

УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН АМН УКРАЇНИ

На правах рукопису

ПОТІХА Ольга Петрівна

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА
КЛІТИННИХ ТА ОРГАННИХ КУЛЬТУР
СІМ'ЯНИКІВ
ТА ОБГРУНТУВАННЯ ЇХ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГІПОГОНАДИЗМІ**

14.00.03—ендокринологія

14.00.23—гістологія, цитологія, ембріологія

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ—1993

011.018
611.013
576 3
577.3

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00810713 (K)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Українському науково-дослідному інституті ендокринології та обміну речовин АМН України.

Наукові керівники:

доктор медичних наук, професор, член-кореспондент АН та АМН України **Тронько Микола Дмитрович**;

доктор медичних наук **Турчин Іван Семенович**.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук **Варга Степан Васильович**;

доктор медичних наук, професор **Гордієнко Вадим Максимович**.

Провідна установа — Український науково-дослідний інститут фармакотерапії ендокринних захворювань МОЗ України.

Захист відбудеться « 9 » *ноябр.* 1993 р. о . . . год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради по ендокринології Д 008.14 при Українському науково-дослідному інституті ендокринології та обміну речовин АМН України (254114, Київ, вулиця Вишгородська, 69).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Українського науково-дослідного інституту ендокринології та обміну речовин.

Автореферат розісланий *9 октябр.* 1993 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат медичних наук

Шостак-Пасічник І. М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. За даними наукових досліджень у 40-45 % випадків причиню безплідних шлюбів є порушення андрогенної функції /Михайличенко, 1983; Пешперел, 1986/. Істотне значення у виникненні патології статевих залоз відіграють психомоторні перевантаження, профпатологія, екологічно несприятливі фактори зовнішнього середовища, серед яких іонізуюче опромінення.

Для лікування захворювань, пов'язаних із недостатністю функцій статевих залоз останнім часом щораз більшого застосування набувають методи трансплантації. Однак, необхідність пошуку донорів, проблема імунологічної сумісності, складність хірургічної техніки зумовили особливий інтерес до використання як трансплантантів культур клітин. Вільне пересадження культури клітин і тканин є досить простов маніпуляцією, що не потребує складного оперативного втручання, трансплантаційний матеріал вводитьися за допомогою звичайної голки внутрішньом'язево або підшкірно в жирову клітковину.

До несих досліджень проблема використання органічних культур сім'яників у клінічній практиці не опрацьовувалась, а в літературі нема жодних відомостей про культивування клітин сім'яників новонароджених поросят.

Мета дослідження. Розробити оптимальні умови культивування клітин і тканин сім'яників новонароджених поросят, вивчити основні властивості цих культур і оцінити можливість їх ксенотрансплантації за умов експериментального гіпогонадизму.

Наукова новизна результатів дослідження. Розроблено нові методи одержання клітинних та органічних культур сім'яників новонароджених поросят, що мають високу життєздатність, специфічну структуру й певну гормональну активність /метод захищено автор-

ським свідощтвом/. Уперше здійснено ауто- та ксенотрансплантації цих культур кастрованим щурам, а також щурам із експериментальним гіпогонадізмом, не застосовуючи імунодепресанти. Одержано оригінальні дані, які свідчать про можливість підвищувати функціональну активність культур сім'яників за умов застосування гормональних препаратів /хоріонічний гонадотропін людини/ і деяких хімічних речовин /натрій оксибутират, метилурацил/.

Практична значущість роботи. Одержані результати показали можливість лікування деяких форм гіпогонадізму за допомогою ксенотрансплантації культур клітин і тканин сім'яників новонароджених поросят. Крім цього, органні та клітинні культури можна використовувати як модель у фундаментальних дослідженнях.

Основні положення, які виносяться на захист:

1. Опрацьовано метод виділення та культивування клітинних і органних культур сім'яників новонароджених поросят. Бивчено їх біологічні властивості. Морфологічно в культурах ідентифіковані клітини Лейдіга, Сертолі та статеві клітини.
2. Клітинні й органні культури сім'яників новонароджених поросят продукують тестостерон протягом тривалого періоду спостереження - до одного місяця. Хоріонічний гонадотропін /ХГ/ і натрій оксибутират стимулюють продукування андрогенів. Культури гормонально найактивніші на 5-8 добу культивування, на що необхідно зважати, використовуючи їх у клінічній практиці.
3. Аутогнсплантація культивованих тканин сім'яників збільшує концентрацію тестостерону в крові кастрованих щурів до нормальних величин, тимчасом як некультивовані тканини не мають подібного ефекту.
4. Ксенотрансплантація органної культури сім'яників новонароджених поросят щурам із кадмієвим гіпогонадізмом здатна компенсу-

вати андрогенну недостатність.

5. Отримані клітинні й органні культури сім'яків новонароджених поросят можна рекомендувати для корекції андрогенних порушень.

Запровадження в практику. Спосіб лікування деяких форм гіпогонадизму за допомогою трансплантації клітинних та органних культур сім'яників новонароджених поросят запроваджено в клінічну практику в Українському НДІ ендокринології та обміну речовин АМН України /акти додаються/.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на ІV з'їзді ендокринологів України /м.Львів, 1987/ і на Українській конференції "Актуальні проблеми сексології та андрології" /м.Донецьк, 1992/.

Структура та обсяг роботи. Дисертація викладена на 130 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури, 4 розділів експериментальних досліджень, обговорення, висновків та списку літератури, який включає 115 джерел вітчизняних та зарубіжних авторів. Робота проілюстрована 3 таблицями та 40 малюнками.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Відповідно до завдань роботи, основні дослідження проведено на клітинних та органних культурах сім'яників новонароджених поросят.

Для одержання клітинної культури подрібнену тканину сім'яника попередньо обробляли 0,25 % розчином трипсину при температурі 25-28° С на магнітній мішалці. Потім роз'єднані клітини відокремляли розчином Хенкса і вирощували на шматочках сляди телу "Мусканг" в пробірках з живильним середовищем 199 і інактивованов сироваткою везелкої рогачої худоби у відношенні 1 : 5 при температурі 32° С.

Для цитологічних та гістохімічних досліджень клітинні культури через кожні 24 години з моменту посіву і до кінця експерименту /30 діб/ фіксували 96° етиловим спиртом. Препарати забарвлювали гематоксиліном Майєра з дофарбуванням цитоплазми еозином. Проводили оцінку мітотичної активності культур. Загальні ліпіди виявляли з допомогою судану чорного за методом Беккера. Активність ферменту 3 β -ол-стероїддегідрогенази визначали за методом Суріної /1967/.

Органну культуру одержували культивуючи фрагменти тканини у розмірі 1 мм³ у живильному середовищі зазначеного вище складу і в тому ж температурному режимі. З метою збільшити термін активного функціонування клітин у живильне середовище на третю добу культивування вносили натрію оксидобутират /натрієва сіль гамма-оксимасляної кислоти/ або метилурацил-пиримідиноє похідне у вигляді 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 % розчинів. Проводили також одночасне додавання цих препаратів, але у мінімальній концентрації - 0,001 % розчину.

Для гістологічного і електронно-мікроскопічного дослідження матеріал на 5, 10 і 15 доби культивування фіксували в ізосмотичних розчинах параформу і глутаральдегіду /рН 7,4/, обробляли осмієвим фіксатором, обезводнювали в етанолах і поміщали в епон-812. Напівтонкі зрізи забарвлювали 1 % розчином толуїдинового синього і бури. Ультратонкі зрізи виготовляли на ультратомі ІКБ-880, контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю, а потім вивчали під електронним мікроскопом JEM-100С.

Стероїди, які органна культура виділяє в живильне середовище, визначали методом тонкошарової хроматографії, використовуючи системи розчинників гексан-етилацетат /70:30/ і хлороформ-ацетат /90:1/. Стероїди ідентифікували за виключенням ³H-холестерину /0,08 мБк/мл/.

Вивчали вплив різних доз ХГ /0,025; 0,1; 0,25; 1,0; 1,5 і 3,0 од/мл/ на андрогенну функцію клітинної та органної культури сім'яників новонароджених поросят в динаміці росту. Вміст тестостерону в живильному середовищі визначали радіоімунологічним методом за допомогою набору Стерон¹²⁵I.

Дослідження по вивченню ауто- і ксенотрансплантації проведені на 200 щурах-самцях лінії Вістар. Частині тварин робили кастрації під ефірним наркозом. Фрагменти видалених сім'яників і їх 5-добова органна культура використовувались як трансплантаційний матеріал. У іншій групі щурів викликали гіпогонадизм введенням кавдію хлориду /0,55 мг на 100 г маси тіла/, а потім після його розвитку проводили ксенотрансплантації 5-добової органної культури сім'яників новонароджених поросят. В усіх експериментальних тварин оцінювали зміну андрогенної функції за вмістом тестостерону в сироватці крові в динаміці до 3- місяців після трансплантації.

Статистичну обробку одержаного цифрового матеріалу проводили за допомогою комп'ютера.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Цитологічний аналіз клітинної культури сім'яників новонароджених поросят

Вивчення клітинної культури сім'яників новонароджених поросят проводили в динаміці її росту протягом 30 діб. За допомогою цитологічних і гістохімічних методів дослідження визначена тканинна належність різних типів клітин. Слід зазначити, що вже в першу добу культура виявляє здатність прикріплюватись до скла й слядинок, а мікроскопічно проглядаються окремі клітини і материнські конгімерати. Через 24 години серед типових фібробластів виділяються різні типи клітин. Це епітеліальні клітини округлої або

полігональної форми зі світлими або яедь гіперхромними ядрами, які містять у собі різну кількість ядерць, і клітини Лейдига, що мають характерну полігональну форму зі світлими ядрами. В цитоплазмі останніх визначається 3 β -ол-стероїддегідрогеназа. При морфологічному аналізі 48-годинної культури виявлено, що кількість клітин збільшилась за рахунок розмноження ізольованих клітинних елементів та за рахунок міграції і розмноження з "материнських" клітинних конгломератів. На 3-4 добу від моменту посіву спостерігалось чітке диференціювання різних типів клітин. Через 5-6 діб росту створюється судільний шар клітин і культура набуває мозаїчного вигляду, властивого сім'яникам не тільки новонароджених поросят, а й інших експериментальних тварин. На цьому етапі добре ідентифікуються різні типи клітин. Поміж фібробластиами розташовуються клітини, які за морфологічними ознаками /поліморфізм та ексцентричність розташування ядер, компактність цитоплазми/ були віднесені до статевих клітин - сперматогоніїв. Крім того, визначились вакуолізовані полігональні клітини, що тісно прилягають одна до одної і утворюють епітеліальну мембрану. Їх ядра мають округлу форму з хвилястою каріолемою та кількома ядерцями. Виходячи зі структурних особливостей, вони розглядалися як клітини Сертолі. Зустрічаються також клітини, що перевищують своїми розмірами клітини Сертолі. Ядра їх овальні, з 1-2 ядерцями. Цитоплазма чітко поділяється на ендо- і екзоплазму, вакуолізовану по периферії. В останній виявлено фермент 3 β -ол-стероїддегідрогеназу, що дозволяє віднести їх до клітин Лейдига. У цей період дослідження інтенсивно розмножувались всі типи клітин, але найбільша кількість мітозів зустрічалась у фіброблестах. Виведений вид культура зберігає до 10-12 дня росту, але слід зазначити, що на цей час в усіх типах клітин збільшувалась кількість ліпід-

них крапель. Таким чином, вже помітні деякі ознаки старіння культури.

У пізніші строки, починаючи з 14 діб після посіву, в культурі наростають ознаки дистрофії та деструкції, найбільше виражені у статевих клітинах, що зменшувались у розмірах, заокруглювались і гинули шляхом пікнозу. В їх цитоплазмі збільшувалась кількість ліпідних включень. Зменшувалась кількість клітин Лейдига, які через 18-20 днів були тільки поодинокими і характеризувались низькою активністю 3 α -ол-стероїддегідрогенази. Але клітини Сертолі були численними і також утворювали епітеліальні мембрани, які склалися з двох і більше шарів. Вони становлять найактивніший пул. Фібробласти продовжували інтенсивно розмножуватись і через один місяць вже витіснили інші типи клітин.

На цей час клітини Лейдига в культурі вже не визначаються. Відзначено дегенеративні зміни в клітинах Сертолі, причому вони спершу настають у центральній частині епітеліальних мембран. Зустрічались також епітеліальні клітини нез'ясованої належності. Основна маса ліпідних включень розташовувалась позаклітинно, що вказувало на дегенеративні зміни в різних типах клітин.

Отже, проведені дослідження свідчать про високу функціональну активність 5-8-добової культури. Використання XI людини у різних концентраціях дає змогу дібрати для подальших досліджень найоптимальнішу його дозу, яка викликає максимальну стимуляцію секреції тестостерону клітинами культури. Вона становила 0,1 од/мл середовища /рис. 1/.

Одержані результати свідчать, що клітини культури сім'яників новонароджених порослят здатні секретувати тестостерон і адекватно реагувати на XI протягом місяця. Найвищу концентрацію тестостерону виявлено на 5 добу культивування /рис. 2/.

Враховуючи біохімічні результати, слід сподіватися, що в цих

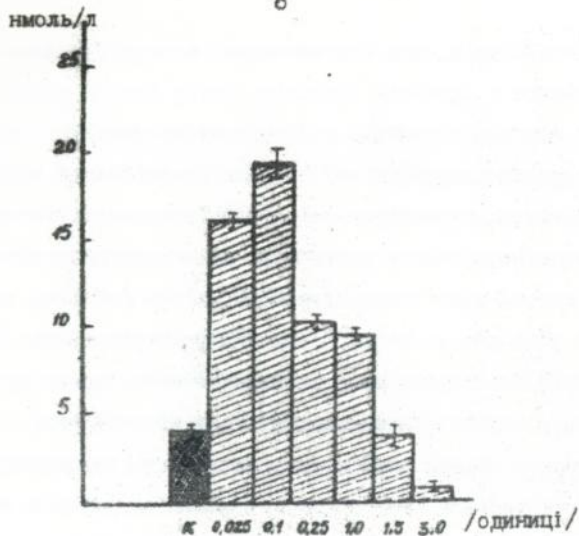


Рис. 1. Вплив різних концентрацій хоріонічного гонадотропіну на продукцію тестостерону /нмоль/л/ у клітинній культурі сім'яників.

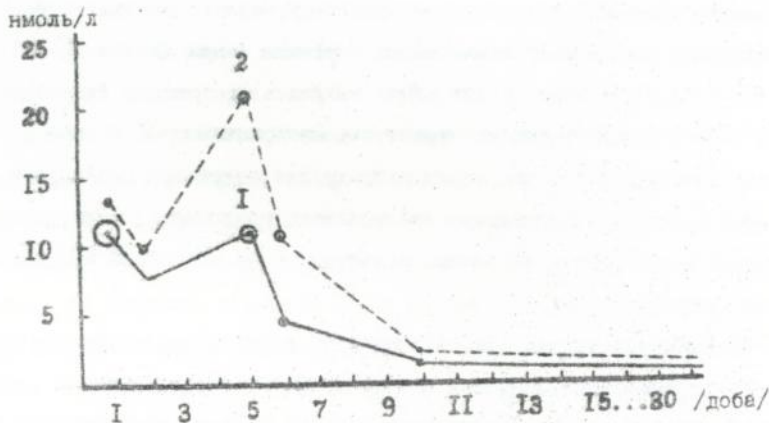


Рис. 2. Вплив хоріонічного гонадотропіну /0,1 од/мл/ на продукцію тестостерону /нмоль/л/ у клітинній культурі сім'яників новонароджених поросят:
 1 - без впливу гонадотропіну;
 2 - в присутності гонадотропіну.

умовах матимуть місце адекватні зміни й у структурі клітин Лейдіга, продуцентів тестостерону.

Справді, гістологічні та гістохімічні дослідження показали, що вже через 2 години після введення ХГ у клітинах Лейдіга, що зберігають полігональну форму, спостерігаються ознаки активізації ядерцевого апарату. Через 6 годин з'явилися поодинокі мітози в сперматогоніях. Виражено підвищувались мітотична активність клітин Лейдіга і вміст у цитоплазмі 3β -ол-стероїддегідрогенази, що свідчить про посилення їх функціональної активності. Через 48 годин кількість мітозів у пулі клітин Лейдіга, порівняно з відповідним контролем, збільшилась в 2-2,5 рази. Слід відзначити, що за цих умов ХГ істотно не впливав на структуру клітин інших типів. На подальших етапах /72, 96 година/ зберігалася зростання кількості клітин Лейдіга. Активність 3β -ол-стероїддегідрогенази залишалася досить високою.

Отже, сдержані біохімічні, гістологічні та гістохімічні дані свідчать про активуючий вплив ХГ людини на процеси синтезу і секреції тестостерону клітинами Лейдіга, особливо на 5 добу культивування, в період утворення суцільного шару клітин, який супроводжується високою мітотичною активністю.

2. Морфофункціональна характеристика органічної культури сім'яників новонароджених поросят у нормі та під впливом хоріонічного гонадотропіну та деяких хімічних чинників

Зважаючи на те, що в клінічній практиці ширше застосовуються органічні культури, вважалось за доцільне з'ясувати оптимальні терміни культивування клітин сім'яників новонароджених поросят, а також розробити способи підвищення функціональної активності їх органічної культури.

Проведені гістологічні й електронномікроскопічні дослідження показали, що в 5-добовій контрольній органічній культурі сім'яни-

канальці представлено стовбуровими і підтримуючими клітинами. Структура клітинного ядра дає змогу диференціювати гермінативний епітелій та елементи строми сім'яника. Серед епітеліальних клітин спостерігаються мітози. Сперматогонії типу А і В розрізняються за характером розподілу хроматину в ядрі та ступенем зернистості цитоплазми. Слід відзначити, що клітини типу В чисельніші. Обов'язковим компонентом їх цитоплазми є щільні осміофільні тільця. Інколи сперматогонії з'єднані одна з одною тонкими цитоплазматичними містками. Серед клітинних елементів сім'яних каналців, як і в нативній залозі, визначаються клітини Сертолі, ультраструктурна організація яких зумовлена їх функціями. Ці клітини з довгастими ядрами, оточеними вузьким обідком цитоплазми. Їх положення на неструктурованій гомогенній базальній мембрані визначає полярність розташування органел. Апікальні відділи цитоплазми дещо розширені, а плазмалема тут трансформована на зразок численних мікроворсинок, внаслідок чого вона набуває бахромчатого рисунку. Клітин Лейдіга у інтерстиції незначна кількість. Їх цитоплазмі характерний добре розвинений гладкий ендоплазматичний ретикулум, який має вигляд трубчатих структур.

Отже, у 5-добовій органій культурі зберігаються всі клітинні елементи, властиві нативному сім'янику.

У 10-денній культурі при збереженні органоархітектоніці базальні шари представлені клітинами Сертолі і сперматогоніями, більш властивими типові А зі світлими ядрами. Серед численних сперматогоній трапляються сперматоцити першого порядку із досить щільними й однорідними ядрами. Вони розташовані переважно у зоні неоформленого просвіту каналця. Але на цей строк дослідження в усіх типах клітинних елементів помічено дистрофічні зміни, які проявляються у зменшенні в цитоплазмі кількості функціонально активних органел і зернистого вмісту. У інтерстиції поряд з пооди-

ножками клітинами Лейдига із зернистою цитоплазмою та набряклим світлим ядром проглядаються окремі елементи стромы і клітинний детрит.

У 15-добовій органій культурі зберігаються тільки поодинокі клітини сім'яних канальців, що мають ознаки досить низької життєздатності. Чітко виражені некробіотичні зміни і фібротизація культури. Таким чином, досліджено, що органія культура є функціонально найактивнішою у той же строк, що й клітинна, тобто на 5 добу культивування.

Як і у випадку з клітинною культурою, нами було вивчено здатність органій культури синтезувати андрогени. Проведені біохімічні дослідження показали, що контрольна органія культура сім'яників новонароджених поросят /3-7 дні культивування/ продукує від 5 до 8 стероїдів /рис.3 /.

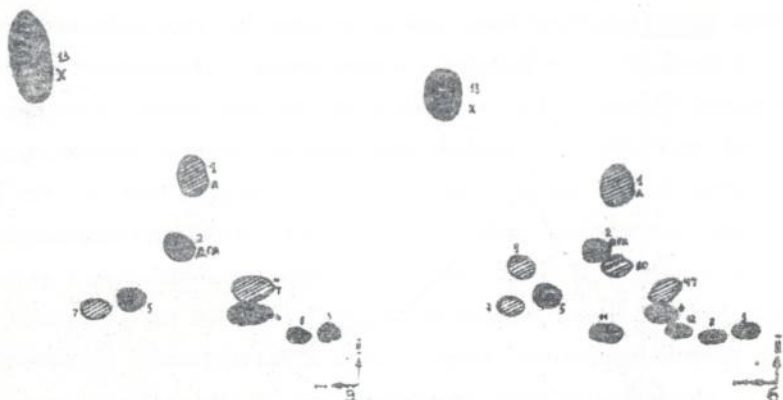


Рис. 3. Схема розташування статевих стероїдів, які продукує органія культура новонароджених поросят на двомірній тонкошаровій хроматограмі:
а - без введення гонадотропіну;
б - в присутності гонадотропіну.

Умовні позначення: I - система гексан-етілацетат;
II - система хлороформ-ацетон.

Штрихові ділянки - поглинання УФ-світла;

Чорні ділянки - позитивна реакція з трихлоридом сурьми;
T - тестостерон; АII - андростендіол; ДІА - дигідроепіандростерон; А - андростендіон; X - холестерин /інші стероїди не ідентифікувалися/.

Внесення ХГ посилювало синтез стероїдів клітинами культури і підвищувало їх вміст у культуральному середовищі /рис. 3 б/. При цьому вклучення мітки збільшувалось у тестостероні на 207 %, андростендіолі - на 92 %, ДГА - на 167 % і андростендіоні - на 16%, порівняно з контролем.

При гістологічному дослідженні 5-добової культури виявлено, що ХГ викликає деяку активізацію і гіпертрофію інтерстиціальної тканини. Клітини Лейдига розташовуються численнішими групами, причому багато з них мають округлі світлі ядра і являють собою активнішу популяцію. Ефект ХГ проявляється також у накопиченні великої кількості сперматоцитів першого порядку, серед яких фіксуються ознаки мейотичної активності. Збільшується кількість клітин Сертолі.

Слід відзначити, що секреція тестостерону організм культури під впливом ХГ перевищувала контрольні величини напротязі досить тривалого часу - до 16 діб спостереження.

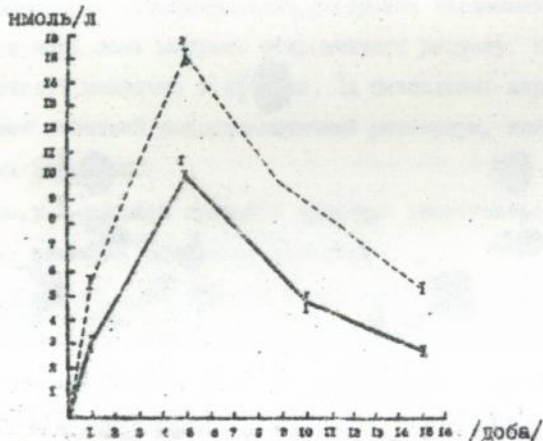


Рис. 4. Вплив хоріонічного гонадотропіну на продукцію тестостерону (нмоль/л) в організмі культури сім'яників:
 1 - без введення гонадотропіну;
 2 - в присутності гонадотропіну.

Отже, одержані результати свідчать про підвищену здатність андрогенної активності органної культури сім'яників новонароджених поросят під впливом ХГ людини.

Крім того, нами були зроблені спроби підвищити функціональну активність органної культури, особливо 5-добової, за допомогою деяких хімічних речовин, зокрема натрію оксibuтирату і метилурацилу. Ці препарати були вибрані на основі даних літератури. Так, натрію оксibuтират завдяки своїм антигіпоксичним властивостям збільшує збереженість β -клітин у культурі підшлункової залози /Галкін, Колесніков, 1962/. Метилурацил є анаболіком і антиоксидантом /Моргунова, 1963/. Показано, що він також стимулює мітотичну активність /Хісамова та ін., 1965; Солуянов, 1966/.

Світлооптичні й електронномікроскопічні дослідження показали, що введення натрію оксibuтирату лише невеликими концентраціями /0,001 та 0,005 % розчини/ забезпечує в 5-добовій органній культурі збереженість клітинного окладу, який проявляє ознаки високої життєздатності і функціональної активності клітин Сертолі й гоноцитів. Значно частіше, як у контролі, зустрічаються сперматоцити першого порядку. Загалом дещо підвищується мітотична активність. Клітини Лейдига мають світлі ядра і дещо гіпертрофований ендоплазматичний ретикулум. У їх цитоплазмі визначаються кристаліди з високовпорядкованою структурою. Через 10 і 15 діб, як і в контролі, всі клітинні елементи проявляють ознаки низької життєздатності. Спостерігається нагромадження клітинного детриту не тільки в інтерстиції, а й у центральних відділах каналців.

Виходячи з морфологічних даних, які свідчать про те, що натрію оксibuтират проявляє свою активуючу дію лише в 5-добовій культурі, ми провели радіоімунологічне визначення тестостерону в культуральному середовищі. Одержані результати свідчать, що додаючи препарат в низьких концентраціях /0,001 та 0,005 %/, продукція

тестостерону зростала вп'ятеро і втрьох відповідно. За умов вищих концентрацій /0,01 та 0,05 %/ секретія гормону не відрізнялась від контрольних величин /Рис. 5/.

нмоль/л

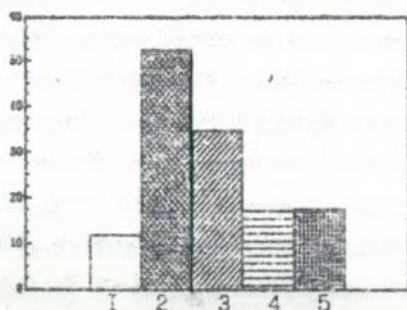


Рис. 5. Вплив натрію оксibuтирату на продукування тестостерону /нмоль/л/ в органій культурі сім'яників новонароджених поросят:

1 - контроль; 2 - 0,001 % розчин;
3 - 0,005 % розчин; 4 - 0,01 % розчин;
5 - 0,05 % розчин

рім того були проведені аналогічні дослідження, в яких вивчався вплив метилурацилу та його одночасної дії з натрію оксibuтиратом. Світлооптичні і електронномікроскопічні дослідження показали, що метилурацил не справляє такого вираженого як натрій оксibuтират впливу на морфофункціональні властивості органних культур і не призупиняє в них процесів дегенерації.

Таким чином, одержані результати свідчать про те, що органна культура сім'яників новонароджених поросят у ранні строки /5 діб/ проявляє найвираженішу специфічну активність, при цьому натрій оксibuтират, як і ХГ лодьня, помітно підвищує її морфофункціональні властивості.

Комплексний гістологічний, радіоімунологічний і біохімічний підхід дав змогу показати, що в органій культурі підвищені се-

кредіі тестостерону клітинами Лейдига, викликане гормональним або хімічним чинниками, супроводжується проліферацією і підвищенням функціональної активності клітин сім'яних каналців, можливість обміну інформацією між останніми та інтерстиціальними клітинами.

3. Особливості перебігу ауто- та ксенотрансплантації культури сім'яників у кастрованих щурів і у щурів із експериментальним гіпогонадізмом

Із метою компенсації андрогенної недостатності кастрованим щурам із експериментальним гіпогонадізмом було здійснено ауто- та ксенотрансплантації некультивованої і культивованої тканини сім'яника, а також ксенотрансплантацію органної культури сім'яників новонароджених поросят. Ауто- та ксенотрансплантуючи кастрованим щурам некультивовані фрагменти їх же сім'яників лише на 14 добу спостерігалась тенденція до підвищення рівня тестостерону в сироватці крові, а потім упродовж наступних трьох місяців трансплантація не давала позитивного ефекту /Рис. 6 а/.

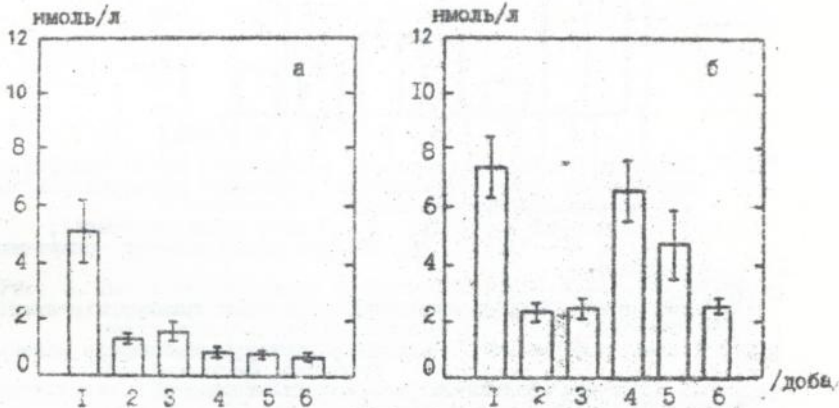


Рис. 6. Зміна концентрації тестостерону /нмоль/л/ у сироватці крові кастрованих щурів після ауто- та ксенотрансплантації некультивованої /а/ та культивованої /б/ тканини сім'яників: 1 - інтактний контроль; 2 - 7 днів після кастрації; 3, 4, 5, 6 - 14, 30, 45, 90 днів після трансплантації, відповідно.

При аутотрансплантації органної культури сім'яників рівень тестостерону через 30 днів практично нормалізувався, через 45 днів – дещо знизився, но перевищуючи як такий у кастрованих тварин у 3,2 рази /Рис. 6 б/.

Одержані результати свідчать про те, що при культивуванні тканини сім'яника в трансплантанті зберігається досить висока функціональна активність у клітинах Лейдіга.

У попередньо кастрованих щурів через 14 і 30 днів після ксенотрансплантації рівень тестостерону в крові підвищувався в два рази, потім дещо знизувався, але на третій місяць був вищим, ніж при кастрації /Рис. 7/.

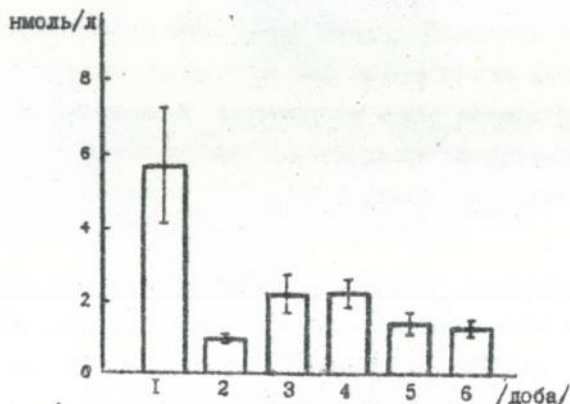


Рис.7. Вміст тестостерону /нмоль/л/ у сироватці крові кастрованих щурів після ксенотрансплантації органної культури сім'яників новонароджених поросят:
1 – інтактний контроль; 2 – 7 днів після кастрації;
3, 4, 5, 6 – 14, 30, 45, 90 днів після ксенотрансплантації, відповідно.

Таким чином, аутотрансплантація органних культур сім'яників щурів і ксенотрансплантація органних культур сім'яників новонароджених поросят ефективніші, ніж аутотрансплантація некультивованих фрагментів тканини сім'яників щурів.

Крім того, була використана модель експериментального гіпо-

гонадізму, визваного кадмієм хлоридом. Через три тижні після його введення маса сім'яників зменшилась на 23 %, їх стероїдогенна активність - на 60 %, а вміст тестостерону в сироватці крові зменшувався в три рази, що свідчило про розвиток гіпогонадізму.

Через один місяць після ксенотрансплантації у цих щурів рівень тестостерону в сироватці крові нормалізувався і в усі наступні строки залишався стабільно високим /Рис. 8/.

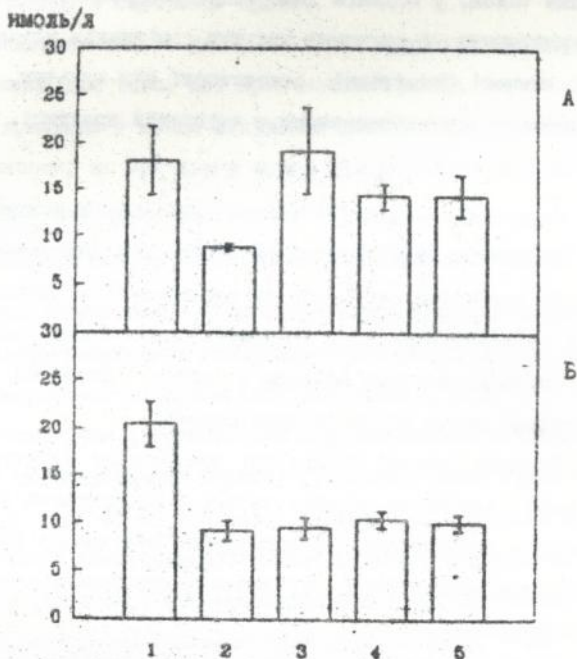


Рис. 8. Вміст тестостерону в сироватці крові щурів при ксенотрансплантації таким тваринам органічної культури сім'яників новонароджених поросят /А/ і при розвитку експериментального гіпогонадізму /Б/:

- 1 - інтактний контроль;
- 2 - 18 днів після введення кадмієм хлориду;
- 3, 4, 5 - 30, 45 і 90 днів після ксенотрансплантації при гіпогонадізмі, відповідно.

Відомо, що за умов руйнування клітин Лейдига кадмії хлоридом надиринки здатні забезпечувати тільки базальний рівень секреції тестостерону. Тому одержані результати можна вважати свідченням того, що джерелом тестостерону є трансплантат, у якому функціональна активність клітин Лейдига все ж поступово зникається.

Таким чином, у поданій дисертації розроблені методи культивування клітинних і органних культур сім'яників новонароджених порослят, вивчені біологічні властивості цих культур, показана перспективність їх застосування в клінічній практиці.

В И С Н О В К И

1. Розроблено методіку оптимальних умов культивування органних і клітинних культур сім'яників новонароджених порослят.

2. За допомогою світлової та електронної мікроскопії в клітинних і органних культурах ідентифіковано основні типи клітин: статеві клітини, клітини Лейдига і Сертолі. Показано, що за умов культивування мають місце їх проліферації.

3. Вивчено основні біологічні властивості культур сім'яників, а саме, здатність розмножуватись і продукувати андрогени. За допомогою тонкошарової хроматографії виділено з культурально-го середовища тестостерон, дігідроепіандростерон, андростендіон і андростендіол.

4. Хоріонічний гонадотропін і натрій оксидокортик* підвищують андрогенну активність досліджуваних культур і сприяють проліферації клітин.

5. Аутоіндукація органних культур сім'яників у кастрованих щурів повністю компенсує андрогенну недостатність протягом 45 днів після пересадки. Некультивована тканина сім'яників не має позитивного ефекту.

6. Ксенотрансплантація органних культур сім'яників новонароджених поросят шурам із гіпогонадізмом, викликаним кадмію хлоридом, підвищує рівень тестостерону в сироватці крові до нормальних величин протягом тривалого періоду дослідження.

7. Ксенотрансплантація органних культур сім'яників новонароджених поросят кастрованим шурам не викликає помітних змін у вмісті тестостерону в сироватці крові.

8. Експериментальні дані, що ми їх одержали, є теоретичним обґрунтуванням для того, щоб запропонований метод застосувати в клінічній практиці з метою лікування деяких форм гіпогонадізму. Слід відзначити, що при цьому краще використовувати 5-добові культури сім'яників новонароджених поросят.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Морфологическая и гормонпродуцирующая характеристика клеточных культур семенников новорожденных поросят //Тези доповіді ІV з'їзду ендокринологів Української РСР, Львів, 1987. - С.310.

2. Цитологічна і гормональна характеристика клітинних культур сім'яників новонароджених поросят //Фізіологічний журн. - 1990. - 35. - № 4. - С. 60-64 /співавт. Турчин І.С., Тронько М.Д./.

3. Алло- і ксенотрансплантація органних культур сім'яників кастрованим шурам та з експериментальним гіпогонадізмом, викликаним кадмію хлоридом //Фізіологічний журн. - 1993. - 39. - № 6. - С.75-78/співавт. Турчин І.С., Челнакова І.С./.

4. Экспериментально-клиническое обоснование применения ксенотрансплантации клеточной культуры семенников в андрологии //Тези доповіді І конф. Сексопатологія і андрологія, Донецьк. - 1992. - вип. І. - С. 172-175 /співавт. Лучицький Є.В., Турчин І.С., Кобяков С.К./.

Друкарня АВСУ,
Підписано до друку 1.10.93 Обсяг 1 л.д.
Формат 69×94^{1/4} Замовлення 1149 Тираж 100

166/005

AB 28.350

AB 28.350