E. Fertil. Steril. - 1981. - V. 36. - P. 633-637.
30. Hudson R.W. Hormonal parameters of men with varicoceles before and after varicocelectomy// Hudson R.W., Perez-Murrero R.A., Crawford V.A. et al. Fertil. Steril. - 1985. - V. 43. - P. 905-910.
31. Segenreich E. Andrological parameters in patients with varicoceles and fertility disorders treated by high ligation of the left spermatic vein// Segenreich E., Shmueli H., Singer R. et al. Int. J. Fertil. - 1986. - V. 31. - P. 200-203.
32. Comhaire F. Plasma testosterone in patients with varicocele and sexual inadequacy// Comhaire F. and Vermeulen A. J. Clin. Endocrinol. Metab. - 1975. - V. 40. - P.824-829.
33. Su L. The effects of varicocelectomy on serum testosterone levels in infertile men with varicoceles// Su L., Goldstein M. and Schlegel P.N. J. Urol. - 1995. - V.154. - P. 1752-1755.
34. Hudson R.W. The gonadotropin release of men with varicoceles to gonadotropin-releasing hormone// Hudson R.W. and McKay D.E. Fertil. Steril. - 1980. - V.33. - P. 427-432.
35. Will M.A. The influence of reproductive hormones on brain function in the menopausal transition. //Will M.A., Randolph J.F. Minerva Ginecol. - 2009. - Vol. 61. - N 6. - P. 469-81.
36. B. Marchetti. Cross-talk signals in the CNS: role of neurotrophic and hormonal factors, adhesion molecules and intercellular signaling agents in luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-astroglial interactive network// Front. Biosci.- 1997.- N. 2.- P. 88-125.
37. Fujisawa M. The significance of gonadotropin-releasing hormone test for predicting fertility after varicocelectomy// Fujisawa M., Hayashi A., Imanishi O. et al. Fertil. Steril. - 1994. - V.61. - P. 779-782.
38. Seo Y. Plasma concentration of prolactin, testosterone might be associated with brain response to visual erotic stimuli in healthy heterosexual males// Seo Y., Jeong B., Kim J.W., Choi J. Psychiatry Investig. - 2009. - V.6, N.3. - P.194-203.
39. Petrusis A. Neural mechanisms of individual and sexual recognition in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)// Behav Brain Res. - 2009. - V.200, N.2. - P.260-267.

40. Sakuma Y. Neural substrates for sexual preference and motivation in the female and male rat// *Ann N. Y. Acad. Sci.* - 2008. - V.1129. - P.55-60.
41. MacLusky N.J., Leranth C. Androgen modulation of hippocampal synaptic plasticity// *MacLusky N.J., Hajszan T., Prange-Kiel J., Leranth C. Neuroscience.* - 2006. - V.138, N.3. - P. 957-965.
42. Emamian S. Learning impairment caused by intra-CA1 microinjection of testosterone increases the number of astrocytes// *Emamian S., Naghdi N., Sepehri H. et al. Behav. Brain Res.* - 2010. - V.208, N.1. - P.30-37.
43. Schwarz J.M., McCarthy M.M. Steroid-induced sexual differentiation of the developing brain: multiple pathways, one goal// *Schwarz J.M., McCarthy M.M. J. Neurochem.* - 2008. -V.105, N.5. - P.1561-1572.
44. McCarthy M.M. Estradiol modulation of astrocytes and the establishment of sex differences in the brain // *McCarthy M.M., Todd B.J., Amateau S.K. Ann N. Y. Acad. Sci.* - 2003. - V.1007. - P.283-297.
45. Bain J. Testosterone and the aging male: to treat or not to treat? // *Maturitas.* -2010. - V.66, N.1. - P.16-22.
46. Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat // *J. Neuroendocrinol.* - 2009. - V.21, N.4. - P.410-414.
47. Лещинська І.О. Розподіл білка адгезії нервових клітин NCAM в структурах головного мозку щурів за умов дії іонізуючого опромінення в малій дозі. - Автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.04. - Київ. нац. ун-т ім. Т.Шевченка. - К. - 2001. - 20 с.
48. Diestel S. NCAM is ubiquitinated, endocytosed and recycled in neurons // *Diestel S., Schaefer D., Cremer H., Schmitz B. J.Cell Sci.* – 1998. - 120 (Pt22). – P. 4035-49.
49. Н.В. Козубенко. Зміна рівня нервовоспецифічних білків під впливом експериментального соматогенного болю та фармакокорекції 2004 года. -Автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.04; НАН України. Ін-т біохімії ім. О.Паладіна. - К. - 2004. - 19 с.
50. Ситник В.М. Вплив транспортних механізмів на поверхневий розподіл молекул клітинної адгезії у нейритах на ранніх етапах розвитку в культурі 2001 года.- Автореф. дис. канд. біол. наук: 03.00.02; НАН України. Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця. - К. - 2001. - 19 с.
51. Garcia-Segura L.M. The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output // *Garcia-Segura L.M., Lorenz B., DonCarlos L.L. Reproduction.* - 2008. - Vol. 135. - N 4. – P. 419-29.
52. G. Wennemuth. Assessment of fibronectin as a potential new clinical tool in andrology. // *G. Wennemuth, A. Meinhardt, C. Mallidis et al. Andrologia.* - 2001. - Vol. 33, N.1. - P. 43-46.
53. Aoshiba K. Fibronectin supports bronchial epithelial cell adhesion and survival in the absence of growth factors// *Aoshiba K., Rennard S.I., Spurzem J.R. Am. J. Physiol.* - 1997. - V. 273, N. 3.– P. 684-93.
54. Trentin A.G. T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization // *Trentin A.G., Moura Neto V. Neuroreport.* - 1995. - V.26, N 6.– P.293-6.
55. Miranda P.V., Tezon J.G. Characterization of fibronectin as a marker for human epididymal sperm maturation. // *Mol Reprod Dev.* – 1992.- V.33, N.4. – P. 443–450.
56. Suter D.M. An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. // *Suter D.M. and Forher P. Current Opinin in Neurobiology.* – 1998. – V.8, N.1. – P.106-116.
57. Turner T.T. The study of varicocele through the use of animal models// *Human Reproduction Update.* – 2001. – V.7, N.1. – P.78-84.
58. G.A. Ushakova, I.R. Nikonenko, A.G. Nikonenko, G.G. Skibo. Extracellular matrix heparin induces alteration of the cell adhesion during brain development// *Neurochem. Int.*- 2002.-V. **40**, N. 3. - P. 277-283.
59. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
60. Rommerts F.F.G. Testosterone: An overview of biosynthesis, transport, metabolism and action. In E Nieschlag, HM Behre (eds), *Testosterone Action Deficiency Substitution.* // *Rommerts F.F.G., Focko F.G. Berlin: Springer.* - 1990. - P. 1.
61. Ishikawa T. Varicocele ligation on free testosterone levels in infertile men with varicocele // *Ishikawa T., Fujisawa M. Arch. Androl.* - 2004. - V.50, N6. - P.443-448

62.Надашкевич О.Н. Імунологічні показники у хворих на системну склеродермію // Практична медицина. – 1999. – №5-6. – С. 22-24.

63. Garcia-Segura L.M. The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output //Garcia-Segura L.M., Lorenz B., DonCarlos L.L. Reproduction. - 2008. - V. 135, N. 4. – P. 419-429.

64.Бабаева О.И., Князева М.В. Биохимическая характеристика соединительной ткани при аневризме аорты – можно ли предсказать её разрыв? // Украинский биохимический журнал. – 2002. – Т.74, № 4а (додаток 1). – С. 109.

Реферат

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВАРИКОЦЕЛЕ НА АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА НЕРВНЫХ КЛЕТОК

А.В. Люлько, А.Л. Суварян, Г.А. Ушакова

На сегодня нет информации о том, каким образом развитие варикоцеле влияет на уровень адгезивных белков в различных отделах мозга крыс в условиях экспериментального варикоцеле – в частности в гипоталамо-гипофизарной системе, как главном регуляторе сперматогенеза и продукции тестостерона.

В нашей работе мы показали, что в условиях развития варикоцеле у крыс распределение растворимой формы нейрональной молекулы клеточной адгезии (НМКА) в структурах головного мозга является неравномерным. Повышение растворимой формы НМКА в мозжечке в 1,7 раза на 12 неделю после операции и в 2 раза – на 18 неделю, в гиппокампе в 2,4 раза на 12 и в 1,4 раза – на 18 неделю после операции обусловлено протеолитическими процессами, в свою очередь, может быть связано с необходимостью повышения пула НМКА, как сигнальной молекулы в плане контроля синаптической пластичности. Происходит перераспределение в мозге общего количества НМКА между растворимой и мембранной формами, что обеспечивает большую эффективность передачи сигнала при нарушении гипоталамо-гипофизарной оси при снижении синтеза тестостерона. Экспериментальный варикоцеле приводит к повышению мембранной формы НМКА в левом яичке и к снижению уровня этого белка в надпочечниках на 6 неделе после операции, что указывает на функциональную взаимозависимость этих органов в зависимости от содержания тестостерона. Нарушение синтеза тестостерона влияет на метаболизм адгезивных белков ЦНС в таламусе/гипоталамусе, участвующих в регуляции репродуктивной функции и

Summary

EFFECT OF EXPERIMENTAL VARICOCELE ON THE ADHESIVE PROPERTIES OF NERVE CELLS

O.V. Lyulko, A.L. Suvaryan, G.A. Ushakova

No information about how the development of varicocele affects the level of adhesive proteins in different parts of the brain of rats under the experimental varicocele – particularly in the hypothalamic-pituitary axis, as the main regulators of spermatogenesis and testosterone production.

In our work we have shown that on the development of varicocele in rats, the distribution of soluble forms of neuronal cell adhesion molecule (NMCA) in brain structures is uneven. Increased soluble form in the cerebellum NMCA 1,7 times at 12 weeks after surgery and 2 times – up to 18 weeks, in the hippocampus in 2,4 times in 12 and 1,4 times for 18 w. after surgery due to enzyme processes in turn, can be strictly related with the need to increase the pool NMCA as signaling molecules in terms of control of synaptic plasticity. Redistribution in the brain total NMCA between soluble and membrane forms, which provides greater efficiency of signal transmission in violation of hypothalamic-pituitary axis to a lower synthesis of testosterone. Experimental varicocele leads to increased membrane forms in the left testicle NMCA and to lower the level of this protein in the adrenal gland at 6 weeks after surgery, indicating a functional interdependence of these depending on the content of testosterone. Violation of the synthesis of testosterone affects the metabolism of adhesive proteins in CNS thalamus / hypothalamus involved in regulation of reproductive function and hormones regulate the pituitary. Stagnation of varicocele leads to higher content of plasma fibronectin is connected with the inflammatory process and the possibility of forming thrombus.

регулюють виділення гормонів гіпофізом. Застой крові при варикоцеле приводить до підвищенню вмісту плазменного фібронектину, пов'язаного з запальним процесом і можливістю формування тромба.

Ключевые слова: варикоцеле, безпліддя, тестостерон, нейрональна молекула клітинної адгезії, фібронектин.

Key words: varicocele, infertility, testosterone, neuronal cell adhesion molecule (NCAM), fibronectin.