

УДК 616.697-092.9-02:546.48'131

<sup>1</sup>Антонян И. М., <sup>2</sup>Омельченко Е. А., <sup>2</sup>Забирник А. С.

### ИЗМЕНЕНИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ АНДРОГЕННОГО ДЕФИЦИТА ПОД ВЛИЯНИЕМ СИНГЕННОЙ КУЛЬТУРЫ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. ТРЕКИНГ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИМИДЖИНГ КЛЕТОК EX VIVO/IN VIVO

<sup>1</sup>Харьковская медицинская академия последипломного образования

<sup>2</sup>ООО «Вирола», г. Харьков

torak@list.ru

Мужской возрастной гипогонадизм – распространенная причина бесплодных браков (понижение уровня тестостерона). Лечение проводится посредством гормонзаместительной терапии, которая имеет ряд ограничений. Целью исследования была проверка альтернативного метода с использованием клеток стромы костного мозга (КСКМ). В ходе эксперимента доказано, что метод приводит к необратимым позитивным изменениям гормонального статуса у подопытных животных на фоне модельной патологии. Трекинг КСКМ показал, что после введения они направляются в межканальцевое пространство тестикул и равномерно распределяются в указанном пространстве, сохраняя свою жизнеспособность до 28 дней.

**Ключевые слова:** возрастной гипогонадизм; тестостерон; трекинг; клетки стромы костного мозга.

**Связь работы с научными программами, планами, темами.** Исследование было проведено в рамках НИР Харьковской медицинской академии последипломного образования «Розробка та удосконалення ефективності діагностичних і терапевтичних технологій при хірургічних захворюваннях нирок і сечовивідних шляхів і чоловічої репродуктивної системи», № гос. регистрации 0198U002627.

**Введение.** Демографическая проблема является одной из наиболее острых в современном обществе. Ее составляющие лежат как в социальной плоскости, так и в медицинском поле. По данным ВОЗ количество бесплодных браков составля-

ет 8–18 %, в Украине – 17–19,5 % [1]. При этом около 45 % случаев приходится на мужское бесплодие [2.].

Причин, приводящих к мужскому бесплодию, существует много, но одной из наиболее распространенных является возрастной андрогенный дефицит (ВАД). Патогенез этого состояния связан с понижением уровня основного мужского гормона – тестостерона (Т).

В одном из исследований в США, HIM study, изучалась частота встречаемости гипогонадизма у мужчин старше 45 лет. При оценивалась и демографическая составляющая, и сопутствующие заболевания [3].

Т.о., вероятность проявления гипогонадизма оказалась достоверно высокой: артериальная гипертензия (1,84), гиперлипидемия (1,47), сахарный диабет (2,09), ожирение (2,38), заболевания простаты (1,29) хроническая обструктивная болезнь легких (1,40) [3].

Максимальное содержание Т у мужчин наблюдается в 25–30 лет. По данным Massachusetts Male Aging Study (MMAS) концентрация общего Т, начиная с 30–35-летнего возраста снижается на 0,8 %, а биодоступного Т – на 2–3 % каждый год. Такое гормональное изменение вызывает возникновение различных патологий в различных органах и тканях. Как следствие, происходит снижение качества жизни пациентов. Одним из его проявлений является эректильная дисфункция (ЭД) [4].

Если концентрация Т в молодости невысокая (нижняя граница содержания общего Т составляет

12 нмоль/л), то после 30 лет может начаться развитие возрастного гипогонадизма. В последствии снижении уровня сывороточного Т растёт от 7 % (40–60 лет) и до 35 % (старше 80 лет). Как правило, в возрасте 60–70 лет концентрация общего Т не превышает 12 нмоль/л.

Таким образом, логично признать, что излечение заключается в восстановлении необходимого уровня гормона. Традиционно подобная коррекция проводится посредством гормонзаместительной терапии (ГЗТ). В целом, применение ГЗТ направлено на сохранение у мужчин вторичных половых признаков, улучшение сексуальной функции, поддержание хорошего самочувствия, сохранение минеральной плотности костной ткани и позитивное влияние на кардиометаболические показатели, т. е. коррекцию основных симптомов гипогонадизма.

Наличие клинических симптомов гипогонадизма и низкий уровень Т, подтвержденный лабораторными исследованиями, являются показанием для назначения ГЗТ. Монотерапия препаратами Т может быть эффективна в лечении ЭД у мужчин, страдающих гипогонадизмом. Но такая стратегия более эффективна для восстановления либидо, чем ЭД.

ГЗТ способствует повышению сексуальной активности у мужчин с гипогонадизмом, появлению более частых сексуальных мыслей и фантазий, увеличению частоты и продолжительности ночных эрекций. Наблюдается улучшение роста волос в некоторых андрогензависимых зонах, увеличиваются мышечная масса и сила, и уменьшается объем жировой ткани, отмечается увеличение минеральной плотности костной ткани.

На сегодня разработаны эффективные препараты, которые производятся в различных лекарственных формах и широко представлены на украинском фармрынке [5].

Однако любая заместительная фармакотерапия также имеет ряд ограничений и чревата различными побочными эффектами. Кроме того, она создает неудобство необходимостью постоянного приема препарата.

Терапия Т требует соблюдения определенных условий и мер предосторожности:

- осуществление мониторинга на наличие новообразований – УЗИ простаты до, во время и после курсовой ГЗТ;
- мониторинг уровней ПСА, гемоглобина и гематокрита;
- оценка активности печеночных ферментов;
- мониторинг почечных параметров.

Следует также учитывать, что применение ГЗТ не всегда допустимо. Такая терапия невозможна у следующих групп пациентов:

- пограничный уровень ПСА;
- изменение консистенции предстательной железы при пальцевом ректальном исследовании;
- увеличение объема и изменение структуры предстательной железы при УЗИ и верифицированным диагнозом рака простаты;
- андрогензависимая карцинома молочной железы;
- опухоли печени в анамнезе;
- уровень гематокрита более 52%;
- не компенсированной сердечной недостаточности (увеличение отеков);
- наличием обструктивного апноэ во сне, так как оно может усиливаться.

Вышесказанное свидетельствует о необходимости поиска альтернативных путей коррекции АД. Особенно, если речь идет о мужчинах среднего возраста. Для них необходимость постоянного применения лекарственных препаратов создает дискомфорт, т.к. снижает качество жизни пациента.

Попытки заменить фармакотерапию биологическими регенеративными методами ведутся давно, однако в последнее время количество работ, посвященных разработке данных методов, возросло в десятки раз. Наиболее популярными являются использование клеток стромы костного мозга (КСКМ), т.к. они могут быть получены от взрослых особей для аутотрансплантации [6, 7]. Сегодня клетки стромы активно используются в регенеративной медицине (диабет, инфаркт миокарда, лейкемия, комбустиология и т.д.). Логично предположить, что использование КСКМ имеет достаточно преимуществ:

- однократное введение;
- при их использовании не возникает побочных эффектов;
- нет необходимости постоянного мониторинга биохимических показателей и тестостерона.

Хороший терапевтический эффект обусловлен высокой способностью КСКМ к пролиферации, дифференцированию, самообновлению.

В нашем эксперименте речь идет о локальной трансплантации сингенных клеток у крыс, т.к. трансплантация аутологических клеток затруднена из-за малых размеров подопытных объектов. При этом следует обратить внимание на то, что эффективность такой трансплантации зависит от способности клеток регенерировать поврежденные ткани, и их способности мигрировать в поврежденные органы.

Нами был проведен ряд экспериментов на крысах, в которых вначале была воспроизведена модель АД с помощью CdCl<sub>2</sub>, которая была стабильной, и при отсутствии терапии – необратимой

[8, 9, 10]. Одним из путей оценки полученного результата являлась оценка гормонального статуса подопытных животных.

При проведении последующей серии экспериментов проводилось одностороннее интратестикулярное введение КСКМ в различных количествах. В результате было показано, что подобный путь введения, даже при максимальном количестве клеток, является малоэффективным [11].

Таким образом, целью последующей серии экспериментов являлась оценка эффективности двустороннего введения КСКМ в различных количествах, а также трекинг введенных клеток.

Однако при использовании КСКМ необходимо удостовериться в том, что клетки мигрировали к своей цели. Существуют, разумеется, косвенные методы: упомянутая выше оценка гормонального состояния подопытных животных, гистологические исследования и т.д. [12].

Так как нам не удалось обнаружить в литературе достоверной информации о распределении трансплантированных КСКМ в тканях семенников при их введении, было принято решение о визуальном подтверждении присутствия введенных клеток в тканях яичек и продолжении их жизнедеятельности, что было бы наиболее убедительным аргументом при проведении подобных экспериментов. Для оценки приживления КСКМ в организме реципиента необходимо проводить трекинг (от англ. tracking – отслеживание) клеток после их трансплантации [13, 14]. Экспериментальные методы предусматривают использование специальных красителей или меток [15].

Одним из распространенных методов визуализации клеток при трансплантации является применение зеленого флуоресцентного белка – GFP, полученного из медузы *Aequorea victoria*. Данный метод относится к категории оптического имиджинга с использованием экзогенных маркеров. Этот белок в его стабилизированном и усиленном варианте является наиболее широко используемым флуоресцентным репортером в биологических и медицинских исследованиях. Всего к настоящему времени клонировано около 200 генов флуоресцентных белков (FPs) и хромопротеинов (CPs) [16]. При флуоресцентной визуализации (флуоресцентном имиджинге – ФИ) зондирующее излучение определенной длины волны возбуждает флуоресцентные молекулы-мишени (флюорофоры), способные в ответ испускать фотоны с большей длиной волны, которые регистрируются детектором [17].

В последние десятилетия трансгенные мыши определенных клеточных линий, экспрессирующие GFP в тканях всего организма, были широко ис-

пользованы в экспериментах с применением люминисцентной микроскопии. Например, MMTV – GFP мышей использовали для визуализации клеток молочной железы и опухолей [18, 19].

Метод выявления трансплантированных клеток по GFP прост и информативен [19]. Известно, что применение гена GFP в качестве экзогенного метчика с целью визуализации трансплантированных клеток позволяет отслеживать трекинг клеток-трансплантантов в течение длительного времени в отличие от методов с применением других метчиков [19]. Применение данного метода окрашивания также позволит судить об интенсивности функционирования клеток.

Использование зеленого флуоресцентного белка (GFP) является оптимальным методом для того чтобы получить быструю и эффективную метку клеток и провести трекинг *in vivo*.

**Цель исследования** – изучение изменения гормонального статуса животных на фоне введения сингенных клеток стромы костного мозга; визуализация трекинга вводимых клеток.

**Материалы и методы исследования.** Модель АД воспроизводили с помощью  $CdCl_2$  на половозрелых самцах крыс. Эффективная доза токсина, вызывающая необратимые изменения, была подобрана в ходе предыдущих экспериментов. Она составила  $150 \text{ мкг}/100 \text{ г}$  массы тела животного. Доза является достаточной для воспроизведения модели, т.е. возникновения эндокринной патологии в организме самцов крыс, но не является летальной [8, 9, 10].

Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», утвержденных Пятым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013).

Для подбора эффективного количества клеток для двустороннего интратестикулярного введения в эксперименте использовалось 5 групп животных: интактная группа (ИГ); группа экспериментальной патологии (ЭП); 3 группа – животные-реципиенты, которым вводили клетки в количестве по 80000 клеток в каждое яичко; 4 группа – животные-реципиенты, получавшие клетки в количестве по 100000 в каждое яичко и 5 группа – животные-реципиенты, получавшие клетки в количестве 200000 в каждое яичко. Клетки вводились на 7 сутки после введения токсина.

Оценка эффективности действия введенной КСКМ проводилась по показателям гормонального статуса животных: тестостерон (Т), фолликулосте-

мулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), глобулин, связывающий половые гормоны (ГСПГ), андрогенный индекс (АИ). Оценка всех показателей проводилась на 28 сутки эксперимента.

КСКМ были получены согласно разработанной методики [20].

Костный мозг выделяли из бедренных костей сингенных самцов крыс. Суспензию клеток костного мозга отмывали дважды в растворе Хэнкса центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде DMEM/F12 (1/1) (Sigma) с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки (Sigma), 2mM L-Глютамина (Sigma) и 50 мкг/мл гентамицина. Посевная концентрация составляла 1 млн кл./см<sup>2</sup> культурального сосуда. Через 24 часа культивирования среду с неприкрепившимися клетками удаляли и трижды промывали сосуд раствором Хэнкса для того, чтобы удалить кровяные клетки костного мозга. К прикрепленным ко дну сосуда клетками добавляли свежую культуральную среду и культивировали клетки стромы при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем продолжали культивировать клетки еще 10–12 дней до образования клеточного монослоя, меняя среду каждые 3 суток.

За основу процедур для получения перманентно экспрессирующих GFP культур КСКМ был взят протокол лаборатории D. Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Швейцария) [21].

Для трансфекции использовали клетки линии НЕК (Human Embryonic Kidney) 293T. В качестве векторов использовали 3 плазмиды (2 пакующих и одна несущая ген GFP).

Клетки НЕК 293T культивировали на среде DMEM, 10% FBS, 2 mM глутамин. За день до трансфекции клетки рассеивали в чашку Петри (10 см<sup>2</sup>) по 2,5×10<sup>6</sup> на чашку. На следующий день осуществляли трансфекцию. Использовали метод кальций – фосфатной трансфекции: изотонический раствор, содержащий буфер HEPES, фосфат и плазмиды смешивали с CaCl<sub>2</sub>. При этом образовывался осадок из частиц фосфата кальция и ДНК, размер которых лежит в нанометровом диапазоне. Суспензию добавляли к культуре клеток, которые поглощали частицы путем фагоцитоза и начинали производить репликативно-дефектные вирусы. Собирали супернатант с культуральных флаконов, где проходила трансфекция через каждые 12–24 часа. Затем этот супернатант добавляли к культуре КСКМ и культивировали 3–4 суток. Химерный вирус включался в геном клеток и начиналась экспрессия белка GFP, что подтверждалось свечением клеток.

Мы проводили сравнение титра вирусов в зависимости от используемых реактивов для транс-

фекции (Sigma, USA / AppliChem GmbH, Germany). Метод был оптимизирован для использования именно КСКМ. Мы провели сравнение 3 методов концентрации лентивирусных частиц: сбор культуральной среды в период наиболее интенсивного продуцирования вирусных частиц, концентрация общего супернатанта путем осаждения в комплексе с ПЭГ-6000; ультрацентрифугирование общего супернатанта при 79 000g.

Проведение микроскопии проводилось с помощью микроскопа Olympus X71. Использованное увеличение: окуляр ×10, объектив ×40, ×60. Полоса возбуждения 510–560 нм, полоса люминесценции 500–570 нм.

Для введения животным КСКМ снимали с культурального флакона путем последовательной инкубации в растворе Версена и трипсина. Отмывали культуральную среду путем центрифугирования и переносили в транспортную среду. Количество клеток подсчитывали с помощью камеры Горяева.

Также было проведено сравнение оптимального соотношения клетки/вирусные частицы во время заражения и, соответственно, процента зараженных клеток.

Трекинг трансплантированных клеток проводился как *ex vivo*, так и *in vivo*. Для трекинга *ex vivo* нами изымались семенники животных, куда немедленно трансплантировались клетки, после чего органы подвергались заморозке. Из замороженных препаратов органов готовились препараты для исследования.

#### Результаты исследования и их обсуждение.

Через 28 дней после однократного введения животным токсина в дозе 150 мг/кг веса животного были выявлены следующие изменения гормонального статуса животных (**табл.**): содержание Т снизилось на 58,5 %, содержание ФСГ повысилось на 35,0 %, ЛГ – на 18,3 %, ГСПГ – на 126,6 %, АИ снизился на 83,6 %.

Введение клеток в количестве 80 000 клеток в 3 группе привело к улучшению гормонального статуса животных (**табл.**). При сравнении с ЭП наблюдались следующие изменения: содержание Т увеличилось на 23,1 %, содержание ФСГ снизилось на 27,5 %, ЛГ – на 6,7 %, ГСПГ – на 45,0 %, АИ вырос на 14,6 %.

Если сравнивать полученные результаты из ИГ, то можно увидеть следующее: уровень Т оказался меньшим на 35,5 %, содержание ФСГ превышало содержание в ИГ на 7,5 %, ЛГ – на 11,7 %, ГСПГ – на 81,5 %, АИ был меньше на 69,0 %. Изменения, которые наблюдались после введения КСКМ в количестве 80 000 в 3 группе в каждое яйцо были намного более позитивными, чем результаты, полученный после введения животным даже

Показатели гормонального статуса крыс на модели поражения CdCl<sub>2</sub> при двустороннем интратестикулярном введении КСКМ

	Т, нмоль/л	ФСГ, нг/мл	ЛГ, нг/мл	ГСПГ, нмоль/л	АИ, %
ИГ	23,4 ± 2,0	4,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	95,3 ± 8,1	28,7 ± 3,4
ЭП	9,7 ± 0,7*	5,4 ± 0,1*	7,1 ± 0,1*	215,9 ± 11,4*	4,7 ± 0,4*
3 группа	15,1 ± 1,3**	4,3 ± 0,1**	6,7 ± 0,1**	173,0 ± 9,1**	8,9 ± 0,7**
4 группа	19,0 ± 1,4**	4,0 ± 0,1**	6,6 ± 0,1**	136,1 ± 10,7**	15,0 ± 1,2**
5 группа	22,6 ± 1,6**	3,9 ± 0,1**	6,0 ± 0,1**	85,0 ± 7,9**	32,6 ± 4,9**

Примечания: \* – достоверное отличие от ИГ; \*\* – достоверное отличие от ЭП.

максимального количества клеток, 200000 клеток, в одно яичко.

Гормональный эффект, полученный после двустороннего интратестикулярного введения подопытным животным клеток в количестве 100 000 и 200 000, в 4й и 5й группах оказался более выраженным (табл.). После введения животным клеток в количестве 100 000 отмечены следующие изменения по сравнению с группой ЭП: содержание Т увеличилось на 39,7 %, содержание ФСГ снизилось на 35,0 %, ЛГ – на 8,3 %, ГСПГ – на 83,7 %, АИ увеличился на 35,9 %. При сравнении полученных результатов с ИГ мы наблюдались следующие изменения: дефицит Т составил 18,8 %, содержание ФСГ не отличалось от ИГ, содержание ЛГ оказалось больше на 10,0 %, ГСПГ – на 42,8 %, АИ – ниже на 4,8 %.

Интратестикулярное введение клеток в количестве 200 000 привело к наиболее позитивным изменениям: содержание Т увеличилось на 55,1 % по сравнению с ЭП, содержание ФСГ снизилось на 37,5 %, ЛГ – на 18,3 %, ГСПГ – на 37,4 %, АИ увеличился на 97,2 %. При сравнении полученных результатов с ИГ был показано следующее: содержание Т оказалось несколько ниже, чем в ИГ – на 3,4 %, содержание ФСГ – на 2,5 %, содержание ЛГ не отличалось от ИГ, ГСПГ – ниже на 10,8 %, АИ оказался выше на 13,6 %.

Сравнение результатов, полученных после введения клеток в количестве 80 000 и 100 000 клеток КСКМ было показано следующее: содержание Т после введения КСКМ в количестве 100 000 оказалось больше на 16,7 % по сравнению с группой, получившей КСКМ в количестве 80 000, АИ – на 21,3 %, содержание ФСГ – меньше на 7,4 %, ЛГ – на 1,7 %, ГСПГ – на 38,7 %.

При сравнении результатов в группах животных, получивших клетки КСКМ в количестве 80 000 и 200 000, получены такие результаты: содержание Т в группе животных, получивших 200 000 клеток, оказалось больше на 32,1 %, АИ – больше на 82,6 %, содержание ФСГ – на 10,0 %, ЛГ – на 11,7 %, ГСПГ – на 92,3 %.

При сравнении результатов в группах подопытных животных, получивших клетки КСКМ в количе-

стве 100 000 и 200 000, было показано: содержание Т в группе животных, которые получили клетки КСКМ в количестве 200 000, оказалось больше на 15,4 %, АИ – на 61,3 %, содержание ФСГ – больше на 2,5 %, ЛГ – на 10,0 %, ГСПГ – на 53,6 %.

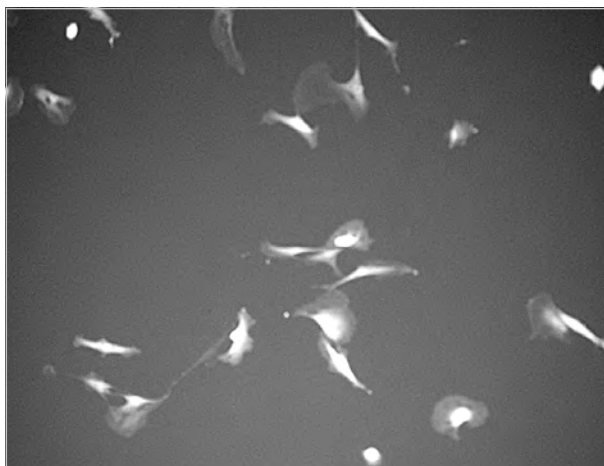
Выявленный от использования КСКМ эффект имеет несомненные перспективы для использования в биологии и медицине. Однако возникает логичный вопрос о механизме восстанавливающего действия клеток в яичках, ответ на который можно получить при проведении трекинга трансплантированных клеток после их введения в яички животных. Эта процедура была нами проведена с помощью описанной выше технологии с использованием флуоресцентного имиджинга (рис. 1).

Для получения исходной картины распределения клеток, нами был проведен эксперимент *ex vivo*, результат которого представлен на рис. 2. Методологически введение клеток осуществлялось вдоль длинной оси яичка путем трехкратной инокуляции при обратном ходе иглы. Сразу же после этой манипуляции, яички были подвергнуты заморозке.

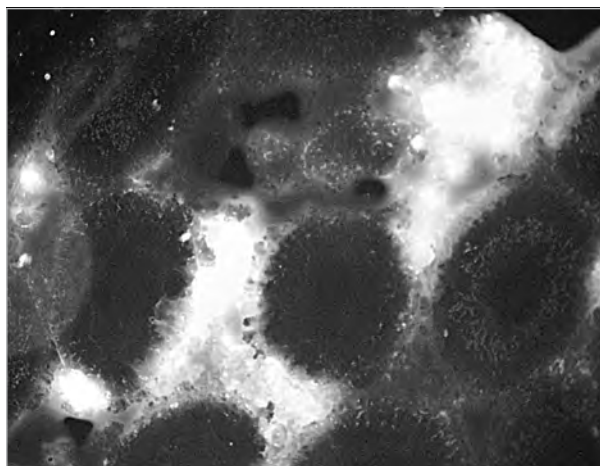
Серия экспериментов *ex vivo* продемонстрировала, что КСКМ распределяется вдоль инъекционного канала крупными скоплениями. При этом они визуализировались только в межканальцевом пространстве.

Ни рис. 3 показано, что на 1е сутки после введения КСКМ были обнаружены в межканальцевом пространстве яичек. Флуоресцентный имиджинг свидетельствует о том, что клетки распределились в этом пространстве более равномерно, по сравнению с результатами, полученными *ex vivo* (рис. 2) и определяются на значительном расстоянии от места инъекции. Т.е., на поперечных срезах замороженных яичек определялись клетки, которые через 24 часа мигрировали на значительное расстояние от места инокуляции и достаточно равномерно распределялись в межканальцевом пространстве. Инъекционный канал не определяется.

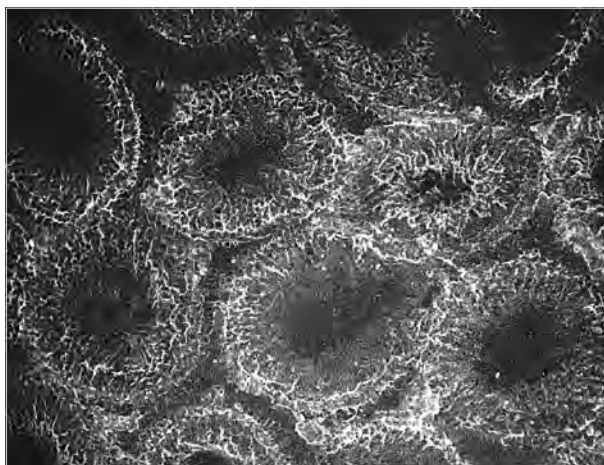
На рис. 4 продемонстрировано, что на 28е сутки эксперимента также наблюдается флуоресцентное свечение, хотя и не столь интенсивное, как *ex vivo* и в 1-е сутки после трансплантации.



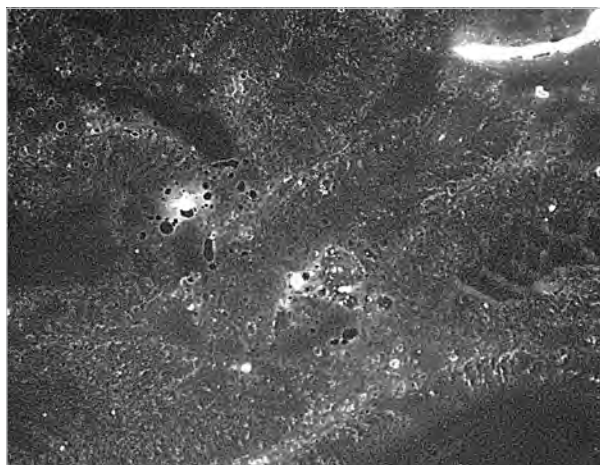
**Рис. 1.** Культура КСКМ, експресуюча GFP. Об. 25х.



**Рис. 2.** Розподіл КСКМ, позначених GFP, після їх інтратестикулярного введення *ex vivo*. Об. 60х.



**Рис. 3.** Розподіл КСКМ, позначених GFP, на 1-е сутки після інтратестикулярної трансплантації. Об. 60х.



**Рис. 4.** Розподіл КСКМ, позначених GFP, на 28-е сутки після інтратестикулярного введення КСКМ. Об. 60х.

Данні цього трекинга свідчать про те, що введені нами клітки залишаються життєздатними і присутні тільки в міжканальцевому просторі яєчок і, виходячи з результатів по оцінці гормонального статусу тварин, проявляють специфічну активність в посттрансплантаційний період, стимулюючи гормональну активність тестикул.

Т.о., показано, що модифікована нами методика з використанням реактиву виробника Sigma класу Biototechnology Grade дозволяє отримати на 40 % більший титр вірусу. Трансфекція КСКМ лентивірусними частинками, концентрованими з допомогою ПЭГ-6000, дозволила отримати високий процент заражених кліток і зручну форму зберігання вірусу при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Найбільш ефективною виявилася концентрація лентивірусних частинок з допомогою ультрацентрифугування: токсичність була невисокою, а результат – оптимальним серед усіх запропонованих

варіантів. В результаті була отримана специфічна лінія кліток, здатних продукувати трансфекційні агенти – реплікативно дефектні лентивіруси.

**Висновки.** В результаті проведених експериментів було доведено, що двостороннє інтратестикулярне застосування КСКМ в кількості 200000 кліток призводить до позитивної зміни гормонального статусу у підопитних тварин на фоні моделі патології АД, що свідчить про регенерацію в семенниках крис.

Було створено банк КСКМ з експресією GFP, який може бути використаний для дослідження трекингу кліток в семенниках. Данна культура може застосовуватися в прикладних методах флуоресцентного мікроджингу при проведенні трансплантації.

В ході експерименту з допомогою КСКМ позначених GFP і флуоресцентної мікроскопії при трансплантації в ткани реципієнта було показано

но, что после введения *in vivo* клетки направляются в межканальцевое пространство тестикул. Дальнейшее наблюдение показало, что клетки равномерно распределяются в указанном пространстве и сохраняют свою жизнеспособность до 28 дней.

**Перспективой дальнейших исследований** станет разработка метода визуализации вводимых клеток для их трекинга.

### Литература

1. Kozub M. M. Auxiliary reproductive techniques in women with infertility following surgery for tubal pregnancy / M. M. Kozub, V. M. Olkhovska // *Int. medical J.* – 2015. – № 4. – P. 42–46.
2. Lytvynets Ye. A. Value sexually transmitted infections in development and complications of acute epididymitis / Ye. A. Lytvynets, V. R. Balabanyk // *Male health.* – 2012. – № 1. – P. 8–10
3. Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study / [T. Mulligan, M.F. Frick, Q.C. Zuraw et al.] // *Int. J. Clin. Pract.* – 2006. – Vol. 60 (7). – P. 762–769.
4. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study / H.A. Feldman, C. Longcope, C.A. Derby // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002 – Vol. 87 (2). – P. 589–598.
5. Kirilyuk M. Late-onset androgen deficiency syndrome in males. Modern approaches to diagnosis and treatment / M. Kirilyuk // *Clinical endocrinology and endocrinology surgery.* – 2013. – № 3 (44). – P. 61–68.
6. Охоботов Д. А. Влияние культур, обогащенных стволовыми клетками, на сперматогенез при экспериментальном двухстороннем крипторхизме : автореф. дис. на соискание научной степени канд. мед. наук. : спец. 14.00.40 «Урология» / Д. А. Охоботов. – М., 2008. – 36 с.
7. Miroshnikov Ya. O. Umbilical blood transplantation in treatment of spermatogenesis disorders at male sterility / Ya. O. Miroshnikov // *Medical psychology.* – 2010. – № 4. – P. 91–93.
8. Антонян И. М. Изучение ферментов перекисного окисления липидов в эксперименте по подбору эффективной дозы хлорида кадмия для создания модели мужского бесплодия у самцов крыс / И. М. Антонян // *Проблеми сучасної науки та освіти.* – 2009. – № 4. – С. 66–69.
9. Антонян И. М. Определение эффективной концентрации кадмия хлорида для создания модели необратимого бесплодия у самцов крыс / И. М. Антонян // *Проблеми сучасної науки та освіти.* – 2010. – № 1. – С. 48–50.
10. Антонян И. М. Вплив різних доз CdCl<sub>2</sub> на масу статевих органів щурів при створенні моделі вторинного андрогенного дефіциту / І. М. Антонян // *Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія.* – 2013. – № 1. – С. 13–20.
11. Антонян И. М. Визначення ефективної кількості стобурових клітин та методу введення для корекції гормональної дисфункції в експерименті на самцях щурів / І. М. Антонян // *Проблеми сучасної науки та освіти.* – 2010. – № 4. – С. 74–76.
12. Современные методы визуализации стволовых клеток *in vivo* (обзор) / [А. В. Мелешина, Е. И. Черкасова, М. В. Ширманова и др.] // *СТМ.* – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 174–188.
13. Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver / [T. G. Fellous, S. Islam, P. J. Tadrous et al.] // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49. – P. 1655–1663.
14. Meirelles Lda S. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells / Lda S. Meirelles, A. I. Caplan, N. B. Nardi // *Stem Cells.* – 2008. – Vol. 26 (9). – P. 2287–2299.
15. Скуратов А. Г. Методики трекинга трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток в организме реципиента / А. Г. Скуратов, А. Н. Лызикив, Д. Р. Петренев // *Проблеми здоров'я та екології.* – 2014. – № 4 (42). – С. 84–89.
16. Fluorescent proteins: physical-chemical properties and application in cell biology / [O. V. Stepanenko, V. V. Verkhusha, I. M. Kuznetsova et. Al.] // *Cytology.* – 2007. – Vol. 49, № 5. – P. 395–420.
17. Современные методы визуализации стволовых клеток *in vivo* (обзор) / [А. В. Мелешина, Е. И. Черкасова, М. В. Ширманова и др.] // *СТМ.* – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 174–188.
18. GFP expression in the mammary gland for imaging of mammary tumor cells in transgenic mice / [Ahmed Fayyaz, Jeffrey Wuckoff, Y. L. Elaine et al.] // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62, – P. 7166–7169.
19. Сравнение различных методов выделения, мечения и трансплантации звездчатых клеток печени крысы / [А. К. Шафигуллина, А. А. Трондин, Г. Р. Бурганова и др.] // *Сборник трудов Института Фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* – 2013. – Т. VIII, № 3. – С. 147–151.
20. Технології виділення клітин строми кісткового мозку людини, розмноження *in vitro* та індукції в нервові клітини та остеобласти: Метод. рек. / [О. А. Щегельська, Ю. Ю. Микулинський, О. А. Омельченко та ін.]. – Харків, 2004. – С. 7–10.
21. Barde I. Production and titration of lentiviral vectors, in *Current protocols in neuroscience* / I. Barde, P. Salmon, D. Trono // *Current Protocols.* – 2010. – Chapter 4. – Unit 4.21. doi: 10.1002/0471142301.ns0421s53.

## References

1. Kozub MM, Olkhovska VM. Auxiliary reproductive techniques in women with infertility following surgery for tubal pregnancy. *Int medical J.* 2015;4:42–6.
2. Lytvynets YeA, Balabanyk VR. Value sexually transmitted infections in development and complications of acute epididymitis. *Male health.* 2012;1:8–10.
3. Mulligan T, Frick MF, Zuraw QC, et al. Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study. *Int J Clin Pract.* 2006;60(7):762–9.
4. Feldman HA, Longcope C, Derby CA. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(2):589–98.
5. Kirilyuk M. Late-onset androgen deficiency syndrome in males. *Modern approaches to diagnosis and treatment. Clinical endocrinology and endocrinology surgery.* 2013;3(44):61–8.
6. Okhobotov DA. Vlianiye kul'tur, obogashchennykh stvolovymi kletkami, na spermatogenez pri eksperimental'nom dvukhstoronnem kriptorkhizme [avtoreferat]. M., 2008. 36 s.
7. Miroshnikov YaO. Umbilical blood transplantation in treatment of spermatogenesis disorders at male sterility. *Med psychology.* 2010;4:91–3.
8. Antonyan IM. Izucheniye fermentov perekisnogo okisleniya lipidov v eksperimente po podboru effektivnoy dozy khlorida kadmiya dlya sozdaniya modeli muzhskogo besplodiya u samtsov kryss. *Problemi suchasnoy nauki ta osvity.* 2009;4:66–9.
9. Antonyan IM. Opredeleniye effektivnoy kontsentratsii kadmiya khlorida dlya sozdaniya modeli neobratimogo besplodiya u samtsov kryss. *Problemi suchasnoy nauki ta osvity.* 2010;1:48–50.
10. Antonyan IM. Vpliv ruznikh doz CdCl<sub>2</sub> na masu statevikh organiv shchuriv pri stvorenni modeli vtornogo androgenogo defitsitu. *Yeksperimental'na ta klinichna fiziologiya ta biokhimiya.* 2013;1:13–20.
11. Antonyan IM. Vznacheniya yefektivnoy kil'kosti stoburovikh klitin ta metodu vvodennya dlya korektsii gormonal'noy disfunktsii v yeksperimenti na samtsyakh shchuriv. *Problemi suchasnoy nauki ta osvity.* 2010;4:74–76.
12. Meleshina AV, Cherkasova EI, Shirmanova MV, i dr. Sovremennyye metody vizualizatsii stvolovykh kletok in vivo (obzor). *STM.* 2015;7(4):174–88.
13. Fellous TG, Islam S, Tadrous PJ, Elia G, Kocher HM, Bhattacharya S, Mears L, Turnbull DM, et al. Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology.* 2009;49:1655–63.
14. Meirelles Lda S, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(9):2287–99.
15. Skuratov AG, Lyzikov AN, Petrenov DR. Metodiki trekinga transplantirovannykh mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok v organizme retsipyenta. *Problemy zdorov'ya i ekologii.* 2014;4(42):84–9.
16. Stepanenko OV, Verkhusha VV, Kuznetsova IM, et. Al. Fluorescent proteins: physical-chemical properties and application in cell biology. *Cytology.* 2007;49(5):395–420.
17. Meleshina AV, Cherkasova EI, Shirmanova MV, i dr. Sovremennyye metody vizualizatsii stvolovykh kletok in vivo (obzor). *STM.* 2015;7(4):174–88.
18. Fayyaz Ahmed, Jeffrey Wyckoff, Elaine YL, et al. GFP expression in the mammary gland for imaging of mammary tumor cells in transgenic mice. *Cancer Res.* 2002;62:7166–9.
19. Shafigullina AK, Trondin AA, Burganova GR, i dr. Sravneniye razlichnykh metodov vydeleniya, mecheniya i transplantatsii zvozdchatykh kletok pecheni krysy. *Sbornik trudov Instituta Fundamental'noy meditsiny i biologii Kazanskogo (Privolzhskogo) federal'nogo universiteta. Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya.* 2013;VIII(3):147–51.
20. Shchegel'ska OA, Mikulins'kiy YuYu, Omel'chenko OA, ta in. Tekhnologii vidilennya klitin stromi kistkovogo mozku lyudini, rozmnozhenniya in vitro ta induktsii v nervovi klitini ta osteoblasti: Metod. rek. Kharkiv, 2004. c 7–10.
21. Barde I, Salmon P, Trono D. Production and titration of lentiviral vectors, in *Current protocols in neuroscience. Current Protocols.* 2010. Chapter 4:Unit 4.21. doi: 10.1002/0471142301.ns0421s53.

УДК 616.697-092.9-02:546.48'131

**ЗМІНИ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСУ ТВАРИН В УМОВАХ АНДРОГЕННОГО ДЕФІЦИТУ ПІД ВПЛИВОМ СІНГЕННОЇ КУЛЬТУРИ СТОББУРОВИХ КЛІТИН. ТРЕКІНГ ТА ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ ІМІДЖІНГ КЛІТИН EX VIVO/IN VIVO**

**Антонян І. М., Омельченко О. А., Забірник А. С.**

**Резюме.** Чоловічий віковий гіпогонадизм – поширена причина безплідних шлюбів (зниження рівня тестостерону). Лікування проводиться шляхом гормонзамісної терапії, яка має ряд обмежень. Метою дослідження була перевірка альтернативного методу з використанням клітин стромі кісткового мозку (КСКМ). Від час експерименту доведено, що метод призводить до незворотних позитивних змін гормо-



нального статусу у піддослідних тварин на тлі модельної патології. Трекінг КСКМ показав, що після введення вони спрямовуються в міжканальцевий простір тестикул і рівномірно розподіляються в зазначеному просторі, зберігаючи свою життєздатність до 28 днів.

**Ключові слова:** віковий гіпогонадізм; тестостерон; трекінг; клітини строми кісткового мозку.

UDC 616.697-092.9-02:546.48'131

**ANIMAL HORMONAL STATUS CHANGES IN ANDROGEN DEFICIENCY (AD) SETTINGS UNDER INFLUENCE OF STEM CELLS SYNGENEIC CULTURE. CELLULAR TRACKING AND FLUORESCENCE IMAGING EX VIVO/IN VIVO**

**Antonyan I. M., Omelchenko O. A., Zabirnik A. S.**

**Abstract.** The age-related male hypogonadism is one of the most common causes of infertile marriage in Ukraine. The pathogenesis of this condition is bound to decrease of the level of testosterone (T), the main masculine hormone. The peak levels of T observed in males 25–30 years of age. According to MMAS data the general T concentration declines by 0,8% per year starting from 30–35 years of age, while biologically accessible T level decreases at the rate of 2–3 % annually.

As such, it would be logical to consider that treatment is the restoration of required hormone level. Traditionally the correction is achieved by hormone replacement therapy (HRT). However, any kind of replacement pharmacotherapy also assumes the number of limitations, and potential for adverse events development. Additionally, there is an inconvenience of permanent medications intake.

The T-therapy demands the strict adherence to certain conditions and precautions. The above stated clearly indicates the necessity of search for alternative ways of AD correction. The most popular method is an application of bone marrow stromal cells (BMSC), since they can be harvested from adult individual for further auto-transplantation.

Our experimental work describes the local transplantation of syngenic cells in rats. We conducted a number of experiments on rats reproducing at first the AD model by administration of CdCl<sub>2</sub>, which was permanent and irreversible without therapy.

We assessed the hormonal status in animals within the experiment, as well as conducted the tracking of involved BMSC marked with green fluorescent protein (GFP). 28 days upon single injection of toxin in the dose of 150 mg/kg of weight the following changes in animals' hormonal status were observed: the rate of T-level decline decreased; the FSH, LH and GnRH levels increased; the improvement of free androgen index (FAI).

The bilateral intratesticular injection of 200 000 cells resulted in the most positive outcome: the T-level increased by 55.1% comparing to experimental model of disease; the FSH level decreased by 37.5%, the LH level decreased by 18.3% and the GnRH level decreased by 37,4%; FAI increased by 97.2%.

The comparing of the results obtained with those in the intact group revealed the following: T-level was slightly lower by 3.4% than in the intact group; the FSH level was 2.5% lower than in the intact group; the LH levels were equal for both groups; the GnRH level was 10.8% lower than in the intact group; FAI was 13.6% higher than in the intact group.

The study of tracking of GFP-marked BMSC both *ex vivo* and *in vivo* revealed that cells spread equally along their intratesticular inoculation. The assessment was done immediately after BMSC injection *ex vivo*, and on Day 1 and Day 28 of the experiment in order to confirm cells presence in the testicles of animals under experiment.

The conducted experiments prove that bilateral intratesticular BMSC injection in the dose of 200 000 per each testicle results in the most positive outcome in correction of experimental Age-related Androgen Deficiency model.

We created the cell bank of BMSC with GFP expression which can be used for the research of tracking of cells in testicles. Our cell culture can be utilized in applied methods of fluorescence imaging at the time of transplantation. Also, it was demonstrated that after injection *in vivo* the cells migrate into intercanalicular space of the testicles and spread in there equally maintaining the vitality for up to 28 days.

**Keywords:** age-related male hypogonadism; testosterone; trekking; bone marrow stromal cells.

Стаття надійшла 30.03.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування