

стерона в сыворотке крови в 1,5- и 3-месячный срок после трансплантации. Органнне культуры семенников новорожденных поросят могут быть рекомендованы для клинических целей.

Вступ

Чоловіча безплідність є важливою медико-соціальною проблемою. Патологічний процес у чоловічих статевих органах, як правило, порушує їх андрогенну функцію. Для її корекції застосовують консервативні та хірургічні методи лікування. Медикаментозні методи лікування порушень чоловічої статевої функції не завжди задовольняють практичних лікарів, а хірургічні методи лікування (пересаджування яєчка) не вийшли за межі клінічної апробації [1—4, 6]. Одним із перспективних методів лікування деяких форм гіпогонадізму є пересаджування культур клітин і тканин сім'яників людини та деяких тварин. Для широкого упроваджування в клінічну практику цього методу необхідно одержати в достатній кількості життєздатні, гормональноактивні культури клітин сім'яників [7], створити експериментальну модель гіпогонадізму та перевірити ефективність методу в експерименті.

Метою нашої роботи було створення гіпогонадізму у щурів за допомогою введення хлориду кадмію та кастрації, а також вивчення впливу трансплантації культур клітин сім'яників щурів і новонароджених поросят на їх андрогенну функцію.

Методика

Досліди виконані на 200 щурах-самцях лінії Вістар масою 230—250 г. Кастрацію здійснювали під ефірним наркозом. Щурам робили середній розріз мошонки, розтинали піхову оболонку одного із сім'яників і витягували його разом із придатками та сім'яним канатиком. Після перев'язування останнього сім'яник разом із придатком відсікали, вхід у піховий канал старанно зашивали, таким же чином видаляли другий сім'яник. Краї рани зашивали, через тиждень у щурів забирали із під'язичної вени кров і визначали в сироватці вміст тестостерону радіоімуннологічним методом за допомогою набору Стерон-125J. Ксено-трансплантацію кастрованим щурам здійснювали за допомогою органної культури клітин сім'яників новонароджених поросят із розрахунку 325 мг тканини на 100 г маси. Експериментальний гіпогонадізм викликали за допомогою хлориду кадмію. Попередньо була підібрана його оптимальна доза (0,055 мг/100 г), яка здатна при одноразовому введенні викликати гіпогонадізм у щурів, що погоджується з даними літератури [5].

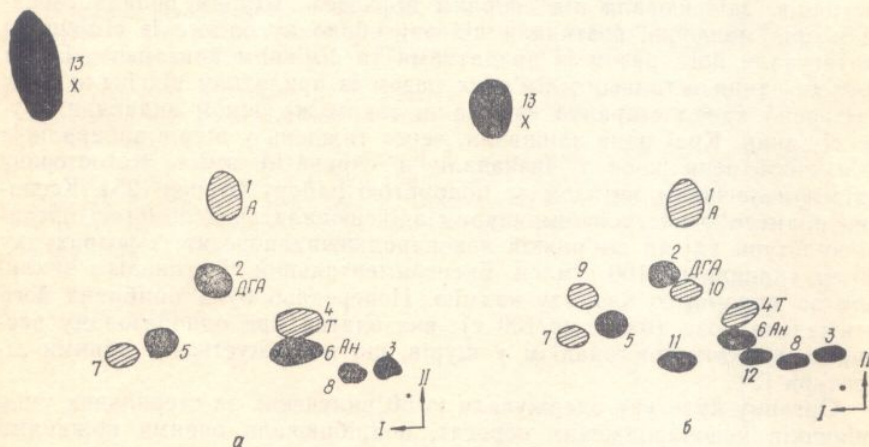
Органну культуру одержували із 50 вилучених за стерильних умов сім'яників новонароджених поросят, подрібнювали очними ножицями на фрагменти від 0,5 до 1 мм, відмивали охолодженим стандартним розчином Хенкса і вміщували в живильне середовище 199, в яке додавали 20 % інактивованої сироватки великої рогатої худоби та антибіотики із розрахунку 100 од/мл середовища; рН середовища доводили до 7,4 5 %-вим стерильним розчином бікарбонату натрію. Культивували при 32 °С у термостаті. Для стимуляції стероїдогенезу використовували хоріонічний гонадотропін (0,1 од/мл живильного середовища). Таким же засобом одержували культуру із сім'яників щурів для вивчення аутотрансплантації. У випадку кастрації трансплантацію проводили в область живота та в ділянку мошонки після 5 діб культивування. За зміненням андрогенної насиченості у сироватці крові робили висновок про вплив трансплантата в різні строки протягом 3 міс з моменту трансплантації. Органну культуру, яку використовували для трансплантації, вивчали за допомогою тонкошарової хроматографії. Стероїди, які виділюють клітини сім'яників у культуральне середовище, екстрагували хлороформом (тричі). Одержаний екстракт промивали 0,1 н NaOH та дистильованою водою, випаровували у вакуумі і

вносили в нього стабільні гормони. Розподіл стероїдів здійснювали за допомогою методу тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol W254 (Чехо-Словаччина) з використанням систем розчинників: гексан — етилацетат (70:30), хлороформ — ацетон (99:1). Тестостерон, дегідроепіандростерон (ДГА), андростендіон, андростендіол ідентифікували за хроматографічною рухливістю у двох системах розчинників, співпадаючих із рухливістю відповідних кристалічних стандартів: за поглинанням УФ-світла та позитивною реакцією із трихлористою сурмою (реакція Oertel). Синтез стероїдів вивчали у дослідях з внесенням в живильне середовище на 24 год ^3H -холестерину в кількості 0,08 мБк/мл. Після екстракції синтезованих продуктів в сухий екстракт вносили стабільні гормони. Стероїди після хроматографування та виявлення в УФ-світлі фарбували трихлористою сурмою, переносили у флакони із сцинтиляційною рідиною РС-8 і перелічували радіоактивність у лічильнику Beckman JS 5000.

Активність стероїд $\Delta^5\beta$ -ол-дегідрогенази визначали за допомогою спектрофотометричного методу [5]. Вміст білка у гормонах — за методом Лоурі.

Результати та їх обговорення

Органна культура сім'яників новонароджених поросят (КСНП) в різні строки культивування продукує від 5 до 8 стероїдів. Переважно це сполуки, котрі мають подвійний зв'язок у кільці В стероїдної молекули і дають позитивну реакцію із трихлористою сурмою.



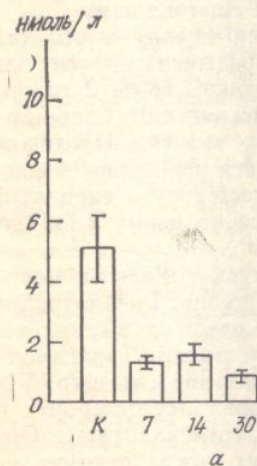
Мал. 1. Схема розміщення тестостерону і інших стероїдів органної культури сім'яників новонароджених поросят на двохмірній тонкошаровій хроматограмі (заштриховані ділянки — поглинання УФ-світла, чорні — позитивна реакція із трихлористою сурмою): а — культура без гонадотропіну, б — органна культура, стимульована хоріонічним гонадотропіном (24 год). I — система гексан—етилацетат (70:30), II — система хлороформ — ацетон (99:1); Т — тестостерон, АН — андростендіол, А — андростендіон; ДГА — дегідроепіандростерон, Х — холестерин.

Кількісну характеристику стероїдогенезу оцінювали за здатністю органної культури синтезувати стероїди у дослідях з додаванням ^3H -холестерину (мал. 1, а). Внесення хоріонічного гонадотропіну (0,1 од/мл) у живильне середовище підвищувало утворення стероїдів. На хромограмі ми відмічали підвищення інтенсивності і збільшення числа плям (мал. 1, б). Включення мітки при цьому збільшувалося: у тестостерон — на 207 %, у андростендіол — на 92 %, у ДГА — на 167 % і у андростендіон — на 108 % порівняно із контролем. Решта стероїдних гормонів не ідентифікована. Основним андрогенним гормоном є

тестостерон, тому за деякі функціональні ознаки тварини. Активність $\Delta^5\beta$ -ол-дегідрогенази стероїдогенезу в сі

Мал. 2. Вміст тестостерону у сироватці крові кастрації після ксенотрансплантації сім'яників новонароджених поросят: К — до кастрації, 7, 14, 30 днів після кастрації, 45, 90 днів відповідно після кастрації.

Трансплантацію оросят кастрованим щуром. При цьому станом першої групи (10-но-жирову клітковину рин) — у ділянку мошонки обох груп ми відмстерону через 2 тижні

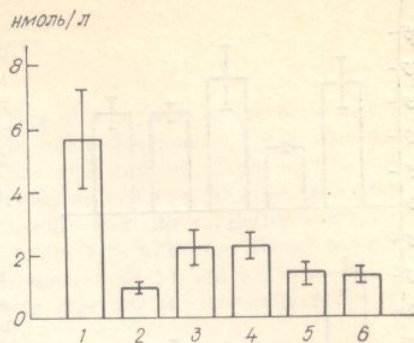


Мал. 3. Вміст тестостерону в сироватці крові кастрації після ксенотрансплантації некультивованих сім'яників в різні строки.

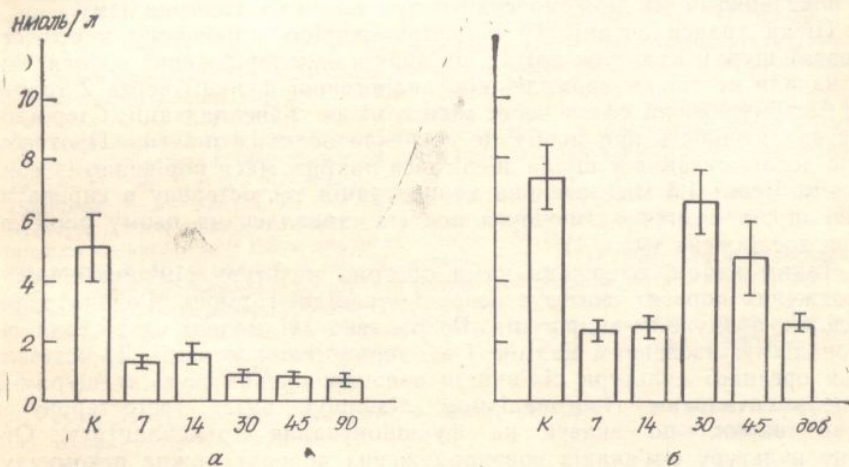
місяці дослідження. Сурності від місця трансплантації здійснювал в кожній) у підшкірно групі використовували гій — некультивовані в одразу ж після каст культивованих клітин, центрації тестостерону ках спостерігався стим був у 2 рази більший значенням андрогенної

тестостерон, тому за вмістом його в крові ми можемо судити про деякі функціональні зміни в організмі тварин. Активність ферменту $\Delta^5\beta$ -ол-дегідрогенази є показником стероїдогенезу в сім'яниках.

Мал. 2. Вміст тестостерону (нмоль/л) у сироватці крові кастрованих щурів після ксенотрансплантації органної культури сім'яників новонароджених поросят: 1 — до кастрації (К — контроль), 2 — 7 дів після кастрації, 3, 4, 5, 6 — 14, 30, 45, 90 дів відповідно після трансплантації.

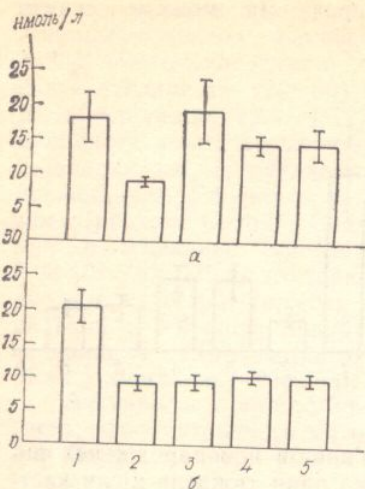


Трансплантацію органної культури сім'яників новонароджених поросят кастрованим щурам здійснювали через один тиждень після кастрації. При цьому становило інтерес вибрати місце трансплантації. Щурам першої групи (10 тварин) трансплантацію здійснювали у підшкірно-жирову клітковину в області живота, щурам другої групи (10 тварин) — у ділянку мошонки. При вивченні андрогенної активності у щурів обох груп ми відмічали незначне збільшення концентрації тестостерону через 2 тижні після трансплантації, якого не було на другому



Мал. 3. Вміст тестостерону (нмоль/л) у сироватці крові щурів після ауто-трансплантації некультивованих (а) та культивованих протягом 5 дів (б) клітин сім'яників в різні строки.

місяці дослідження. Суттєвих різниць значень цього показника в залежності від місця трансплантації ми не спостерігали (мал. 2). Ауто-трансплантацію здійснювали також щурам двох груп (по 20 тварин в кожній) у підшкірно-жирову клітковину в області живота. В першій групі використовували культивовані клітини сім'яників щурів, а в другій — некультивовані клітини сім'яників, які вводили тим же щурам одразу ж після кастрації. В одному випадку, при трансплантації культивованих клітин, через місяць відмічалось збільшення концентрації тестостерону майже до вихідного значення, а в двох випадках спостерігався стимулюючий ефект, бо вміст тестостерону у щурів був у 2 рази більший порівняно з вихідним і порівняно із середнім значенням андрогенної активності інтактних щурів. Але цей ефект був



нестійкий, і через 1,5 міс вміст тестостерону зменшився (мал. 3).

Для вивчення впливу культури на організм тварини, з метою з'ясування можливості застосування у клінічній практиці, ми провели дослідження на моделі експериментального гіпогонадізму, викликаного введенням кадмію

Мал. 4. Вміст (нмоль/л) тестостерону при ксенотрансплантації органної культури сім'яників новонароджених поросят (а, КСНП) щурам із експериментальним гіпогонадізмом (б, контроль), який було викликано введенням кадмію хлориду (CdCl_2): 1 — до введення CdCl_2 ; 2 — 18 діб після введення CdCl_2 ; 3, 4, 5 — 14, 45, 90 діб відповідно після трансплантації КСНП.

хлориду. Введення цієї сполуки призводить до значного ослаблення біосинтезу андрогенів у сім'яниках. При цьому зберігається задовільний загальний стан тварин. Через 3 тижні після введення кадмію хлориду зменшується маса сім'яників на 23 %, концентрація тестостерону — майже у 3 рази, а загальна стероїдогенна активність — на 60 %. За цими показниками ми можемо судити про розвиток гіпогонадізму.

Після трансплантації (у підшкірно-жирову клітковину в області живота) щурам культури клітин сім'яників новонароджених поросят ми відзначали не тільки нормалізацію андрогенної функції через 2 тижні, але й стимулюючий ефект через місяць після трансплантації. Стероїдогенна активність при цьому не досягала великих значень. Протягом 3 міс досліджування у щурів зберігався приріст маси порівняно із контролем. Через 1,5 міс загальна концентрація тестостерону в сироватці крові щурів незначно зменшувалася і зоставалася на цьому рівні до кінця досліджень (мал. 4).

Таким чином, одержана нами органна культура сім'яників новонароджених поросят синтезує основні стероїдні гормони. Гонадотропін підсилює продукцію андрогенів. Розроблено дві моделі одержання гіпогонадізму: введенням кадмію і за допомогою кастрації. Трансплантація органної культури сім'яників новонароджених поросят щурам з експериментальним гіпогонадізмом підвищує вміст тестостерону в крові тварин, що вказує на функціонування трансплантату. Органну культуру сім'яників новонароджених поросят можна рекомендувати для використання у клініці.

Висновки

1. Органна культура сім'яників новонароджених поросят синтезує основні стероїди: тестостерон, дегідроепіандростерон, андростендіон та андростендіол. Синтез андрогенів активується при додаванні у живильне середовище хоріонічного гонадотропіну.

2. Аутоотрансплантація органної культури сім'яників щурів підвищує вміст тестостерону в сироватці крові до нормальних значень протягом 1,5 міс.

3. Ксенотрансплантація органної культури сім'яників новонароджених поросят щурам з експериментальним гіпогонадізмом (введення кадмію хлориду) обумовлює підвищення вмісту тестостерону протягом 3 міс.

O. P. Potikha, I. S. Chelnakova, I. S.

AUTO- AND XENOTRANSPLANTATION OF TESTES TO CASTRATED RATS WITH EXPERIMENTAL HYPOGONADISM

The organ culture from the testes of rats, such as testosterone, dehydroepiandrosterone, and androstenedione, has been obtained. CdCl_2 administration provoked a decrease in body weight and gonadectomy resulted in hypogonadism. Autotransplantation of the testes from castrated rats provoked an increase in body weight and androgen production. Organ cultures from the testes can be used for clinical purposes.

Ukrainian Research Institute of Gerontology, Ministry of Public Health of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беникова Е. А., Турчин И. С. Тестостерон и андростендиол у детей с диабетом // С. 17—19.
2. Данилова А. И., Зубкова С. Т., Турчин И. С. Культура клеток поджелудочной железы при микроангиопатии // Там же. — 19.
3. Комиссаренко И. В., Тронько Н. В. и кортикотропина у больных с заболеваниями поджелудочной железы // Клиническая хирургия. — 1976. — № 5. — С. 616—62.
4. Павловский М. П., Бойко Н. И. Панкреатический островок боли // Клиническая хирургия. — 1976. — № 5. — С. 616—62.
5. Резников А. Г., Демченко В. М. и при гипогонадизме, обусловленном введением кадмия // Пробл. эндокринологии. — 1976. — № 5. — С. 616—62.
6. Шалимов А. А., Турчин И. С. Культура клеток панкреатического островка при панкреатите // Клиническая хирургия. — 1976. — № 5. — С. 616—62.
7. Шумаков В. И., Блюмкин В. И. Культура клеток островков Ланганга // Пробл. эндокринологии. — 1976. — № 5. — С. 616—62.
8. Coldman A. S. Production of C_{19} and C_{21} steroids by the testis // J. Biol. Chem. — 1958. — 233. — P. 231—238.

Київ. наук.-дослід. ін-т ендокринології та метаболізму М-ва охорони здоров'я України

AUTO- AND XENOTRANSPLANTATION OF ORGAN CULTURES OF TESTES TO CASTRATED RATS AND TO RATS WITH EXPERIMENTAL HYPOGONADISM

The organ culture from the testes of newborn pigs able to produce the basic androgens such as testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione and androstenediol has been obtained. CdCl₂ administration to the rats in a dose of 0.055 mg/100 g of body weight and gonadectomy resulted in the development of two experimental models of hypogonadism. Autotransplantation of organ culture from the rat testes and xenotransplantation of the testes from newborn pigs to the rats with experimental hypogonadism provoked an increase in blood plasma testosterone for 1.5 and 3 months, respectively. Organ cultures from the testes of newborn pigs can be recommended for clinical purposes.

Ukrainian Research Institute of Gerontology,
Ministry of Public Health of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беникова Е. А., Турчин И. С. Трансплантация культур бета-клеток в лечении инсулинзависимого диабета у детей // Пробл. эндокринологии.— 1991.— 4, № 37.— С. 17—19.
2. Данилова А. И., Зубкова С. Т., Ефимов А. С. и др. Влияние трансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы на состояние диабетических микроангиопатий // Там же.— 1989.— 2.— С. 9—14.
3. Комиссаренко И. В., Тронько Н. Д., Чебан А. К. и др. Содержание кортикостероидов и кортикотропина у больных гипокортицизмом до и после трансплантации культур клеток коры надпочечников // Врачеб. дело.— 1985.— 12.— С. 77—79.
4. Павловский М. П., Бойко Н. И. Клинические аспекты аллотрансплантации клеток панкреатических островков больным сахарным диабетом с острым и хроническим холециститом // Клин. хирургия.— 1990.— № 11.— С. 2—4.
5. Резников А. Г., Демченко В. М., Нищименко О. В. Влияние антитестикулярной цитотоксичной сыворотки на образование тестостерона в семенниках крыс в норме и при гипогонадизме, обусловленном введением хлорида кадмия // Физиол. журн.— 1976.— 22, № 5.— С. 616—621.
6. Шалимов А. А., Турчин И. С., Лифшиц Ю. З. и др. Опыт ксенотрансплантации культур клеток панкреатических островков после хирургического лечения хронического панкреатита // Клин. хирургия.— 1990.— № 11.— С. 1—2.
7. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Игнатенко С. И. и др. Результаты трансплантации культур островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом // Пробл. эндокринологии.— 1985.— № 5.— С. 67—70.
8. Coldman A. S. Production of Congenital adrenocortical hyperplasia in rats by estradiol-17b hydroxysteroid dehydrogenase // J. Clin. Endocrinol. and Metabol.— 1968.— 28, N 2.— С. 231—238.

Київ. наук.-дослід. ін-т ендокринології та обміну речовин
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов
до редакції 22.05.92