

УДК 577.15

НОРМАЛИЗАЦИЯ ТЕСТИКУЛЯРНОГО СТЕРОИДОГЕНЕЗА И СПЕРМАТОГЕНЕЗА У САМЦОВ КРЫС С ДИАБЕТОМ 2 ТИПА НА ФОНЕ ТЕРАПИИ МЕТФОРМИНОМ

© 2020 г. К. В. Деркач¹, А. А. Бахтюков¹, Л. В. Баюнова¹, И. И. Зорина¹, А. О. Шпаков^{1,*}

Представлено академиком РАН Л.Г. Магазаником

Поступило 18.03.2020 г.

После доработки 08.04.2020 г.

Принято к публикации 08.04.2020 г.

Одним из осложнений сахарного диабета 2 типа у мужчин является нарушение стероидогенной и сперматогенной функций. Имеются данные о восстанавливающем эффекте антидиабетического препарата метформина на эти нарушения. Нами изучено влияние терапии МФ (4 недели, 200 мг/кг/сутки) на гормональные показатели гонадной оси и на морфологические характеристики эпидидимальных сперматозоидов у самцов крыс с тяжелой формой СД2, вызванной высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина. Показано, что МФ терапия, наряду с восстановлением метаболических показателей, нормализует уровни тестостерона и лептина в крови и содержание тестостерона, его прекурсоров, лептина и его рецепторов в семенниках, а также повышает сниженную при СД2 подвижность СП. Это является результатом как системного действия МФ, так и его непосредственного влияния на тестикулярные клетки.

Ключевые слова: сахарный диабет, метформин, стероидогенез, семенник, репродукция

DOI: 10.31857/S2686738920040101

Одним из осложнений сахарного диабета 2 типа (СД2) является нарушение функций репродуктивной системы. У мужчин это выражается в развитии андрогенной недостаточности, ухудшении качества спермы и снижении фертильности [1, 2]. Причинами этого являются нарушения метаболических и гормональных показателей при СД2, вследствие чего нормализующие их фармакологические подходы могут быть использованы для восстановления репродуктивных функций. Препаратом первой линии выбора при лечении СД2 является метформин (МФ), который улучшает сниженную при СД2 чувствительность тканей к инсулину и нормализует углеводный и липидный обмен [3, 4]. Показан восстанавливающий эффект МФ на функции гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, нарушенные при СД2, причем важную роль здесь играют как способность МФ улучшать энергетический обмен, так и его непосредственное влияние на различные звенья этой оси [5]. Однако эффекты МФ на тестикулярный

стероидогенез и сперматогенез, изучены недостаточно, а в отношении тяжелой, декомпенсированной, формы СД2 с характерными для нее нарушенной толерантностью к глюкозе, сильно выраженной инсулиновой и лептиновой резистентностью и дислипидемией, эффекты МФ терапии на функции мужской репродуктивной системы практически не исследованы. Отсутствуют данные о влиянии МФ на содержание тестостерона (Т) и его основных прекурсоров, прогестерона и 17-гидроксипрогестерона, а также на уровни лептина и лептиновых рецепторов в семенниках при СД2. Целью работы было изучить влияние четырехнедельного лечения МФ самцов крыс с тяжелым СД2 на их метаболические и гормональные показатели, на уровни половых стероидных гормонов, лептина и его рецептора в семенниках и на морфологические показатели эпидидимальных сперматозоидов (СП).

Использовали самцов крыс Wistar, которые в начале эксперимента имели возраст два месяца. СД2 вызывали высокожировой диетой и однократной инъекцией низкой дозы стрептозотоцина (25 мг/кг, в/б) через 8 недель после начала диеты, как описано ранее [6]. Через две недели после инъекции стрептозотоцина с помощью глюкометра и тест-полосок “One Touch Ultra” (США) в крови оценивали уровни постпранди-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

альной глюкозы (через 2 ч после приема пищи), с помощью набора “Multi Test HbA1c System kit” (“Polymer Technology Systems”, США) – уровень гликированного гемоглобина (HbA1c). Через 12 недель после начала диеты СД2-крысы делили на две группы: одна в течение 4 недель получала МФ (“Sigma”, США), который вводили с помощью зонда в дозе 200 мг/кг/сутки (ДМ, $n = 6$), другая получала плацебо (Д, $n = 6$). Контрольные крысы находились на стандартной диете, вместо стрептозотоцина им вводили растворитель (0.1 М цитратный буфер, pH 4.5), вместо МФ они получали плацебо (К, $n = 6$). За три дня до окончания эксперимента проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ), для чего крысам вводили глюкозу (2 г/кг, в/б) и измеряли уровень глюкозы до и через 15, 30, 60 и 120 мин после введения [6]. Перед глюкозной нагрузкой и через 120 мин после нее в крови оценивали уровни Т, инсулина, лептина и лютеинизирующего гормона (ЛГ), используя наборы “Тестостерон-ИФА” (“Алкор-Био”, Россия), “Rat Insulin ELISA kit” (“Mercodia”, Швеция), “ELISA kit for Leptin, Rat” и “ELISA kit for LH, Rat” (“Cloud-Clone Corp.”, США). После декапитации наркотизированных крыс у них забирали семенники и оценивали в них содержание Т, прогестерона и 17-гидроксипрогестерона с помощью ИФА-наборов фирмы “Chema” (Россия) и содержание лептина и его рецептора с помощью наборов “ELISA kit for Leptin, Rat” и “ELISA kit for Leptin Receptor, Rat” (“Cloud-Clone Corp.”, США), как описано ранее [7].

При выводе крыс из эксперимента у них оценивали морфологические показатели эпидидимальных СП, для чего из каудальной части эпидидимиса извлекали 5 мг СП, помещали их в 195 мкл среды фертилизации “Quinn’s Advantage™ Medium With NEPES” (“In Vitro Fertilization Inc.”, США), инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Для оценки морфологии исследовали мазки, которые окрашивали азуром и эозином, используя набор “Спермо-Дифф-200” (ООО “Фирма Синтакон”, Россия). Подсчитывали число морфологически дефектных (СП с извитым хвостом или дефектами головки) и подвижных форм на 100 СП в каждом препарате.

Статистический анализ проводили с помощью программы “Microsoft Office Excel 2007”. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения выборок с нормальным распределением использовали t -критерий Стьюдента. Данные представляли, как $M \pm SD$. Достоверными считали отличия при $p < 0.05$.

СД2-крысы имели повышенную массу тела и жировой ткани, умеренно выраженную гипергликемию, повышенные уровни лептина и инсулина через 120 мин после глюкозной нагрузки и

повышенный уровень HbA1c (табл. 1). В группе Д была нарушена толерантность к глюкозе, о чем свидетельствует более высокое значение AUC_{0-120} (интегрированная площадь под кривой “концентрация глюкозы, мМ–время, мин” в течение 120 мин) в тесте с глюкозной нагрузкой в сравнении с контролем (табл. 1). Уровень ЛГ в группе Д не менялся (табл. 1).

При этом у СД2-крыс были достоверно снижены уровни Т в крови и 17-гидроксипрогестерона в семенниках и отмечалась тенденция к снижению уровня Т в семенниках (табл. 1, 2). Уровни интра-тестикулярного прогестерона в группах Д и К не различались. В семенниках СД2-крыс был повышен уровень лептина и снижен уровень лептинового рецептора (табл. 2).

Лечение МФ приводило к снижению массы тела и жировой ткани, ослаблению гипергликемии и снижению уровня HbA1c, частичному восстановлению толерантности к глюкозе, снижению уровней лептина и инсулина через 120 мин после глюкозной нагрузки, нормализации уровня Т в крови, но не влияло на уровень ЛГ (табл. 1). В семенниках крыс группы ДМ в сравнении с группой Д повышалось содержание Т, прогестерона и 17-гидроксипрогестерона, снижалось содержание лептина и частично восстанавливался уровень лептинового рецептора (табл. 2).

При изучении морфологии эпидидимальных СП было показано, что при СД2 статистически значимо повышалась доля неподвижных и дефектных форм СП и имела тенденция к снижению доли СП с поступательным прямолинейным движением (табл. 2). Лечение МФ в значительной степени повышало подвижность СП – доля СП с прямолинейным поступательным движением повышалась на 67% в сравнении с группой Д, доля неподвижных СП снижалась как в сравнении с группой Д (в среднем в 4 раза), так и с контролем (в 2.7 раза) (табл. 2). При этом общее число СП в исследуемых группах статистически значимо не различалось (табл. 2).

Полученные данные указывают на то, что лечение МФ крыс с тяжелым СД2 восстанавливает ослабленную у них продукцию Т и его прекурсоров в семенниках, нормализует уровень Т в крови, улучшает морфологические характеристики эпидидимальных СП. Восстановление стероидогенной и сперматогенной функций может быть обусловлено как системным действием МФ вследствие нормализации метаболических показателей и ослабления гиперлептинемии и гиперинсулинемии, так и непосредственным влиянием МФ на энергетический обмен и сигнальную трансдукцию в стероидогенных и генеративных клетках семенников, тем более что МФ способен легко проникать через гистогематические барьеры и имеет высокую биодоступность. В пользу

Таблица 1. Влияние лечения метформином (4 недели, перорально, 200 мг/кг) на метаболические и гормональные показатели у самцов крыс с СД2, вызванным высокожировой диетой и низкой дозой стрептозотоцина

| Показатель | К, n = 6 | Д, n = 6 | ДМ, n = 6 |
|--|--------------|---------------|----------------|
| Масса тела, г | 351.7 ± 11.8 | 403.3 ± 17.6* | 376.8 ± 19.5*# |
| Масса жира, г | 11.4 ± 1.5 | 22.3 ± 3.1* | 14.6 ± 3.5# |
| Глюкоза натощак, мМ | 4.83 ± 0.27 | 6.17 ± 0.58* | 5.10 ± 0.43# |
| Глюкоза (ГТТ, 120 мин), мМ ^а | 5.05 ± 0.48 | 8.98 ± 1.70* | 7.28 ± 1.44* |
| HbA1c, % | 4.07 ± 0.25 | 6.53 ± 0.98* | 5.23 ± 0.86*# |
| AUC ₀₋₁₂₀ , отн. ед. | 1084 ± 145 | 1860 ± 316* | 1445 ± 281*# |
| Инсулин натощак, нг/мл | 1.01 ± 0.30 | 1.19 ± 0.32 | 0.96 ± 0.34 |
| Инсулин (ГТТ, 120 мин), нг/мл ^а | 1.50 ± 0.35 | 2.40 ± 0.49* | 1.67 ± 0.36# |
| Лептин натощак, нг/мл | 3.51 ± 0.51 | 6.21 ± 0.93* | 4.74 ± 0.94*# |
| Лептин (ГТТ, 120 мин), нг/мл ^а | 5.14 ± 0.59 | 10.37 ± 1.35* | 8.02 ± 1.43*# |
| Тестостерон, нМ | 13.2 ± 3.7 | 7.5 ± 2.7* | 12.2 ± 3.4# |
| ЛГ, нг/мл | 2.16 ± 0.41 | 2.51 ± 0.37 | 2.04 ± 0.40 |

Примечание. ^а – уровни глюкозы, инсулина и лептина через 120 мин после глюкозной нагрузки при проведении ГТТ. * – различия между группами К и Д статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия между группами Д и ДМ статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены, как $M \pm SD$.

Таблица 2. Влияние лечения метформином на содержание лептина, лептинового рецептора, тестостерона и его прекурсоров в семенниках, а также на морфологические характеристики эпидидимальных сперматозоидов у крыс с СД2

| Показатель | К, n = 6 | Д, n = 6 | ДМ, n = 6 |
|---|---------------|----------------|----------------|
| <i>Гормональные показатели</i> | | | |
| Лептин, пг/мг | 19.6 ± 2.7 | 31.6 ± 7.4* | 21.3 ± 7.2# |
| Лептиновый рецептор, пг/мг | 8.59 ± 1.46 | 5.83 ± 1.58* | 7.09 ± 1.10 |
| Прогестерон, нмоль/г | 0.445 ± 0.038 | 0.387 ± 0.081 | 0.540 ± 0.099# |
| 17-гидроксипрогестерон, нмоль/г | 0.090 ± 0.022 | 0.049 ± 0.014* | 0.082 ± 0.015# |
| Тестостерон, нмоль/г | 0.884 ± 0.275 | 0.706 ± 0.138 | 0.941 ± 0.184# |
| <i>Показатели спермограммы</i> | | | |
| Количество сперматозоидов, млн/мл | 21.7 ± 5.5 | 18.8 ± 3.4 | 23.3 ± 3.9 |
| Доля СП с поступательным прямолинейным движением, % | 30.7 ± 6.5 | 23.7 ± 8.1 | 40.2 ± 10.8# |
| Доля неподвижных СП, % | 16.2 ± 3.8 | 26.2 ± 6.5* | 5.5 ± 1.6*# |
| Доля дефектных СП, % | 31.7 ± 8.4 | 47.8 ± 13.0* | 38.8 ± 5.9 |

Примечание. Дефектными считали сперматозоиды с морфологическими дефектами хвоста и головки. * – различия между группами К и Д статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия между группами Д и ДМ статистически значимы при $p < 0.05$. Данные представлены, как $M \pm SD$.

прямого воздействия МФ на семенники свидетельствуют следующие факты. Во-первых, в семенниках крыс группы ДМ повышенный при СД2 уровень лептина снижался до контрольных значений и, наряду с этим, частично восстанавливалось сниженное при СД2 содержание лептиновых рецепторов, что указывает на нормализацию начальных звеньев тестикулярного лептино-

вого сигналинга при лечении МФ. При этом базальный и стимулированный глюкозой уровень лептина в крови хотя и снижался в результате системного эффекта МФ, но оставался достоверно выше контрольных значений. На основании этого можно предположить, что нормализация уровня лептина и лептинового рецептора в семенниках может быть обусловлена не только системными

эффектами МФ, но и его прямым воздействием на тестикулярные клетки, тем более, что эффекты МФ и лептина на энергетический гомеостаз клеток являются сходными [5]. Во-вторых, содержание интратестикулярного Т и доля СП с поступательным прямолинейным движением, имевших тенденцию к снижению при СД2, в группе ДМ не только достоверно повышались в сравнении с группой Д, но превосходили контрольные значения, что свидетельствует в пользу прямого активирующего воздействия на них МФ (табл. 2).

Ранее другими авторами было показано, что МФ частично восстанавливает стероидогенез и сперматогенез у крыс со стрептозотоциновой моделью СД1 [8, 9]. Поскольку основным системным механизмом действия МФ при СД2 является ослабление инсулиновой и лептиновой резистентности и снижение массы жировой ткани, а при СД1 эти нарушения отсутствуют, то в основе восстанавливающего эффекта МФ на функции репродуктивной системы у самцов крыс с СД1 могут лежать ослабление продукции активных форм кислорода и снижение интенсивности воспалительных и апоптотических процессов в тестикулярной ткани. Необходимо отметить, что антиоксиданты ω 3-ненасыщенные жирные кислоты и таурин также частично восстанавливают сперматогенез и стероидогенез у самцов крыс с СД [10, 11].

Системная гиперлептинемия при СД2 приводит к повышению уровня интратестикулярного лептина, что во многом обусловлено нарушением целостности гематотестикулярного барьера в условиях усиления окислительного стресса и воспаления в семенниках [12]. Результатом этого является снижение чувствительности тестикулярных клеток к лептину и ослабление в них лептиновых сигнальных путей, в том числе вследствие усиления активности негативных регуляторов лептинового сигналинга, что приводит к ингибированию стимулирующего влияния лептина на мужскую репродуктивную систему [13–15]. Показанное нами снижение уровня интратестикулярного лептина при лечении МФ СД2-крыс до такового в контроле может свидетельствовать в пользу нормализации транспорта лептина через гематотестикулярный барьер и восстановления регуляции стероидогенеза и сперматогенеза интратестикулярным лептином. Уровень ЛГ в крови СД2-крыс с андрогенным дефицитом не отличается от такового в группе К, что указывает на снижение чувствительности стероидогенных клеток Лейдига к гонадотропинам при тяжелом СД2. В группе ДМ при отсутствии изменений уровня ЛГ уровень Т восстанавливается, что свидетельствует о нормализации чувствительности семенников к ЛГ при лечении МФ СД2-крыс. Это может быть обусловлено нормализацией лептинового сигналинга в клетках Лейдига, поскольку лептиновые и

гонадотропиновые пути в них функционируют синергично [13].

Лечение МФ (4 недели, 200 мг/кг/сутки) самцов крыс с тяжелым СД2 восстанавливает у них андрогенный статус, что обусловлено нормализацией стероидогенеза и лептинового сигналинга в семенниках диабетических животных. МФ также увеличивает подвижность эпидидимальных СП, что указывает на повышение фертильности спермы. Полученные нами на экспериментальных животных данные указывают на возможность использовать метформинотерапию для восстановления функций репродуктивной системы у мужчин с тяжелыми формами СД2, что, однако, требует дополнительных клинических исследований.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и ДНТ (№ 18-515-45004 ИНД-а) и госзадания АААА-А18-118012290427-7. Для проведения ИФА использовали оборудование ЦКП ИЭФБ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу и использованию животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (протокол № 2/3-2019 от 29.03.2019 г.), European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”. Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

Авторы статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jangir R.N., Jain G.C.* // Curr. Diabetes Rev. 2014. V. 10(3). P. 147–157.
<https://doi.org/10.2174/1573399810666140606111745>
2. *Fink J., Matsumoto M., Tamura Y.* // Steroids. 2018. V. 138. P. 161–166.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.08.002>
3. *Schernthaner G., Schernthaner G.H.* // Diabetes Res. Clin. Pract. 2020. V. 159. P. 107946.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107946>
4. *An H., He L.* // J. Endocrinol. 2016. V. 228 (3). P. R97–R106.
<https://doi.org/10.1530/JOE-15-0447>
5. *Faure M., Bertoldo M.J., Khoueiry R. et al.* // Front Endocrinol (Lausanne). 2018. V. 9. P. 675.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00675>
6. *Derkach K.V., Bondareva V.M., Chistyakova O.V. et al.* // Int. J. Endocrinol. 2015. V. 2015. P. 245459.
<https://doi.org/10.1155/2015/245459>
7. *Derkach K., Zakharova I., Zorina I. et al.* // PLOS One. 2019. V. 14(3). P. e0213779.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213779>

8. *Nna V.U., Bakar A.B.A., Ahmad A., Mohamed M.* // *Andrology*. 2019. V. 7 (1). P. 110–123. <https://doi.org/10.1111/andr.12567>
9. *Nna V.U., Bakar A.B.A., Ahmad A. et al.* // *Andrology*. 2019. <https://doi.org/10.1111/andr.12739>
10. *Liu H., Lin S., Lv Q. et al.* // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 975 (Pt. 2). P. 801–811. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_62
11. *Hasan M.M., El-Shal A.S., Mackawy A.M.H. et al.* // *J. Cell. Biochem.* 2020. V. 121 (2). P. 1524–1540. <https://doi.org/10.1002/jcb.29388>
12. *Wang X., Zhang X., Hu L., Li H.* // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018. V. 16 (1). P. 55. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0368-4>
13. *Giovambattista A., Suescun M.O., Nessralla C.C. et al.* // *Neuroendocrinology*. 2003. V. 78 (5). P. 270–279. <https://doi.org/10.1159/000074448>
14. *Yuan M., Huang G., Li J. et al.* // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014. V. 12. P. 15. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-15>
15. *Pinto-Fochi M.E., Pytlowanciv E.Z., Reame V. et al.* // *Reproduction*. 2016. V. 152(6). P. 795–808. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0072>

NORMALIZATION OF TESTICULAR STEROIDOGENESIS AND SPERMATOGENESIS IN MALE RATS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS UNDER THE CONDITIONS OF METFORMIN THERAPY

K. V. Derkach^a, A. A. Bakhtyukov^a, L. V. Bayunova^a, I. I. Zorina^a, and A. O. Shpakov^{a,#}

^a *I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation*

[#]*e-mail: alex_shpakov@list.ru*

Presented by Academician of the RAS L. G. Magazanik

One of the complications of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in men is steroidogenic and spermatogenic dysfunctions. There is evidence of a restoring effect of the antidiabetic drug metformin (MF) on them. We studied the effect of MF therapy (4 weeks, 200 mg/kg/day) on the hormonal parameters of the gonadal axis and on the morphological characteristics of epididymal spermatozoa in male rats with a severe form of T2DM caused by a high-fat diet and a low-dose streptozotocin. It has been shown that MF therapy, along with the restoration of the metabolic parameters, normalizes the plasma levels of testosterone and leptin and the content of testosterone, its precursors, leptin and its receptors in the testes, and also increases sperm motility, which is reduced in T2DM. This is the result of both the systemic action of MF and its direct effect on testicular cells.

Keywords: diabetes mellitus, metformin, steroidogenesis, testis, reproduction