

СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ НЕОНАТАЛЬНОЙ ОРХИЭКТОМИИ И ЕЕ АНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ У КРЫС ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ГИПОГОНАДОТРОПНОГО ГИПОГОНАДИЗМА

С.В. Айсаева², А.Ф. Юдина¹, В.В. Салухов¹, В.А. Башарин¹,

М.С. Колесникова³, А.А. Минаков¹, А.А. Ховпачев¹

¹*Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России, 194044, г. Санкт-Петербург,*

vtmz@vmeda.org

²*Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-космическая академия имени А.Ф. Можайского Министерства обороны Российской Федерации, 197198, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, vka@mil.ru*

³*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Минобороны России, 195043, г. Санкт-Петербург,*

gniiivm_2@mil.ru

Резюме

Введение. Широкое распространение мужского андрогенодефицита диктует необходимость дальнейшего совершенствования экспериментальных моделей для поиска средств его профилактики и лечения. В работе представлено экспериментальное обоснование протокола односторонней орхиэктомии у новорождённых крыс, направленного на моделирование гипогонадотропного гипогонадизма.

Цель исследования. Стандартизовать последовательность односторонней орхиэктомии в условиях общей анестезии у новорождённых крыс, приводящую к формированию гипогонадотропного гипогонадизма.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 197 3 суточных крысах линии Спрег-Доули собственного разведения в три этапа. На первом этапе было выполнено сравнительное исследование различных методик

неонатальной общей анестезии. На втором – стандартизована последовательность односторонней орхиэктомии на 3 суточных крысах. На третьем – выполнена апробация разработанной последовательности посредством оценки встречаемости осложнений и оценка уровня половых гормонов у прооперированных крыс-самцов на 30 и 120 сутки жизни в сравнении с ложнооперированными животными.

Результаты. Установлено, что среди оцененных способов неонатального анестезиологического пособия, наиболее приемлема анестезия изофлураном болюсной схемой. Выполнен расчет среднесмертельных доз парентеральных гипнотиков. Воспроизведена и дополнена последовательность орхиэктомии: обоснован параингвинальный доступ и оперативный манёвр эктомии семенника. После орхиэктомии у крыс наблюдали стойкое снижение концентрации тестостерона в сравнении с ложнооперированными животными. Предлагаемая последовательность обладала удовлетворительной воспроизводимостью и была связана с низким числом послеоперационных осложнений: из 76 наблюдений острую массивную кровопотерю встречали в 5,2 %, подкожную эвентрацию кишки – в 8,3 %, гнойный абсцесс рубца – в 1,3 % случаев.

Заключение. Манипуляции на неонатальных особях сопряжены с высоким риском неблагоприятного исхода. Валидированные протоколы орхиэктомии и общей анестезии обладают высокой воспроизводимостью низкой частотой осложнений, позволяя масштабнo моделировать устойчивую эндокринную дисфункцию в отсроченный период.

Ключевые слова: гипогонадотропный гипогонадизм; экспериментальная модель; крысы; неонатальная орхиэктомия; анестезия; тестостерон

Для корреспонденции: Ховпачев Алексей Андреевич,
khovpachev@gmail.com

**STANDARDIZATION OF THE ORCHIECTOMY AND ITS
ANESTHETIC SUPPORT IN NEWBORN RATS FOR MODELING
HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM**

Svetlana V. Aisaeva², Anna F. Yudina¹, Vladimir V. Salukhov¹, Vadim A. Basharin¹, Maria S. Kolesnikova³, Alexey A. Minakov¹, Alexey A. Khovpachev¹,

¹*S.M. Kirov Military Medical Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 194044, Saint Petersburg, Russian Federation.*

²*A.F. Mozhaysky Military Space Academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 197198, Saint Petersburg, Russian Federation.*

³*State Research and Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation (State Research Institute of Military Medicine), 195043, Saint Petersburg, Russian Federation.*

Abstract

Introduction. The widespread prevalence of male androgen deficiency necessitates further refinement of experimental models to identify means for its prevention and treatment. This study presents an experimental justification for a unilateral orchiectomy protocol in neonatal rats aimed at inducing hypogonadotropic hypogonadism.

Aim: To standardize the sequence of orchiectomy under general anesthesia in neonatal rats, leading to the development of hypogonadotropic hypogonadism.

Materials and Methods. The study was performed on 197 3-day-old Sprague-Dawley rats of the same line in three stages. The first stage was a comparative study of various general anesthesia techniques. The second stage standardized the unilateral orchiectomy sequence. The third stage tested the developed sequence by assessing the incidence of complications and analyzing sex hormone levels in the operated male rats on days 30 and 120 of life.

Results. It was found that among the evaluated methods of neonatal anesthetic care, the most acceptable is anesthesia with isoflurane using a bolus scheme. The calculation of the average lethal doses of parenteral hypnotics was performed. The

sequence of orchiectomy was reproduced and supplemented: the paraingvinous access and the surgical maneuver of orchiectomy were justified. After orchiectomy, a persistent decrease in testosterone concentration was observed in rats compared to sham-operated animals. The proposed sequence had satisfactory reproducibility and was associated with a low number of postoperative complications: out of 76 observations, acute massive blood loss was observed in 5.2%, subcutaneous intestinal eventeration – in 8.3%, scar abscess – in 1.3% of cases.

Conclusion. Manipulations on neonatal individuals are associated with a high risk of adverse outcome. Validated protocols of orchiectomy and general anesthesia have high reproducibility and low complication rate, allowing for large-scale m

Keywords: hypogonadotropic hypogonadism; experimental model; rats; neonatal orchiectomy; anesthesia; testosterone.

Corresponding author: Khovpachev Alexey Andreevich,
khovpachev@gmail.com

Введение. Гипогонадизм у мужчин – это клинический и биохимический синдром, связанный с низким уровнем тестостерона, а также нечувствительностью рецепторного аппарата к нему и его метаболитам. Гипогонадизм оказывает негативное воздействие на множество органов и систем, ухудшая качество жизни и жизненный прогноз [1]. В последние годы клиническая значимость мужского гипогонадизма существенно возросла. Переосмысление роли эндокринной дисфункции яичек в нарушениях гуморального афферентного пути при острых и хронических состояниях объясняет данную взаимосвязь – эти патологии лежат в основе высокой смертности, утраты трудоспособности и снижения качества жизни. Так, к гипогонадизм-ассоциированным состояниям относят: травму, сепсис, хроническую сердечную недостаточность, метаболический синдром, сахарный диабет, иммунодефицит, остеопороз и т.д. В этой связи, поиск механизмов развития и методов лечения гипогонадизма – приоритетная мультидисциплинарная задача [2, 3].

Изучение механизмов развития, функциональных последствий и способов коррекции гипогонадизма в клинике невозможна без экспериментальных исследований на животных [4]. Гонадэктомия в ранний неонатальный период у крыс служит инструментом моделирования мужского гипогонадотропного гипогонадизма [5]. В основе этой модели лежит односторонняя орхиэктомия у крыс возрастом до 3 сут. По сравнению с кастрацией уже взрослых особей данный подход инициирует нарушение дифференциации нейроэндокринной системы мозга андрогенами [6]. Модель характеризуется заметно более высокой воспроизводимостью – на порядок превосходящей показатели существующих аналогов [5].

Анализ состояния разработанности методических подходов к выполнению орхиэктомии у новорождённых грызунов свидетельствует об их разрозненном характере и отсутствии общепринятых протоколов [5, 6, 7, 8]. Исходя из проанализированных данных, рассматриваемое вмешательство имеет ряд особенностей: абдоминальный доступ, потребность оптического

увеличения, специфика анестезиологического обеспечения. Сразу после рождения органы крыс, включая нервную систему и ее барьеры, недоразвиты, что увеличивает риск общей анестезии. Неонатальные анестезиологические техники сопряжены с высокой вероятностью периоперационной смертности и транзиторной кардиореспираторной депрессии. Последняя хоть и не приводит к гибели на операционном столе, но значима в неврологическом отношении в отдалённый период, приводя к когнитивной дисфункции и, несомненно, влияя на качество эксперимента. В дополнение, важнейшим моментом при проведении манипуляций с новорождёнными остаётся риск их гибели после возвращения в гнездо вследствие отказа крысы-матери от ухода за детёнышем или причинения ему вреда. В отсутствие должной подготовки самок, последнее сводит на нет все старания исследователей [9].

Резюмируя изложенное, явно разрозненные сведения о методологии орхиэктомии у новорождённых, с одной стороны, и операционно-анестезиологический риск – с другой, а также связанные с этим обстоятельством потенциально высокая летальность и неудовлетворительные неврологические исходы, порождают необходимость сравнительного исследования наиболее подходящих оперативных приёмов и методик анестезиологического обеспечения из числа известных, их апробацию в рамках единой последовательности.

Цель исследования – стандартизировать последовательность односторонней орхиэктомии в условиях общей анестезии у новорождённых крыс, приводящую к формированию гипогонадотропного гипогонадизма.

Материалы и методы. Тест-объектами в исследовании служили 197 крыс линии Спрег-Дули обоего пола собственного разведения. Возраст животных на начало исследования составлял 3 сут, масса – 3–4 г. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях и Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных. Проведение

исследования было одобрено независимым этическим комитетом при Военно-медицинской академии (протокол от 20 декабря 2022 г. № 273).

Общие условия содержания включали 12-ч режим освещённости, температурный диапазон 20–22 °С, влажность воздуха не более 75 % в соответствии с кратностью воздухообмена. Крысы имели неограниченный доступ к стандартному полнорационному комбикорму и фильтрованной водопроводной воде. На периродовой период и период лактации самкам-матерям обеспечивали высококалорийное белковое питание мучным червём.

Разведение крыс осуществляли в весенне-летний период линейным методом. Для случной кампании использовали половозрелых крыс-самок возрастом 4 мес массой 180–220 г и племенных крыс-самцов возрастом 6–12 мес массой 350–450 г. Перед случкой производили их осмотр на предмет наличия больных и ослабленных особей. Далее 4–5 самок одного возраста и 1 самца помещали в общую клетку и оставляли на весь период размножения [10].

При появлении признаков поздней стадии беременности самок отсаживали в отдельные клетки. Для нивелирования развития стресса на фоне изоляции использовали прозрачные клетки из органического стекла с отверстиями в боковых стенках. С целью снижения вероятности поедания потомства или отказа от него, самок после отсаживания и до выполнения орхиэктомии адаптировали к рукам и периоперационным ольфакторным раздражителям путём помещения в клетку ватных шариков, пропитанных антисептиками и клеем БФ-6 [7]. При поедании потомства, самок выбраковывали из племенного стада.

Пол новорожденных крыс предварительно определяли посредством оценки ано-генитального расстояния, окончательно – интраоперационно. В возрасте 21 сут крыс отлучали от матери, отсаживали в однополые группы по 6 особей и переводили на питание комбикормом.

Стандартизацию техники моделирования гипогонадотропного гипогонадизма осуществляли в три этапа. На первом этапе было выполнено сравнительное исследование различных видов общей анестезии на 3 сут крысах

обоого пола. На втором – разработана точная последовательность односторонней орхиэктомии на самцах возрастом 3 сут. На третьем этапе выполняли апробацию разработанной последовательности посредством оценки встречаемости осложнений и анализом уровня тестостерона у крыс-самцов на 30 и 120 сут жизни.

При подборе методики анестезии использовали фармакологические средства седативно-гипнотического действия: тиопентал натрия (Курган-синтез, Россия), тилетамин и золазепам (Золетил-100, Valdepharm, Франция), диэтиловый эфир стабилизированный для наркоза (Кузбассоргхим, Россия), изофлуран (Laboratories Karizoo S.A., Испания). Препараты вводили внутривенно (в/в) и ингаляционно (инг). Для респираторной поддержки использовали газообразный медицинский кислород по ГОСТ 5583-78.

На первом этапе особей поделили на 6 групп:

- 1 группа – тилетамин + золазепам в/в (n=13);
- 2 группа – тиопентал натрия в/в (n=14);
- 3 группа – криоанестезия (n=12);
- 4 группа – диэтиловый эфир – инг. болюсная методика (n=10);
- 5 группа – изофлуран – инг. болюсная методика (n=16);
- 6 группа – изофлуран – инг. высокопоточная методика (n=12).

Показателями сравнения служили летальность, уровень глубины угнетения неврологической функции, время достижения хирургической стадии анальгезии и время выхода из нее, управляемость анестезии.

Для неингаляционной в/в анестезии применяли тиопентал натрия в нарастающей дозе от 1 до 12 мг/кг и комбинацию тилетамин с золазепамом в диапазоне от 5 до 50 мг/кг.

Для криоанестезии использовали иммерсионный метод. Крыс помещали в палец латексной перчатки, который погружали в стакан с холодной водой и колотым льдом на период индукции хирургической стадии криогипбернации [9]. Показатели оценивали после однократной иммерсии.

Для ингаляционной анестезии методикой болюсной индукции с последующей периодической подачей анестетика (болюсная методика) диэтиловым эфиром и изофлураном использовали установку оригинальной конструкции (рисунок 1).

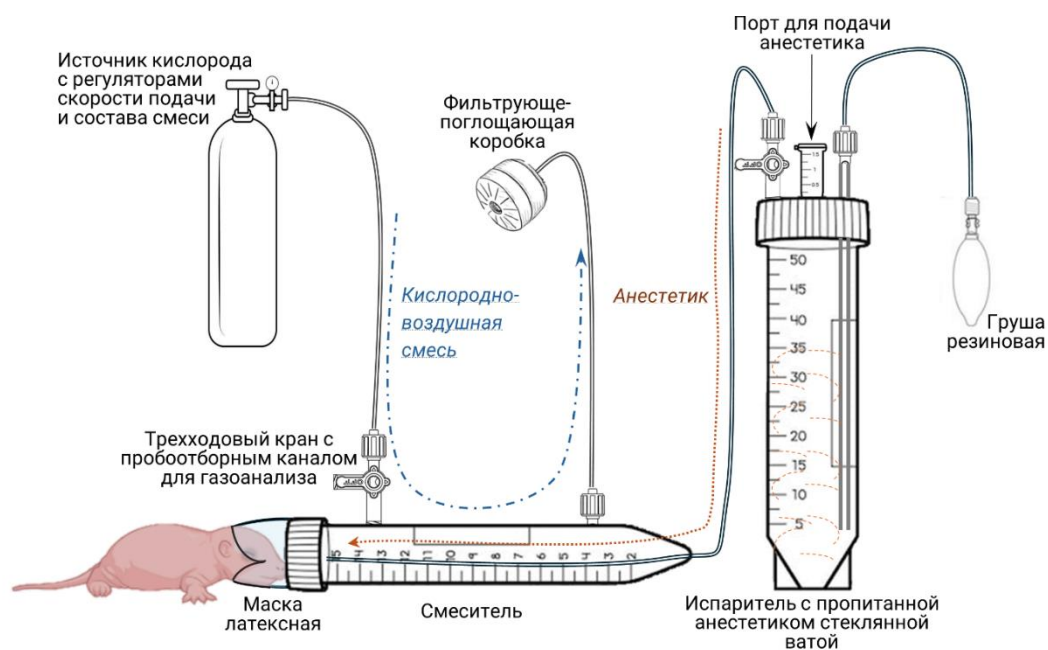


Рисунок 1. Схема установки для болюсной ингаляции летучих анестетиков

После камерной преоксигенации 100 % кислородом осуществляли индукцию анестезии масочным способом путём болюса в смеситель атмосферного воздуха, насыщенного в испарителе парами анестетика. Далее подачу анестетика прекращали. Начинали подачу в контур 50 % кислорода со скоростью 1 л/мин. При необходимости поддержания анестезии подачу ингалянта периодически повторяли в условиях перекрытого тока кислорода. Все этапы болюсной анестезии выполняли на фоне самостоятельного дыхания животных. Концентрацию диэтилового эфира в смесителе определяли посредством индикаторных трубок на диэтиловый эфир (Импульс, Россия) с помощью ручного пробоотборного насоса НП-3М (Крисмас+, Россия).

Для анестезии изофлураном в высоком, относительно кислородного запроса организма, потоке кислородно-воздушной смеси (высокопоточная

методика) использовали ветеринарную наркозно-дыхательную станцию Торо DMW для мелких животных с испарителем для изофлурана VetFlo (Kent Scientific., США). Индукцию анестезии выполняли в камере при концентрации изофлурана 5 об. % в токе 100 % кислорода 0,2 л/мин. Поддержание анестезии осуществляли масочным способом изофлураном в концентрации 1,5–2,5% в токе 50 % кислорода 0,1 л/мин на фоне самостоятельного дыхания животных. Для завершения анестезии подачу анестетика прекращали, продували контур кислородно-воздушной смесью со скоростью 2 л/мин.

Для восстановления температуры тела после анестезии крыс в индивидуальном боксе на подстилке из домашней клетки помещали в воздушную термостатируемую камеру (Thermo Sci., США) при температуре 42 ± 2 °С. Всех прооперированных крыс одного помета подсаживали к крыс-матери одновременно после восстановления неврологической функции.

В группах, получавших ингаляционную анестезию, показатели оценивали в течение 20 мин анестезии и после нее.

Неврологическую функцию у животных определяли по рефлексу переворачивания со спины на живот, рефлексам выпрямления в ответ на давление пинцетом на передние, задние конечности и хвост, а также по реакции на разрез кожи скальпелем. Хирургическая глубина анестезии характеризовалась отсутствием этих пяти рефлексов. Нормальная неврологическая функция – их сохранностью: переворачиванием крыс на лапки при расположении на плоскости на спине, избеганием тактильного и ноцицептивного раздражителя [7].

Стандартизацию техники оперативного вмешательства проводили на 3 сут крысах-самцах в объёме односторонней лапаротомической орхиэктомии. В пределах объёма вмешательства для сравнения риска развития интра- и послеоперационных осложнений, затрачиваемого хирургического времени, степени травматизации оценивали различные модификации отдельных оперативных приёмов ($n = 20$). В конечном виде методика орхиэктомии состояла из 4 этапов: доступ, мобилизация семенника, орхиэктомия, ушивание.

Операцию проводили с соблюдением правил асептики и антисептики в положении лёжа на спине с отведёнными конечностями при 3–10-кратном оптическом увеличении. Для серии операций инструменты не меняли при условии, что их содержали в чистоте и дезинфицировали между животными погружным способом в 70 % изопропиловом спирте с последующим ополаскиванием в дистиллированной воде. После индукции животное фиксировали к столику пластырем за конечности, отграничивали зону вмешательства. Операционное поле обрабатывали ватными палочками по схеме: повидон-йод 10 % раствор – сухо – хлоргексидина биглюконат водный 0,5 % раствор – сухо.

На этапе лапаротомического доступа на передней брюшной стенке находили линию, соединяющую пупок и проекцию бедренного сосудисто-нервного пучка отведённой конечности. По этой линии латерально-вниз от пупка на 3 мм отмечали точку-ориентир. Через точку-ориентир параллельно паховой складке (параингвинально) выполняли разрез кожи длиной 3 мм так, чтобы отложенная точка была его серединой. Далее раздвигали края раны, тупо отсепаровывали кожу, сдвигали вниз паховую жировую клетчатку, пересекали мышцы живота и париетальный листок брюшины.

На этапе мобилизации семенника орган находили интраперитонеально в области, примыкающей к паховой стенке брюшной полости. Захватив пинцетом оболочки семенника, его с придатком и семенным канатиком извлекали наружу через разрез, при этом нарушая целостность направляющей связки.

На этапе орхиэктомии перевязывали семявыносящий проток вместе с кровеносными сосудами семенника наложением лигатурного шва с 3 узлами рассасывающейся викриловой нити. По лигатуре ампутировали семенник с придатком. Вправляли оставшуюся культю канатика в брюшинную полость.

На последнем этапе послойно ушивали рану рассасывающимся шовным материалом викрил 5/0 (Ethicon, США). Для изоляции послеоперационной раны

защитной плёнкой на нее наносили каплю медицинского клея БФ-6 (Муромский приборостроительный Завод, Россия).

Этапы односторонней лапаротомической орхиэктомии у 3 сут крыс представлены на рисунок 2.

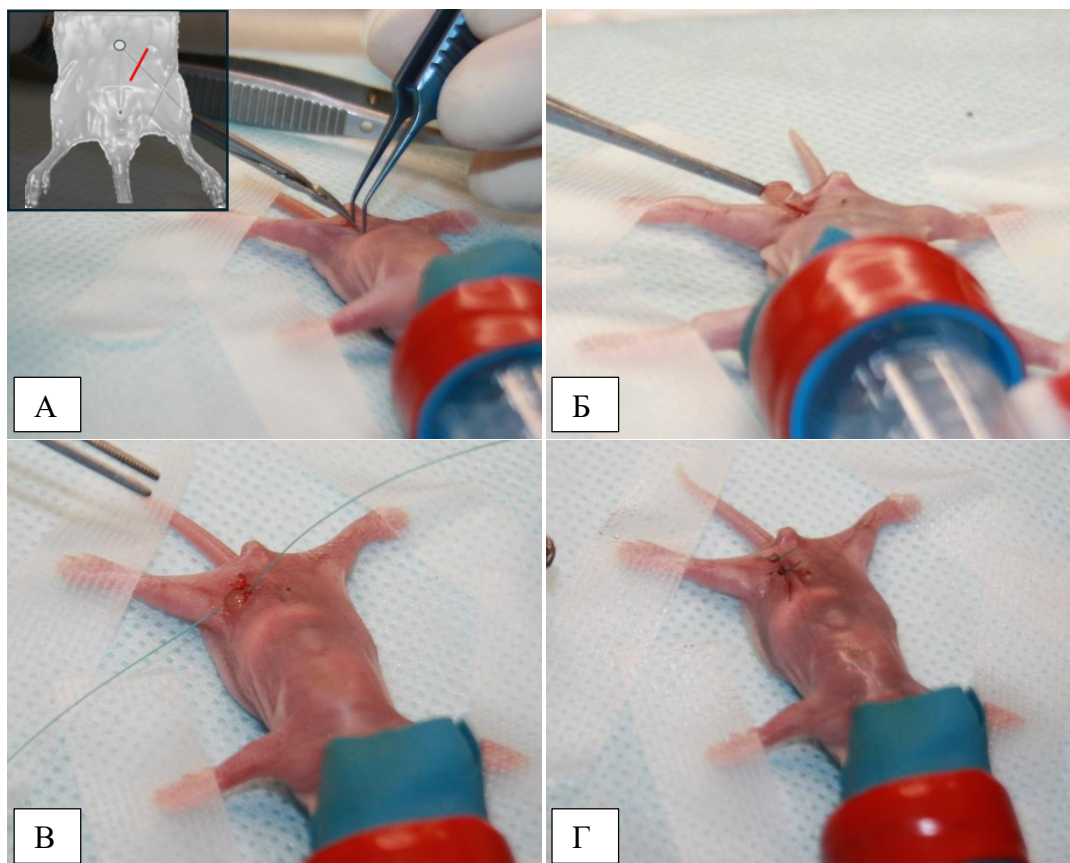


Рисунок 2. Этапы односторонней лапаротомической орхиэктомии (отграничитель операционного поля удалён): А – параингвинальный доступ; Б – мобилизация семенника; В – орхиэктомия; Г – закрытие раны

В последующем выполняли гистологическое исследование операционного материала (семенников), окрашенного гематоксилином и эозином [11].

Апробацию методики проводили посредством подсчёта летальных исходов и послеоперационных осложнений после выполнения орхиэктомии в условиях анестезии изофлураном ($n = 76$), а также и оценкой уровня общего тестостерона после операции ($n = 12$) в сравнении с ложнооперированными

особями (n = 12).

Уровень общего тестостерона у крыс-самцов оценивали на 30 и 120 сут жизни. Сроки исследования были обусловлены наступлением подросткового периода жизни и половой зрелости. В качестве группы сравнения использовали ложнооперированных контрольных особей, прошедших общую анестезию и лапаротомию в аналогичные сроки.

Взятие крови осуществляли у фиксированных в рестейнере грызунов из боковой вены хвоста с 12 ч до 14 ч дня – в период наибольшей секреции тестостерона в течение суток [4]. Отбор осуществляли в предварительно промытый натриевой солью гепарина (B.Braun, Германия) инсулиновый шприц в объёме 0,3–0,5 мл. Далее кровь переносили в пробирки типа «Эппендорф», которые размещали в штативах над хладоэлементом для поддержания температуры 2–8 °С. Кровь центрифугировали на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) 10 мин при 3000 об/мин (фактор разделения 6680 g). Анализировали супернатант.

Концентрацию тестостерона в плазме крови оценивали методом иммуноферментного анализа с использованием набора «Тестостерон-ИФА-Бест» (Вектор-Бест, Россия). Оптическую плотность измеряли при помощи микропланшетного анализатора CLARIOstar (BMG Labtech, Германия).

Сбор, хранение, первичную обработку данных осуществляли в программном обеспечении (ПО) Office Excel 2016. Статистический анализ результатов проводили при помощи ПО Statistica версии 10.0 и среды программирования R версии 4.4.2. Проверку нормальности распределения данных осуществляли при помощи критерия Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия временных показателей оценивали с помощью критерия Гехана-Вилкоксона, уровня тестостерона – U-критерия Манна-Уитни, показателя летальности – критерия χ^2 . Токсичность анестетиков оценивали методом пробит-анализа, используя обобщённую линейную модель с бинарным откликом и пробитной функцией связи без логарифмирования дозы.

Токсичность представлена в виде $LD_{50} \pm SE$, где LD_{50} – средняя смертельная доза, SE – стандартная ошибка.

Результаты и обсуждение. На этапе разработки анестезиологического обеспечения выбор методик был осуществлён исходя из особенностей неонатальной орхиэктомии: высокий риск вмешательства на новорождённом животном, короткий срок операции – менее 12 мин, серийность вмешательств – от 8 до 20 орхиэктомий подряд, необходимость сохранения спонтанного дыхания ввиду невозможности интубации трахеи и искусственной вентиляции лёгких.

Неингаляционная анестезия посредством в/б введения комбинации тилетамин + золазепам в диапазоне доз от 5 до 50 мг/кг или тиопентала натрия в диапазоне от 1 до 12 мг/кг сопровождалась либо практически полным сохранением ноцицептивной чувствительности, либо острой кардиореспираторной депрессией с последующей гибелью. Срок гибели животных в обеих группах варьировал от 2 до 120 мин после инъекции и зависел от дозы. Все попытки базовых мероприятий по поддержанию жизнедеятельности в объёме компрессий грудной клетки, ингаляции 100 % кислорода, согревания были безрезультатны. Таким образом, обезболивающее действие неингаляционных анестетиков оценено не было.

Установлено, что LD_{50} тилетамина и золазепама для 3 сут крыс составила $27,7 \pm 3,96$ мг/кг, тиопентала натрия – $7,1 \pm 0,74$ мг/кг. Экспериментальные точки и расчётные кривые доза-летальность представлены на рисунке 3.

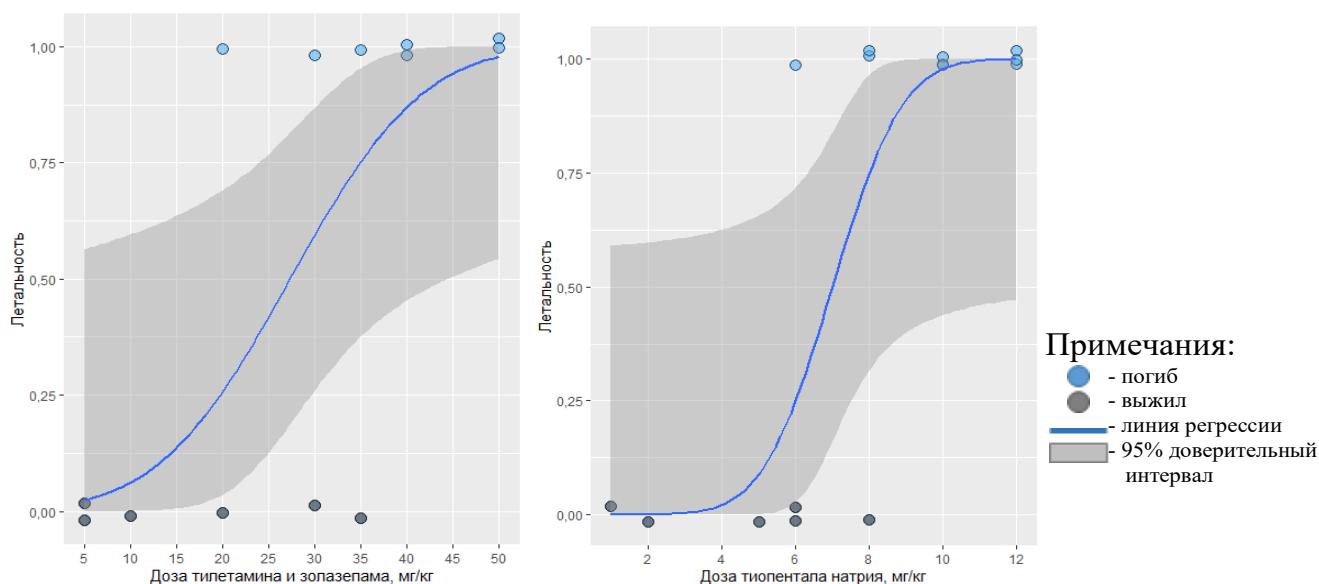


Рисунок 3. Токсичность комбинации тилетамин + золазепам и тиопентала натрия для 3 сут крыс при в/б введении

Считают, что по сравнению с неингаляционной анестезией, методика криогибернции более предпочтительна у новорождённых грызунов [7]. В группе криоанестезии уровень смертности составил 25 % (3 из 12 наблюдений). Летальные исходы наблюдали в течение 25–30 мин после индукции. Ещё в 25 % случаев наблюдали выраженную кардиореспираторную депрессию, требовавшей в половине случаев экстренного согревания и базовых мероприятий по поддержанию жизнедеятельности. Среди выживших особей развитие гибернации, соответствовавшей по уровню хирургической стадии анестезии, наблюдали через 12,3 мин. Период отсутствия болевой чувствительности после однократного охлаждения составлял 13,6 [5,8; 16,3] мин. Было отмечено, что время гибернации существенно варьировало в зависимости от температуры в операционной и в 44 % (4 из 9) случаев было меньше 12 мин – предполагаемого целевого времени выполнения орхиэктомии. Медиана времени восстановления рефлексов в термокамере составляла 9,3 мин при температуре 42 ± 2 °C.

Ингаляционная анестезия диэтиловым эфиром после индукционного болюса характеризовалась концентрацией анестетика в пространстве смесителя от 3 до 8 об % (от 0,96 до $2,56 \times 10^{-4}$ мг/м³) при комнатной температуре.

Летальность в группе составляла 20 %, медиана времени развития хирургической стадии анальгезии – 4,6 мин, медиана восстановления рефлекса после 20 мин поддержания анестезии – 7,1 мин.

В группе животных, получавших изофлуран высокопоточной методикой, летальных исходов не наблюдали. Медиана времени развития потери реакции на разрез кожи составляла 3,8 мин, время восстановления после 20 мин анестезии – 6,5 мин.

В группе животных, получавших изофлуран болюсной методикой, летальность также отсутствовала. Медиана времени развития потери реакции на разрез кожи составляла 3,2 мин, времени восстановления после 20 мин поддержания анестезии – 7,5 мин.

Сравнительная характеристика различных анестезиологических методик приведена в таблица 1.

Таблица 1

Эффективность и безопасность различных видов анестезии у 3 сут крыс

Анестетик / методика анестезии	Доза анестетика	Летальность (погибло \ всего в группе)	Срок потери болевых рефлексов после начала анестезии, мин	Срок восстановления спонтанного передвижения после прекращения анестезии, мин
Криоанестезия	-	3/12*	12,3 [9,6; 15,2]*	9,3 [7,0; 12,5]
Диэтиловый эфир / болюсная методика	3–8 об %	2/10	4,6 [3,1; 5,8]	7,1 [4,5; 12,3]
Изофлуран / высокопоточная методика	индукция – 5 об %; поддержание – 1,5–2,5 об %	0/12	3,8 [2,1; 4,3]	6,5 [4,1; 11,8]
Изофлуран / болюсная методика	-	0/16	3,2 [2,1; 4,2]	7,5 [6,1; 10,5]
Примечание: * - различия значимы в сравнении с группой «Изофлуран / болюсная методика», $p < 0,05$				

Таким образом, среди при сравнении методик наиболее эффективным и безопасным, обеспечивающим стабильные условия анестезии и быстрое восстановление после ее окончания оказалась анестезия изофлураном.

Однако болюсная методика по сравнению с высокопоточной была более экономичной по расходу анестетика, ввиду отсутствия технической возможности проведения анестезии на метаболическом потоке – потенциально более анестетик-сберегающей методики. Также болюсная методика была менее требовательна по техническому оснащению, ввиду отсутствия необходимости использования полноразмерной наркозно-дыхательной станции. Так установка для болюсной ингаляции анестетиков была выполнена из расходного общелабораторного имущества, что способствовало снижению потребности в специализированном оборудовании при масштабировании эксперимента.

На следующем этапе исследования болюсная и высокопоточная методики анестезии изофлураном характеризовались отсутствием сопряжённой летальности, редкими эпизодами кардиореспираторной депрессии, хорошей управляемостью и быстрым восстановлением.

На этапе разработки последовательности орхиэктомии было опробовано несколько оперативных доступов, приёмов эктомии семенника, оценена встречаемость исходов. Точность орхиэктомии была подтверждена гистологическим исследованием операционного материала (рис 4).

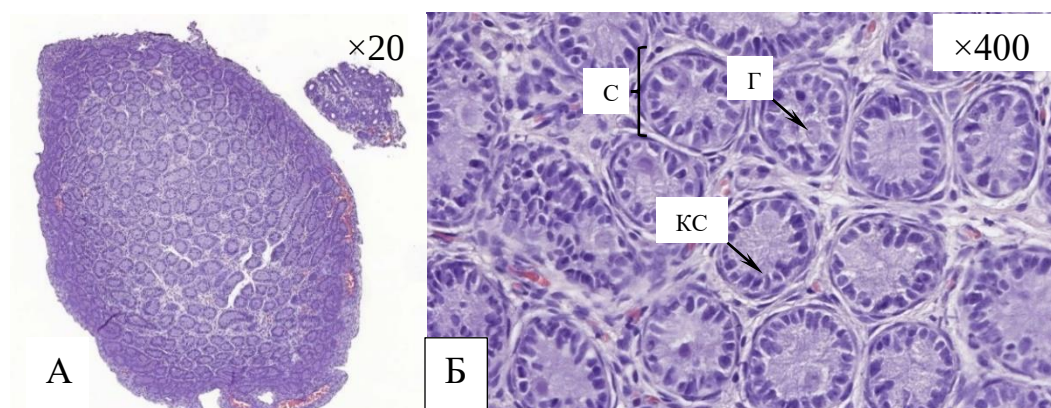


Рисунок 4. Семенник с придатком 3 сут крысы на малом (А) и большом (Б) увеличении, окраска гематоксилином и эозином. Строение – вариант нормы, видны характерные элементы: семенной каналец (С) с клетками Сертоли (КС) и гоноцитами (Г)

У крыс в неонатальный период семенники с придатками расположены интраперитонеально. Среди испытанных лапаротомических доступов наиболее подходящим оказался параингвинальный разрез через точку, отложенную по пупочно-бедренной линии на 3 мм от пупка латерально-вниз в сторону задней конечности. Отмечено, что смещение линии разреза ближе к паху сочетается с возникновением случаев травматизации пахового сосудисто-нервного пучка и развитием острого массивного кровотечения. Смещение доступа в сторону срединной линии, использование срединного и парасагиттального разреза сопровождалось трудностью локализации семенника, а также выполнением травматического поперечного рассечения мышечных волокон. Последнее, ассоциировалось с несостоятельностью мышечного шва, что отсроченно приводило к развитию подкожной эвентрации кишки у 50 % (6 из 12 случаев) оперированных животных.

Для обеспечения состоятельности гемостаза культи после ее вправления в брюшную полость было испробовано несколько вариантов оперативного приема эктомии семенника с последующей тракцией культи и наблюдением в течение 5 мин за развитием возможного кровотечения. Установлено, что острое отсечение канатика ножницами или скальпелем без последующего лигирования сопряжено с развитием кровотечения. Последовательное наложение на канатик микрососудистого зажима типа «бульдог» на 30 с и отсечение семенника ножницами гарантировало отсутствие осложнений. Наложение одной лигатуры с тремя узлами без прошивания канатика также гарантировало надёжный гемостаз и отсутствие соскальзывания шовного материала. Ввиду большего удобства выполнения, в дальнейшем использовали преимущественно последний приём.

При апробации разработанной последовательности орхиэктомии на фоне болюсной или высокопоточной анестезии изофлураном летальность составила 4 случая из 76 наблюдений (5,2 %) и была сопряжена с острой массивной кровопотерей. В послеоперационном периоде наблюдали 6 случаев

подкожной эквентрации кишки без ущемления (8,3 %), 1 гнойный абсцесс послеоперационного рубца (1,3 %).

При оценке эффективности моделирования эндокринной дисфункции было установлено кратное снижение концентрации тестостерона в опытной группе по сравнению с контрольной группой (рисунок 5). На 30 и 120 сут жизни уровень тестостерона в группе односторонней орхиэктомии был ниже по сравнению с группой ложноперированных особей: 0,9 [0,55; 0,95] против 7,0 [5,5; 8,0] нг/мл и 1,0 [0,45; 1,5] против 13,5 [11,0; 14,0] нг/мл, соответственно ($n = 12$, различия достоверны по U-критерию Манна-Уитни)

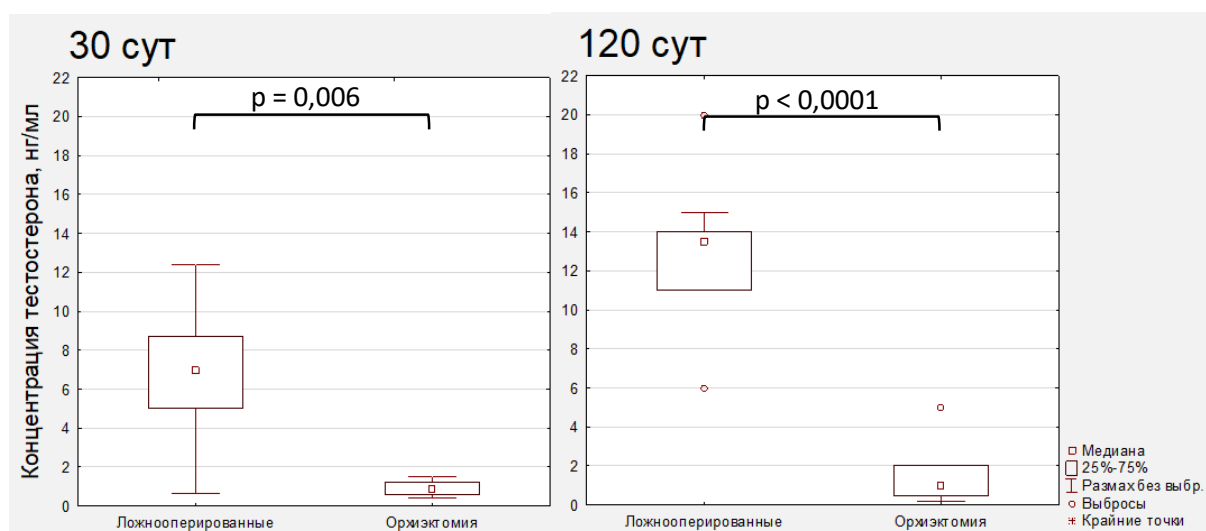


Рисунок 5. Концентрация тестостерона у самцов крыс на 30 и 120 сут жизни после моделирования гипогонадизма

Заключение.

В ходе работы были подобраны оптимальные условия общей анестезии, стандартизована и апробирована последовательность односторонней орхиэктомии. Методической особенностью настоящего исследования было использование болюсной схемы анестезии с помощью оригинальной ингаляционной установки для изофлурана, обоснование и использование нового доступа, ранее не описанного в литературе при данном вмешательстве. Результаты оценки эндокринного статуса прооперированных взрослых особей

демонстрируют устойчивое развитие эндокринной дисфункции. Последнее позволяет рассматривать использованную последовательность манипуляций как воспроизводимую модель гипогонадотропного гипогонадизма [5].

Установлен перечень часто встречаемых осложнений как со стороны анестезии (кардиореспираторная депрессия), так и со стороны вмешательства (эвентрация из-за несостоятельности мышечного шва, рубцовый абсцесс).

Необходимо отметить, что по данным литературы неонатальное использование изофлурана у грызунов ассоциировано с развитием динамической кишечной непроходимости [7]. В ходе нашего исследования признаков развития данного состояния отмечено не было.

Литература.

1. Дедов И.И., Мокрышева Н.Г., Мельниченко Г.А., Роживанов Р.В., Камалов А.А., Мкртумян А.М., Халимов Ю.Ш., Ворохобина Н.В. Проект клинических рекомендаций «Синдром гипогонадизма у мужчин». *Ожирение и метаболизм*. 2021;18(4):496-507. <https://doi.org/10.14341/omet12817>
2. Салухов В.В., Айсаева С.В. Функциональный гипогонадизм у мужчин: основные причины и нейроэндокринные механизмы его развития. *Медицинский Совет*. 2024; 6: 112–123. <https://doi.org/10.21518/ms2024-210>
3. Волкова Н.И., Сафроненко А.В., Ганцгорн Е.В. Дегтярева Ю.С. Клинико-фармакологические основы применения лекарственных препаратов тестостерона для заместительной гормональной терапии при гипогонадизме у мужчин. *Ожирение и метаболизм*. 2022; 19(2): 233–241. <https://doi.org/10.14341/omet12850>
4. Матичин А.А., Фаустова Н.М., Каргопольцева Д.Р., Макарова М.Н. Циркадианные колебания уровня тестостерона в плазме крови половозрелых самцов крыс. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2020; 2: 36–42. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-02-04>
5. Способ моделирования мужского гипогонадотропного гипогонадизма Патент RU 2749477 С1. Байрамов А.А., Никитина И.Л., Юхлина Ю.Н., Гринева

Е.Н., Шабанов П.Д., Галагудза М.М., Кельмансон И.А., Дейнега А.С., Зеленер А.О., Саракаева Л.Р., Плаксина А.О. Дата регистрации: 11.06.2021.

6. Юхлина Ю.Н. Роль системы кисспептина KISS1/KISS1R в генезе задержки старта пубертата и мужского гипогонадотропного гипогонадизма (клинико-экспериментальное исследование) : специальность 14.01.02 «Эндокринология» : дисс. на соискание учёной степени к.м.н., 2019: 128.

7. Bernhardt J.A., d'Acampora A.J., Tramonte R., Serafim J. Effect of post-natal castration on sepsis mortality in rats. *Acta Cir Bras.* 2007. 22(1): 22–29. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502007000100004>

8. SOP 7.30. Orchidectomy (Mice) : University Animal Care Committee Standard Operating Procedure. URL: <https://www.queensu.ca/animals-in-science/policies-procedures/sop/mice/7-30> (31.03.2026).

9. Anesthesia and Analgesia: Neonatal Mice and Rats. URL: <https://www.bu.edu/research/ethics-compliance/animal-subjects/animal-care/anesthesia/anesthesia-and-analgesia-neonatal-mice-and-rats-iacuc> (31.03.2026).

10. Лабораторное животноводство. Под ред. А.И. Метелкина. М.: Медгиз; 1958: 323.

11. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии : Руководство. Под ред. Д.Э. Коржевского. СПб.: СпецЛит; 2013: 127.

References.

1. Dedov I.I., Mokrysheva N.G., Melnichenko G.A., Rozhivanov R.V., Kamalov A.A., Mkrtumyan A.M., Khalimov Yu.Sh., Vorokhobina N.V. Draft clinical guidelines «Hypogonadism syndrome in men». *Obesity and metabolism.* 2021;18(4):496-507. (In Russ.). <https://doi.org/10.14341/omet12817>

2. Salukhov V.V., Aisaeva S.V. Functional hypogonadism in men: the main causes and neuroendocrine mechanisms of its development. *Medical Council.* 2024; 6: 112–123. (In Russ.). <https://doi.org/10.21518/ms2024-210>

3. Volkova N.I., Safronenko A.V., Gantsgorn E.V., Degtyareva Yu.S. Clinical and pharmacological basis for the use of testosterone drugs for hormone replacement therapy for hypogonadism in men. *Obesity and Metabolism*. 2022; 19 (2): 233–241. (In Russ.). <https://doi.org/10.14341/omet12850>
4. Matichin A.A., Faustova N.M., Kargopol'tseva D.R., Makarova M.N. Circadian fluctuations in testosterone levels in the blood plasma of sexually mature male rats. *Laboratory animals for scientific research*. 2020: 2: 36–42. (In Russ.). <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-02-04>
5. Method for modeling male hypogonadotropic hypogonadism Patent RU 2749477 C1. Bayramov A.A., Nikitina I.L., Yukhlina Yu.N., Grineva E.N., Shabanov P.D., Galagudza M.M., Kelmanson I.A., Deinega A.S., Zelener A.O., Sarakaeva L.R., Plaksina A.O. Date of registration: 11.06.2021. (In Russ.).
6. Yukhlina Yu.N. The role of the kisspeptin system KISS1/KISS1R in the genesis of delayed onset of puberty and male hypogonadotropic hypogonadism (clinical and experimental study): specialty 14.01.02 «Endocrinology»: diss. for the degree of candidate of medical sciences, 2019: 128. (In Russ.).
7. Bernhardt J.A., d'Acampora A.J., Tramonte R., Serafim J. Effect of post-natal castration on sepsis mortality in rats. *Acta Cir Bras*. 2007. 22(1): 22–29. <https://doi.org/10.1590/s0102-86502007000100004>
8. SOP 7.30. Orchidectomy (Mice) : University Animal Care Committee Standard Operating Procedure. URL: <https://www.queensu.ca/animals-in-science/policies-procedures/sop/mice/7-30> (31.03.2026).
9. Anesthesia and Analgesia: Neonatal Mice and Rats. URL: <https://www.bu.edu/research/ethics-compliance/animal-subjects/animal-care/anesthesia/anesthesia-and-analgesia-neonatal-mice-and-rats-iacuc> (31.03.2026).
10. Laboratory Animal Husbandry. Ed. by A.I. Metelkin. Moscow: Medgiz; 1958: 323. (In Russ.).
11. Morphological Diagnostics. Preparation of Material for Histological Examination and Electron Microscopy: A Guide. Ed. by D.E. Korzhevsky. St. Petersburg: SpetsLit; 2013: 127. (In Russ.).