

УДК 616-018

В.Н. Лесовой, Н.М. Андоньева, И.М. Антонян,
Ю.Б. Ларьяновская**, С.А. Кешишян*

Областной клинический центр урологии и нефрологии им. В.И. Шاپовала, г. Харьков

** Харьковская медицинская академия последипломного образования*

*** Национальный фармацевтический университет, г. Харьков*

ПРИМЕНЕНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОГОНАДИЗМЕ

Приведены результаты изучения влияния клеток стромы костного мозга (КСКМ) на модельную патологию андрогенного дефицита (АД) у половозрелых крыс. В результате экспериментов доказано, что применение $CdCl_2$ в дозе 150 мкг/100 г массы тела животного приводит к воспроизведению стойкого АД. Применение КСКМ в количестве 200 000 в оба яичка является наиболее эффективным способом коррекции данной патологии и альтернативой медикаментозной терапии. Применение КСКМ не увеличивает риск развития злокачественных новообразований.

Ключевые слова: клетки стромы костного мозга, андрогенный дефицит.

За последнее время все больше супружеских пар репродуктивного возраста обращаются к врачам в связи с бесплодием [1]. Явление это часто носит вторичный характер, что может быть обусловлено как эндогенными факторами, так и экзогенными: стрессы, травмы, перенесенные заболевания и связанный с ними прием лекарственных препаратов и т. д. [2, 3].

Наши наблюдения показали, что все чаще причиной возникновения нарушений, влекущих за собой мужское бесплодие, является недостаточная секреция эндогенного тестостерона. Этот симптомокомплекс имеет множество названий — андрогенный дефицит (АД), вторичный гипогонадизм, частичный андрогенный дефицит, возрастной андрогенный дефицит и т. д. [4, 5]. Снижение уровня тестостерона имеет определенные клинические проявления: прогрессирующее увеличение массы тела, снижение либидо, эректильная дисфункция, патоспермия, повышенная потливость, снижение работоспособности, слабость, сонливость, утомляемость, депрессивные реакции.

Для восстановления уровня тестостерона существует два основных пути: проведение заместительной гормональной терапии (ЗГТ) и/или стимуляции активности клеток Лейдига для увеличения выработки эндогенного тестостерона [6–8]. Для этой цели,

как правило, используется хорионический гонадотропин, эффективность которого у взрослых невысока.

ЗГТ доказала свою эффективность в ходе многих исследований. Однако любой специалист отлично знает и о ее недостатках [9, 10]:

- необходимости постоянного применения препаратов;
- осуществлении постоянного мониторинга на наличие новообразований;
- контроле уровня гематокрита;
- побочных эффектах в результате применения лекарственного средства.

Многие ученые все чаще обращаются к поиску альтернативных методов лечения различных заболеваний с помощью клеток стромы костного мозга (КСКМ) [11, 12].

Определенные успехи достигнуты в экспериментальном изучении свойств стволовых клеток и внедрены в лечебную практику травматологов, кардиологов, комбустологов, нейрохирургов. Ксенотрансплантация для коррекции гормонального обмена в настоящее время используется и в Украине [13, 14].

Современные биотехнологии, внедренные в клеточную и тканевую терапию, основаны на репаративном потенциале стволовых клеток, а именно: их повышенной способности к пролиферации и регенерации. При этом восстановление функцио-

© В.Н. Лесовой, Н.М. Андоньева, И.М. Антонян и др., 2011

нальной активности органов и тканей рассчитано на:

- трансплантацию клеток для формирования новых тканей в месте их введения;
- имплантацию новых тканей, конструируемых *in vitro*;
- индукцию регенерации *in vivo* здоровыми тканями вблизи очага поражения.

Таким образом, учитывая рост числа пациентов с АД, возникает необходимость поиска патогенетически обоснованных и безопасных методик восстановления уровня тестостерона.

Нами был проведен ряд экспериментов, в ходе которых изучались эффективность и безопасность применения трансплантации КСКМ в яички самцов крыс для лечения модельного гипогонадизма.

Материал и методы. Нами проведены эксперименты на половозрелых самцах белых крыс в возрасте 12–14 недель. Исследование проводилось в три этапа, на каждом из которых решались определенные задачи, а именно:

- подбор эффективной дозы токсина для создания стойкой (не способной к самоизлечению) модели АД;
- подбор способа введения и эффективной дозы КСКМ для коррекции экспериментального АД;
- оценка отдаленных результатов интра-тестикулярной трансплантации КСКМ и риска развития новообразований.

Для получения максимально достоверных данных в ходе эксперимента мы оценивали влияние токсина и КСКМ на зависимые от тестостерона органы-мишени животных (семенники, придатки яичек, семенные пузырьки, вентральная часть предстательной железы — ВЧПЖ), морфологические характеристики яичек и ВЧПЖ. Оценка этих показателей проводилась на 28-е сутки после введения КСКМ.

Кроме того, нами были изучены отдаленные последствия введения КСКМ в яич-

ки подопытных животных, достигших предельного возраста и погибших естественной смертью.

Результаты и их обсуждение. В ходе экспериментов по подбору токсичной концентрации $CdCl_2$ (55, 100, 150, 200 мкг/100 г массы тела) нами была выбрана доза 150 мкг/100 г массы тела животного, которая вызывает стойкие гормональные изменения у животных, соответствующих АД (таблица). При введении животным максимальной дозы — 200 мкг/100 г массы тела до окончания эксперимента (28-е сутки) не дожило ни одно животное.

Световая микроскопия морфоструктуры семенников животных в интактной группе представлена срезами семенных канальцев в поперечном или косом направлении овальной или округлой формы. Белковая и сосудистая оболочки соответствовали норме. В базальном отделе содержатся сперматогонии. Среди них различаются клетки с хроматином в ядре конденсированного и неконденсированного вида. В промежуточном отделе стенки канальца расположены сперматоциты. Большая часть сперматоцитов I порядка находилась в третьей стадии профазы, в пахитене. В части канальцев хорошо прослеживались метафазы первого и второго делений и анафазы этих делений. В адлюминальном отделе семенных канальцев видны многочисленные сперматиды и сформированные сперматозоиды. Половые клетки разных этапов развития размещены концентрическими слоями согласно стадиям сперматогенного цикла. Лента сперматогенного эпителия содержала не менее 4–6 рядов клеток. Между сперматогониями на базальной мембране расположены многочисленные клетки Сертоли. В межканальцевых локусах видны кровеносные сосуды, вокруг которых находятся немногочисленные фибробласты и клетки Лейдига. Клеточные мембраны последних часто плохо различались, ядра клеток овальной формы,

Изменения массы органов-мишеней в зависимости от дозы $CdCl_2$, мг

Доза $CdCl_2$	m семенников	m ВЧПЖ	m семенных пузырьков	m придатков яичек
Интактная группа	3489,2±21,5	981,7±17,1	950,4±15,5	1069,5±15,2
55 мкг/100 г массы тела	3497,9±16,6	932,3±13,7	941,8±15,2	1031,4±13,1
100 мкг/100 г массы тела	3489,1±18,2	978,8±16,8	963,0±17,1	1039,9±16,0
150 мкг/100 г массы тела	3127,7±16,3*	634,9±18,0*	877,5±16,6*	886,3±15,7*
200 мкг/100 г массы тела	2735,9±17,7*	644,6±16,3*	623,3±16,5*	654,6±17,3*

* Достоверное отличие от интактной группы.

в основном нормохромные, в них видно четкую россыпь хроматиновой зернистости (рис. 1).

Введение токсина приводит к тяжелому повреждению семенников крыс. Была отмечена отчетливая деструкция большинства

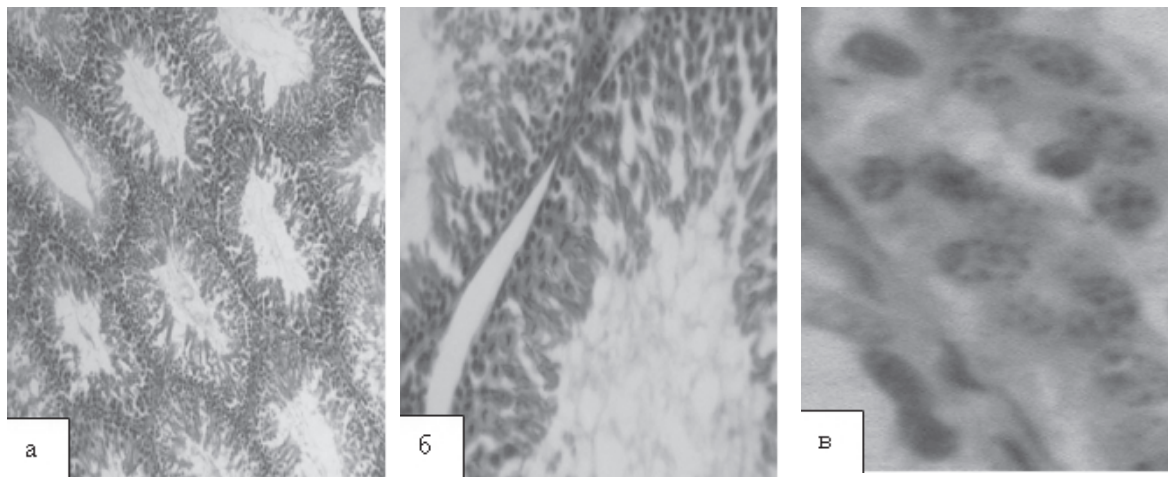


Рис. 1. Яичко intactных крыс, окраска гематоксилин-эозином:

а — в семенных канальцах виден полный пул половых клеток от сперматогоний до сперматозоидов, $\times 100$; б — в стенке канальца видны сперматоциты в метафазе I и II деления, $\times 250$; в — нормохромные клетки Лейдига в межканальцевом локусе, $\times 400$

Микроскопическое исследование предстательной железы intactных крыс показало, что паренхима железистой ткани представлена многочисленными поперечными профилями конечных отделов (ацинусы) простатических железок, которые умеренно варьируют по размеру. Ацинусы имели округло-овальную форму, контуры их четкие, тургор стенок хороший. Плотность расположения относительно друг друга высокая. Эпителиальные клетки, выстилающие стенку ацинусов, имели кубическую или высокую кубическую форму. Клетки расположены одним слоем, ядро содержится в базальной части, цитоплазма равномерно окрашена. Межацинарная строма представлена скудно (рис. 2).

семенных канальцев с атрофией сперматогенного эпителия. Канальцы уменьшены в размере, контуры их часто извилистые, некоторые канальцы в стадии падения. Вокруг деструктивно измененных канальцев образуется молодая соединительная ткань, которая вытесняет интерстициальную ткань. Половые клетки как ранних, так и поздних этапов развития атрофированы или обнаруживаются очень немногочисленные сперматогонии неопределенного типа и индифферентные половые клетки; клетки Сертоли часто деструктивного вида, немногочисленные, с пробелами в расположении. В межканальцевых локусах клетки Лейдига пролиферируют, ядра клеток мелкие, гиперхромные (рис. 3). Все эти изменения

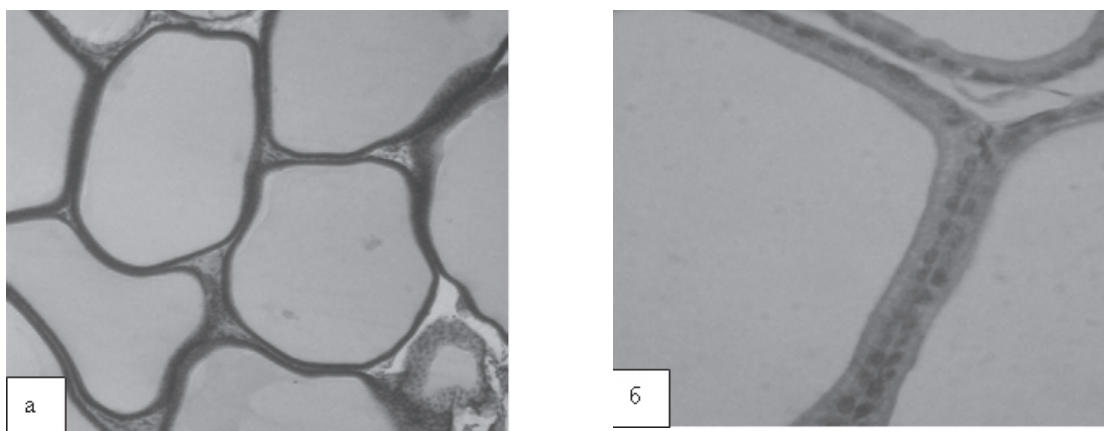


Рис. 2. ВЧПЖ крыс, окраска гематоксилин-эозином: а — ацинусы простатических железок нормальные, $\times 200$; б — кубический эпителий, выстилающий ацинусы, не изменен, $\times 400$

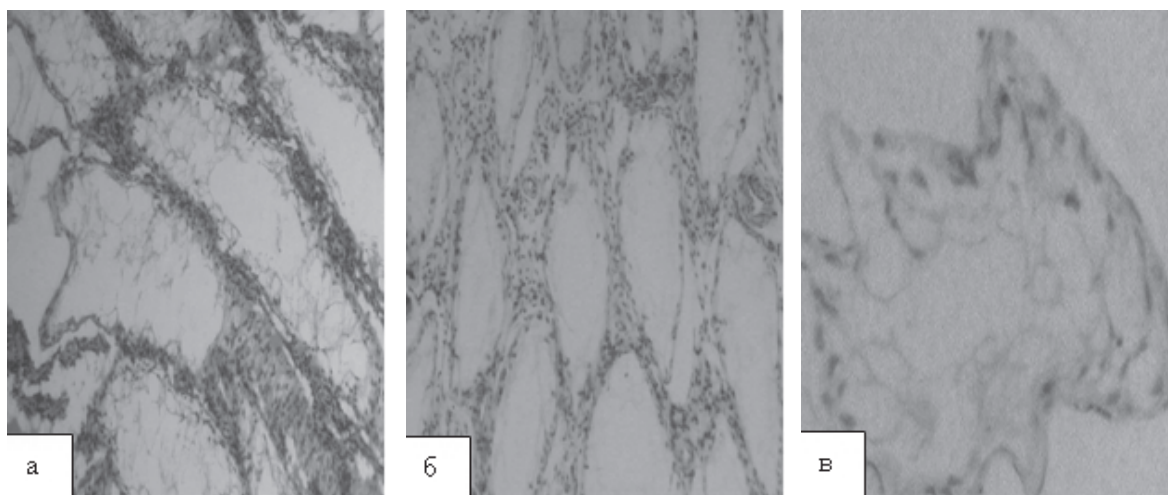
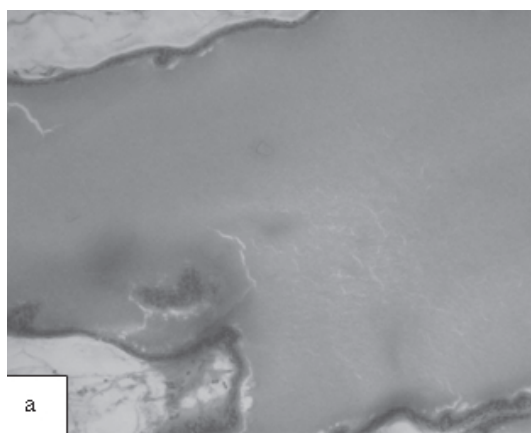


Рис. 3. Яичко крыс на 7-й день после введения $CdCl_2$ в дозе 150 мкг, окраска гематоксилин-эозином: а — атрофия семенных канальцев, нарушение сперматогенеза, пролиферация клеток Лейдига в межканальцевом локусе, $\times 200$; б — молодая соединительная ткань между атрофированными канальцами, $\times 200$; в — в семенных канальцах видны единичные клетки Сертоли и сперматогонии, индифферентные половые клетки $\times 400$

подтверждают развитие у крыс данной группы АД.

В предстательной железе часто наблюдается кистозное расширение ацинусов, иногда уплощение клеток. Во многих ацинусах видна отчетливая вакуолизация цитоплазмы эпителиальных клеток. Эпителий становится многорядным. Эти признаки свидетельствуют о функциональной недостаточности, снижении функциональной активности предстательной железы (рис. 4).



стигнут не был. После введения КСКМ в количестве 200 000 клеток только в одно яичко существенных отличий в морфологической картине семенных желез по сравнению с группой экспериментальной патологии отмечено не было. Многие семенные канальцы были опустошены, часть из них заполнена клеточным эозинофильным детритом. Вокруг некоторых канальцев в виде муфт развивается нежная фиброзная ткань. В отдельных канальцах сохранены клетки

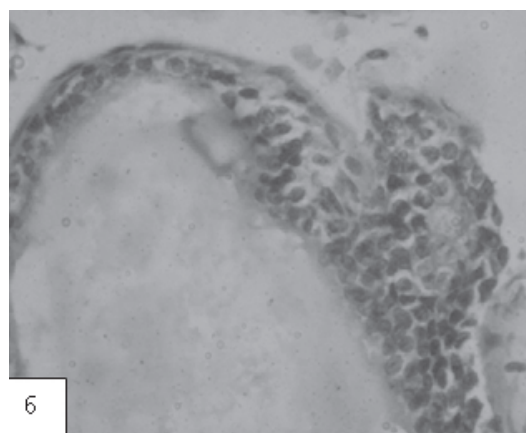


Рис. 4. ВЧПЖ крыс на 28-й день после введения $CdCl_2$ в дозе 150 мкг, окраска гематоксилин-эозином: а — кистозное расширение ацинуса, $\times 100$; б — вакуолизация и пролиферация эпителиальных клеток, $\times 400$

На следующем этапе наших исследований проводился подбор эффективного количества КСКМ и пути их введения. Нами были выбраны количества клеток 80 000, 100 000 и 200 000. Клетки вводили в одно или в оба яичка. В случае, когда клетки вводили только в одно яичко, вне зависимости от их количества, необходимый эффект до-

Сертоли, видны сперматогонии и сперматоциты, но расположение их хаотичное. В части канальцев видно восстановление ранних фаз сперматогенеза (фазы размножения и фазы роста). Клетки Лейдига в межканальцевых локусах незрелого типа, с мелкими ядрами, без хроматиновой зернистости, местами явно увеличены в количестве (рис. 5).

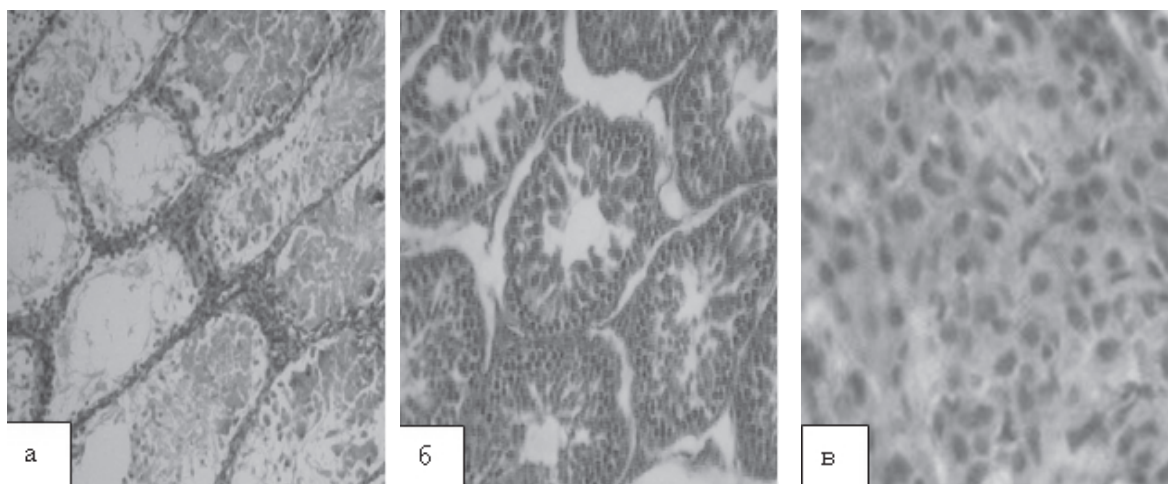


Рис. 5. Яичко крыс, после трансплантации КСКМ в дозе 200 000 клеток в одно яичко, окраска гематоксилин-эозином: а — опустошение семенных канальцев, клеточный детрит в просвете части канальцев, $\times 100$; б — семенные канальцы заполнены сперматогониями, сперматоцитами и ранними сперматидами, $\times 200$; в — пролифераты незрелых клеток Лейдига, $\times 400$

В ВЧПЖ ацинусы простатических железок часто были увеличены в размере. Эпителий, выстилавший стенки ацинусов, вакуолизирован. Выраженность вакуолизации эпителия несколько уменьшалась по сравнению с таковой у животных экспериментальной группы (рис. 6). Приведенные признаки свидетельствуют об определенном снижении функциональной активности предстательной железы у животных, которым КСКМ вводили только в одно яичко.

вые клетки расположены правильными рядами. Прослеживается разделение на сперматоциты I и II порядка, наличие различных этапов дифференцировки сперматид. Многие канальцы содержали и сперматозоиды. В межканальцевой строме вокруг кровеносных сосудов находятся нормохромные клетки Лейдига с заметной хроматиновой зернистостью в ядре (рис. 7).

Исследование тестикул интактных крыс предельного возраста (33–36 месяцев) пока-

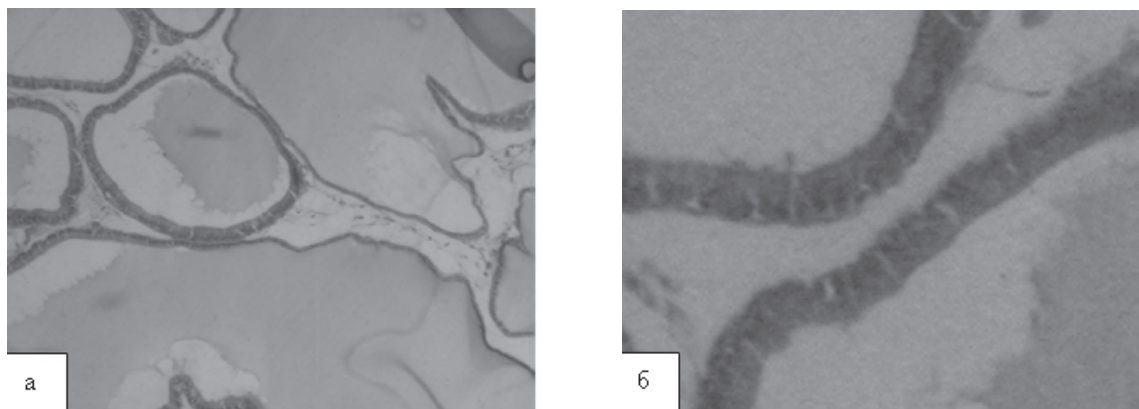


Рис. 6. ВЧПЖ крыс после трансплантации КСКМ в количестве 200 000 клеток только в одно яичко. Ацинусы простатических железок увеличены в размере, выраженная вакуолизация эпителиальных клеток, выстилающих стенки ацинусов, окраска гематоксилин-эозином, $\times 250$

Введение КСКМ в количестве по 200 000 одновременно в оба яичка обеспечивает репарацию семенных канальцев с полноценным восстановлением процесса сперматогенеза. Семенные канальцы нормального размера. В подавляющем большинстве их в стенке обнаружено 3–4 слоя сперматогенного эпителия, много клеток Сертоли. Поло-

зало, что у большинства животных на фоне семенных канальцев с визуально незаметными изменениями в состоянии сперматогенного эпителия отмечены канальцы с «пробелами» в ленте и уменьшением рядов половых клеток, увеличение канальцев с отсутствием зрелых сперматозоидов. Кроме того, замечено расширение межканаль-

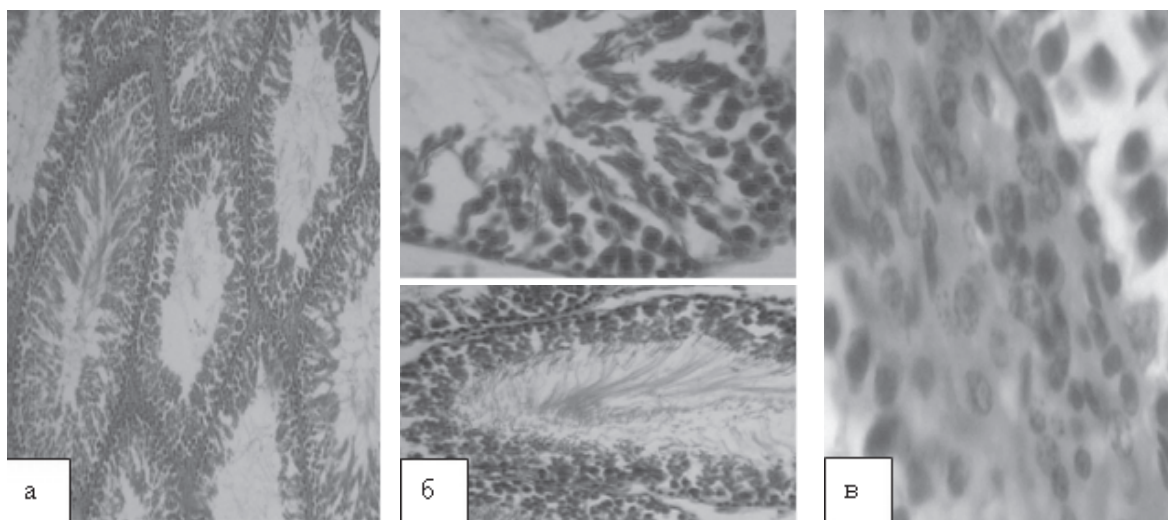


Рис. 7. Яичко крысы после трансплантации КСКМ в количестве по 200 000 одновременно в оба яичка, окраска гематоксилин-эозином: а — нормальное состояние семенных канальцев, $\times 100$; б — разделение на сперматоциты I и II порядка, у ленты сперматогенного эпителия видны все генерации половых клеток, $\times 250$; в — нормохромные клетки Лейдига в межканальцевом локусе, $\times 400$

цевых пространств, особенно во внутренних областях яичка. В части канальцев обращала на себя внимание очаговая отслойка половых клеток от базальной мембраны, обнаруживались канальцы с шелушением половых клеток в просвете. Клетки Лейдига в межканальцевых локусах в большинстве немногочисленны, в то же время отчетливо видна гипертрофия части из них, что, возможно, свидетельствует об их напряженном состоянии (рис. 8). Следует отметить, что среди интактных крыс старческого возраста выявлены и отдельные случаи очагового или диффузного асперматогенеза (рис. 9). Перечисленные признаки свидетельствуют о появлении у крыс предельного возраста признаков определенного угнетения, а в редких случаях — полного прекращения сперматогенеза. Признаков опухолевых процессов не обнаружено.

В паренхиме ВЧПЖ интактных крыс этого возраста наблюдали отчетливые колебания размера ацинусов простатических желез, часто извилистость их контуров, уплощение эпителиальных клеток. Секрет в просвете части ацинусов был мощно окрашен, в просвете отдельных ацинусов обнаружены конкременты — сгустки секрета с той или иной степенью пропитывания минеральными солями. Увеличение межацинарной стромы железы не наблюдалось (рис. 10). Описанное состояние простатических железок свидетельствует о снижении функциональной активности секреторных единиц, что связано со старением организма, развитием компенсаторных проявлений (увеличением извилистости контуров ацинусов для увеличения площади желез и количества функционирующих клеток).

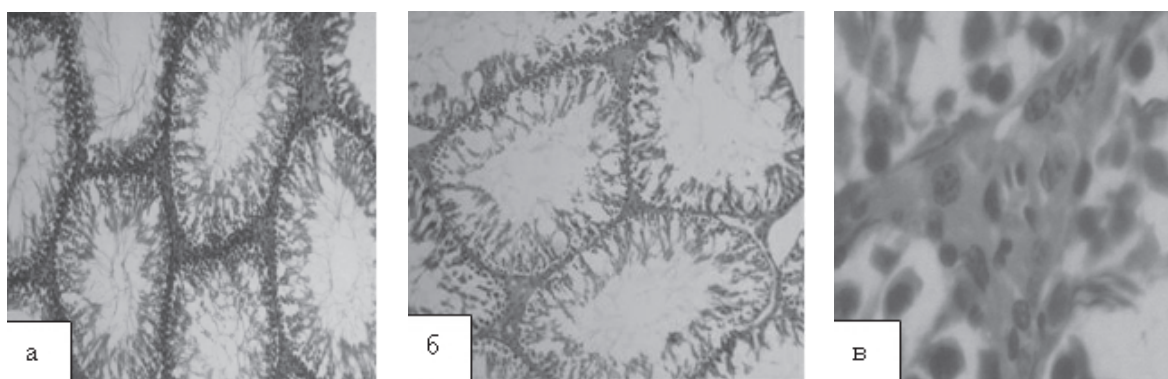


Рис. 8. Яичко крысы, окраска гематоксилин-эозином: а — нормальное состояние семенных канальцев, $\times 100$; б — «пробелы» в ленте сперматогенного эпителия и уменьшение рядов половых клеток, $\times 200$; в — гипертрофия клеток Лейдига, $\times 400$

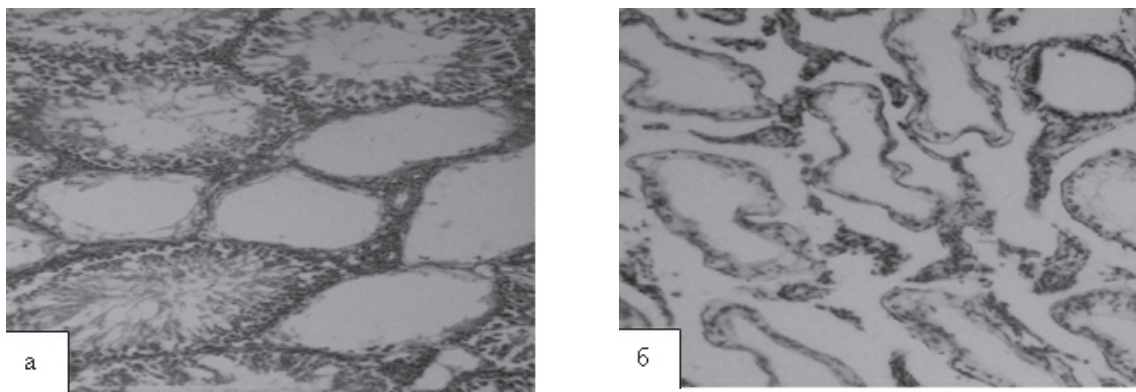


Рис. 9. Яичко крысы, окраска гематоксилин-эозином: а — очаговый асперматогенез, $\times 200$; б — диффузный асперматогенез, оболочки канальцев сморщенные, $\times 100$

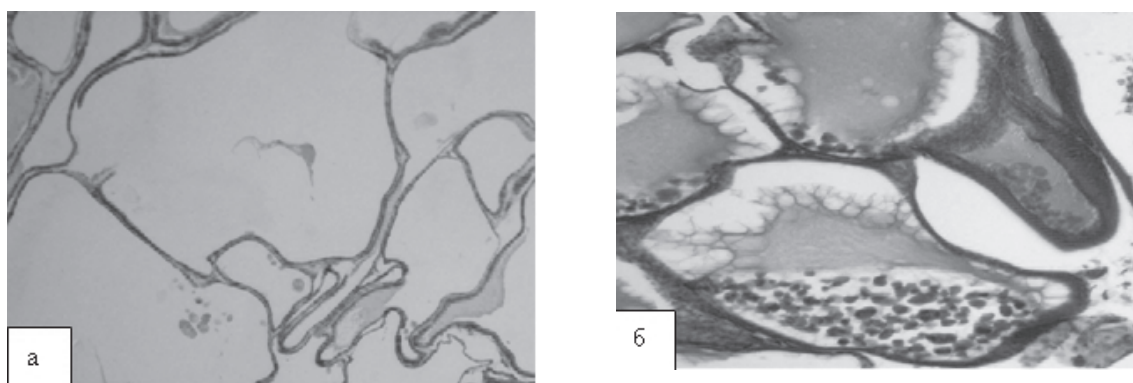


Рис. 10. ВЧПЖ крысы, окраска гематоксилин-эозином $\times 100$: а — колебания размера ацинусов простатических железок; б — конкременты в просвете ацинусов, мощная эозинофильная окраска секрета

При изучении морфоструктуры семенников крыс, которые в возрасте 20–22 недель на фоне поражения CdCl_2 получили КСКМ в количестве по 200 000 в каждое яичко и умерли естественной смертью в 33–36-месячном возрасте, не выявлено существенных различий в состоянии паренхимы по сравнению с интактными животными соответ-

ствующего возраста. И у этих животных видна была гипертрофия части клеток Лейдига в межканальцевых локусах (рис. 11). Никаких признаков опухолевого роста отмечено не было.

Состояние простатических железок ВЧПЖ таких крыс также практически соответствовало интактному контролю (рис. 12).

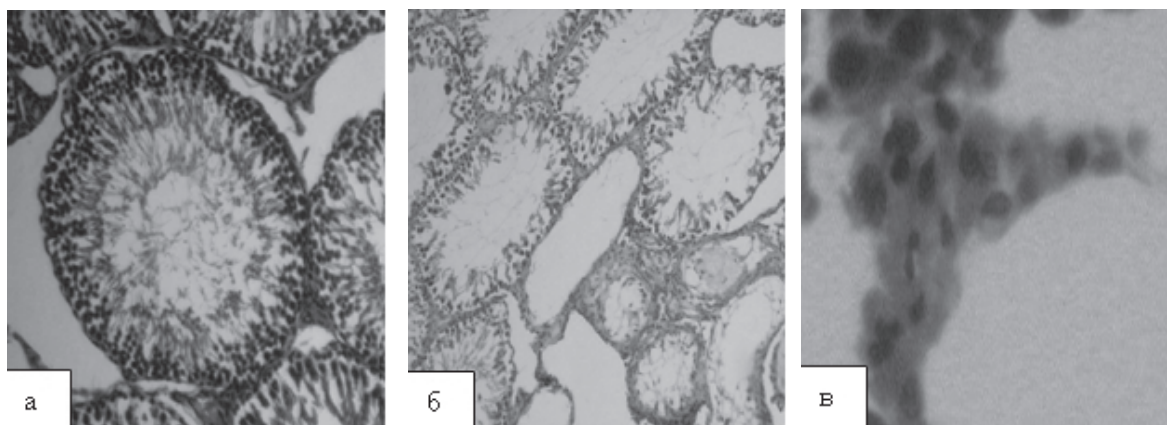


Рис. 11. Яички крыс, которым на фоне поражения CdCl_2 трансплантировали КСКМ в количестве по 200 000 в каждое яичко, окраска гематоксилин-эозином: а — семенные канальцы с полноценным сперматогенезом, $\times 200$; б — уменьшение рядов половых клеток в ряде канальцев, опустошение отдельных канальцев, $\times 100$; в — появление гипертрофированных клеток Лейдига в межканальцевом локусе, $\times 400$

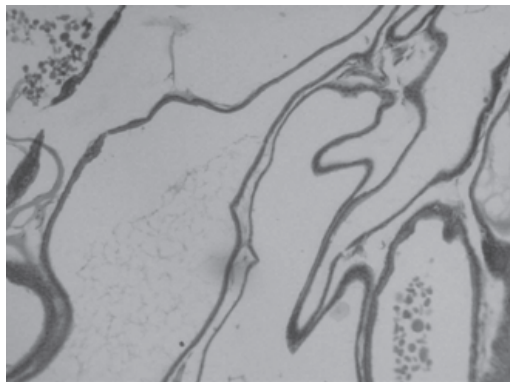


Рис. 12. ВЧПЖ крысы, которая на фоне поражения CdCl_2 получила КСКМ в количестве по 200 000 в каждое яичко. Увеличение размера, извилистость контура ацинусов простатических железок, конкременты в части ацинусов. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$

Таким образом, интраабдоминальное введение 150 мг/100 г массы тела CdCl_2

позволяет создать устойчивую модель АД у самцов белых крыс, что проявляется характерными изменениями морфоструктуры семенников и ВЧПЖ. Трансплантация КСКМ в дозе по 200 000 в каждое яичко является наиболее эффективным способом коррекции экспериментального гипогонадизма. У животных, получавших лечение КСКМ, достигших предельного возраста и умерших естественной смертью, наблюдались характерные возрастные изменения морфоструктуры ткани семенников и ВЧПЖ. Новообразований органов половой системы у данных животных не наблюдалось. Регенеративные свойства КСКМ при их интратестикальном введении способствуют восстановлению секреторной и экскреторной функций яичек, не увеличивают риск развития злокачественных новообразований, являются альтернативой медикаментозной терапии.

Список литературы

1. Нікітін О.Д. Соціально-медичні аспекти безплідного шлюбу / О. Д. Нікітін // Вісник Вінницького національного медичного університету. — 2009. — № 13, т. 2. — С. 571–586.
2. Аляев Ю. Г. Нарушение половой и репродуктивной функции у мужчин / Ю. Г. Аляев, В. А. Григорян, М. Е. Чалый. — М. : Литера, 2006. — 188 с.
3. Зачепило А. В. Особенности этиологии и патогенеза нарушений функции мужской репродуктивной системы, обусловленных экологическими факторами / А. В. Зачепило, С. Б. Аргифексов // Проблемы репродукции. — 2007. — Т. 13, № 4. — С. 76.
4. Arver S. Current guidelines for the diagnosis of testosterone deficiency / S. Arver, M. Lehtihet // Advances in the Management of Testosterone Deficiency. Front Horm Res. — Basel, Karger, 2009. — V. 37. — P. 5–20.
5. Щепелев П. А. Андропоуза — актуальная проблема современной андрологии / П. А. Щепелев, Н. Н. Гарин // Міжнародний ендокринологічний журнал. — 2008. — № 4. — С. 93–96.
6. Shabsigh R. The use of testosterone preparations for erectile dysfunction / R. Shabsigh // The Aging Male. — 2004 — V. 7. — P. 312–318.
7. Testosterone use in men with sexual dysfunction: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials / E. R. Boloca, M. V. Uruga, R. M. Haddad [et al.] // Mayo Clin. Proc. — 2007. — V. 82, № 1. — P. 20–28.
8. Diagnosis and treatment of erectile dysfunction / A. Tsertsvadze, F. Yazdi, A. H. Fink [et al.] // Evidence Report/Technology Assessment, № 171. — Ottawa, Canada : University of Ottawa Evidence-based Practice Center, 2009. — 230 p.
9. Rhoden E. L. Medical progress: Risks of Testosterone replacement therapy and recommendations for monitoring / E. L. Rhoden, A. Morgentaler // NEJM. — 2004. — V. 350. — P. 482–492.
10. Prostate cancer in men using testosterone supplementation / F. D. Gaylis, D. W. Lin, J. M. Ignatoff [et al.] // J. Urol. — 2005. — V. 174. — P. 534–538.
11. Мірошников Я. О. Трансплантация пуповинной крови у лікуванні порушень сперматогенезу при чоловічому безплідді // Я. О. Мірошников // Медична психологія. — 2010. — № 4. — С. 91–93.
12. Охоботов Д. А. Влияние культур, обогащенных стволовыми клетками, на сперматогенез при экспериментальном двухстороннем крипторхизме : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. мед. наук. : спец. 14.00.40 / Д. А. Охоботов. — М., 2008. — 36 с.
13. Легач Є. І. Ксенотрансплантатія органної культури надниркових залоз. Досвід клінічного застосування при ревматоїдному артриті та бронхіальній астмі / Є. І. Легач, В. В. Сирота // Трансплантологія. — 2004. — Т. 6, № 2. — С. 39–41.
14. Дроздович І. І. Морфологічна характеристика ксенотрансплантата органної культури сім'яників у щурів з експериментальним гіпогонадизмом різних форм / І. І. Дроздович, І. С. Турчин, О. П. Потіха // Трансплантологія. — 2005. — Т. 8, № 1. — С. 53–58.

В.М. Лісовий, Н.М. Андон'єва, І.М. Антонян, Ю.Б. Ларьяновська, С.А. Кешишян
ЗАСТОСУВАННЯ СТРОМАЛЬНИХ СТВОЛОВИХ КЛІТИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ
ГІПОГОНАДИЗМІ

Наведені результати вивчення впливу клітин стромы кісткового мозку (КСКМ) на модельну патологію андрогенного дефіциту (АД) у статевозрілих щурів. У результаті експерименту доведено, що застосування CdCl_2 в дозі 150 мкг/100 г маси тіла тварин приводить до відтворення стійкого АД. Застосування КСКМ у кількості 200 000 в обидва яєчки є найбільш ефективним способом корекції даної патології та альтернативою медикаментозній терапії. Застосування КСКМ не приводить до підвищення ризику розвитку злоякісних новоутворень.

Ключові слова: клітини стромы кісткового мозку, андрогенний дефіцит.

V.N. Lesovoy, N.M. Andonyeva, I.M. Antonyan, Yu.B. Laryanovskaja, S.A. Keshyshyan
APPLICATION OF STROMAL STEM CELLS IN EXPERIMENTAL HYPOGONADISM

The results of bone marrow stromal cells (BMSC) impacting to the model pathology of the androgenic deficiency (AD) of sexually mature rats. In the result of the experiment was show, that CdCl_2 with dose 150 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of animal mass hade made the stable model of the AD. The BMSC using in the quantity 200 000 in the both testicle is the most effective correction way of the AD. This way is the alternative to the medicamental treatment. The BMSC using don't result to the risk growth of tumors.

Key words: bone marrow stromal cells, androgenic deficiency.