

ВІДДАЛЕНІ РЕЗУЛЬТАТИ ІНТРАТЕСТИКУЛЯРНОГО ВВЕДЕННЯ КЛІТИН СТРОМИ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРАМ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГІПОГОНАДИЗМОМ

Антонян І.М.

Харківська медична академія післядипломної освіти

Антонян І.М. Віддалені результати інтратестикулярного введення клітин строми кісткового мозку щурам з експериментальним гіпогонадізмом // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 82-87.

В статті наведені результати експерименту щодо підбору ефективної кількості стовбурових клітин в культурі (КСК) для корекції експериментального вторинного андрогенного дефіциту (ВАД). Модель була відтворена на статевозрілих самцях щурів за допомогою CdCl₂. Досліджувані морфометричні характеристики стану сперматогенного епітелію свідчать про те, що найбільш ефективна кількість клітин складає 200 000. КСК має бути введена в обидва яєчка у вказаній кількості.

Ключові слова: культура стовбурових клітин, вторинний андрогенний дефіцит

Антонян І.М. Отдаленные результаты интратестикулярного введения клеток строми костного мозга крысам с экспериментальным гипогонадизмом // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 82-87.

В статье приведены результаты эксперимента по подбору эффективного количества стволовых клеток в культуре (КСК) для коррекции экспериментального вторичного андрогенного дефицита (ВАД). Модель было создана на половозрелых самцах крыс с помощью CdCl₂. Исследованные морфометрические характеристики состояния сперматогенного эпителия свидетельствуют о том, что наиболее эффективное количество клеток составляет 200 000. КСК должна вводиться в оба яичка в указанном количестве.

Ключевые слова: культура стволовых клеток, вторичный андрогенный дефицит

Antonyan I.M. Long-term outcomes of intratesticular injection of bone marrow stromal cells in rats with experimental hypogonadism // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С.82-87.

In the article are results of the experiment as for selection of effective dose of stem cells culture (SCC) for the experimental secondary androgen deficiency (SAD) correction. The model was made with viripotents males of rats by CdCl₂. Morphometric characteristics of the spermatogenic epithelium had shown, that the most effective quantity of cells is 200 000. SCC have to be enter in the every testicle.

Key words: stem cells culture, secondary androgen deficiency

Вступ. Все більше подружніх пар звертаються до лікарів з приводу нездатності мати дітей. Та все більший відсоток серед причин цього складає нездатність мати дітей збоку чоловіків [3]. Причин, які призводять до виникнення чоловічого безпліддя, досить багато, але одне з перших місць посідає вторинний андрогенний дефіцит (ВАД). Його виникнення може бути викликане не тільки віковими змінами, але й багатьма негативними факторами: екологічними, інтоксикаційними, побічними діями лікарських засобів та ін. [2,4,6,12].

Зазвичай виникнення ВАД викликано зниженням рівня тестостерону (Т) – гормону, для якого яєчки є органом-мішенню, що, відповідно, супроводжується зниженням їх секреторно функції [9]. На сьогодні серед пацієнтів з віковим андрогенним дефіцитом частка чоловіків віком до 35 років значно збільшилась, що суттєво впливає на їх фертильність і погіршує демографічну ситуацію в країні. Таким чином, лікування ВАД потребує відновлення рівня Т, що, зазвичай, досягається за допомогою замісної гормональної терапії [14,15]. Така терапія є ефективною, але має суттєві недоліки [17,18].

Секреторна активність яєчка, яка регулюється гонадотропними гормонами, досить важно піддається відновленню при застосуванні класичних лікарських засобів. Тому, впровадження методів клітинної терапії, є патогенетично обумовленим та логічним [10,16]. При цьому застосування клітин-

ної терапії має не тільки своїх прихильників. Деякі фахівці висловлюються щодо можливості виникнення новоутворень, на тлі застосування КСКМ [стволовые клетки и рак].

Наша держава теж опікується вивченням лікувальних можливостей КСКМ та безпечним їх застосуванням. Так, в Харківській медичній академії післядипломної освіти виконується науково-дослідна робота «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 нашого експерименту було довести, що інтратестикулярна трансплантація КСКМ ефективно відновлює функцію сім'яників, уражених CdCl₂ та не призводить до виникнення новоутворень.

Матеріали та методи. Експериментальну модель ВАД відтворювали за допомогою CdCl₂, необхідна доза якого була підібрана раніше експериментальним шляхом [5, 11]. КСКМ використовували в кількості по 200000 в кожне яєчко, оскільки саме такий шлях введення та кількість клітин є найбільш ефективними, що було доведено в попередніх експериментах [7].

Культуру стовбурових клітин отримували згідно розробленої методики [1].

В експерименті було застосовано 5 груп статевих

возрілих самців щурів: 1 група – інтактна (I¹) віком 12-14 тижнів, 2 група – експериментальна патологія (ЕП) віком 16-18 тижнів; 3 група – тварини, яким на тлі ураження токсином, вводили КСКМ в кількості по 200000 в кожне яєчко (віком 20-22 тижня); 4 група – інтактні тварини віком від 33 до 36 міс., смерть яких відбулася природним шляхом (I²); 5 група – щури, яким було введено КСКМ по 200000 в кожне яєчко на тлі ураження токсином у віці 20-22 тижня, смерть яких також наступила природним шляхом.

Нами був досліджений морфологічний стан сім'яників на наявність новоутворень, а також вивчений стан 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 обробляти на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Nikon View 5.

Результати та їх обговорення. В I¹ групі на зрізах яєчок щурів звивисті сім'яні каналці, зрізані у поперечному або косому напрямку, мають овальну чи округлу форму. Діаметр каналців звичайний, власна оболонка каналців, а також білова та судинна оболонки відповідали нормі. Стінка сім'яних каналців побудована статевими клітинами. В базальному відділі містяться самі молоді клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії. Серед них розрізняються клітини з хроматином у ядрі конденсованого (тип В) та неконденсованого (тип А) виду. Сперматогонії типу А подані як так зва-

ними світлими (що об'являються), так і темними (резервними) клітинами. Іноді видно мітоз у сперматогоніях. У проміжному відділі стінки каналця розташовані сперматоцити. Більша частина сперматоцитів I-го порядку знаходилася у третій стадії профазі, у пахітені. У частині каналців добре простежували метафазу першого і (значно рідше) другого поділу та анафазу цих поділів. 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. Посадження різних типів статевих клітин у каналцях типові. В різних каналцях чітко простежено не тільки сперматогенез (процес послідовних перебудов зародкових клітин: сперматогонія → сперматозоїд), а й сперміогенез – етапи клітинних перетворень від сперматиди до сперматозоїда. Стрічка сперматогенного епітелію містила не менш 4-6 рядів клітин. Між сперматогоніями на базальній мембрані розміщені численні клітини Сертолі. Чітко видно їх світле грушоподібне ядро з ядерцем. Цитоплазматичні відростки клітин маскуються статевими клітинами подальших етапів розвитку. Міжканалцева сполучна тканина подана дуже обмежено. В цих міжканалцевих локусах видні кровоносні судини, навколо яких гуртуються нечисленні фібробласти та клітини Лейдіга (інтерстиціальні ендокриноцити або гландулоцити). Клітинні мембрани останніх часто погано розрізнялися, ядра клітин овальної форми, в основному нормохромні, в них видно чітку розсіп хроматинової зернистості (рис. 1).

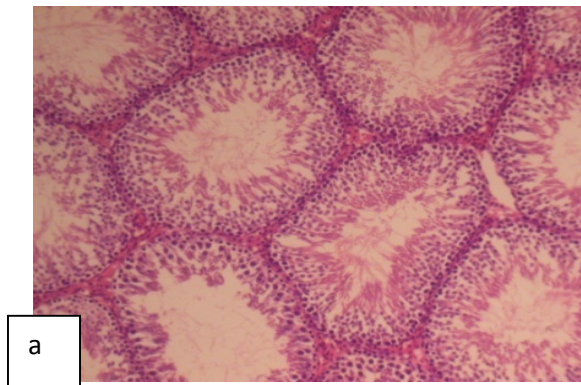


Рис. 1. Яєчко щура групи I¹: а - у сім'яних каналцях видно повний пул статевих клітин від сперматогоній до сперматозоїдів (x100); б - нормохромні клітини Лейдіга у міжканалцевому локусі (x400); Гематоксилін-еозин.

Мікроскопічне дослідження стану передміхурової залози інтактних щурів показало типову для цих тварин будову [8,13]. Паренхіма залозистої тканини подана чисельними поперечними профілями кінцевих відділів (ацинуса) простатичних залозок, які помірно варіюють за розміром. Ацинуси мали округло-овальну форму, контури їх чіткі, тургор стінок достатній. Щільність розташування відносно один до одного висока. Епітеліальні клітини, що вистеляли стінку ацинусів, мали кубічну або високу кубічну форму. Клітини розташовано одним шаром, ядро міститься у базальній частині, цитоплазма рівномірно пофарбована.

Секрет у просвіті ацинусів виявлений не у всіх випадках. Колір секрету варіює від блідо-рожевого до досить потужно рожевого. Міжацинарна строма представлена скудо (рис. 2).

Введення токсину в дозі 150 мкг/100 г маси тіла призводить до важкого пошкодження тестикул щурів. Відмічена виражена деструкція більшості сім'яних каналців з атрофією сперматогенного епітелію. Канальці зменшені у розмірі, контури їх часто звивисті, деякі каналці у стадії спадання. На часті мікропрепаратів видно, що навколо деструктивно змінених каналців 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; клі-

тини Сертолі часто деструктивні на погляд, нечисленні, з прогалинами у розташуванні. У міжканальцевих локусах клітини Лейдіга проліферують, ядра клітин дрібні, гіперхромні (рис. 3).

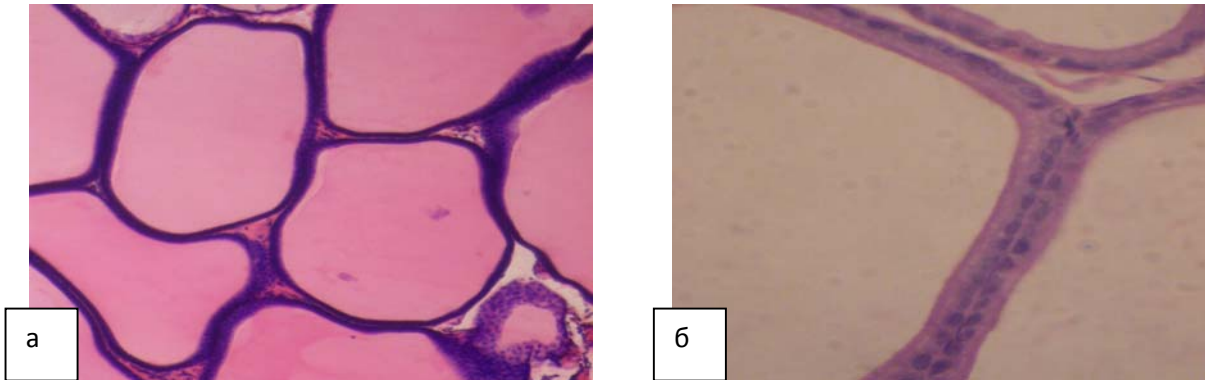


Рис. 2. ВЧПЗ щура групи I: а – ацинуси простатичних залозок нормальні за станом (x200); б – кубічний епітелій, що вистеляє ацинуси, не змінено (x400). Гематоксилін-еозин.

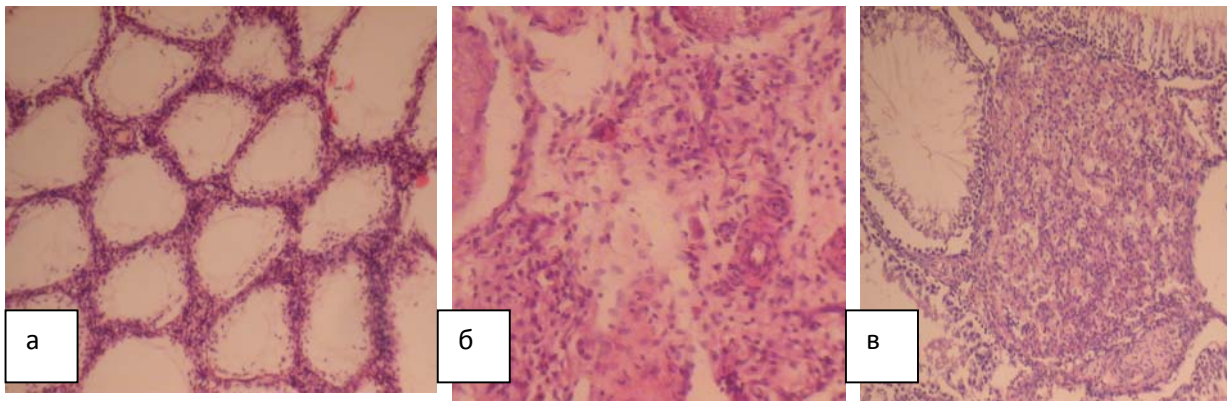


Рис. 3. Яечко щура (2 група, ЕП) на 28 день після введення $CdCl_2$ дозою 150 мкг/100г: а – виразна атрофія сім'яних каналців, відсутність сперматогенезу (x100); б – фіброзна тканина, що заміщує каналці (x200); в – масивний проліферат клітин Лейдіга (x200). Гематоксилін-еозин.

У передміхуровій залозі цих самців спостерігається кістозне розширення ацинусів, іноді зменшення висоти (сплюснення) клітин. У багатьох ацинусах видна виразна вакуолізація цитоплазми

епітеліальних клітин. Епітелій стає багатошаровим. Ці ознаки свідчать про функціональну недостатність, зниження функціональної активності передміхурової залози тварин (рис. 4).

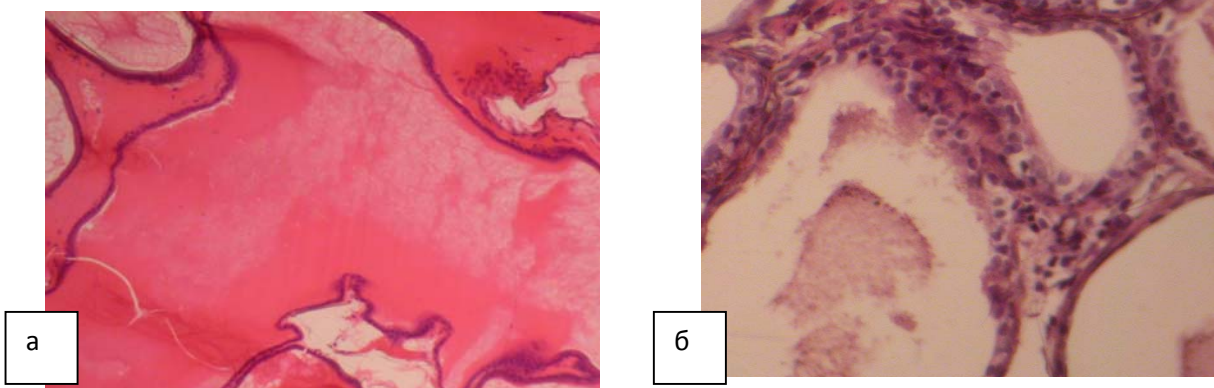


Рис. 4. ВЧПЗ щура (2 група, ЕП) після введення $CdCl_2$ дозою 150 мкг/100г: а – кістозне розширення ацинусу (x100); б – вакуолізація та проліферація епітеліальних клітин (x400). Гематоксилін-еозин.

Введення КСКМ по 200000 в обидва яєчка забезпечує репарацію сім'яних каналців з повноцінним відновленням процесу сперматогенезу. Сім'яні каналці нормального розміру. У переважній більшості їх у стінці виявлено 3-4 шари сперматогенного епітелію, багато клітин

Сертолі. Статеві клітини розташовані правильними 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 каналців містили і

сперматозоїди. У міжканальцевій стромі навколо кровоносних судин клітини Лейдіга нормохромні з помітною хроматиною зернистістю у ядрі (рис. 5).



Рис. 5. Яєчко щура (3 група) після трансплантації КСКМ дозою по 200000 клітин в кожне яєчко.: а – нормальний стан сім'яних каналців (x100); б – поділ сперматоцитів I-го і II-го порядку (x250); в – нормохромні клітини Лейдіга у міжканальцевому локусі (x400). Гематоксилін-еозин.

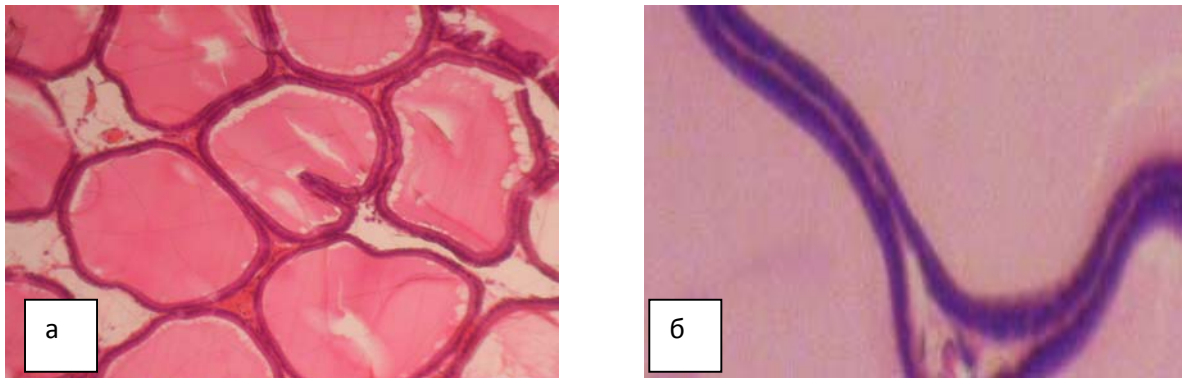


Рис. 6. ВЧПЗ щура (3 група) після трансплантації КСКМ дозою по 200000 клітин в кожне яєчко: а – стан ацинусів простатичних залозок відповідає нормі (x200); б – епітеліальні клітини, що вистеляють стінку ацинусів, не змінені (x400). Гематоксилін-еозин.

Дослідження тестикул інтактних щурів межового похилого періоду життя (33–36 місяців) показало, що у більшості тварин на тлі сім'яних каналців з візуально непомітними змінами у стані сперматогенного епітелію, відмічені каналця з "прогалинами" у стрічці та зменшенням рядів статевих клітин, збільшення каналців з відсутністю зрілих сперматозоїдів. Крім того, помічено розширення міжканальцевих просторів, особливо у внутрішніх областях яєчка. В частині каналців звертало на себе увагу вогнищеве відшарування статевих клітин від базальної мембрани, виявлялися каналці з злуцненням статевих клітин у просвіті. Клітини Лейдіга у міжканальцевих локусах у більшості нечисленні, в той же час виразно видно гіпертрофію частини з них, що, можливо свідчить про напружений стан їх (рис. 7). Слід відмітити, що серед інтактних щурів похилого віку виявлені і поодинокі випадки вогнищового або дифузного асперматогенезу (рис. 8). Перелічені вище ознаки свідчать про появу у щурів межового похилого віку ознак певного пригнічення, а в поодиноких випадках повного припинення сперматогенезу. Ознак пухлинних процесів не виявлено.

У паренхімі ВЧПЗ інтактних щурів цього віку

Передміхурова залоза щурів, які отримували КСКМ в кількості по 200000 у кожне яєчко за морфологічним станом не відрізнялася від інтактного контролю (рис. 6).

спостерігали виразне коливання розміру ацинусів простатичних залоз, часто звивистість їх контурів, сплошення епітеліальних клітин. Секрет у просвіті частини ацинусів був потужно пофарбований, у просвіті окремих ацинусів виявлені конкременти – згустки секрету з тією чи іншою ступеню просякнення мінеральними солями. Збільшення міжацинарної стромы залози не спостерігали (рис. 9). Описаний вище стан простатичних залозок свідчить про зниження функціональної активності секреторних одиниць, пов'язане очевидно з постарінням організму, розвиток компенсаторних проявів (збільшенню звивистості контурів ацинусів, щоб збільшити площу залоз і кількість функціонуючих клітин).

При вивченні морфоструктури сім'яників щурів, які у віці 20-22 тижні на тлі ураження $CdCl_2$ отримали КСКМ в кількості по 200000 в кожне яєчко та померли природною смертю у 33–36-ти місячному віці, не виявлено суттєвих відмінностей у стані паренхіми їх порівняно з інтактними тваринами відповідного віку. І у цих тварин видна була гіпертрофія частини клітин Лейдіга у міжканальцевих локусах (рис. 10). Жодних ознак пухлинного росту не помічено.

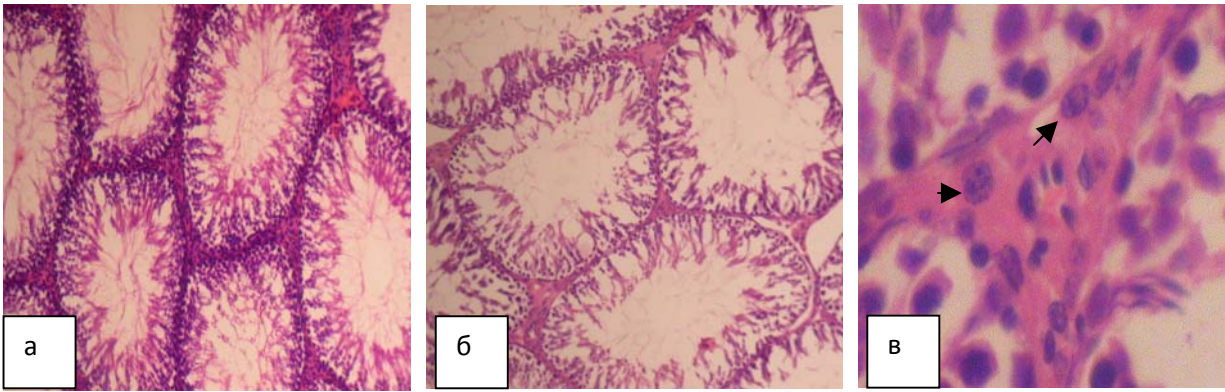


Рис. 7. Яєчко шура (4 група): а – нормальний стан сім'яних канальців (x100); б – ”прогалини” у стрічці сперматогенного епітелію та зменшенням рядів статевих клітин (x200); в – гіпертрофія клітин Лейдіга (x400). Гематоксилін-еозин.

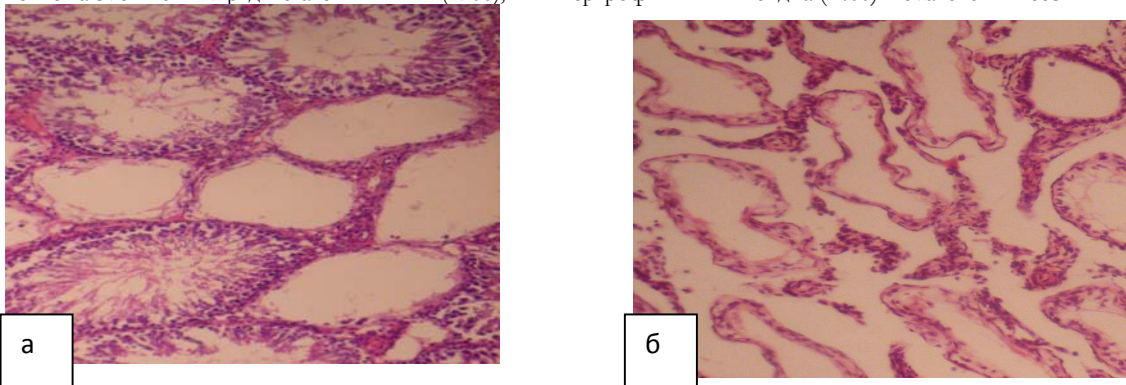


Рис. 8. Яєчко а шура (4 група): а – вогнищевий асперматогенез (x200); б – дифузний асперматогенез, оболонки канальців зморщені (x100). Гематоксилін-еозин.

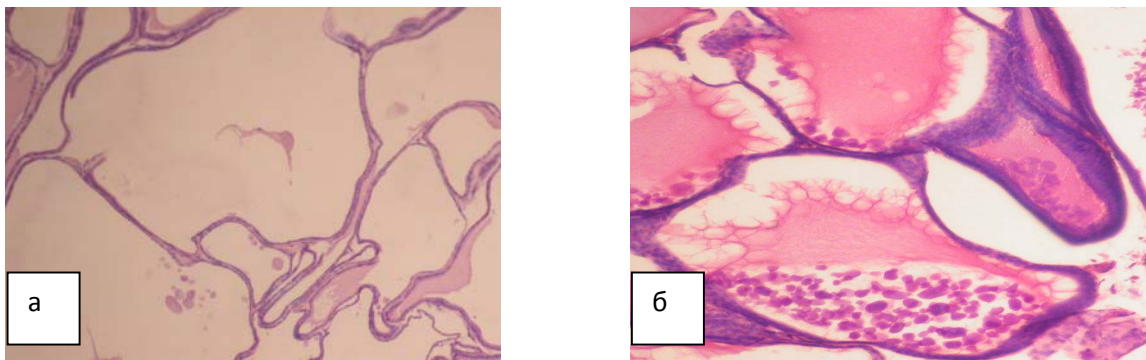


Рис. 9. ВЧПЗ шура (4 група): а – коливання розміру ацинусів простатичних залозок; б – конкременти в просвіті ацинусів, потужне еозинофільне фарбування секрету. Гематоксилін-еозин. x100.

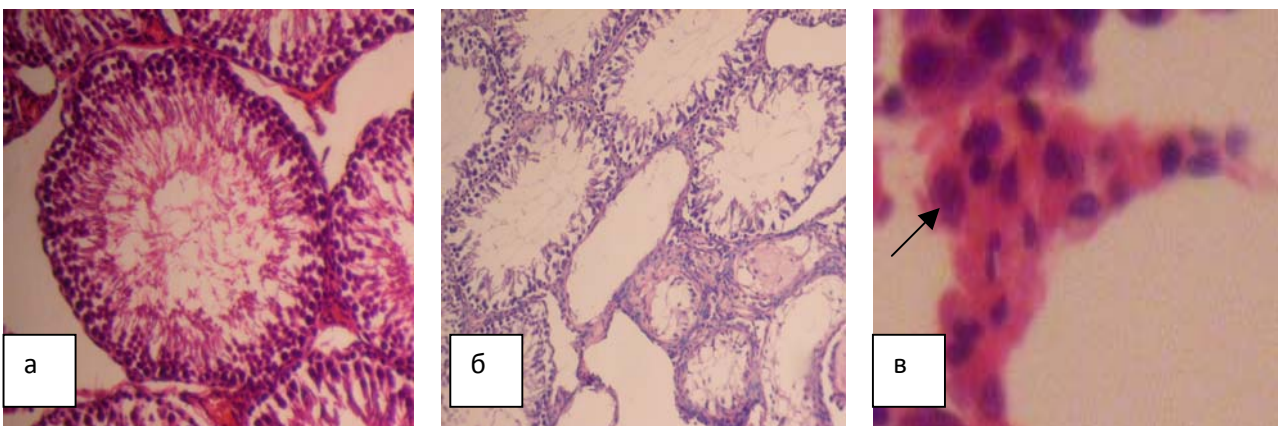


Рис. 10. Яєчки шурів (5 група), яким на тлі ураження CdCl_2 трансплантовані КСКМ в кількості по 200000 клітин в кожне яєчко: а – сім'яні канальці з повноцінним сперматогенезом (x200); б – зменшення рядів статевих клітин у ряді канальців, спустошення поодиноких канальців (x100); поява гіпертрофованих клітин Лейдіга у міжканальцевому локусі (x400). Гематоксилін-еозин.

Стан простатичних залозок ВЧПЗ таких щурів також практично відповідав інтактному контролю (рис. 11).

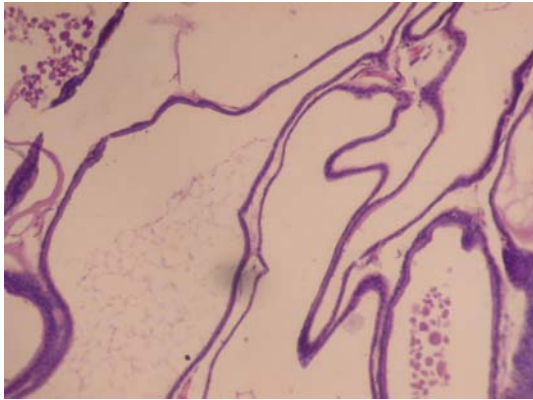


Рис. 11. ВЧПЗ щура (5 група), який на тлі ураження $CdCl_2$ отримав КСКМ в кількості по 200000 клітин в кожне яєчко. Збільшення розміру, звивистість контуру ацинусів простатичних залозок, конкременти у частині ацинусів. Гематоксилін-еозин. x100.

Висновки:

1. Інтрабдомінальне введення 150 мкг/100 г маси тіла $CdCl_2$ призводить до незворотного пошкодження тестикул щурів.
2. Трансплантація щурам КСКМ в кількості по 200000 клітин в кожне яєчко призводить до відновлення морфоструктури сім'яників та значних покращень стану ВЧПЗ.
3. Морфоструктура сім'яників та ВЧПЗ щурів 4 та 5 груп, що померли природним шляхом, не відрізняються між собою.
4. Позитивні зміни в сім'яниках та ВЧПЗ тварин 3 групи (яким на тлі ураження токсином, вводили КСКМ в кількості по 200000 в кожне яєчко) незворотні та тривалі, та не супроводжуються розвитком новоутворень.
5. Подальші наші дослідження спрямовані на вивчення можливих небажаних побічних явищ щодо змін у генетичному стані піддослідних тварин.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Антонян І.М. Використання культури стовбурових клітин для корекції андрогенного дефіциту у щурів / Проблеми безперервної медичної освіти та науки. — 2011. — № 1 — С. 57-59.
2. Бойко М. І. Чоловіча безплідність // Нова медицина. — 2002. — № 4. — С. 36-39.
3. Гринчук В.О. Чоловічий фактор у безплідному шлюбі // Здоров'я чоловіка. — 2007. — № 2. — С. 183-187.
4. Дедов І.І., Калиниченко С. Ю. Возрастной андрогенный дефицит у мужчин. — М.: Практическая медицина, 2006., С. 41-47.
5. Ермишкин А. В. Фармакобиохимическая коррекция нарушений сперматогенеза при интоксикации хлоридом кадмия в эксперименте. Автореф. дис. канд. мед. наук.: 03.00.04 / А. В. Ермишкин — Рязань, 2004. — 22 с.
6. Зачешило А.В., Аргифексов С.Б. Особенности этиологии и патогенеза нарушений функции

мужской репродуктивной системы, обусловленных экологическими факторами // Пробл. репродукции. — 2007. — Т. 13, № 4. — С. 76.

7. Котельников А. В. Сезонные и половые особенности ТБК-реактантов в гонадах белых крыс в условиях кадмиевой интоксикации / А. В. Котельников, С. В. Котельникова // Современные проблемы науки и образования. — 2008. — № 6. — С. 6.
8. Лар'яновська Ю.Б., Котелевцев Н.В. Морфоструктура передміхурової залози білих лабораторних щурів. // Медицина сегодня и завтра. — 2005. — №1. — С.12-14.
9. Минухин А. С. Показатели андрогенизации у мужчин молодого возраста с различным состоянием эректильной функции [Текст] / А. С. Минухин, В. А. Бондаренко // Здоровье мужчины. — 2009. — № 2. — С. 63-65.
10. Мірошников Я. О. Трансплантація пуповинної крові у лікуванні порушень сперматогенезу при чоловічому безплідді // Я. О. Мірошников. Медична психологія — 2010 — № 4 — С. 91-93.
11. Мірошников Я.О. Оцінка ефективності комплексного лікування хворих на варикоцеле з порушенням функції репродуктивної системи / Я. О. Мірошников, В. В. Дриманова. Практична медицина — 2009 г. — Т. 15, № 2 — С. 42-47.
12. Нікітін О.Д. Соціально-медичні аспекти безплідного шлюбу / О.Д. Нікітін // Вісник Вінницького національного медичного університету. — 2009. — № 13, Т. 2 — С. 571-586.
13. Технології виділення клітин стромы 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. — ХМАПО — Харків, 2004. — С. 7-10.
14. 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.
15. Diagnosis and Treatment of Erectile Dysfunction [Text] / A. Tsertsivadze, F. Yazdi, A. H. Fink [et al.] // Evidence Report/Technology Assessment, № 171. — Ottawa, Canada: University of Ottawa Evidence-based Practice Center, 2009. — 230 p.
16. Prostate cancer in men using testosterone supplementation / Gaylis FD, Lin DW, Ignatoff JM, et al. // J. Urol. — 2005 — V. 174 — P. 534-538.
17. 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.
18. Shabsigh R. The use of testosterone preparations for erectile dysfunction / R. Shabsigh // The Aging Male — 2004 — V. 7 — P. 312-318.

Надійшла 19.03.2012 р.
Рецензент: доц. В.М.Волошин