

УДК: 616.831-001.,137^с
 © Антонян І.М., 2012

ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОСТРУКТУРИ ТЕСТИКУЛ САМЦІВ ЩУРІВ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ КЛІТИН СТРОМИ КІСТКОВОГО МОЗКУ НА ТЛІ УРАЖЕННЯ ТВАРИН ТОКСИНОМ

Антонян І.М.

Харківська медична академія післядипломної освіти

Вступ. Науковий прогрес завжди розвивається у напрямку комфортного життя людини. Не є винятком і його медична галузь. Різниця полягає лише в тому, що завданням вчених-медиків є пошук таких методів лікування людини, які були б найбільш ефективними, економічними і, звісно, не мали б суттєвих побічних ефектів.

Пошук таких методів ведеться за всіма медичними спеціальностями. Не є виключенням й урологія. Питання полягає у тому, на лікування якого захворювання потрібно направити зусилля. Покладаючись на наш досвід та світову статистику, ми дійшли висновку, що вторинний андрогенний дефіцит (ВАД) є тією проблемою, яка потребує пошуку альтернативного методу лікування [3].

Виникнення ВАД може бути обумовлено багатьма причинами як екзо- та і ендогенного характеру [5,8]. За даними різних джерел статистика цього захворювання є невтішною, оскільки торкається чоловіків середнього й молодого віку, а не тільки похилого, як це було ще років за 20 назад [4]. Така ситуація призводить до того, що все більш подружніх пар звертаються до лікарів з проблемою нездатності мати дітей і, як виявляється, все частіше винними виявляються чоловіки, які страждають на ВАД [1,2].

Основною причиною виникнення захворювання є зниження рівня основного чоловічого гормону – тестостерону (Т). Зазвичай, його нестаток корегуються за допомогою замісної андрогенної терапії (ЗАТ) [12]. Вона, безумовно, ефективна, але має суттєві недоліки: необхідність постійного вживання препаратів ЗАТ, проходження пацієнтом постійного моніторингу на наявність новоутворень, за умов виникнення яких терапії має бути негайно припинена [13].

Нашим завданням було знайти такий спосіб коригування ВАД, який би не потребував постійного застосування препаратів Т, а також не мав побічних ефектів. Проведений нами аналіз показав, що в багатьох галузях медицини науковці досить успішно використовують клітини строми кісткового мозку (КСКМ) [7,9].

Вивчення КСКМ триває в Харківській медичній академії післядипломної освіти вже більше ніж 10 років. Останнім часом воно виконується в рамках науково-дослідної програми «Вивчення індукції направлено диференціювання стромальних клітин, кісткового мозку і жирової тканини і розробка технології використання диференційованих аутологічних клітин для лікування захворювань різного генезу» (номер державної реєстрації 0111U004772).

Метою експерименту було визначити ефективну кількість КСКМ (при їх інтратестикулярному введенні), яка б дозволила скоригувати експе-

риментальний гіпогонадізм, модель якого відтворена на самцях щурів.

Матеріали та методи. Модель ВАД була створена за допомогою CdCl₂ на статевозрілих самцях щурів [11]. В експерименті використовували 5 груп тварин: 1 група – інтактні тварини (ІГ), 2 група – експериментальна патологія (ЕП), 3 група – тварини, яким інтратестикулярно однобічно вводили КСКМ в кількості 80000 клітин, 4 група – тварини, яким інтратестикулярно однобічно вводили КСКМ в кількості 100000 клітин та 5 група – тварини, яким інтратестикулярно однобічно вводили КСКМ в кількості 200000 клітин. Ефект після введення клітин в різних кількостях, ми оцінювали за морфологічним станом тестикул та вентральної частини передміхурової залози (ВЧПЗ).

Мікроскопію і фотографування препаратів здійснено на мікроскопі Micros 400 (Austria), доукомплектованого цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотографування проведено в системі Aver Media, фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Nikon View 5.

Також протягом експерименту нами було досліджено вагові зміни органів-мішеней: сім'яників, сім'яних пухирців, ВЧПЗ та придатків яєчок.

Культуру стовбурових клітин отримували згідно розробленої методики [10].

Результати та їх обговорення. Як показала світлова мікроскопія в ІГ на зрізах яєчок звивисті сім'яні каналці мають овальну чи округлу форму. Стінка сім'яних каналців побудована статевими клітинами. В базальному відділі містяться самі молоді клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії. У проміжному відділі стінки каналця розташовані сперматоцити. Більша частина сперматоцитів І-го порядку знаходилася у третій стадії профазі, у пахітені. В адлюмінальному відділі сім'яних каналців видні численні сперматиди та сформовані сперматозоїди, які розташовані голівкою до просвіту каналця. Статеві клітини різних етапів розвитку розміщені у строгому порядку, концентричними шарами згідно зі стадіями сперматогенного циклу. В різних каналцях чітко простежено не тільки сперматогенез (процес послідовних перебудов зародкових клітин: сперматогонія → сперматозоїд), а і сперміогенез – етапи клітинних перетворень від сперматиди до сперматозоїда. Між сперматогоніями на базальній мембрані розміщені численні клітини Сертолі (підтримуючі клітини). В міжканалцевих локусах видні кровоносні судини, навколо яких гуртуються нечисленні фібробласти та клітини Лейдига. Клітинні мембрани останніх часто погано розрізнялися, ядра клітин овальної форми, в основному нормохромні, в них видно чітку розсіп хроматинової зернистості (рис. 1).

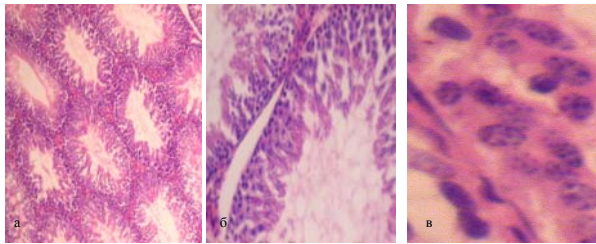


Рис. 1. Яечко шурів ІГ: а – у сім'яних канальцях видно повний пул статевих клітин від сперматогоній до сперматозоїдів (x100); б – у стінці канальця видно сперматоцити у метафазі І-го та ІІ-го поділу (x250); в – нормохромні клітини Лейдіга у міжканальцевому локусі (x400). Гематоксилін-еозин.

Мікроскопічне дослідження стану ВЧПЗ в ІГ показало типову для цих тварин будову [6]. Паренхіма залозистої тканини подана чисельними попережними профілями кінцевих відділів (ацинуси) простатичних залозок, які помірно варіюють за розміром. Щільність розташування відносно один до одного висока. Клітини розташовано одним шаром, ядро міститься у базальній частині, цитоплазма рівномірно пофарбована. Секрет у просвіті ацинусів виявлено не у всіх випадках. Колір секрету варіює від блідо-рожевого до досить потужно рожевого. Міжацинарна строма представлена скудо (рис. 2).

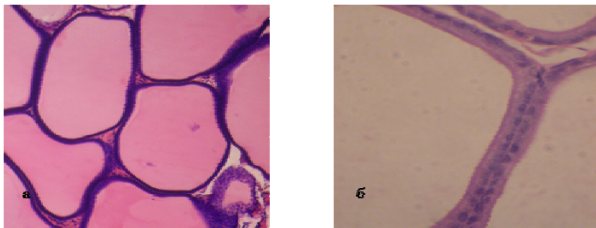


Рис. 2. ВЧПЗ шурів ІГ: а – ацинуси простатичних залозок нормальні за станом (x200); б – кубічний епітелій, що вистеляє ацинуси, не змінено (x400). Гематоксилін-еозин.

Введення токсину призводить до тяжкого пошкодження тестикул шурів. Була 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 часті 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, нечисленні, з прогалинами у розташуванні. У міжканальцевих локусах клітини Лейдіга проліферують, ядра клітин дрібні, гіперхромні (рис. 3). Всі ці зміни документують розвиток у шурів даної групи ВАД.

У ВЧПЗ цих самців часто спостерігається кістозне розширення ацинусів, іноді сплюснення клітин. У багатьох ацинусах видна виразна вакуолізація цитоплазми епітеліальних клітин. Епітелій стає многорядним. Ці ознаки свідчать про функціональну недостатність, зниження функціональної активності передміхурової залози тварин (рис. 4).

Інтрастестикулярне одностороннє введення

КСКМ в кількості 80000 клітин шурів не дуже виразно впливало на його морфологічний стан. Значна кількість сім'яних канальців деградована, спустошена від статевих клітин. В деяких канальцях спостерігали клітини Сертолі та нечисленні сперматогонії. Місцями міжканальцево видні вогнища фіброзної тканини. Клітини Лейдіга у міжканальцевих локусах здебільше дрібні, незрілі. В той же час мозаїчно по мікропрепарату у частині канальців видні були проліферативні прояви з боку сперматогоній, які іноді розташовувалися у стінці у декілька рядів. (рис. 5).

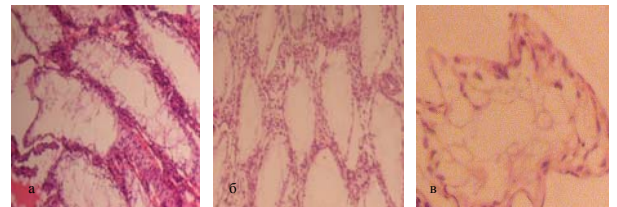


Рис. 3. Яечко шурів після введення $CdCl_2$ в дозі 150 мкг/100г: а – атрофія сім'яних канальців з повним порушенням сперматогенезу, проліферація клітин Лейдіга у міжканальцевому локусі; б – молода сполучна тканина між атрофованими канальцями; в – у сім'яному канальці видні одичні клітини Сертолі та сперматогонії, індиферентні статеві клітини. Гематоксилін-еозин. а-б x200, в-x400.

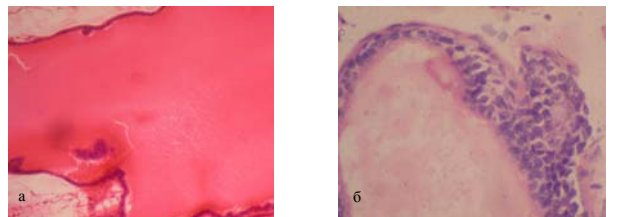


Рис. 4. ВЧПЗ шурів після введення $CdCl_2$ дозою 150 мкг/100г: а – кістозне розширення ацинусу (x100); б – вакуолізація та проліферація епітеліальних клітин (x400). Гематоксилін-еозин

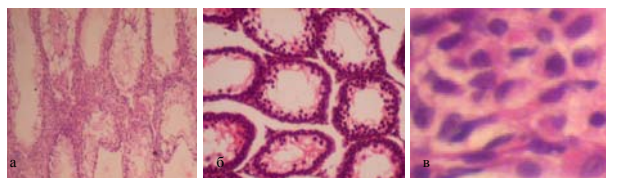


Рис. 5. Яечко шурів після трансплантації в нього КСКМ в кількості 80000 клітин: а – сім'яні канальці спустошені, в стінці їх видні нечисленні сперматогонії, вогнищевий фіброз міжканальцево (x100); б – в стінках сім'яних канальців видна проліферація сперматогоній, які утворюють декілька рядів (x200); в – клітини Лейдіга незрілого виду (x400). Гематоксилін-еозин.

Збільшення дози КСКМ до 100000 клітин при трансплантації тільки в одне яечко не призводить до показового покращення морфологічного стану його сім'яних канальців порівняно з попередньою кількістю при аналогічному введенні: також візуалізувалися спустошені канальні та міжканальцеві фіброзні розростання. Втім, в деяких з канальців видні хаотично розташовані сперматогонії, а у ряді канальців спостерігали помітне поживлення початкових етапів сперматогенезу (окрім сперматогоній – сперматоцити І-го порядку). Клітини Лейдіга зменшені у кількості, але ядра їх ще часто незрілого виду (рис. 6).

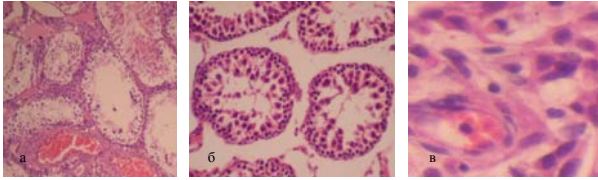


Рис. 6. Яєчко щурів після інтратестикулярної однобічної трансплантації КСКМ в кількості 100000 клітин: а – у спустошених сім'яних канальцях хаотично розташовані сперматогонії, невиразний фіброз міжканальцево (x100); б – початкові етапи сперматогенезу у сім'яних канальцях, видні сперматогонії, сперматоцити I-го порядку (x200); в – клітини Лейдіга незрілого виду (x400). Гематоксилін-еозин.

Після інтратестикулярного введення КСКМ в кількості 200000 клітин, морфологічна картина **сім'яних залоз** нагадувала наведену вище при введенні попередніх кількостей КСКМ також тільки в одне яєчко. Багато сім'яних канальців спустошена, частина з них заповнена клітинним еозинофільним детритом. Навколо деяких канальців у вигляді муфт розвивається ніжна фіброзна тканина. В окремих канальцях збережені клітини Сертолі, видні сперматогонії та сперматиди, але розташування їх хаотичне. У частини канальців, як і при введенні попередніх доз КСКМ, видно відновлення ранніх фаз сперматогенезу (фази розмноження та фази росту). Клітини Лейдіга у міжканальцевих локусах незрілого типу, з дрібними ядрами, без хроматинової зернистості, місцями виразно збільшені у кількості. (рис. 7).

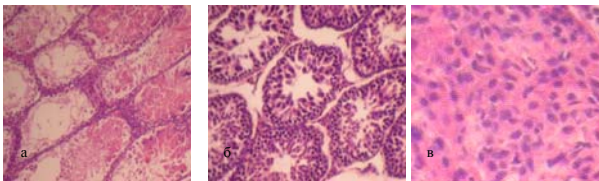


Рис. 7. Яєчко щурів після інтратестикулярної однобічної трансплантації КСКМ в кількості 200000 клітин: а – спустошення сім'яних канальців, клітинний детрит у просвіті частини канальців (x100); б – сім'яні канальці заповнені сперматогоніями, сперматоцитами та ранніми сперматидами (x200); в – проліферат незрілих клітин Лейдіга (x400). Гематоксилін-еозин.

Окрім яєчок, у щурів різних груп 2 серії експерименту досліджена також і вентральна частка передміхурової залози. У тварин, яким КСКМ у діапазоні кількостей від 80000 до 200000 клітин вводили інтратестикулярно однобічно, у дослідженій частині залози ацинуси простатичних залозок часто були збільшені у розмірі. Епітелій, що вистеляє стінки ацинусів, вакуолізований. Виразність вакуолізації епітелію зменшувалася у щурів, яким вводили КСКМ дозою 200000 клітин (рис. 8). Наведені ознаки свідчать про певне зниження функціональної активності передміхурової залози у тварин, яким КСКМ вводили тільки у одно яєчко.

Інтратестикулярне введення КСКМ дозою 80000 клітин, 100000 клітин або 200000 клітин тільки у одно яєчко щурам з індукованим CdCl_2 дозою 150 мкг/100г маси тіла експериментальним ВАД okazується недостатнім для відновлення нормального стану тестикулярної тканини цього яєчка. На тлі деструктивних змін лише у доволі обмеженої частині канальців під впливом цих доз КСКМ простежена активація ранніх ета-

пів розвитку статевих клітин (фази розмноження та фази росту), що свідчить о появі тільки початкових проявів регенерації, а не про відновлення органом своєї сперматогенної функції. Гормональна функція яєчок за станом клітин Лейдіга не відновлюється, а функціональна активність передміхурової залози залишається зниженою.

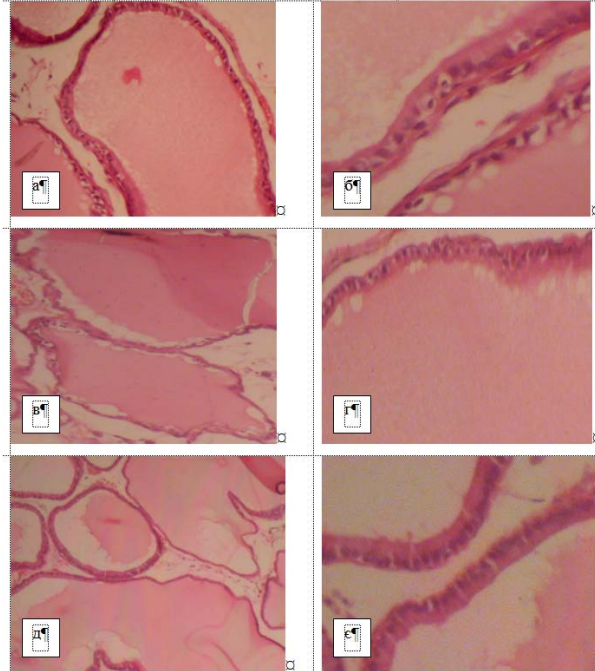


Рис. 8. ВЧПЗ щурів після інтратестикулярної однобічної трансплантації КСКМ дозою 80000 клітин (а-б), 100000 клітин (в-г) та 200000 клітин (д-е): ацинуси простатичних залозок збільшені у розмірі, виразність вакуолізації епітеліальних клітин, що вистеляють стінки ацинусів, зменшується при збільшенні дози введених клітин. Гематоксилін-еозин. x250.

При дослідженні вагових змін органів-мішеней, нами були отримані результати, наведені в табл. 1.

Дані, наведені в таблиці демонструють, що після введення тваринам токсину маса тестикул знизилась на 11,6 %, ВЧПЗ – на 40,3 %, сім'яних пухирців – на 23,9 % та придатків яєчок – на 22,6%. Введення інтратестикулярно однобічно КСКМ в кількості 80000 клітин не призвело до суттєвих позитивних змін маси органів-мішеней. У порівнянні з ІГ маса сім'яників була нижче на 10,4 %, ВЧПЗ – на 37,4 %, сім'яних пухирців – на 20,9 % та придатків яєчок – на 23,0 %.

Введення КСКМ в кількості 100000 клітин в одне яєчко також не призвело до суттєвих позитивних змін маси органів-мішеней. У порівнянні з ІГ маса сім'яників була нижче на 11,3 %, ВЧПЗ – на 39,5 %, сім'яних пухирців – на 24,0 % та придатків яєчок – на 24,2 %.

Інтратестикулярна однобічна трансплантація КСКМ в максимальній кількості, 200000 клітин, також не викликало суттєвих змін маси органів-мішеней до рівня ІГ. У порівнянні з ІГ маса сім'яників була нижче на 11,6 %, ВЧПЗ – на 40,3 %, сім'яних пухирців – на 21,8 % та придатків яєчок – на 23,2 %.

Таблиця 1. Зміни маси органів-мішеней самців щурів після інтратестикулярного одностороннього введення КСКМ на тлі ураження CdCl₂

	m сім'яників, мг	m ВЧПЗ, мг	m сім'яних пухирців, мг	m придатків яєчок, мг
ІГ	3493,7 ± 20,9	996,7 ± 21,7	1045,4 ± 13,5	1051,6 ± 11,8
ЕП	3088,2 ± 19,7*	594,9 ± 18,2*	795,4 ± 19,3*	814,1 ± 20,6*
80000	3130,2 ± 19,9*	624,3 ± 17,0*	827,2 ± 20,3*	810,2 ± 19,6*
100000	3100,1 ± 20,9*	603,5 ± 20,1*	795,0 ± 22,9*	797,2 ± 22,7*
200000	3087,4 ± 20,1*	595,1 ± 18,4*	817,8 ± 18,9*	807,5 ± 19,7*

Примітка: * - вірогідна відмінність від ІГ; ** - вірогідна відмінність від ЕП.

Висновки:

1. Проведені нами дослідження показали, що застосування токсину, CdCl₂, в дозі 150 мкг/100 г ваги тварини можливо використовувати для відтворення моделі ВАД на самцях щурів.
2. Використання КСКМ в кількості 80000, 100000 та 200000 при введенні тільки в одне яєчко не призводить до позитивних змін щодо морфологічних характеристик тестикул.
3. Використання КСКМ в таких кількостях при введенні лише в одне яєчко також не при-

зводить до покращення стану ВЧПЗ.

4. При дослідженні вагових змін органів-мішеней, сім'яників, ВЧПЗ, сім'яних пухирців та придатків яєчок після введення КСКМ в тих самих дозах також не призводить до підвищення їх масових коефіцієнтів.
5. Таким чином, отримані результати свідчать про те, що необхідно провести дослідження з використанням КСКМ в тих самих кількостях, але шляхом введення їх в обидва яєчка щурів, на яких буде змодельований ВАД.

ЛІТЕРАТУРА:

1. **Бойко М.І.** Чоловіча безплідність // Нова медицина. — 2002. — № 4. — С. 36–39.
2. **Гринчук О.В.** Чоловічий фактор у безплідному шлюбі // Здоров'я чоловіка. — 2007. — № 2. — С. 183–187.
3. **Дедов І.І., Калиниченко С.Ю.** Возрастной андрогенный дефицит у мужчин. — М.: Практическая медицина, 2006., С. 41–47.
4. Державний комітет статистики України. Експрес-випуск. № 150 від 16.06.2011 р., 20 с.
5. **Кудлай Е.Н.** Мужские факторы бесплодия на современном этапе // Здоров'я чоловіка. — 2007. — № 1. — С. 125–128.
6. **Лар'яновська Ю.Б., Котелевець Н.В.** Морфоструктура передміхурової залози білих лабораторних щурів. // Медицина сьогодні і завтра. — 2005. — №1. — С.12–14
7. **Мірошников Я.О.** Трансплантація пуповинної крові у лікуванні порушень сперматогенезу при чоловічому безплідді // Я. О. Мірошников. Медична психологія — 2010 — № 4 — С. 91–93.
8. **Нікітін О.Д.** Соціально-медичні аспекти безплідного шлюбу / О.Д. Нікітін // Вісник вінницького національного медичного університету. — 2009. — № 13, Т. 2 — С. 571–586.
9. **Охоботов Д.А.** Влияние культур, обогащенных стволовыми клетками, на сперматогенез при экспериментальном двухстороннем крипторхизме: Автореф. дис. канд. мед. наук.: 14.00.40 / Д. А. Охоботов — Москва, 2008. — 36 с.
10. Технології виділення клітин строми кісткового мозку людини, розмноження in vitro та індукції в нервові клітини та остеобласти: Метод. рек. / **Шегельська О.А., Микулинський Ю.Ю., Омельченко О.А.** та ін. — ХМАПО — Харків, 2004. — С. 7–10.
11. **Ana P. Ebselen.** Attenuates cadmium-induced testicular damage in mice / A. P. Ardais, F. W. Santos, C. W. Nogueira. // Journal of applied toxicology. — 2008. — № 28. — P. 322–328.
12. **Bolona E.R.** Testosterone use in men with sexual dysfunction: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials [Text] / E. R. Boloca, M. V. Uruga, R. M. Haddad et [et al.] // Mayo Clin. Proc. — 2007. — Vol. 82, № 1. — P. 20–28.
13. **Rhoden E.L., Morgentaler A.** Medical progress: Risks of Testosterone replacement therapy and recommendations for monitoring / E.L. Rhoden, A. Morgentaler // NEJM — 2004 — V. 350 — P. 482–492.

Антонян І.М. Дослідження морфоструктури тестикул самців щурів після введення клітин строми кісткового мозку на тлі ураження тварин токсином // Український медичний альманах. — 2012. — Том 15, № 4. — С. 30–33.

В статті наведені результати експерименту з вивчення морфологічного стану сім'яників та вентральної частини передміхурової залози (ВЧПЗ) щурів за умов введення клітини строми кісткового мозку (КСКМ) на тлі ураження CdCl₂. За допомогою токсину відтворювали модель вторинного андрогенного дефіциту (ВАД). Проведені дослідження показали, що при введенні КСКМ лише в одне яєчко результат не був досягнутий. Введення тваринам КСКМ у кількості по 200000 клітин в кожне яєчко призвело до досягнення найкращих результатів лікування ВАД.

Ключові слова: вторинний андрогенний дефіцит, клітини строми кісткового мозку.

Антонян И.М. Исследования морфоструктуры тестикул самцов крыс после введения клеток строми костного мозга та фоне поражения животных токсином // Український медичний альманах. — 2012. — Том 15, № 4. — С. 30–33.

В статье приведены результаты эксперимента по изучению морфологического состояния семенников и вентральной части предстательной железы (ВЧПЖ) крыс при введении клеток строми костного мозга (КСКМ) на фоне поражения CdCl₂. С помощью токсина воспроизводили модель вторичного андрогенного дефицита (ВАД). Проведенные исследования показали, что при введении КСКМ только в одно яичко результат достигнут не был. Введение животным КСКМ в количестве по 200000 клеток в каждое яичко привело к достижению наилучших результатов лечения ВАД.

Ключевые слова: вторичный андрогенный дефицит, клетки строми костного мозга.

Antonyan I.M. A study of morphological structure of male rats testis after bone marrow stromal cells injection on the background of toxic exposure of the animals // Український медичний альманах. — 2012. — Том 15, № 4. — С. 30–33.

In the article are results of the experiment as for morphology of testis and the ventral prostate of rats studying after the bone marrow stromal cells (BMSC) entering at the CdCl₂ action. The toxin had made the model of the secondary androgen deficiency (SAD). Studies had shown, that BMSC entering just in a one testicle didn't made any result. The entering BMSC in both testicle in the quantity 200000 cells had made the best results for SAD treatment.

Key words: bone marrow stromal cells, secondary androgen deficiency.

Надійшла 21.05.2012 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін