

РГБ ОЛ

13 ЯНВ 1997

№ прорах дубовица

КАНТОВА ЗИНИРА СУЛТАН-МУРАТОВНА

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ
НЕОНАТАЛЬНОГО АДЕНОГИПОФИЗА

14.00.41 - трансплантология и искусственные органы

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

М О С К В А - 1996

Работа выполнена на кафедре оперативной хирургии и хирургической анатомии с курсами Клинической андрологии и трансплантологии медицинского факультета Российского Университета дружбы народов и в Экспериментальной лаборатории нейр цитологии НИИ мозга РАМН.

Научные руководители:

академик РАМН, член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор

КИРИЛЛОВСКИЙ И. Д.

доктор медицинских наук

ВИКТОРОВ И. В.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор

ИГНАТЕНКО С. И.

доктор медицинских наук, профессор

КРИКА И. А.

Ведущая организация:

Институт трансплантологии и
искусственных органов ИЗ РФ

Защита состоится "20" сентября 1997 г. в 13 час.
на заседании диссертационного совета Д 057.22.06 в Российском
Университете дружбы народов по адресу: 117198, Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке
Российского Университета дружбы народов по адресу: 117198, Москва,
ул. Миклухо-Маклая, 8.

Автореферат разослан "20" сентября 1996 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Э. Д. Смирнова.

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ. Хирургическое лечение больных с гипофизарной недостаточностью путем пересадки гипофиза решает ряд сложных проблем: пересаженная железа не только восполняет дефицит гормонов и нормализует психический статус больного, но также улучшает его обменные процессы и соматическое состояние.

Принципиально новым подходом было предложение проф. И. Д. Кирпатовским (1981) пересаживать гипофиз в комплексе с нейросекреторными ядрами переднего гипоталамуса. При этом в гипоталамо-гипофизарном комплексе восстанавливались как артериальный приток, так и венозный отток за счет включения в трансплантат внутренней сонной артерии и кавернозного синуса. По данной методике к настоящему времени им произведено на Клинической базе кафедры оперативной хирургии 29 операции больным, страдающим несахарным диабетом, пангипопитуитаризмом и вторичным гипогонадизмом.

Однако, органная трансплантация остается на сегодняшний день вмешательством, сопряженным с определенными хирургическими и биологическими трудностями и требующим благоприятных условий для забора трансплантата и его консервирования, а также проведения комплексной иммуносупрессивной терапии и владения хирургом техникой сосудистого шва (Шумаков В. И. и др., 1994; Karl R. C. et al., 1977; и др.). Поэтому в последние годы, помимо органной трансплантации, ведется разработка методов пересадки культуры клеток соответствующей эндокринной железы.

Известны два способа культивирования эндокринных органов: цитотипический, т.е. метод получения монослойных культур клеток и органотипический, т.е. метод получения культуры ткани эмбрионального эндокринного органа.

Большие успехи достигнуты в культивировании бета-клеток поджелудочной железы и лечения больных с сахарным диабетом (В. Н. Блюмкин и др., 1930; С. Н. Игнатенко и др., 1991; В. И. Шумаков и др., 1994; A. Andersson, 1976; и ин. др.), а также интерстициальных эндокриноцитов для лечения больных с андрогенной недостаточностью (И. Д. Кирпатовский, М. Е. Басмаджян и др., 1987; J. Y. Brownling et al., 1981; и др.).

В то же время культивирование клеток и ткани аденогипофиза с лечебной целью недостаточно разработан, хотя этот метод представляет прекрасную экспериментальную модель для изучения состояния гормон-

скретирующих клеток и влияния гипоталамических регуляторов на клеточный состав и функциональную активность аденоцитов (Ф.П. Федотов и др., 1992; Peillon Françoise, 1973; и др.).

В частности, мы не нашли в литературе сведения по лечению больных, страдающих гипофизарной недостаточностью этим методом, что и определила характер настоящей работы. При этом за основу была взята идея про. И.Д. Кирпатовского совместного культивирования гипофиза с нейросекреторики ядрами переднего гипоталамуса и сочетанной культуральной трансплантации гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ: разработать методику изолированного и сочетанного культивирования аденогипофиза в эксперименте и изучить состояние пересаженной культуры алло- и ксенотрансплантатов аденогипофиза.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Дать сравнительную оценку статического (монослойного) и ротационного методов культивирования клеток аденогипофиза и семенника.
2. Изучить возможности использования ротационного метода при культивировании ткани аденогипофиза разной видовой и возрастной принадлежности.
3. Провести сравнительный анализ изолированного и сочетанного культивирования гипофиза.
4. Изучить в динамике состояние пересаженной культуры алло- и ксенотрансплантатов аденогипофиза в эксперименте.
5. Провести клиническую апробацию ксенотрансплантации культуры ткани гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА.

Впервые разработан ротационный метод получения культуры ткани аденогипофиза и семенников, обеспечивавший максимальный выход гормонпродуцирующих клеток.

Впервые проведен сравнительный анализ двух методов: статического (получения монослойных клеточных культур) и ротационного.

Впервые разработана экспериментальная модель сочетанного культивирования гипофиза с ядрами переднего гипоталамуса и гонадами.

Впервые в мировой практике проведена клиническая апробация ксенотрансплантации сочетанной культуры ткани гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.

Экспериментально показана целесообразность получения культуры ткани аденогипофиза и семенников ротационным методом. Установлены максимально допустимые сроки культивирования эндокринной ткани (гипофиз, семенники) животных неонатального возраста ротационным методом (до 7 дней).

Проведены исследования по сочетанному культивированию гипофиза с ядрами переднего гипоталамуса и тестикулярной тканью. Обнаружено, что содержание гормонов в питательной среде при сочетанном культивировании гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса вдвое выше, чем при изолированном культивировании аденогипофиза и семенников.

Выявлено, что для получения аденоцитов и интерстициальных эндокриноцитов лучше использовать аденогипофизы и семенники животных неонатального возраста.

Установлена целесообразность применения 3-х суточной культуры ткани аденогипофиза, полученной ротационным методом. При данном методе культивирования к 3-м суткам в питательной среде выявлено максимальное содержание гормонов (ЛГ, ФСГ, пролактин).

Показано, что сочетанная культура гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса, полученная ротационным методом, может быть рекомендована в клинику как метод лечения больных с нарушениями гормонального баланса в организме (гипогонадизм, андрогенная недостаточность, импотенция и т.д.).

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Разработанная методика выделения и культивирования ткани аденогипофиза получила практическое применение при хирургическом лечении больных с секреторным бесплодием и вторичным гипогонадизмом, андрогенной недостаточностью и импотенцией в г. Москве в хирургическом отделении медсанчасти № 11, являющейся клинической базой кафедры оперативной хирургии и хирургической анатомии с клиническим центром андрологии и пересадки эндокринных органов РУДН (зав. кафедрой академик РАНТН, член-кор. РАНН, проф. И.Д. Кирпатовский).

Материалы диссертации включены в лекционный курс по трансплантологии на кафедре оперативной хирургии и хирургической анатомии РУДН (г. Москва).

АПРОВАЦИЯ РАБОТЫ.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены :

- на научно-клинических конференциях кафедры оперативной хирургии и хирургической анатомии РУДН (г.Москва, 1993-1996);
- на научной конференции молодых ученых медицинского факультета Университета дружбы народов (г.Москва, 1995);
- на III Всероссийской научно-практической конференции "Антропогенные воздействия и здоровье человека" (г.Калуга, 1996);
- на междузавской научно-практической конференции, посвященной 85-летию кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии СГМУ "Анатомо-хирургическое и экспериментальное обоснование оперативных вмешательств" (г.Саратов, 1996);
- на I-м Российском конгрессе по патофизиологии с международным участием (г.Москва, 1996).

ПУБЛИКАЦИИ.

Основные положения диссертации опубликованы в 5 научных работах.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, характеристики материала и методов исследования, результатов собственных исследований, общего заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Объем исследования - 8 глав, 230 страницы машинописного текста. Работа иллюстрирована 20 таблицами и 50 рисунками. В списке литературы 310 источников, из них 150 отечественных и 160 иностранных авторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Проведенные исследования носят комплексный экспериментально-клинический характер.

Характеристика экспериментального материала

Экспериментальные исследования включают две части:

- 1/- разработку и сравнительную оценку разных методов культивирования эндокринных органов (аденогипофиз, семенник) ;
- 2/- экспериментальную оценку результатов трансплантации культуральной ткани неонатального аденогипофиза.

Работа проведена с использованием разных видов животных. В качестве донора были взяты взрослые быки, взрослые и неонатальные (7- дневные) крысы, неонатальные (1- дневные) поросята. В качестве реципиентов - бес породные половозрелые белые крысы - самцы. Всего проведено 214 эксперимента с использованием 902 животных. Общее количество экспериментального материала представлено в таблице 1.

В первой части экспериментальные исследования проводились по следующим сериям:

- сравнительная оценка культивирования аденогипофиза и семенников статическим и ротационным методами;
- культивирование ткани аденогипофиза разной возрастной категории;
- культивирование ткани аденогипофиза разной видовой принадлежности;
- сочетанное культивирование гипофиза, ядер переднего гипоталамуса и семенников неонатальных (1-дневных) поросят;
- алло- и ксенотрансплантация культуры ткани неонатального аденогипофиза

С целью проведения сравнительного анализа статического (клеточная культура) и ротационного (тканевая культура) методов культивирования использованы аденогипофизы взрослых животных (быки и крысы) и семенники крыс неонатального возраста.

Для культивирования ротационным методом ткани аденогипофиза разной видовой принадлежности был выбран один вид животных (крысы), но разного возраста. Следующие эксперименты по культивированию проведены на биологически разных видах животных (крыс и поросят), но одного возраста, т.е. неонатального периода (таб.1)

По предложению академика И.Д.Кирпатовского нами специально была проведена серия экспериментов по сочетанному культивированию гипофиза с другими биологическими структурами функционально взаимосвязанными между собой (ядра переднего гипоталамуса, гонады). В последующем именно эта серия стала основой для клинической апробации нового метода.

Таблица 1.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

| Вид эндокрин- ной ткани | Вид животных | Культивирование | | | Трансплантация | |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|----------------|-----------------|
| | | Изолированное | Сочетанное | | в мышцу | под оболочку |
| | | Стати- ческий метод | Рота- ционный метод | Ротацион ный метод | | семен- ника |
| | быки | 11/28 | 11/22 | | | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Аденоги- пофиз | взрослые | | | | | |
| | крысы | 13/120 | 23/145 | | | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | неонаталь крысы (7-днев.) | | | 23/310 | 15/15 | 36/36 |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | неонаталь поросята (1-днев.) | | 10/40 | | 15/15 | 36/36 |
| | ----- | ----- | ----- | 15 / 60 | ----- | ----- |
| Семен- ник | неонаталь | | | | | |
| | поросята (1-днев.) | | | | | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | неонаталь крысы (7-днев.) | 3/45 | 3/30 | | | |
| | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Всего: | | 27/193 | 70/547 | 15 / 60 | 30 / 30 | 72/72 |
| ИТОГО: | | 214 / 902 | | | | |

числитель - количество экспериментов

знаменатель - количество животных

Вторая часть экспериментального раздела включала изучение результатов пересадки алло- и ксеногенных трансплантатов культуры ткани неонатального аденогипофиза, полученного ротационным методом.

Для этого были проведены две серии экспериментов, различавшихся по месту пересадки культуры (мышца живота и семенники взрослых крыс). Всего произведено 102 операции пересадки культур ткани неонатального аденогипофиза на 102 животных, из них в мышцу живота - 30 и в семенник - 72 (табл.1). Иммуносупрессивная терапия после операции не применялась.

Все животные содержались в одинаковых условиях до и после операции. Выведение животных из экспериментов и оценка состояния пересаженных культуральных трансплантатов осуществлялось в одни и те же запланированные сроки: через 3 дня, 1-2 недели, 1, 3 и 6 месяцев.

В экспериментальной части работы были использованы следующие методы исследования:

- 1- Экспериментальный метод - забор донорского материала (гипофиз, ядра переднего гипоталамуса, семенник) с последующей его подготовкой к культивированию.
- 2- Культуральный метод - получение клеточных и тканевых культур аденогипофиза и семенников статическим и ротационным методами.
- 3- Трансплантация культуры ткани аденогипофиза (в мышцу живота и под капсулу семенника).
- 4- Гистологический метод - окраска трипановым голубым, по Романовскому-Гимза и гематоксилином и эозином.
- 5- Гормональный метод - определение концентрации гормонов ЛГ, ФСГ, пролактина и тестостерона в культуральной среде радиоиммунологическим методом с использованием "kit"-ов, фирмы CIS (Франция).
- 6- Метод статистической обработки - с определением достоверности $P < 0,05$

При выделении и культивировании аденоцитов и интерстициальных эндокриноцитов нами был применен способ получения культуры эмбриональных клеток Лейдига, разработанный в 1987 году на нашей кафедре М.Е.Басмаджян, И.Д.Кирпатовским, В.Г.Геворкяном и С.С.Гамбаровым (авторское свидетельство N - 1317305). При культивировании ротационным методом был взят способ получения культуры эмбриональных нервных клеток в роллерной установке (И.В.Викторов с соавт., 1985г.). В процессе работы оба метода были видоизменены по некоторым параметрам.

Для культивирования аденоцитов и интерстициальных эндокриноцитов статическим методом (получение монослойных клеточных культур) использовали пенициллиновые флаконы, а ротационным методом культивирование осуществляли в специальных флаконах в мини-роллерной установке в термостате.

Среда для культивирования состояла из 70% минимальной среды Игла, 10% сыворотки крупного рогатого скота, 20% сбалансированного солевого раствора Симкса, 600 мг% глюкозы, 0,2 ЕД/мл инсулина и 10-2 М органического буфера НЕРЕС. Замену ростовой среды проводили каждые 24 часа. Максимальный срок культивирования 7 суток. Ежедневно с помощью световой микроскопии изучали гистологические изменения в культуре, а в слывах среды определяли радиоиммунологическим методом концентрацию гормонов (ЛГ, ФСГ, пролактин, тестостерон).

Для снятия монослоя из пенициллиновых флаконов использовали смесь Версена и 0,25 % раствора трипсина в соотношении 1:1.

Характеристика клинических наблюдений

Культуральная ткань гипофиза, полученная ротационным методом, была применена в условиях клиники. Для этого в Центре андрологии и пересадки эндокринных органов на кафедре Оперативной хирургии и хирургической анатомии Российского Университета дружбы народов (рук. академик И.Д. Кирпатовский) впервые в мировой практике выполнена ксенотрансплантация сочетанной культуры ткани неонатального гипофиза, ядер переднего гипоталамуса и семенников 20 больным, страдающим вторичным гипогонадизмом, андрогенной недостаточностью и импотенцией, бесплодием с различными формами нарушения сперматогенеза (табл. 2).

Ксенотрансплантацию сочетанной культуры ткани гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса проводили больным с тяжелыми бесперспективными формами нарушения сперматогенеза и гормонального баланса в организме. Средний возраст больных составлял 30 лет, при продолжительности диагностированной патоспермии 5-7 лет. До этого пациенты длительное время получали комплексную консервативную терапию.

включающую антибиотики, ферменты и гормональные препараты. Из 20 больных у 7 в анамнезе отмечены различные хирургические вмешательства, выполненные с лечебно-диагностической целью.

Таблиц 2.
Распределение больных по нозологическим формам

| Нозологические формы | | Количество больных |
|--|-------------------------------------|--------------------|
| Секреторное бесплодие | нормоастеноспермия тератоспермия | 1 |
| | олигозооспермия Gravis | 10 |
| | азооспермия | 6 |
| Вторичный гипогонадизм, андрогенная недостаточность и импотенция | | 3 |
| Всего: | | 20 |

Показанием для ксенотрансплантации сочетанной культуры ткани гипофиза явились отсутствие положительного эффекта от длительно проведенной консервативной терапии, продолжительность заболевания и тяжелые степени нарушения сперматогенеза (азооспермия, олигозооспермия gravis и тератоспермия). В зависимости от нозологической формы всем больным перед операцией проводились специальные клинические обследования (консультация уролога, сексопатолога, эндокринолога, бактериальный посев и анализ простатического сока, исследование на хламидий, определение гормонов /половых и гонадотропных/ в периферической крови и спермиологический анализ эякулята).

Только по результатам комплексного клинического обследования консультативно решался вопрос о необходимости применения данного метода лечения.

Культура гипофиза, предназначенная для клинической апробации сопровождалась своим паспортом. В паспортные данные входили: донор культуры, возраст дозора, метод культивирования, срок культивирования, состав культуры, анализ культуральной среды на стерильность с помощью светового микроскопа и дата передачи культуры в клинику. В клинике перед операцией обязательно проводилось бактериологическое исследование культуральной среды и самого трансплантата, а также определялось содержание гормонов в культуральной жидкости.

Культура ткани гипоталамо - гипофизарно - тестикулярного комплекса пересаживалась по разработанной проф. И.Д.Кирпатовским (1987) методике в паравазальную щель под белочную оболочку гонад с применением микрохирургической техники. Не нарушая целостности структуры семенных канальцев создавался специальный "карман" в паравазальной щели с помощью микродилататоров различного диаметра. После введения культуры прецизионный разрез белочной оболочки зашивался одним узловым швом атравматической иглой с нитью 7/0.

По показаниям у некоторых больных в послеоперационном периоде был исследован иммунологический статус. По методу Брауде, Гордман (1964) в модификации А.П.Алексеева оценивалось состояние Т-системы иммунитета с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов, как стимулированную, так и не стимулированную специфическим мутагеном ФГА. Процентное содержание Т- лимфоцитов определялось по спонтанному розеткообразованию лимфоцитов с эритроцитами барана и В- лимфоциты - с помощью ЕАС - розеток, с использованием сухого компонента морской свинки. Гуморальный иммунитет оценивался по активности комплемента и комплемент-связывающих антител к ткани яичка.

У больных со вторичным гипогонадизмом, андрогенной недостаточностью и импотенции определялась концентрация гормонов ЛГ, ФСГ, пролактина и тестостерона в сыворотке крови с использованием тест-наборов "radioimmunoassay kit" фирмы CIS (Франция) и оценивался сексуальный статус.

В связи с тем, что основным критерием, определяющим тяжесть бесплодия, является степень угнетения сперматогенеза, то спермиологический анализ эякулята у больных с бесплодием осуществлялся в достаточно ко-

роткие сроки после операции с целью выяснения наличия или отсутствия положительной динамики. Исследования проводились через 1 месяц, 3, 6 и 12 месяцев после ксенотрансплантации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ежедневно проводимые гистологические и гормональные наблюдения за состоянием культуры показали, что клетки аденогипофиза взрослых животных (крыс и быков) при статическом и ротационном методах культивирования хорошо переживают в культуре в течение 24 - 48 часов. Начиная с 3-х суток, аденоциты уменьшаются в размерах, ядра их становятся гиперхромными и к 5-7 суткам культура практически погибает.

При статическом (клеточная культура) методе культивирования аденогипофиза взрослых животных максимальная концентрация гонадотропных гормонов (ЛГ, ФСГ) в питательной среде определяется на 5-е сутки, хотя к этому времени большинство аденоцитов подвергаются резким структурным изменениям. Видимо, происходит выход гормонов в среду из погибших клеток аденогипофиза.

Нами была обнаружена совершенно иная картина при обоих методах культивирования семенников крыс неонатального возраста. Интерстициальные эндокриноциты при статическом методе сохраняют свою жизнеспособность и функциональную активность в течение всего периода культивирования (7 дней). Массовой гибели клеток, что имело место при культивировании аденогипофиза взрослых крыс и быков в данном случае не наблюдается, хотя к 7-м суткам культивирования разрушаются межклеточные связи и клетки располагаются достаточно изолировано друг от друга.

При ротационном методе культивирования семенников животных неонатального возраста (крыс и поросят), начиная со 2-х суток интерстициальные эндокриноциты образуют большие скопления в межклеточных пространствах. Вокруг микрофрагмента происходит формирование отграниченного слоя из вновь появившихся клеток. К 5-м суткам в культуре ткани семенников встречаются клетки Лейдига как в стадии митоза, так и в стадии распада. Интерстициальные эндокриноциты (клетки Лейдига) располагаются небольшими группами. Обширных очагов некроза клеток не

наблюдается. Уровень тестостерона (ng/ml) в культуральной среде максимальных цифр достигает на 3-е сутки культивирования.

Исходя из вышеизложенного, культуру эндокринных органов, в частности, аденогипофиза и семенников животных неонатального возраста, можно получить обоими методами. Однако ротационный метод обладает значительным преимуществом над статическим.

Анализируя этапы выделения и приготовления культур статическим методом можно выделить следующие его недостатки:

- механическое повреждение клеток при обработке материала;
- риск инфицирования культуры, который зависит от времени обработки и приготовления культур, т.е. от продолжительности контакта экспериментатора с культивируемым материалом;
- продолжительность культивирования;
- экономические затраты, т.е. необходимость наличия дорогостоящей аппаратуры и реактивов (Перколл-градиенты, центрифуги и т.д.);

Кроме того для получения монослойной культуры с максимальным содержанием гормонов в питательной среде необходимо 7-14 дней, что крайне нежелателен для получения культур клеток аденогипофиза, т.к. в процессе культивирования происходит исчезновение многих типов аденоцитов и к 5-7 суткам культивирования сохраняются в основном АКТ и пролактинсекретирующие клетки.

В связи с этим была проведена серия экспериментов с целью выяснения возможности получения ротационным методом культуру ткани аденогипофиза неонатального возраста. В данной серии использован один вид животных (крысы), но разного возраста.

При культивировании аденогипофиза неонатальных крыс, начиная с 3-х суток аденоциты в культуре образуют трабекулы и розетки. Вокруг микрофрагмента происходит формирование отграничительного слоя, из вновь образованных клеток. В 3-х суточной культуре неонатального аденогипофиза определяются клетки в стадии митоза. К 5-м суткам культивирования завершается формирование отграничительного слоя вокруг микрофрагмента. Очаги некроза, характерные к этим срокам для культуры взрослой ткани аденогипофиза, в данном случае отсутствуют.

К 7-м суткам культивирования клетки неонатального аденогипофиза уменьшаются в размерах, ядра их становятся гиперхромными, появляются участки в микрофрагменте с разрушенными межклеточными связями.

При гормональном исследовании выявлено, что гормоны (ЛГ, ФСГ и пролактин) определяются в питательной среде в течение 7 дней культивирования.

Таким образом, ткань аденогипофиза неонатальных животных культивируется ротационным методом лучше, чем взрослых особей. В культуре неонатальной ткани происходит гибель одних и деление других клеток аденогипофиза, значит, данная культура не только переживает в условиях *In vitro*, но и растет, активно продуцируя гормоны (ЛГ, ФСГ и пролактин). В то время как взрослая ткань аденогипофиза способна переживать в культуре в течение 2-3 суток, затем начинает погибать и первыми в этой культуре погибают ФСГ-секретирующие клетки.

Следующая серия экспериментов была проведена с целью выяснения возможности использования ротационного метода при культивировании ткани аденогипофиза разной видовой принадлежности. В качестве источника культуры были взяты аденогипофизы разных видов животных, но неонатального возраста (7-дневных крысят и 1-дневных поросят).

При культивировании была обнаружена аналогичная гистологическая картина: начиная со 2-х суток культивирования также происходит формирование отграничительного слоя вокруг микрофрагмента. К 7-м суткам отмечается увеличение количество аденоцитов с гиперхромными ядрами, хотя встречаются клетки аденогипофиза в стадии деления. Выяснилось, что концентрация гормонов (ЛГ, ФСГ и пролактин) в питательной среде максимальных цифр также достигает к 3-м суткам культивирования, затем отмечается ее медленное снижение.

Таким образом результаты культивирования аденогипофиза и семенников разных видов животных (крас, быки и поросята) ротационным методом показали, что жизнеспособность и функциональная активность культур зависят от возраста животных и не зависят от их биологического вида.

Учитывая наличие тесной функциональной взаимосвязи гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы, по предложению академика И.Д.Кирпатовского, нами было проведено сочетанное культивирование этих органов в трех вариантах:

- 1/- гипофиз и ядра переднего гипоталамуса;
- 2/- гипофиз и семенники;
- 3/- гипофиз, ядра переднего гипоталамуса и семенники одновременно.

При гормональном исследовании было выявлено, что содержание гормонов (ЛГ, ФСГ и пролактина) в питательной среде выше, чем при изолированном культивировании в одни и те же сроки. Так, содержание ЛГ в питательной среде на 3-е сутки составлял $1,4 \pm 0,2$ (IU/L) при изолированном культивировании ткани аденогипофиза неонатальных (1-дневных) поросят, а при сочетанном культивировании гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса уровень ЛГ на 3-е сутки достигал $2,5 \pm 0,2$ (IU/L).

При гистологическом изучении совместно культивируемых микрофрагментов гипофиза и семенников выяснилось, что к 3 суткам вокруг микрофрагмента наблюдается формирование отграничительного слоя. В эти же сроки в микрофрагментах определяются большое количество аденоцитов и интерстициальных эндокриноцитов в стадии митоза.

К 5 суткам появляются аденоциты мелких и средних размеров. Однако, количество их значительно меньше по сравнению с изолированной культурой аденогипофиза в те же сроки наблюдения. Количество аденоцитов с нормохромными ядрами преобладали над количеством аденоцитов с гиперхромными ядрами.

При анализе 7 суточной сочетанной культуры гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса было обнаружено, что гистологическая картина явна не отличается от вышеописанной гистологической картины 5 суточной культуры.

Таким образом при сочетанном культивировании гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса нам удалось воспроизвести функциональную взаимосвязь "во флаконе", существующий в организме между этими органами.

Культура ткани аденогипофиза неонатальных животных (7-дневных крысят и 1-дневных поросят), полученная ротационным методом, подверглась экспериментальной трансплантации под оболочку гонад и в толщу мышц живота взрослых крыс.

Результаты трансплантации показали, что место пересадки оказывает большое влияние на состояние пересаженного аденогипофиза.

В ближайшие сроки (1-2 недели), как в аллогенном, так и в ксеногенном трансплантате появляются участки некробиоза при пересадке в мышцу. Вблизи трансплантатов местами отмечается лимфоидная инфильтрация

В эти же сроки происходит образование тонких волокон соединительной ткани. К 1 месяцу наблюдения трансплантат, как алло-, так и ксеногенный, пересаженный в мышцу полностью погибает и место его локализации замещается соединительной тканью.

При гистологическом исследовании алло- и ксеногенных трансплантатов культуры ткани аденогипофиза после пересадки (через 2 недели) в семенник выявлено, что клетки аденогипофиза располагаются компактно, образуя трабекулы и розетки, в созданной "кармане". Иногда встречаются митотически делящиеся аденоциты как в аллогенном, так и в ксеногенном трансплантате. Через 3 месяца после пересадки в области трансплантата наблюдается образование мелких кровеносных сосудов. Явления лимфоидной инфильтрации больше проявляются к этому сроку при ксенотрансплантации. Структура семенных канальцев при обоих видах трансплантации не нарушена, с картиной нормального сперматогенеза. Через 6 месяцев после ксенотрансплантации выявлено значительное утолщение капсулы семенника в области локализации трансплантата, а в некоторых случаях (в 2 из 6) сохраняется ее отслойка. Тогда как при аллотрансплантации утолщение капсулы не так заметно. Количество участков с живыми клетками в аллогенном трансплантате больше, чем при ксеногенном.

Таким образом, анализ пересадки в мышцу неонатального, культурального алло- и ксенотрансплантата аденогипофиза показал ее нецелесообразность, так как максимальный срок переживания культуры составляет до 1 месяца. В то же время, алло- и ксеногенные трансплантаты культуры неонатальной ткани аденогипофиза в семеннике сохраняют свою жизнеспособность в течение 6 месяцев (максимальный срок наблюдения), не вызывая каких-либо серьезных осложнений со стороны гонад.

Учитывая наилучшие результаты при сочетанном культивировании гипоталамо-гипофизарно-гестикалярного комплекса и иммунологическую привилегированность семенников для клинической апробации была взята 3-х суточная сочетанная культура гипофиза и операции осуществлялись под белочную оболочку гонад больным со вторичным гипогонадизмом, андрогенной недостаточностью и сеареторным бесплодием, с тяжелыми степенями нарушения сперматогенеза.

Часть больных в послеоперационном периоде получали "мягкую" иммуносупрессивную терапию, включающую преднизолон, хорионический гонадотропин и гепарин.

Через 3 месяца после операции ксенотрансплантации в Клиническом центре андрологии было обследовано 13 человек, через 6 месяцев - 8 и через 12 месяцев - 4 (таблица 3).

Таблица 3.

Сроки и результаты культуральной трансплантации

| Исологические формы | | Сроки наблюдения | | |
|---|---------------------------|------------------|--------|---------|
| | | 3 мес. | 6 мес. | 12 мес. |
| Секреторное бесплодие | Норкоастено-тератоспермия | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
| | Олигозооспермия gravis | 6/6 | 5/5 | 2/1 |
| | Азооспермия | 3/2 | 2/2 | 1/1 |
| Вторичный гипогонадизм, андрогенная недостаточность, импотенция | | 3/3 | - | - |
| Всего | | 13/12 | 8/8 | 4/3 |

числитель - количество оперированных больных

знаменатель - количество больных с улучшением спермиологических и гормональных показателей

Из 20 ксенотрансплантации сочетанной культуры ткани гипофиза лишь в 1 случае была отмечена картина острого реактивного орхита, у остальных больных (19) - операция и послеоперационный период протекали без осложнений. Иммунологические исследования, проведенные после операции и спустя несколько месяцев, свидетельствовали об отсутствии реакции отторжения трансплантата в период наблюдения.

При анализе эякулята было выявлено положительное влияние операции ксенотрансплантации на все показатели сперматогенеза (общий объем, количество подвижных и морфологически нормальных форм и т.д.).

У больного с тератоспермией и астеноспермией (до операции: 87 % - количество морфологически аномальных форм сперматозоидов и 25 % - количество подвижных форм) наблюдалась нормализация сперматогенеза по всем критериям в течение всего года (максимальный срок наблюдения). Так, через 3 месяца после операции количество подвижных (активно- и малоподвижных) форм соответствовало - 68 %, а количество морфологически аномальных форм уменьшилось до 10 % в исследуемом эякуляте.

Увеличение количества подвижных форм (активно- и малоподвижные) на 40% по сравнению от исходных величин отмечено у больных с нарушениями в виде олигозооспермии *gravis*. Однако, у пациентов с азооспермией лишь у некоторых (см. табл. 3) появляются единичные подвижные и морфологически нормальные формы сперматозоидов. Хотя положительная динамика сохраняется в течение всего периода наблюдения.

У больных со вторичным гипогонадизмом, андрогенной недостаточностью и импотенцией также наблюдалось улучшение гормонального, андрологического и сексуального статуса. При этом, у лиц более молодого возраста положительный эффект операции был выражен ярче, чем у лиц пожилого возраста.

Выводы.

1. Для получения культуры аденогипофиза и семенников можно использовать как статический метод (клеточная культура), так и ротационный (органный культура). Культивирование статическим методом требует многоэтапной обработки исходного материала, что приводит к увеличению риска механического повреждения клеток. Ротационный метод технически легко выполнить и обеспечивает получение культуры с минимальным повреждением гормонсекретирующих клеток.

2. Максимальный выход гонадотропных (ЛГ, ФСГ и пролактин) и половых (тестостерон) гормонов в питательную среду при статическом методе культивирования аденогипофиза и семенников отмечается на 5-е сутки, а при ротационном - на 3-е сутки. К 7 суткам секреция этих гормонов резко снижается при обоих методах культивирования за исключением пролактина.

3. Культивирование аденогипофиза разной видовой принадлежности (бики, поросята и крысы) ротационным методом практически приводит к однородным результатам. В то же время гипофиз и семенники, взятые от неонатальных животных культивируются лучше, чем от взрослых особей.

4. Продолжительность жизни культуры ткани аденогипофиза зависит от места пересадки. Семенник животных благодаря наличию "гематотестикулярного барьера" является привелигированной зоной для аллотрансплантации: пересаженные под оболочку семенника клетки аденогипофиза остаются жизнеспособными в течение 6 месяцев (максимальный срок наблюдения), в то время как в мышце живота — лишь до одного месяца.

5. При пересадке в семенник явных различий между аллогенными и ксеногенными трансплантатами культурального аденогипофиза не выявлено, несмотря на то, что иммуносупрессивная терапия не применялась.

6. При сочетанном культивировании ротационным методом гипофиза с ядрами переднего гипоталамуса и тестикулярной тканью содержание гормонов ЛГ, ФСГ, пролактина и тестостерона в питательной среде вдвое выше во все сроки наблюдения, чем при изолированном культивировании.

7. При клинической апробации разработанного метода сочетанного культивирования гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса неонатальных поросят больных с секреторным бесплодием, а также со вторичным гипогонадизмом и андрогенной недостаточностью отмечена положительная динамика в спермиологических и гормональных показателях (максимальный срок наблюдения — 1 год).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для культивирования ткани аденогипофиза и семенников разной видовой принадлежности следует рекомендовать применение ротационного метода.
2. Для получения культур аденоцитов и интерстициальных эндокриноцитов ротационным методом целесообразно использовать неонатальные аденогипофизы и семенники.

3. Для клинических целей лучше использовать сочетанную 3-х суточную культуру гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса.
4. Операции ксенотрансплантации сочетанной культуры гипоталамо-гипофизарно-тестикулярного комплекса следует производить под белочную оболочку гонад с применением микрохирургической техники.
5. Ксенотрансплантацию сочетанной культуры ткани гипофиза в гонады можно рекомендовать как перспективный метод лечения мужского секреторного бесплодия с тяжелыми и средними степенями нарушения сперматогенеза и при эндокринных формах импотенции.

СПИСОК работ, опубликованных по материалам диссертации.

1. Каитова Э.С., Кирпатовский И.Д., Лысенко А.И. Культивирование ткани аденогипофиза разных возрастных групп // Антропогенные воздействия и здоровье человека: Сбор. докл. 3-я Всероссийская научно-практ. конф. Калуга, 1996г.
2. Кирпатовский И.Д., Каитова Э.С., Викторов И.В., Рахманова Г.А. Первые клинические наблюдения ксенотрансплантации сочетанной культуры ткани неонатального аденогипофиза и яичка в клинике // Новые технологии в медицине: Тез. докл. Научно-практич. конф. Москва, 1996г. - С 26-27
3. Лысенко А.И., Смирнова Э.Д., Каитова Э.С. Мужская гонада как иммунологически привилегированная область при трансплантации. Морфологическая оценка пересаженной аллогенной ткани аденогипофиза. // Новые технологии в медицине: Тез. докл. Науч.-практ. конф. Москва, 1996г. - С 28-31.
4. Кирпатовский И.Д., Каитова Э.С., Рахманова Г.А., Баскаков В.В. Сочетанная ксенотрансплантация культуры ткани аденогипофиза в клинике // Анатомо-хирургическое и экспериментальное обоснование оперативных вмешательств: Тез. докл. Науч. конф. Саратов, 1996г. - С 18-19.
5. Кирпатовский И.Д., Каитова Э.С., Викторов И.В. Культуральная трансплантация гонад, гипофиза и ядер гипоталамуса при мужском бесплодии и эндокринной импотенции // Тез. докл. I-й Российский конгресс по патофизиологии. Москва, 1996г. - С. 318-319

ZINFIRA SULTAN-MURATOVNA KAITOVA

TRANSPLANTATION OF CULTURED TISSUES OF NEONATAL
ANTERIOR PITUITARY

Comparative analysis of static (cultured cells) and rotation (culture of organs) methods of cultivation was carried out which proved the advantage of rotation method.

For the first time in the world's practice there was fulfilled experimental researches on combination cultivation of hypophysis with nucleus of anterior hypothalamus and testis by means of rotation method. It was proved that while using combination cultivation of hypothalamus hypophysis testis complex the content of hypophysis and sexual hormones in cultivated medium is more at any time of observation than isolated cultivation method gives.

There was carried out xenotransplantation of combination culture of hypophysis in clinic for patients suffering from infertility (azoospermia, teratospermia and oligozoospermia gravis) and for patients with hypogonadotropism, impotency. These researches showed improvement and balance of spermatogenesis and hormonal indices after xenotransplantation.