

## ЗМІНИ СПЕРМАТОГЕННОГО ЕПІТЕЛІУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА МОДЕЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГІПОГОНАДИЗМУ

Харківська медична академія післядипломної освіти (м. Харків)

Дана робота є фрагментом НДР «Вивчення індукції направленої диференціювання стромальних клітин, кісткового мозку і жирової тканини і розробка технології використання диференційованих аутологічних клітин для лікування захворювань різного генезу», № державної реєстрації 0111U004772.

**Вступ.** Репродуктивне здоров'я нації є предметом занепокоєння будь-якої держави, та Україна не є виключенням. Негативна тенденція останніх десятиліть, нажаль, залишається незмінною – зменшення народжуваності на тлі збільшення частки людей похилого віку. Зусилля держави щодо стимулювання підвищення народжуваності, а саме, застосування економічних та соціальних важелів, останнім часом принесли деякі покращення.

В нашій країні все частіше спеціалісти зустрічаються з проблемою безплідного шлюбу [1, 3]. Як показано в багатьох дослідженнях, складовою частиною такої проблеми є чоловіче безпліддя [2, 4]. Вторинний андрогенний дефіцит (ВАД) як причина чоловічого безпліддя зустрічається досить часто.

Серед багатьох причин, які обумовлюють виникнення ВАД у чоловіків, вагому долю складає порушення вмісту андрогенів, зокрема – тестостерону (Т) [8, 10]. Нестаток цього гормону в організмі чоловіків призводить до виникнення багатьох супутніх негараздів з боку нервової системи, психологічного стану хворого та багато іншого [11].

Зазвичай лікування ВАД проводиться за допомогою замісної андрогенної терапії (ЗАТ). Це дуже ефективний спосіб лікування, але він, як і багато інших фармакотерапевтичних заходів, має досить суттєві побічні ефекти. Зокрема, пацієнти мають постійно застосовувати препарати Т, що потребує значних фінансових затрат. Крім того, застосування ЗАТ вимагає постійного моніторингу на наявність злорякісних новоутворень [7].

Така ситуація вимагає пошуку альтернативних шляхів лікування ВАД. Сьогодні багато науковців звертають до немедикаментозних методів лікування захворювань. Зокрема, нашу увагу привернули можливості застосування культури стовбурових клітин (КСК) [5, 9]. Такий метод лікування не потребує постійного застосування та моніторингу на виникнення злорякісних новоутворень.

**Мета дослідження.** Завданням нашого експерименту було довести доцільність використання КСК для лікування ВАД та визначити ефективну кількість клітин для лікування. Ефективність застосованої терапії ми оцінювали за морфометричними показниками сперматогенного епітелію.

**Об'єкт і методи дослідження.** Модель ВАД відтворювалась на статевозрілих щурах за допомогою CdCl<sub>2</sub> в дозі 150 мкг/100 г ваги тварини, яка була підібрана раніше експериментальних шляхом. В експерименті застосовували 8 груп тварин: 1 група – інтактна (ІГ), 2 група – експериментальна патологія (ЕП), 3 група – тварини, яким на тлі ураження токсинном вводили КСК у кількості 80000 в одне яєчко, 4 група – 100000 клітин в одне яєчко; 5 група – 200000 клітин в одне яєчко, 6 група – по 80000 в кожне яєчко; 7 група – по 100000 клітин в кожне яєчко та 8 група – по 20000 клітин в кожне яєчко. Ефективність проведеної терапії оцінювали за морфологічними характеристиками сім'яників та вентральної частини передміхурової залози (ВЧПЗ). Результати експерименту оцінювали на 28 день.

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 етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Морфометрична оцінка стану сперматогенного епітелію проводили за такими кількісними показниками: індекс сперматогенезу (ІС), відносна кількість звивистих каналців (ЗК) зі злуцтеним сперматогенним епітелієм, відносна кількість звивистих каналців з сперматоцитами у метафазі 2-го поділу дозрівання (з 12-ю стадією мейозу) та кількість нормальних сперматогоній (НС) у звивистому сім'яному каналці. ІС підраховували за 4-бальною системою – фіксували у звивистому сім'яному каналці наявність шарів: сперматогоній, сперматоцитів, сперматид і сперматозоїдів (кожний шар – один бал). Потім за формулою  $\Sigma A/100$ , де А – число шарів у кожному каналці, 100 – число врахованих каналців, вираховували індекс сперматогенезу.

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.

Культуру стовбурових клітин отримували згідно розробленої методики [6].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Проведення морфометричної оцінки стану сперматогенного епітелію після введення тваринам токсину показало, що ІС значно знизився і став нижче на 26,4 %, показник ЗК знизився до 0, кількість

канальців з 12 стадією мейозу також знизилась до 0, кількість НС знизилась на 96,2 % (табл.).

Подальше введення КСК в кількості 80000 клітин в одне яєчко дещо покращило стан сперматогенного епітелію. ІС підвищився у порівнянні з ЕП на 1,5 %, НС – на 12,6 %, показники ЗК та кількість канальців з 12 стадією мейозу не змінилися та дорівнювали 0. Введення клітин у кількості 100000 в одне яєчко викликало не більш позитивні зміни, ніж введення клітин у кількості 80000 клітин. ІС підвищився у порівнянні з ЕП на 7,6 %, НС – на 9,4 %, показники ЗК та кількість канальців з 12 стадією мейозу також не змінилися та дорівнювали 0. Введення клітин у найбільшій кількості, 200000 клітин, також не призвело суттєвого покращення стану сперматогенного епітелію. ІС підвищився на 8,2 %, НС – на 14,1 %, показники ЗК та кількість канальців з 12 стадією мейозу також не змінилися та дорівнювали 0 (табл.).

Введення культури КСК в обидва яєчка по 80000 клітин призвело до значного покращення стану сперматогенного епітелію. ІС підвищився 85,5 % у порівнянні з ЕП, кількість канальців з 12 стадією мейозу підвищилась на 30,0 %, НС – 93,7 %, значення ЗК як і в попередньому експерименті дорівнювало 0. Введення КСК в кожне яєчко по 100000 клітин призвело до підвищення ІС на 91,5 %, кількість канальців з 12 стадією мейозу підвищилась на 56,0 % та НС – на 96,96 %, значення ЗК як і раніше дорівнювало 0. Після введення КСК в кожне яєчко по 200000 клітин морфометричні показники стану сперматогенного епітелію були такі: ІС не відрізнявся від ІГ, показники ЗК в цьому випадку вже показали позитивну динаміку та підвищилися у порівнянні з ЕП на 48,5 %, кількість канальців з 12 стадією мейозу підвищилась на 84,0 %, НС – на 97,1 % (табл.).

Таблиця

**Морфометрична оцінка стану сперматогенного епітелію**

	ІС	ЗК	12 ст. мейозу	НС
ІГ	3,3 ± 0,01	0,33 ± 0,21	5 ± 0,3	52,8 ± 1,4
ЕП	0,08 ± 0,01*	0*	0*	2,03 ± 0,2*
80000/1	0,13 ± 0,01*,**	0*,**	0*,**	8,7 ± 0,5*,**
100000/1	0,33 ± 0,06*,**	0*,**	0*,**	7,0 ± 0,4*,**
200000/1	0,35 ± 0,02*,**	0*,**	0*,**	9,5 ± 0,6*,**
80000/2	2,9 ± 0,01*,**	0*,**	1,5 ± 0,4*,**	51,5 ± 0,7**
100000/2	3,1 ± 0,02*,**	0*,**	2,8 ± 0,4*,**	53,2 ± 1,3**
200000/2	3,3 ± 0,02**	0,16*,**	4,2 ± 0,5*,**	53,3 ± 2,2**

**Примітка:** \* – вірогідна відмінність від ІГ; \*\* – вірогідна відмінність від ЕП; /1 – введення токсину та КСК в одне яєчко; /2 – введення токсину та КСК в обидва яєчка.

**Висновки.** Введення піддослідним тваринам CdCl<sub>2</sub> в дозі 150 мкг/100 г ваги тварини призвело до значного погіршення морфометричних показників стану сперматогенного епітелію: ІС знизився на 26,4 %, показник ЗК знизився до 0, кількість канальців з 12 стадією мейозу також знизилась до 0, кількість НС знизилась на 96,2 %.

Введення тваринам КСК в різних кількостях в одне яєчко на тлі їх ураження токсином не призвело до значного покращення морфометричних показників стану сперматогенного епітелію. Навіть у максимальній кількості, 200000 клітин, ІС відрізнявся від ІГ на 89,4 %, НС – на 82,0 %, показник ЗК дорівнював 0, кількість канальців з 12 стадією мейозу – також.

Двобічне інтратестикулярне введення тваринам, що знаходились під впливом токсину, КСК

спостерігалось значне покращення морфометричних показників стану сперматогенного епітелію. Після введення КСК в кожне яєчко по 200000 ІС не відрізнявся від ІГ, показник ЗК був нижче на 51,5 %, кількість канальців з 12 стадією мейозу буда нижче у порівнянні з ІГ на 16,0 %, НС навіть трохи перебільшував значення в ІГ – на 1,0 %.

Таким чином, нами був зроблений висновок про те, що для лікування ВАД на моделі, відтвореній на щурах, доцільно застосовувати двобічне інтратестикулярне введення КСК по 200000 клітин.

**Перспективи подальших досліджень.** В наступних дослідженнях буде необхідно зосередитися на вивченні віддалених результатів застосування регенеративних клітинних методик при лікуванні експериментального вторинного андрогенного дефіциту.

### Список літератури

1. Божедомов В.А. Иммунологические причины бездетного брака (обзор литературы) / В.А. Божедомов, И.И. Гузов, О.В. Теодорович // Пробл. репродукции. – 2004. – №6. – С. 57-62.
2. Горпинченко И. И. Лечение эректильной дисфункции [Текст] / под ред. И. И. Горпинченко. — К. : издательский дом «Профессионал», 2008. — 191 с.
3. Нікітін О.Д. Соціально-медичні аспекти безплідного шлюбу / О.Д. Нікітін // Вісник вінницького національного медичного університету. – 2009. – № 13, Т. 2 – С. 571-586.
4. Нишлаг Э. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы [Текст] / под ред. Э. Нишлага, Г. М. Бере; пер. с англ. — М. : Медицинское информационное агентство, 2005. — 551 с.
5. 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.

6. 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. — ХМАПО — Харків, 2004. — С. 7-10.
7. Burris A. S. A long term prospective study of the physiology and behavioural effects of hormone replacement in untreated hypogonadal men [Text] / A. S. Burris, S. M. Banks, C. S. Carter [et al.] // J. Androl. — 1992. — Vol. 13, Issue 4. — P. 297–304.
8. Kumar A. Biology of Sexual Dysfunction [Text] / A. Kumar, N. B. Pai, S. Rao [et al.] // O.J.H.A.S. — 2009. — Vol. 8, Issue 1. — P. 1–7.
9. Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells // Chang C.M., Kao C.L., Chang Y.L. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2007 — V. 357 (2) — P. 414–420.
10. Stief C. Testosterone and Erection: Practical Management for the Patient with Erectile Dysfunction [Text] / C. Stief // Europ. Urol. Suppl. — 2007. — Vol. 6. — P. 868–873.
11. Traish A. M. Testosterone and Erectile Function: From Basic Research to a New Clinical Paradigm for Managing Men with Androgen Insufficiency and Erectile Dysfunction [Text] / A. M. Traish, I. Goldstein, N. N. Kim // Europ. Urol. — 2007. — Vol. 52, Issue 1. — P. 54–70.

**УДК 616-018**

### **ЗМІНИ СПЕРМАТОГЕННОГО ЕПІТЕЛІУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН НА МОДЕЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПОГОНАДИЗМУ**

**Антонян І.М.**

**Резюме.** 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 CdCl<sub>2</sub>. 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.

**УДК 616-018**

### **ИЗМЕНЕНИЯ СПЕРМАТОГЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СТОЛОВЫХ КЛЕТОК НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГИПОГОНАДИЗМА**

**Антонян И.М.**

**Резюме.** В статье приведены результаты эксперимента по подбору эффективного количества стволовых клеток в культуре (КСК) для коррекции экспериментального вторичного андрогенного дефицита (ВАД). Модель было создано на половозрелых самцах крыс с помощью CdCl<sub>2</sub>. 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.

**UDC 616-018**

### **Changes Of Spermatogenic Epithelium At Application Of Stem Cells On Model Of Experimental Hypogonadism**

**Antonyan I.M.**

**Summary.** 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 CdCl<sub>2</sub>. 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.

Стаття надійшла 1.12.2011 р.