

МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

© Кушнарева Е. А.

УДК 611. 631. 3/. 44:616. 681-007. 41]-003. 93-02 -089. 882-092. 9

Кушнарева Е. А.

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯ СЕМЕННИКА

ГУ «Днепропетровская медицинская академия» МОЗ Украины

(г. Днепропетровск)

Данная работа является фрагментом научной темы кафедры урологии, оперативной хирургии и топографической анатомии Днепропетровской медицинской академии «Морфофункціональні особливості судинного русла та регенераційні можливості внутрішніх органів після органозберігаючих оперативних втручань малоінвазивними методами», № гос. регистрации 0111U008101.

Вступление. На сегодняшний день актуальной остается проблема снижения рождаемости населения, что связано с большим количеством бесплодных браков. Причиной этого часто является снижение андрогенной функции у мужчин. [3, 10, 17]. Проблема восполнения гормонального дефицита остается до конца нерешенной. Гормональная терапия, проводимая при андрогенной недостаточности, зачастую оказывается неэффективной [3, 7, 8, 9, 12, 21, 23]. В последние годы для восполнения андрогенного дефицита помимо гормонального лечения применяются методы трансплантации мужской половой железы или трансплантации ее культур клеток и тканей [2, 4, 5, 7, 8, 9, 17]. Также в литературе описаны методы свободной трансплантации семенника, взятого у неполовозрелого донора [6, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 22].

Целью данного исследования явилось изучение способа ксенотрансплантации неполовозрелого семенника.

Объект и методы исследования. Для исследования послужили донорские яички (семенники) 15 нелинейных белых мышей самцов массой 12 ± 2 г ($M \pm m$) в возрасте 5-7 суток, трансплантированные в семенники реципиентов. Реципиентами послужили 30 взрослых белых крыс-самцов линии Wistar. Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страссбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», утвержденных Первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

Трансплантант помещался под белочную оболочку семенника реципиента согласно методике [16]. Всех животных после трансплантации выводили из эксперимента на 10, 30, и 60 сутки наблюдения. Контролем послужили семенники 5 взрослых нелинейных белых мышей самцов. Производилось

окрашивание гематоксилин-эозином, толуидиновым синим; свежемороженные срезы окрашивались суданом III и ставилась реакция на щелочную фосфатазу. В основу морфометрического анализа положены системные подходы в изучении паренхиматозных органов [1]. Полученные данные подвергали статистической обработке.

Результаты исследований и их обсуждение.

Эффективность проведенной трансплантации семенника наблюдалась в 23 случаях из 30 операций. Отсутствие эффекта отмечалось в 7 случаях: животные погибли. При вскрытии у всех погибших животных была выявлена некроз трансплантатов и гнойная деструкция тимуса и щитовидной железы.

На 10 сутки наблюдения извитые семенные канальцы и кровеносные сосуды сохранялись в периферических отделах трансплантата. В интерстициальной ткани наблюдались как дифференцированные зрелые клетки Лейдига, так и малодифференцированные (фетальные) эндокриноциты. Дифференцированные клетки были крупными, овальной или округлой формы; ядра данных клеток располагались в центре и содержали большое количество хроматина. В среднем наблюдалось $5,80 \pm 0,60$ эндокриноцитов в поле зрения (в контроле $8,10 \pm 0,40$) ($p < 0,05$), из них малодифференцированные эндокриноциты составляли до 26 % от общего количества. Средний объем ядер составлял $52,2 \pm 1,8$ мкм³ (в контроле $76,30 \pm 5,26$) ($p < 0,05$). Митозы эндокриноцитов наблюдались редко. Центральная часть трансплантированного семенника характеризовалась запустением, отсутствием сосудов и извитых семенных канальцев. В интерстициальной ткани наблюдалось большое количество молодых фибробластов. При дальнейшем развитии трансплантированного семенника происходила последовательная смена двух морфологических типов клеток Лейдига: фетальные эндокриноциты по мере дифференцировки заменялись зрелыми клетками Лейдига с высокой секреторной активностью.

На 30-60 сутки наблюдения основная популяция клеток Лейдига была представлена высокодифференцированными зрелыми (дефинитивными) клетками. В среднем наблюдалось $7,90 \pm 0,60$ эндокриноцитов в поле зрения (в контроле $8,10 \pm 0,40$) ($p < 0,05$). Средний объем ядер составлял $75,20 \pm 5,28$ мкм³ (в контроле $76,30 \pm 5,26$) ($p < 0,05$). Интерстициальная

ткань семенника характеризувалась двома типами розположення ендокриноцитів: груповий (кластерний) і одиночний. Груповий варіант розположення наближався вблизи кровеносних судів інтерстиція (перивазально), одиночні ендокриноцити зустрічалися вблизи оболонки деяких извитих семенних каналців (перитубулярно). Цитоплазма кліток Лейдига була світлою, з багачисленними вакуолями, що указувало на их гормонпродуцируючу функцію. Реакція відторження трансплантанта відсутствовала.

Висновки. Данні цього дослідження дозволяють зробити висновки об ефективності

способа ортотопічної ксенотрансплантації неполовозрілого семенника. для восполнення андрогенного дефіцита.

Перспективи дальніших досліджень. Ми вважаємо, що даний спосіб може бути применен для лічення хворих гіпогонадізмом. Використання банку криоконсервованих ксенотрансплантантів семенників, як донорського матеріала, допоможе вирішити проблему дефіцита донорських органів і свести к минимуму технічні і юридичні труднощі, виникаючі при використанні в якості донорського органу яєчка людини.

Література

1. Автандилов Г. Г. Медичинська морфометрія: Руководство / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Артюхин А. А. Спосіб лічення хворих з порушенням чоловічої статевих функцій методом трансплантації / Артюхин А. А., Зарайський Е. І., Романов А. І. // Патент РФ RU (11) 2200012 (13) C1 2003. 03. 10.
3. Бондаренко В. О. Гіпоандрогенемія та чоловіча неплідність / В. О. Бондаренко, О. М. Демченко, Т. Ю. Бурма, Є. І. Скорняков // Сексологія і андрологія / Під ред. Проф. І. І. Горпинченко. – К.: Ін-т урології і нефрології АМН України, 2000. – Вип. 5 – С. 112 – 114.
4. Бондаренко Т. П. Корекція гормонального статусу у кастриованих і з експериментальним гіпогонадізмом крыс путем алло- і ксенотрансплантації органотипічних культур / Т. П. Бондаренко, Салех Абу-Жаяб, Г. А. Божок, Н. М. Алабедалькарим, Е. І. Легач. // Проблеми екології та медицини – 2003 – Т. 7, №1–2. – С. 3–7.
5. Грищенко В. І. Кріобіологія і проблема безпліддя / В. І. Грищенко, Ю. С. Парашук, Ф. В. Дахно, Г. Г. Юрченко. – Київ, 1990. – 136 с.
6. Карпунин В. Т. Експериментальна імплантація яєчка / В. Т. Карпунин // Вопр. урології. – Запорожжє, 1964. – С. 57–60.
7. Кирпатовський І. Д. Хірургічна корекція ендокринної імпотенції / І. Д. Кирпатовський, Д. Л. Горбатюк // Анатомо-експериментальні аспекти. – М.: Університет дружби народів, 1986. – 170 с.
8. Кирпатовський І. Д. Розробка методики субкапсулярної інтрастатистулярної пересадки гіпофіза / І. Д. Кирпатовський, Е. С. Дендєберов // Проблеми репродукції. – 2000. – №5. – С. 75–77.
9. Кирпатовський І. Д. Підтримання гормонального гомеостазу комбінованої і ізолированої аллотрансплантацією, или можливість комбінованих ендокринних пересадок по принципу «три в одному» / І. Д. Кирпатовський // Тез. докл. Другого Російського конгр. по патофізіології «Патофізіологія органів і систем. Типові патологічні процеси». – М., 2000. – С. 317–318.
10. Возіанов О. Ф. Клінічна сексологія і андрологія / За ред. О. Ф. Возіанова, І. І. Горпинченко. – К.: Здоров'я, 1996. – 536 с.
11. Кушнарєв А. А. Ксенотрансплантація яєчка / А. А. Кушнарєв // Проблеми кріобіології. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 346–348.
12. Лучицький В. Є. Андрогенодефіцитний стан у чоловіків, хворих на цукровий діабет 2 типу / В. Є. Лучицький // Ендокринологія. – 2012. – №2. – С. 28–36.
13. Нехвядович В. З. Сравнительная оценка результатов гомотрансплантації яєчків / В. З. Нехвядович // Трансплантація органів і тканин. – Горький, 1970. – С. 176–177.
14. Петросьян Ж. Л. Морфофункціональний аналіз аллотрансплантованих семенників собак і крыс різного візра: автореф. дисс. на соискание ученої ступені канд. мед. наук: спец. 03. 00. 11 «Ембріологія і гистологія» / Ж. Л. Петросьян. – М.: Ін-т морфології людини АМН СССР, 1978. – 21 с.
15. Райцина С. С. Значення вікових змін і змін, виникаючих під впливом синестрола в семеннику крыс, для його приживлення при гомотрансплантації / С. С. Райцина, І. С. Казакова // Матеріали докл. 3-й Всесоюз. Конф. По пересадке тканин і органів. Єреван, 1963. – С. 428–430.
16. Топка Е. Г. Спосіб трансплантації яєчка / Е. Г. Топка, О. А. Кушнарєв // Пат. 56412 А України, МПК А61В17/00 №2002032248; Заявл. 21. 03. 2002; опубл. 15. 05. 2003. Бюл. №5. 2 с.
17. Турчин І. С. Трансплантація культур клітин і тканин сім'яників при гіпогонадізмі / І. С. Турчин, М. Д. Тронько, І. В. Комісаренко [та ін.]. – Київ: «Медкол» МНІЦ БІО-ЕКОС, 1999. – 25 с.
18. Bressler R. Differentiaion of peritubular myoid cells of the testis. Effects of intratesticular implantation of newborn mouse testis into normal and hypophisecto-mized adults / R. Bressler, M. H. Ross // Biol. Reprod. -1972. – Vol. 6, № 1. – P. 148–159.
19. Brooks J. R. Endocrinology / Brooks J. R., Hill G. H., deScoville A., Priario J. C., Crocker D., Selenkow H. A. // – 1960. -Vol. 66 -P. 392.
20. Buck A. C. Differentiation of first- and second set grafts of neonatal testis, ovary, intestine and spleen implanted beneath the kidney capsule of adult albino rat hosts / A. C. Buck // Amer. J. Anat. – 1963. – Vol. 113, №2. – P. 189–213.
21. Kitahara S. Secondary treatment failure without anti-human choriogonic gonadotropin antibody in patient with Kallmann syndrome / S. Kitahara, K. Yoshida, K. Ishizaka [et al.] // Int. J. Urol. – 1998. – №5, Vol. 4. – P. 398–400.
22. Larkin J. H. Differentiation of first and second-set grafts of embryonic, neonatal and adult testis implanted beneath the kidney-capsule of adult rat hosts / J. H. Larkin // Amer. J. Anat. – 1960. – Vol. 106. – P. 73–82.
23. Parker S. Experience with transdermal testosterone replacement therapy for hypogonadal men / S. Parker, M. Armitage // Clin. Endocrinol. Oxf. – 1999. -№1. – P. 57.

УДК 611. 631. 3/. 44:616. 681-007. 41]-003. 93-02 -089. 882-092. 9

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЯ СЕМЕННИКА

Кушнарева Е. А.

Резюме. Целью данного исследования явилось изучение способа ксенотрансплантации неполовозрелого семенника.

При свободной ортотопической ксенотрансплантации неполовозрелого семенника наблюдалось приживление трансплантата с полной дифференцировкой клеток Лейдига, что указывало на их гормонопродуцирующую функцию. Реакция отторжения трансплантата отсутствовала. Данные настоящего исследования позволяют сделать выводы об эффективности способа ортотопической ксенотрансплантации неполовозрелого семенника для восполнения андрогенного дефицита.

Ключевые слова: ксенотрансплантация, семенник, клетки Лейдига.

УДК 611. 631. 3/. 44:616. 681-007. 41]-003. 93-02 -089. 882-092. 9

КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЯ СІМ'ЯНИКА

Кушнарьова К. А.

Резюме. Метою даного дослідження було вивчення способу ксенотрансплантації статевонезрілого сім'яника.

При вільній ортотопічній ксенотрансплантації статевонезрілого сім'яника спостерігалось приживлення трансплантата з повним диференціюванням клітин Лейдига, що вказувало на їх гормонопродуцируючу функцію. Реакція відторгнення трансплантата була відсутня. Дані цього дослідження дозволяють зробити висновки про ефективність способу ортотопічної ксенотрансплантації статевонезрілого сім'яника для заповнення андрогенного дефіциту.

Ключові слова: ксенотрансплантация, сім'яник, клітини Лейдига.

UDC 611. 631. 3/. 44:616. 681-007. 41]-003. 93-02 -089. 882-092. 9

Xenotransplantation of testes

Kushnaryova E. A.

Abstract. The aim of study was to investigate a method of free orthotopic xenotransplantation immature testis. The object of the study were donated testicles (testes) 15 nonlinear white male mice weighing aged 5-7 days, transplanted into the testes of recipients. Recipients have served 30 adult albino male Wistar rat. All animals were obtained from a transplant experiment 10, 30, and 60 day observation. Served as control testes 5 nonlinear white adult male mice. Staining was performed with hematoxylin-eosin, toluidine blue; frozen sections were stained with Sudan III and posed reaction for alkaline phosphatase. The basis of morphometric analysis is based on a systemic approach to the study of parenchymal organs. The data obtained were subjected to statistical processing.

Effectiveness of transplantation of the testis was observed in 23 cases out of 30 operations. Transplant rejection reaction was absent. This is due to the fact that in the convoluted seminiferous tubules of immature testis no spermatocytes of the first order and differentiated germ cells are antigens for their own body, and for the recipient's body and causing subsequent rejection reaction trasplantanta. Performing in orthotopic transplantation of the testis position includes maintaining optimal temperaturutry and vascularization of the transplanted organ. As a result, achieved the preservation of the blood- testicular barrier graft and its subsequent protection from the immune cells of the recipient.

No effect was observed in 7 cases: animals died. At autopsy all the dead animals was revealed necrosis transplants and purulent destruction of the thymus and thyroid.

On the 10th day of observation convoluted tubules and blood vessels remained in the peripheral regions of the graft. In the interstitial tissue were observed as differentiated mature Leydig cells and poorly differentiated (fetal) endocrinocytes. Differentiated cells were large, oval or round shape; nucleus of these cells were located in the center and contained a large amount of chromatin. Endocrine mitosis were rarely seen. The central part of the transplanted testis was characterized by desolation, absence of vessels and convoluted seminiferous tubules. In the interstitial tissue was observed a large number of young fibroblasts.

With the further development of the transplanted testis occurred a succession of two morphological types of Leydig cells: fetal endocrinocytes as differentiation replaced mature Leydig cells with high secretory activity.

On the 30-60 day of observing the main population of Leydig cells was presented highly differentiated mature (definitive) cells. Interstitial tissue of the testis was characterized by two types of endocrine location: group (cluster) and single. Group option was observed near the location of the blood vessels of the interstitium (perivazal), single endocrinocytes met near the shell of some convoluted seminiferous tubules (peritubular). Leydig cell cytoplasm was light, with numerous vacuoles, indicating that their hormone producing function. Transplant rejection reaction was absent.

The data of this study allow us to make conclusions about the effectiveness of the method orthotopic free xenotransplantation immature testis. to compensate for androgen deficiency. We believe that this method may be used to treat patients with hypogonadism. Using a bank of cryopreserved testis xenotransplantant material, will help solve the problem of shortage of donor organs and to minimize technical and legal difficulties when used as a human testis donor organ.

Key words: xenotransplantation, testis, Leydig cells.

Рецензент – проф. Саричев Л. П.

Стаття надійшла 4. 04. 2014 р.