

© I. M. Антонян

УДК 616-018

I. M. Антонян

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ІНТРАТЕСТИКУЛЯРНОГО ВВЕДЕННЯ КУЛЬТУРИ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА СТАН ПІДДОСЛІДНИХ ЩУРІВ НА ТЛІ ЇХ УРАЖЕННЯ ДВОХЛОРІСТИМ КАДМІЄМ

Харківська медична академія післядипломної освіти (м. Харків)

Протягом останніх років одною з наукових тем, що досліджуються в ХМАПО, є «Вивчення індукції направленого диференціювання стромальних клітин, кісткового мозку і жирової тканини і розробка технології використання диференційованих аутологічних клітин для лікування захворювань різного генезу» (номер державної реєстрації 0111U004772).

Вступ. Зниженням народжуваності на сьогодні занепокоєні суспільства більшості країн світу. Як і будь-яка інша проблема, ця теж має свої причини, які полягають у стані здоров'я, у тому числі і української популяції. Останнім часом все більшу увагу лікарів звертає до себе проблема чоловічого здоров'я у шлюбі, оскільки все частіше це є головною причиною того, що пара не може мати дітей. Питання безпліддя є актуальним для 50–100 млн. людей [1], тобто для однієї з 5–7 пар репродуктивного віку, і у половині випадків причиною цього є чоловічий фактор [10]. Серед багатьох причин, що обумовлюють виникнення патоспермії, однією з провідних є вторинний андрогенний дефіцит (ВАД). Цей стан обумовлений багатьма причинами: зовнішніми факторами, віковими змінами й та ін. [5,10].

Головною складовою погіршання якості сперми є зниження секреторної активності яєчок, яке визначається рівнем тестостерону, корекція якого можлива за рахунок гормонзамісної терапії [3,4]. Така лікування ефективно, але має досить багато недоліків: його не можна перервати, тобто пацієнт має постійно вживати відповідні ліки. Крім того, така терапія загрожує підвищенню ризику виникнення онкологічних захворювань [13,14]. Таким чином виникає потреба у розробці та впровадженні методів лікування ВАД, які б не потребували постійного вживання лікарських препаратів та не мали б ризику виникнення важких побічних ефектів.

Останнім часом багато уваги приділяється таким альтернативним методам лікування які основані на використанні стовбурових клітин [6,8,11,12]. На відміну від традиційної замісної терапії із застосуванням лікарських засобів, цей – патогенетично обґрунтований та спрямований на відновлення сперматогенного епітелію.

Мета дослідження. В межах цієї роботи, нашим завданням було перевірити гіпотезу щодо ефективності застосування КСК для відновлення морфоструктури сім'яників щурів з експериментальним гіпогонадизмом.

Головним завданням нашого експерименту було отримання вірогідних підтверджень щодо впливу

стовбурових клітин на відновлення сперматогенного епітелію після застосування токсичної дози CdCl₂.

Об'єкт і методи дослідження. Нами був проведений експеримент по вивчення ефективності кількості стовбурових клітин (КСК) на гормональний стан піддослідних тварин на тлі їх ураження CdCl₂, за допомогою якого була відтворена модель ВАД. Для оцінки гормонального статусу ми використовували наступні показники: тестостерон (T), лютеїнізуючий гормон (ЛГ), пролактин (ПРЛ), глобулін зв'язуючий статеві гормони (ГЗСГ), андрогенний індекс (AI), який обчислювали за формулою: AI=(T/GЗСГ)100%.

Також нами був вивчений морфологічний стан сім'яників та проведена морфометрична оцінка стану сперматогенного епітелію [7] за такими кількісними показниками: індекс сперматогенезу (ІС), відносна кількість звивистих канальців з злущеним сперматогенным епітелієм (ЗК), відносна кількість звивистих канальців з сперматоцитами у метафазі 2-го поділу дозрівання (з 12-ю стадією мейозу) та кількість нормальних сперматогоній у звивистому сім'яному канальці (НС). ІС підраховували за 4-х бальною системою – фіксували у звивистому сім'яному канальці наявність шарів: сперматогоній, сперматоцитів, сперматид і сперматозоїдів (кожний шар – один бал). Потім за формулою SA/100, де A – число шарів у кожному канальці, 100 – число врахованих канальців, вираховували індекс сперматогенезу.

Модельна патологія була відтворена на статевозрілих щурах шляхом введення токсину в концентрації 150 мкг/100 г ваги тварини, яка була підібрана раніше експериментальним шляхом. В експерименті було використано 5 груп експериментальних тварин: 1 група – інтактна (ІГ), 2 група – експериментальна патологія (ЕП), тваринам 3-ї групи вводили культуру стовбурових клітин у кількості по 80 000 в кожне яєчко, 4-ї групи – у кількості по 100 000 в кожне яєчко, 5-ї групи – у кількості по 200 000 в кожне яєчко.

Культуру стовбурових клітин отримували згідно з розробленої методики [9].

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етических принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Результати досліджень та їх обговорення. Вивчення динаміки змін гормонального стану тварин

МОРФОЛОГІЯ

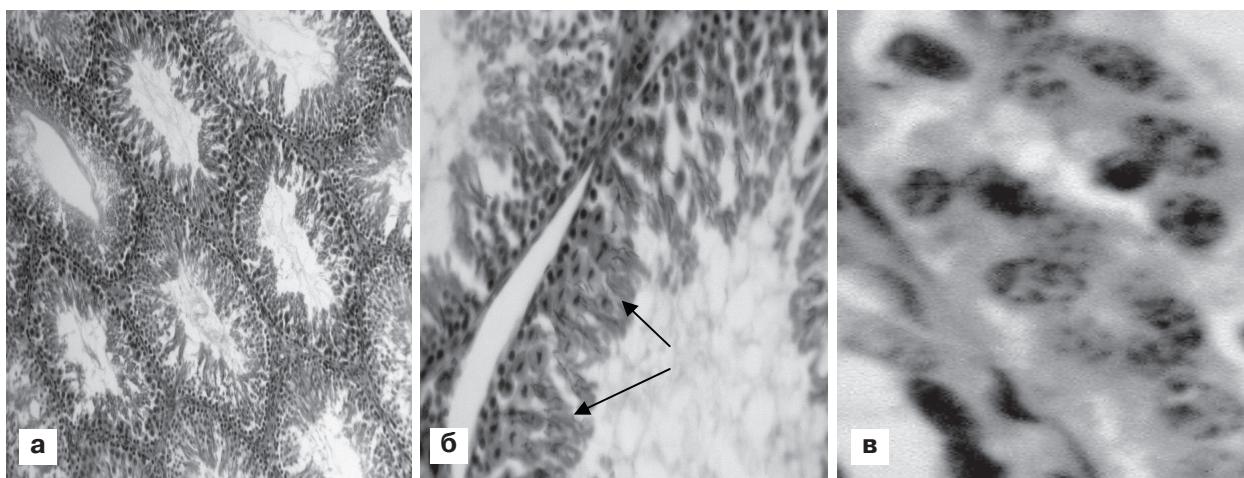


Рис. 1. Яєчко інтактних щурів: а – у сім'яних канальцях видно повний пул статевих клітин від сперматогоній до сперматозоїдів ($\times 100$); б – у стінці канальця видно сперматоцити у метафазі І-го та ІІ-го поділу ($\times 250$); в – нормохромні клітини Лейдіга у міжканальцевому локусі ($\times 400$). Гематоксилін-еозин.

клітини різних етапів розвитку розміщені у строгому порядку, концентричними шарами згідно зі стадіями сперматогенного циклу. Поєднання різних типів статевих клітин у канальцях типове. В різних канальцях чітко простежено не тільки сперматогенез (процес послідовних перебудов зародкових клітин: сперматогонія \rightarrow сперматозоїд), а і сперміогенез – етапи клітинних перетворень від сперматиди до сперматозоїда. Стрічка сперматогенного епітелію містила не менш 4-6 рядів клітин. Між сперматогоніями на базальній мембрани розміщені численні клітини Сертолі (підтримуючи клітини). Чітко видно їх світле грушоподібне ядро з ядерцем. Цитоплазматичні відростки клітин маскуються статевими клітинами подальших етапів розвитку. Міжканальцева сполучна тканина подана дуже обмежено. В цих міжканальцевих локусах видні кровоносні судини, навколо яких гуртується нечисленні фібробласти та клітини Лейдіга (інтерстиціальні ендокриноцити або гландулоцити). Клітинні мембрани останніх часто погано

роздінялися, ядра клітин овальної форми, в основному нормохромні, в них видно чітку розсип хроматинової зернистості (рис. 1).

Після введення тваринам токсину спостерігалися наступні морфологічні зміни. Відмічена виразна деструкція більшості сім'яних канальців з атрофією сперматогенного епітелію. Канальці зменшені у розмірі, контури їх часто звивисті, деякі канальці у стадії спадання. На частині мікропрепаратів видно, що навколо деструктивно змінених канальців утворюється молода сполучна тканина, яка витісняє інтерстиціальну тканину. Як правило, статеві клітини як ранніх, так і пізніших етапів розвитку атрофовані або виявляються дуже нечисленні сперматогонії невизначеного типу та індиферентні статеві клітини; клітини Сертолі часто деструктивні на погляд, нечисленні, з прогалинами у розташуванні. У міжканальцевих локусах клітини Лейдіга проліферують, ядра клітин дрібні, гіперхромні (рис. 2). Кількісна оцінка сперматогенезу співпадала з мікроскопічною

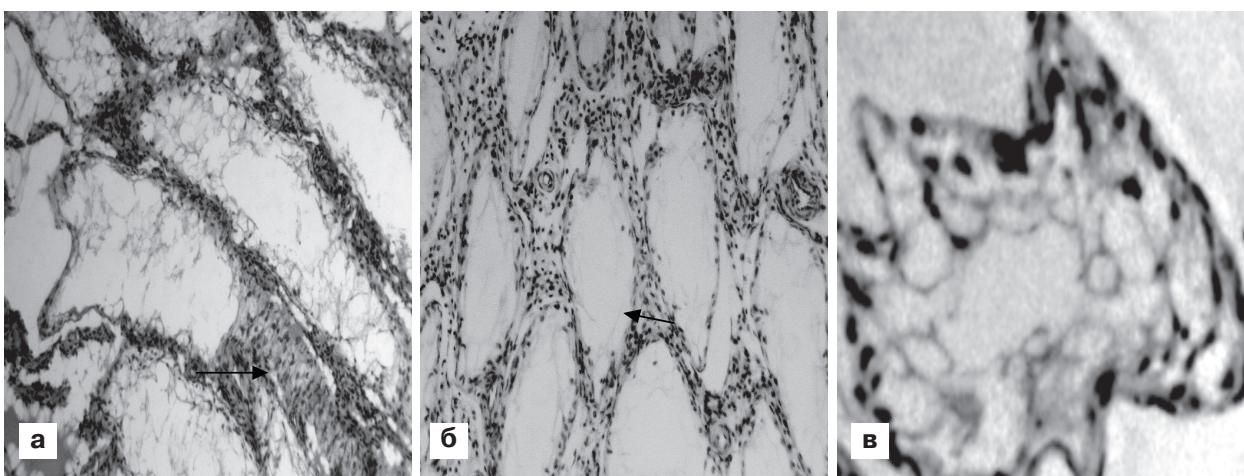


Рис. 2. Яєчко щурів після введення $CdCl_2$ дозою 150 мкг/100 г: а – атрофія сім'яних канальців з повним порушенням сперматогенезу, проліферація клітин Лейдіга у міжканальцевому локусі; б – молода сполучна тканина між атрофованими канальцями; в – у сім'яному канальці візуалізуються одиничні клітини Сертолі та сперматогонії, індиферентні статеві клітини. Гематоксилін-еозин. а-б – $\times 200$, в – $\times 400$.

МОРФОЛОГІЯ

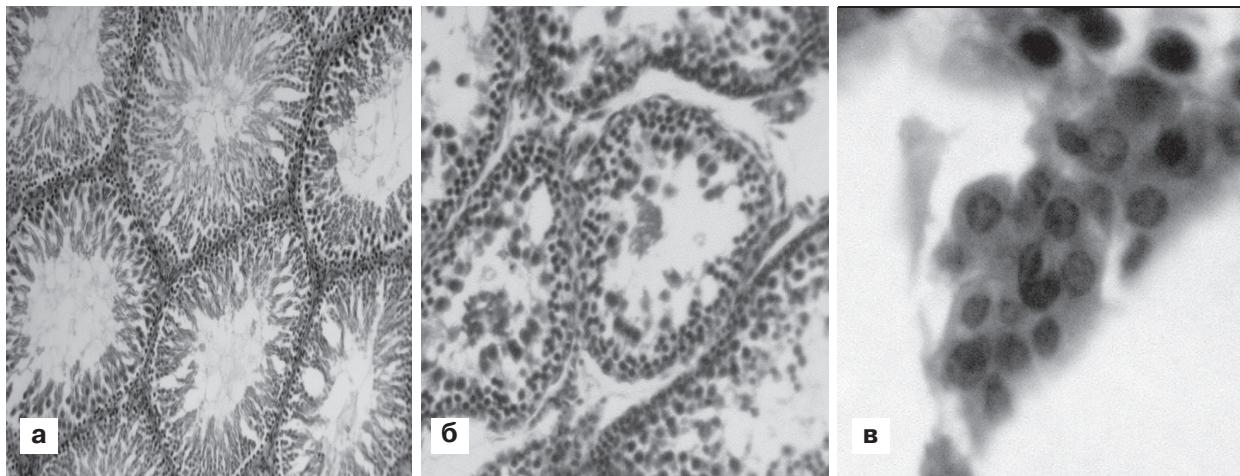


Рис. 3. Яєчко щурів, після трансплантації КСК дозою по 80000 клітин в кожне яєчко: а – сім'яні канальці нормального розміру, містять статеві клітини від сперматогоній до пізніх сперматид ($\times 100$); б – канальці зменшені за розміром, розвиток статевих клітин залишається на рівні сперматоцитів або ранніх сперматид ($\times 100$); в – у міжканальцевому локусі клітини Лейдіга з нормохромними ядрами, без хроматинової зернистості ($\times 400$). Гематоксилін-еозин.

картиною сім'яних залоз та свідчила про втрату канальцями сперматогененої функції. Всі ці зміни документують розвиток у щурів даної групи виразного гіпогонадизму.

Введення КСК в кількості по 80000 клітин в обидва яєчка сприяло відновленню морфоструктури значної кількості звивистих сім'яних канальців. Розмір їх, кількість рядів статевих клітин, правильне розташування рядів та самих статевих клітин згідно стадіям розвитку у таких канальцях нормалізувалося. Однак, канальці з повністю завершеним сперматогенезом, тобто присутністю зрілих сперматозоїдів, були відсутні. Серед сперматогоній видні різні клітини типу А. Клітини Сертолі також доволі численні, на погляд ядра їх не змінено. Okрім таких канальців виявлені канальці дещо меншого розміру, які містили тільки сперматогонії та сперматоцити, або сперматогонії, сперматоцити та ранні сперматиди. Сперматогонії у таких канальцях часто проліферували,

чіткість рядів статевих клітин та концентричне розташування їх не чітке. Крім того, незначна частина канальців (в основному поблизу білкової оболонки) не відновлювалася, залишалася спустошеною. В них видні лише сперматогонії та поодинокі сперматоцити I-го порядку, сім'яні кулі (рис. 3). Кількісна оцінка стану сперматогенезу у сім'яних канальцях підтвердила морфологічні ознаки певної стимуляції регенераторних проявів у них. Під впливом КСК дозою по 80000 клітин у кожне яєчко практично відновилася чисельність найбільш молодих статевих клітин сперматогоній на один канальць (при майже нульовому показнику у контрольних до них щурів), що є вирішальним для подальшого відтворення повноцінного сперматогенезу. В певній мірі відновлюється і ендокринна частина сім'яніків. У міжканальцевих локусах клітини Лейдіга менш чисельні, ядра їх нормохромні, хоча і мають місце тьмяні, без хроматинової зернистості ядра.

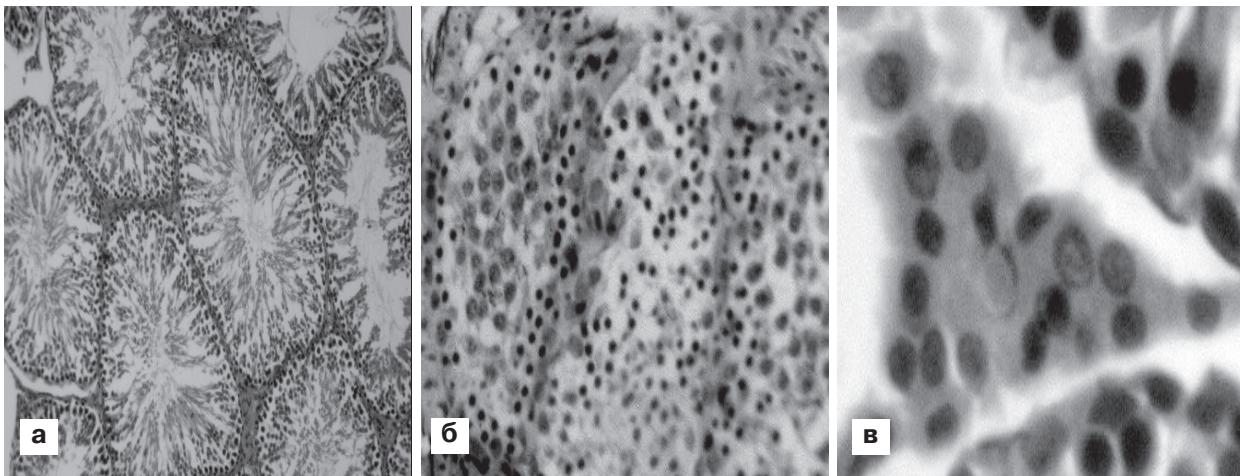


Рис. 4. Яєчко щурів, після трансплантації КСК дозою по 100000 клітин в кожне яєчко: а – статеві клітини у більшості сім'яних канальців розташовані правильними рядами, в них видні сперматогонії, сперматоцити, ранні сперматиди ($\times 100$); б – у стінці канальців статеві клітини розташовано хаотично ($\times 200$); в – стан клітин Лейдіга у міжканальцевому локусі наближено до нормального ($\times 400$). Гематоксилін-еозин.

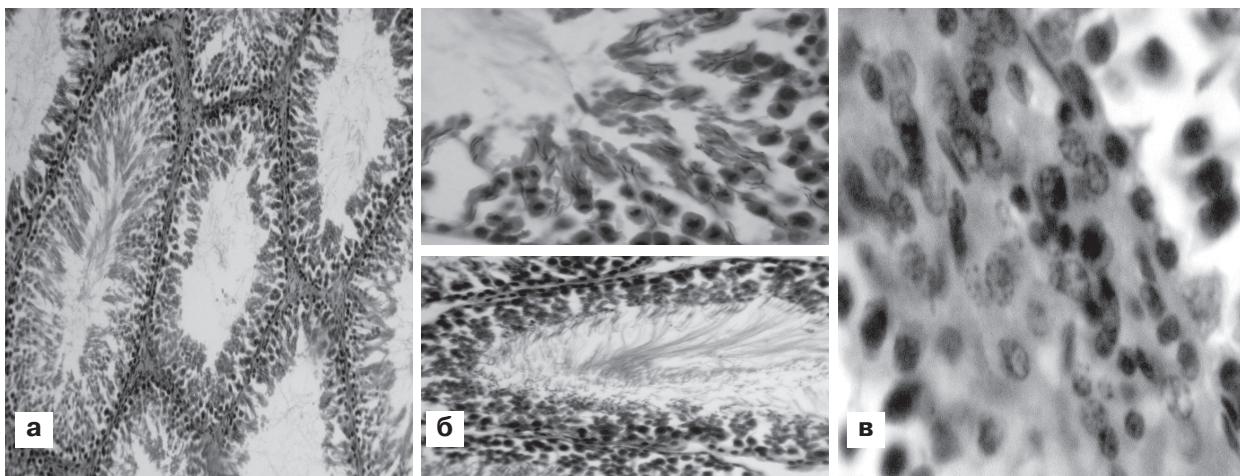


Рис. 5. Яєчко щурів, після трансплантації КСК дозою по 200000 клітин в кожне яєчко:
а – нормальній стан сім'яних канальців (х100); **б** – поділ сперматоцитів I-го і II-го порядку, у стрічці сперматогенного епітелію видні всі генерації статевих клітин (х250);
в – нормохромні клітини Лейдіга у міжканальцевому локусі (х400).
Гематоксилін-еозин.

Інтратестикулярне введення КСК в кількості по 100000 клітин в кожне яєчко сприяє більш повноцінному відновленню тестикулярної тканини ніж після введення тільки у одне яєчко. Переважна більшість сім'яних канальців мала нормальні розміри. Статеві клітини правильно розташовані, лише в деяких канальцях видно хаотичне розташування їх. Спустошених канальців не видно. Клон статевих клітин, що забезпечує сперматогенез, візуально повноцінний, але індекс сперматогенезу ще не досягає рівня інтактних тварин (табл. 2). Клітини Лейдіга у міжканальцевих локусах помірні за кількістю, ядра їх у більшості нормохромні, хроматинова зернистість в частині простежується (рис. 4).

Введення КСК в кількості по 200000 клітин в кожне яєчко забезпечує репарацію сім'яних канальців з повноцінним відновленням процесу сперматогенезу. Сім'яні канальці нормального розміру. У переважній більшості їх у стінці виявлено 3-4 шари сперматогенного епітелію, багато клітин Сертолі. Статеві клітини розташовані правильною рядами. Серед сперматогоній багато як темних клітин типу А, так і світлих клітин типу А. Простежено поділ сперматоцитів I-го і II-го порядку, наявність різних етапів диференціювання сперматид. Багато канальців містили і сперматозоїди. У міжканальцевій стромі навколо кровоносних судин клітини Лейдіга нормохромні з помітною хроматиновою зернистістю у ядрі (рис. 5).

Висновки.

Введення самцям щурів CdCl₂ призвело до патологічних змін у гормональному стані тварин: вміст Т знизився на 58,5%, вміст ЛГ збільшився на 18,3%, ПРЛ – 221,3%, ГЗСГ – на 126,6%, AI знизився на

8,4%. Також суттєво погіршились морфометричні показники сперматогенного епітелію: IC знизився на 88,5%, кількість ЗК знизила до 0, кількість клітин у 12 ст. мейозу – також, кількість НС знизила на 96,2%. Морфологічно відмічена виразна деструкція більшості сім'яних канальців з атрофією сперматогенного епітелію.

Порівняно з введенням КСК в кількості по 80000 та 100 000 клітин в кожне яєчко, найбільш позитивні морфологічні зміни спостерігалися при дозі 200000. У порівнянні з ЕП гормональний стан тварин покращився наступним чином: вміст Т збільшився на 55,1%, вміст ЛГ не відрізнявся від ІГ, вміст ПРЛ знизила на 231,8%, ГЗСГ – на 10,8%, AI збільшився на 97,2%. Також спостерігалися найбільш ефективні зміни морфометричних характеристик сперматогенного епітелію у порівнянні з ЕП: IC покращився на 97,6%, кількість ЗК збільшилась на 51,5%, кількість клітин у 12 ст. мейозу зросла на 84,0%, кількість НС зросла на 97,1%. Введення такої кількості клітин забезпечило репарацію сім'яних канальців з повноцінним відновленням процесу сперматогенезу.

Таким чином, усі вищеперелічені дані свідчать про те, що використання КСК в дозі по 200000 клітин в кожне яєчко є найбільш доцільним для корегування експериментального ВАД.

Перспективи подальших досліджень. Біологічні можливості КСК є важливим резервом замісної та відновлювальної терапії, однак вони потребують подальшого вивчення механізму своєї дії та безпеки застосування.

Список літератури

1. Бойко М. І. Чоловіча безплідність / М. І. Бойко // Нова медицина. – 2002. – № 4. – С. 36–39.
2. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин (методичні рекомендації). – Київ. – 2000. – 24 С.
3. Зачепило А. В. Особенности этиологии и патогенеза нарушений функции мужской репродуктивной системы, обусловленных экологическими факторами / А. В. Зачепило, С. Б. Аргифексов // Пробл. репродукции. – 2007. – Т. 13, № 4. – С. 76.

МОРФОЛОГІЯ

4. Корнеев И. А. Достоверность методов оценки уровня тестостерона и резистентность андрогеновых рецепторов при диагностике возрастного дефицита андрогенов у мужчин / И. А. Корнеев // Андрология и генитальная хирургия. – 2007. – № 2. – С. 6-9.
5. Кудлай Е. Н. Мужские факторы бесплодия на современном этапе / Е. Н. Кудлай // Здоровье мужчины. – 2007. – № 1. – С. 125–128.
6. Мірошников Я. О. Трансплантація пуповинної крові у лікуванні порушень сперматогенезу при чоловічому безплідді / Я. О. Мірошников // Медична психологія – 2010. – № 4. – С. 91-93.
7. Мірошников Я. О. Оцінка ефективності комплексного лікування хворих на варікоцеle з порушенням функції репродуктивної системи / Я. О. Мірошников, В. В. Дриманова // Практична медицина – 2009. – Т. 15, № 2. – С. 42-47.
8. Сериков В. Д. Плацента человека как источник гемопоэтических стволовых клеток / В. Д. Сериков, Ф. Куйперс // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2008. – Т. 3, № 2. – С. 45–50.
9. Технології виділення клітин строми кісткового мозку людини, розмноження *in vitro* та індукції в нервові клітини та остеобласти: Метод. рек / Щегельська О. А., Микулинський Ю. Ю., Омельченко О. А. [та ін.]. – Харків, ХМАПО, 2004. – С. 7-10.
10. Чоловічий фактор у безплідному шлюбі // Здоровье мужчины. – 2007. – № 2. – С. 183–187.
11. Chang C. M. Placenta-derived multipotentstem cells induced to differentiate into insulin-positive cells / C. M. Chang, C. L. Kao, Y. L. Chang [etal.] // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – V. 357 (2). – P. 414–420.
12. Gaylis F. D. Prostate cancer in men using testosterone supplementation / F. D. Gaylis, D. W. Lin, J. M. Ignatoff [etal.] // J. Urol. – 2005. – V. 174. – P. 534-538.
13. Rhoden E. L. Medical progress: Risks of Testosterone replacementtherapy and recommendations for monitoring / E. L. Rhoden, A. Morgentaler // N. E. J. M. – 2004. – V. 350. – P. 482-492.
14. Shabsigh R. The use of testosterone preparations for erectile dysfunction / R. Shabsigh // The Aging Male. – 2004. – V. 7. – P. 312-318.

УДК 616-018

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ІНТРАТЕСТИКУЛЯРНОГО ВВЕДЕННЯ КУЛЬТУРИ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА СТАН ПІДДОСЛІДНИХ ЩУРІВ НА ТЛІ ЇХ УРАЖЕННЯ ДВОХЛОРІСТИМ КАДМІЄМ

Антонян I. М.

Резюме. В статті наведені дані щодо вивчення ефективності використання культури стовбурових клітин (КСК) для лікування вторинного андрогенного дефіциту (ВАД) у самців щурів. В результаті проведеного експерименту було доведено, що використання КСК в кількості 200 000 клітин при інтратестикулярному введенні в обидва яєчка призводить до покращення гормонального стану тварин, а також до регенерації морфологічних та морфометрических характеристик тестикулярної тканини тварин.

Ключові слова: культура стовбурових клітин, вторинний андрогенний дефіцит.

УДК 616-018

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИНТРАТЕСТИКУЛЯРНОГО ВВЕДЕНИЯ КУЛЬТУРЫ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА СОСТОЯНИЕ ПОДОПЫТНЫХ КРЫС НА ФОНЕ ИХ ПОРАЖЕНИЯ ДВУХЛОРІСТИМ КАДМИЕМ

Антонян I. М.

Резюме. В статье приведены данные по изучению эффективности применения культуры стволовых клеток (КСК) для лечения вторичного андрогенного дефицита (ВАД) у самцов крыс. В результате проведенного эксперимента было доказано, что применение КСК в количестве 200 000 клеток при интратестикулярном введении в оба яичка приводит к улучшению гормонального статуса животных, а также к регенерации морфологических и морфометрических характеристик тестикулярной ткани животных.

Ключевые слова: культура стволовых клеток; вторичный андрогенный дефицит.

UDC 616-018

Studying Of Influence Of Intratestikulyarnogo Of Introduction Of Culture Of Stem Cells On The Condition Of Experimental Rats Against Their Defeat By Two-Chloride Cadmium

Antonyan I. M.

Summary. In the article are results of the experiments as for effectiveness stem cells culture (SCC) using for the secondary androgen deficiency (SAD) treatment rats males. The result of the experiment had shown, that the quantity of SCC 200000 in the every testicle had come to the improvement of the hormonal status of animals. This quantity of the SCC had come to the regeneration of the morphological and morphometrical characteristics of the animals testicles tissue.

Key words: stem cells culture, secondary androgen deficiency.

Стаття надійшла 9. 07. 2012 р.

Рецензент – проф. Шепітько В. І.