

# Інтракавернозна трансплантація при еректильній дисфункції: модифікація адгезивних властивостей молекулами SYT1/SYT2 посилює здатність стовбурових клітин відновлювати скоротливу та фосфатазну активність печеристої тканини, ушкодженої внаслідок гіперглікемії

**І.І. Горпинченко, А.М. Ситенко**

ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

**Мета дослідження:** перевірити припущення, що стовбурові клітини (СК) з модифікованими адгезивними властивостями (СК-м-SYT1/SYT2) повинні більш виражено, ніж нативні СК, відновлювати фосфатазну та скоротливу активність печеристої тканини, ушкодженої внаслідок гіперглікемії.

**Матеріали та методи.** На двох групах (n=10; 1:1) статевозрілих щурів-самців лінії Вістар масою 160–180 г з індукованою гіперглікемією (>8 ммоль/л) проведено порівняльне дослідження впливу чотирьох інтракавернозних ін'єкцій (1×10<sup>6</sup> клітин один раз на тиждень) нативних СК і клітин з інтегрованими у мембрану молекулами SYT1/SYT2 (СК-м-SYT1/SYT2) на скоротливу і фосфатазну активність печеристих тканини.

**Результати.** Встановлено, що, по закінченні інтракавернозних ін'єкцій (ІКІ) у групі тварин, які отримували СК-м-SYT1/SYT2, медіана амплітуди скорочень була в 1,6 разу більше (p<0,05, критерій Вілкоксона), а медіани інтенсивності забарвлення на АТФ-азу і ЛФ відповідно на 2 і 1 балів більше, ніж в групі, де вводили нативні СК (p<0,05, критерій Вілкоксона). ІКІ нативних і модифікованих СК не впливали на рівень глікемії.

**Заключення.** Модифікація адгезивних властивостей стовбурових клітин (СК) молекулами SYT1/SYT2 підвищує їхню здатність відновлювати скоротливу і фосфатазну активність печеристої тканини, пошкодженої внаслідок гіперглікемії. Необхідні подальші дослідження процесів хоумінга і диференціювання СК, модифікованих молекулами SYT1/SYT2, в інтактній і патологічно зміненої печеристої тканини *in vitro* і *in vivo*.

**Ключові слова:** еректильна дисфункція, стовбурові клітини, гіперглікемія, інтракавернозна трансплантація, печериста тканина, скоротлива активність, фосфатазна активність.

Розроблення нових високоєфективних методів лікування еректильної дисфункції (ЕД) є актуальним завданням урологічної науки. Незважаючи на те що розвиток ЕД асоціюється з віком, дане захворювання вражає значну кількість чоловіків сексуально активного віку (до 40 років) [1]. Більше того, зазначена патологія значною мірою негативно позначається на психоемоційному стані пацієнта та його сексуального партнера, призводить до розвитку депресії, знижує самооцінку, порушує гармонію міжособистісних відносин, погіршуючи якість життя [2, 3].

Ситуація ускладнюється тим, що майже 50% пацієнтів відмовляється від застосування інгібіторів фосфодіестерази 5-го типу – препаратів «першої ланки» терапії еректильної дисфункції після певного проміжку часу [4, 5]. Крім того, наведена група препаратів не відновлює структуру та функцію печеристої тканини, а тільки потенціює ерекцію. З іншого боку, фаллопротезування не набуло популярності внаслідок травматичності та афізіологічності.

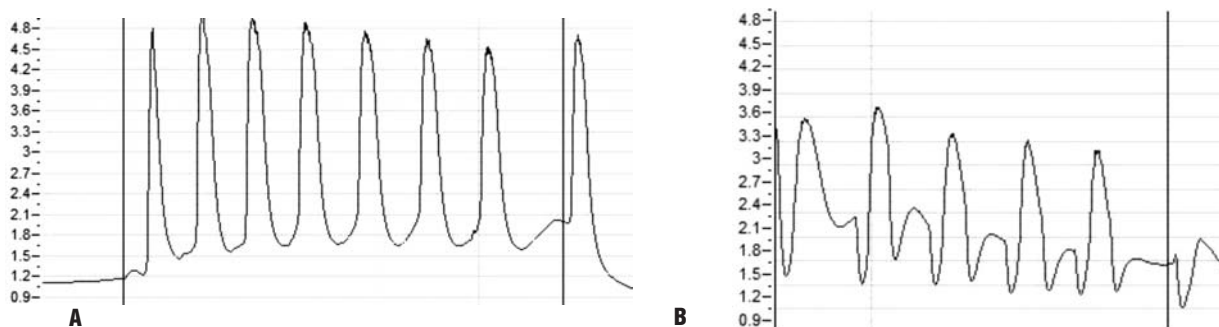
Перспективним напрямком вирішення перелічених проблем може бути застосування стовбурових клітин (СК) з метою відновлення структури та функціональних властивостей печеристої тканини. Саме про це свідчить перший досвід їхньої інтракавернозної трансплантації. Проте при достовірному покращенні структурно-функціональних показників печеристої тканини дуже незначну кількість СК можна ідентифікувати в ній самій [6–16]. Це може пояснюватися міграцією або загибеллю клітин, що, з одного боку, знижує їхній терапевтичний ефект, а з іншого – погіршує вибірковість дії, оскільки СК з током крові можуть потрапляти у різні ділянки організму з непередбачуваними наслідками.

Для вирішення проблеми низької адгезії СК до субендотеліального матриксу було запропоновано інтегрувати в їхню мембрану спеціальні молекули (SYT1 та SYT2). У попередньому експерименті нами було продемонстровано, що експонування СК у середовищах SYT1 та SYT2 призводить до включення цих молекул у клітинну мембрану. Так, частка SYT1 та SYT2 позитивних СК у пулах, що експонувалися у спеціальних SYT1/SYT2 середовищах, була достовірно (p<0,05) вищою, відповідно на 70% та 59% та на 64% та 48%, ніж у пулах, що експонувалися у Sham та SYT1/ SYT1 розчинах.

**Мета дослідження:** перевірити припущення, що СК з модифікованими адгезивними властивостями (СК-м-SYT1/SYT2), повинні більш виражено, ніж нативні СК, відновлювати фосфатазну та скоротливу активність печеристої тканини, ушкодженої внаслідок гіперглікемії.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Згідно з планом експерименту двом групам статевозрілих щурів-самців лінії Вістар із стрептозоточин індукованою гіперглікемією (рівень глюкози >8 ммоль/л) тривалістю 3 міс проводили чотири інтракавернозні ін'єкції (ІКІ) СК (по 1×10<sup>6</sup> клітин) один раз на тиждень: групі А (n=10) вводилися СК-м-SYT1/SYT2, групі В (n=10) – нативні СК. Через 1 тиждень після останньої ІКІ у тварин визначали рівень глюкози у



**Мал. 1. Криві скорочень смужок кавернозної тканини у відповідь на електричний імпульс: А – від гіперглікемічного щура-самця № 3А, що отримав чотири ІКІ МСК-м-SYT1/SYT2 (велика амплітуда скорочень); В – від гіперглікемічного щура-самця № 5В, що отримав чотири ІКІ нативних МСК (мала амплітуда скорочень)**

**Характеристики досліджуваних груп\***

Параметр	Група А, n=10	Група В, n=10	p
Маса тіла, г	161 (147; 167)	157 (149; 167)	>0,05
Рівень глікемії ммоль/л	36 (28; 38)	35 (30; 38)	>0,05
Амплітуда скорочень	3,6 (3,1; 3,9)	2,3 (2,1; 2,7)	<0,05
Інтенсивність фарбування на АТФ-азу, бали	4 (4; 5)	3 (3; 4)	<0,05
Інтенсивність фарбування на ЛФ, бали	5 (4; 5)	3 (3; 4)	<0,05

Примітка: \* – Дані представлені як Me (Персентиль 25; 75).

крові з хвостової вени та виводили з експерименту. Статевий член видаляли, після чого з нього виділяли печеристу тканину для подальшого визначення фосфатазної (лужна фосфатаза – ЛФ та АТФаза) та скоротливої активності.

Експериментальні дослідження виконані на 20 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 160–180 г, розведених у віварії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», що знаходилися на стандартному харчовому раціоні відповідно із санітарно-гігієнічними нормами, правилами «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою метою» (м. Страсбург, 1986). Вихідний рівень глюкози у всіх тварин становив 4,0–5,11 ммоль/л.

Методики індукції гіперглікемії, глюкометрії, визначення фосфатазної активності печеристої тканини та характеристика нативних СК описані у попередніх публікаціях [17, 18]. Ізометрична сила скорочування смужок печеристої тка-

нини у відповідь на електричний імпульс (напруга – 50 В, тривалість – 10 с, частотний діапазон – 1–32 Гц) визначали за стандартною методикою.

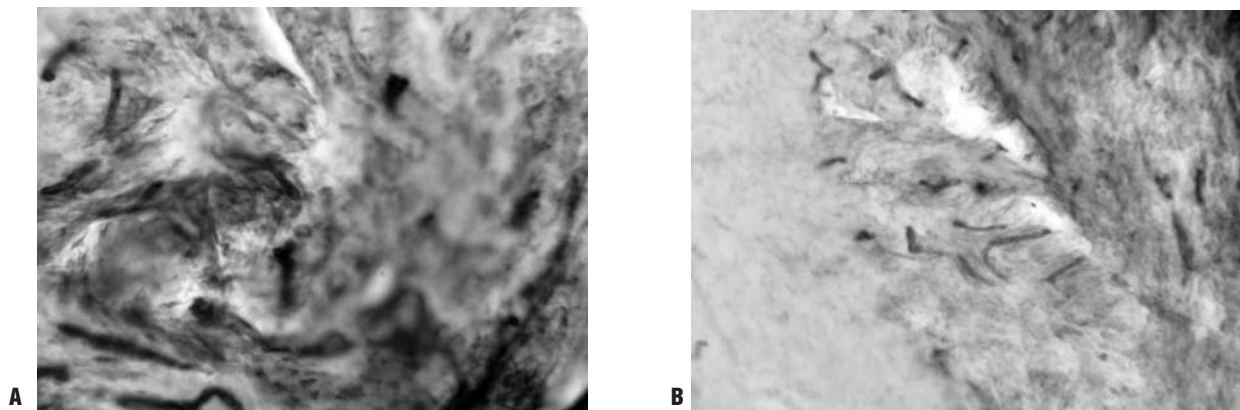
Для модифікації адгезивних властивостей нативні СК експонувалися у спеціальному середовищі, що містило молекули SYT1/SYT2.

Статистичне оброблення достовірності міжгрупових розбіжностей за медіанними значеннями амплітуди скорочень та інтенсивності забарвлення визначали за критерієм Вілкоксона. Рівень значущості був рівним 0,05.

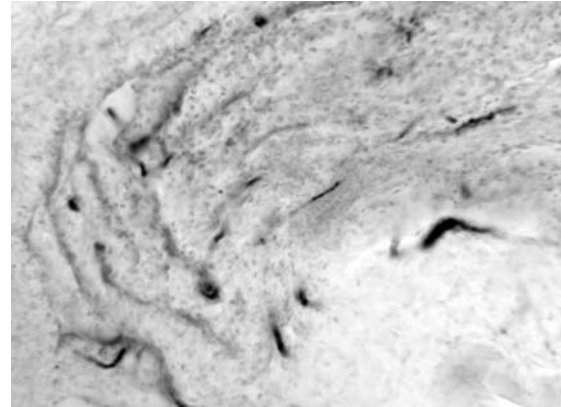
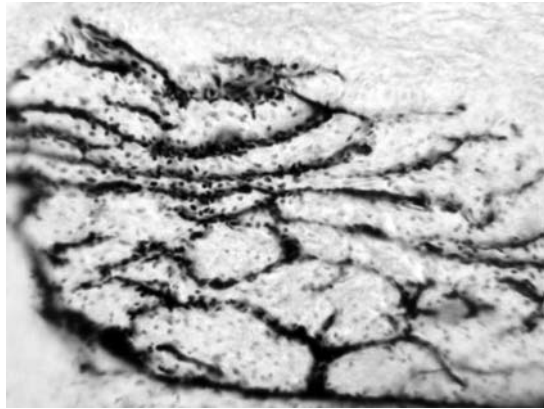
**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

До початку проведення ІКІ обидві групи тварин були співставні за віком та рівнем глікемії (таблиця).

У ході дослідів з електростимуляцією було встановлено, що смужки кавернозної тканини, отримані від гіперглікемічних



**Мал. 2 Активність АТФ-ази у печеристій тканині щура: А – від гіперглікемічного щура-самця № 3А, що отримав чотири ІКІ СК-м-SYT1/SYT2 (інтенсивне і рівномірне накопичення барвника у зоні ендотеліальної вистилки); В – від гіперглікемічного щура-самця № 5В, що отримав чотири ІКІ нативних СК (низькоінтенсивне вогнищеве депонування барвника). Методика Вахштейна та Майзела. 36. ×200**



**Мал. 3. Активність ЛФ у печеристій тканині щура: А – від гіперглікемічного щура-самця № 3А, що отримав чотири ІКІ СКмSYT1/SYT2 (інтенсивне і рівномірне накопичення барвника у зоні ендотеліальної вистилки); В – від гіперглікемічного щура-самця № 5В, що отримав чотири ІКІ нативних СК (низькоінтенсивне вогнищеве депонування барвника). Методика Гоморі. 3б.  $\times 200$**

щурів-самців лінії Вістар, яким вводили СК-м-SYT1/SYT2, регували на дію електричного струму скороченнями більшої амплітуди, ніж смужки від тварин, яким вводили нативні МСК (мал. 1).

Тест Вілкоксона підтвердив, що розбіжності між групами за медіанними значеннями амплітуди скорочення (див. таблицю) мали не випадковий характер.

У попередній роботі [17] було встановлено, що для інтактної печеристої тканини притаманна висока активність ЛФ та АТФ-ази, що визначається переважно в ендотеліальних клітинах (ендотеліальна вистилка синусів та капілярів суцільно фарбується у темно-коричневий колір). Гіперглікемія знижує активність АТФ-ази та ЛФ, що визначається за нерівномірністю відкладання барвника та зниження інтенсивності забарвлення.

По закінченні курсу ІКІ у групі тварин, яким трансплантували МСК-м-SYT1/SYT2, реєструвалося достовірно більш виражене відновлення активності обох ферментів, порівняно з групою, якій вводили нативні клітини. Зокрема, Ме інтенсивності забарвлення на ЛФ та АТФ-азу у групі А були в 1,6 разу вищими, ніж у групі В.

Аналіз змін рівня глікемії в обох групах до та після трансплантації не виявив статистично достовірного впливу з боку як модифікованих, так і нативних СК на цей показник.

Отже, зареєстровані ефекти – більш виражене відновлення скоротливої здатності та фосфатазної активності печеристої тканини у групі, в якій застосовували СК-м-SYT1/SYT2, порівняно з групою, в якій використовували нативні СК, свідчать про те, що включення у мембрану стовбурових клітин молекул SYT1 та SYT2 за допомогою спеціальних векторів посилює їхню здатність фіксуватися до субендотеліаль-

ного матрикусу. Необхідні подальші дослідження процесів диференціювання модифікованих СК в інтактній та патологічно зміненій печеристій тканині статевого члена.

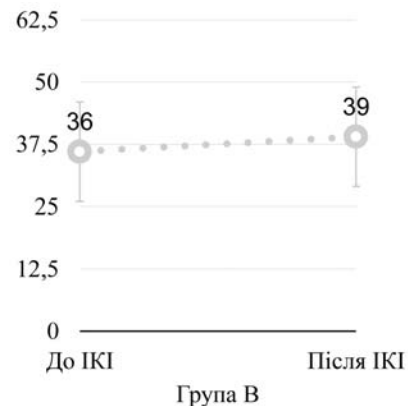
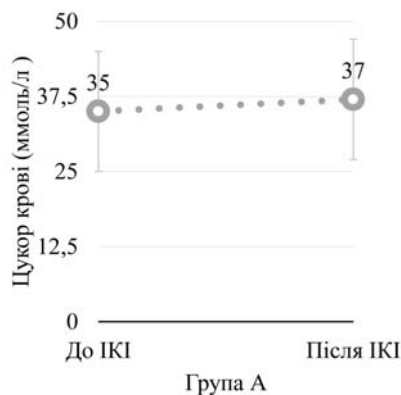
### ВИСНОВКИ

1. Модифікація адгезивних властивостей стовбурових клітин (СК) за допомогою молекул SYT1/SYT2, посилює їхню здатність відновлювати скоротливу активність печеристої тканини щурів-самців лінії Вістар, uszkodженої внаслідок гіперглікемії: медіана амплітуди скорочень СК-м-SYT1/SYT2, була у 1,6 разу більше ( $p < 0,05$ , критерій Вілкоксона), ніж у групі, де використовували нативні СК.

2. Модифікація адгезивних властивостей СК за допомогою молекул SYT1/SYT2 посилює їхню здатність відновлювати фосфатазну активність печеристої тканини щурів-самців лінії Вістар, uszkodженої внаслідок гіперглікемії: медіана інтенсивності забарвлення за АТФ-азою та ЛФ патогістологічних препаратів кавернозної тканини від тварин, яким трансплантували СК-м-SYT1/SYT2, була на 2 та 1 бали більшою ( $p < 0,05$ , критерій Вілкоксона), ніж у групі, де використовували нативні СК.

3. Інтракавернозна трансплантація як модифікованих, так і нативних СК не призводить до корекції рівня глікемії у підслідних тварин, а отже вплив СК на печеристу тканину пов'язаний з їхніми паракринними ефектами.

4. Необхідні подальші дослідження процесів хоумінгу та диференціювання СК, модифікованих молекулами SYT1/SYT2, в інтактній та патологічно зміненій печеристій тканині *in vitro* та *in vivo*.



**Мал. 4. Динаміка гіперглікемії у досліджуваних групах**

**Интракавернозная трансплантация при эректильной дисфункции: модификация адгезивных свойств молекулами SYT1/SYT2 усиливает способность стволовых клеток восстанавливать сократительную и фосфатазную активность пещеристой ткани, поврежденной в результате гипергликемии**  
**И.И. Горпинченко, А.М. Сытенко**

**Intra-cavernous transplantation for treating erectile dysfunction: modification of the adhesive properties by SYT1 / SYT2 molecules enhances the ability of stem cells to restore the contractile and phosphatase activity of cavernous tissue damaged due to hyperglycemia**

**I. Gorpyuchenko, A. Sytenko**

**Цель исследования:** проверить предположение, что стволовые клетки (СК) с модифицированными адгезивными свойствами (СК-м SYT1/SYT2) должны более выражено, чем нативные СК, восстанавливать фосфатазную и сократительную активность пещеристой ткани, поврежденной в результате гипергликемии.

**Материалы и методы.** На двух группах (n=10; 1:1) половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой 160–180 г с индуцированной гипергликемией (>8 ммоль/л) проведено сравнительное исследование влияния четырех интракавернозных инъекций (1×10<sup>6</sup> клеток один раз в неделю) нативных СК и клеток с интегрированными в мембрану молекулами SYT1/SYT2 (СК-м-SYT1/SYT2), на сократительную и фосфатазную активность пещеристой ткани.

**Результаты.** Установлено, что по окончании интракавернозных инъекций (ИКИ) в группе животных, получивших СК-м-SYT1/SYT2, медиана амплитуды сокращений была в 1,6 раза больше (p<0,05, критерий Вилкоксона), а медианы интенсивности окраски на АТФ-азу и ЛФ соответственно на 2 и 1 баллов больше, чем в группе, где вводили нативные СК (p<0,05, критерий Вилкоксона). ИКИ нативных и модифицированных СК не влияли на уровень гликемии.

**Заключение.** Модификация адгезивных свойств СК молекулами SYT1/SYT2 повышает их способность восстанавливать сократительную и фосфатазную активность пещеристой ткани, поврежденной вследствие гипергликемии. Необходимы дальнейшие исследования процессов хоуминга и дифференцировки СК, модифицированных молекулами SYT1/SYT2, в интактной и патологически измененной пещеристой ткани in vitro и in vivo.

**Ключевые слова:** эректильная дисфункция, стволовые клетки, гипергликемия, интракавернозная трансплантация, пещеристая ткань, сократительная активность, фосфатазная активность.

**The objective:** check the assumption that stem cells with modified adhesive properties (SC-m SYT1/SYT2) should be more pronounced than native SCs, restore the phosphatase and contractile activity of cavernous tissue damaged by hyperglycemia.

**Materials and methods.** A comparative study of the effect on the contractile and phosphate activity of the cavernous tissue of four intracavernous injections (ICI) (1×10<sup>6</sup> cells once a week) of native stem cells (SC) and cells, with SYT1/SYT2 molecules, integrated into the cell membrane (SC-m-SYT1/SYT2), was performed in two groups (n=10; 1:1) of sexually mature Wistar rats weighing 160-180 g with induced hyperglycemia (>8 mmol/L).

**Results.** It was found that, at the end of the ICI in the group of animals receiving SC-m-SYT1/SYT2, the median amplitude of contractions was 1.6 times greater (p<0,05, Wilcoxon's test), and the intensity mediants for ATPase and LF, respectively, 2 and 1 points greater than in the group where native SCs were introduced (p<0,05, Wilcoxon's test). ICI of native and modified SC did not affect the level of glycemia.

**Conclusions.** Modification of the adhesive properties of SC by SYT1/SYT2 molecules increases their ability to restore contractile and phosphatase activity of cavernous tissue damaged by hyperglycemia. Further research is needed on the processes of homing and differentiation of SC, modified with SYT1 / SYT2 molecules, in intact and pathologically altered cavernous tissue in vitro and in vivo.

**Key words:** erectile dysfunction, stem cells, hyperglycemia, intracavernous transplantation, cavernous tissue, contractile activity, phosphatase activity.

**Сведения об авторах**

Горпинченко Игорь Иванович – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. В. Винниченко, 9а

Сытенко Андрей Михайлович – ГУ «Институт урологии НАМН Украины», 04053, г. Киев, ул. В. Винниченко, 9а.

E-mail: andrew.sytenko@gmail.com

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Capogrosso P., Colicchia M, Ventimiglia E, Castagna G, Clementi MC, Suardi N, Castiglione F, Briganti A, Cantello F, Damiano R, Montorsi F, Salonia A. One patient out of four with newly diagnosed erectile dysfunction is a young man—worrisome picture from the everyday clinical practice. //J Sex Med. 2013 Jul;10(7):1833-41.
2. Emanu J.C., Avildsen I.K., Nelson C.J. Erectile dysfunction after radical prostatectomy: prevalence, medical treatments, and psychosocial interventions//Curr Opin Support Palliat Care. 2016 Mar; 10(1): 102–107.
3. Mourikis I., Antoniou M., Matsouka E., Voursora E., Tzavara C., Chrysa Ekizoglou, Papadimitriou G.N., Vaidakis N., Zervas I.M. Anxiety and depression among Greek men with primary erectile dysfunction and premature ejaculation// Ann Gen Psychiatry. 2015; 14: 34.
4. Hatzimouratidis K., Hatzichristou D. Phosphodiesterase type 5 inhibitors: unmet needs. // Curr. Pharm. Des. 2009; 15(30): 3476-85.
5. Jiann B.P., Yu C.C., Su C.C., Tsai J.Y. Compliance of sildenafil treatment for erectile dysfunction and factors affecting it.// Int J Impot Res. 2006 Mar-Apr;18(2):146-9.
6. Kwon E.B., Lee J.Y., Piao S., Kim I.G., Ra J.C., Lee J.Y. Comparison of human muscle-derived stem cells and human adipose-derived stem cells in neurogenic trans-differentiation// – Korean J Urol. 2011. – 52(12). – 852-857.
7. Lin G., Banie L., Ning H., Bella A.J., Lin C.S., Lue T.F. Potential of adipose-derived stem cells for treatment of erectile dysfunction// J. Sex Med.- 2009. -6 Suppl 3:320-327.
8. Ning H., Liu G., Lin G., Yang R., Lue T.F., Lin C.S. Fibroblast growth factor 2 promotes endothelial differentiation of adipose tissue-derived stem cells// J. Sex. Med.- 2009. -6(4). P. 967-979.
9. Gholami S.S., Rogers R., Chang J., Ho H.C., Graziottin T., Lin C.S., Lue T.F. The effect of vascular endothelial growth factor and adeno-associated virus mediated brain derived neurotrophic factor on neurogenic and vasculogenic erectile dysfunction induced by hyperlipidemia// J. Urol. – 200. – 3;169. – P.1577-1581.
10. Hristov M., Weber C. Endothelial pro-

11. Vasa M., Fichtlscherer S., Aicher A., Adler K., Urbich C., Martin H. Zeiher A.M., Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease.// Circ Res 2001;89:E1–7.
12. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms.// Circ Res 2004;94:678–685.
13. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. Circulation 2005;112:214–223.
14. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhauser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. Stem Cells 2004;22:377–384.
15. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002;13:4279–4295.
16. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Drago J, Ashjian P, Thomas//J Am Coll Cardiol. – 2005. – 45:982–988.
17. Горпинченко І.І., Ситенко А.М., Бухтіарова Т.А., Ядловський О.Є., Матвієнко А.В., Попандопуло А.Г., Кавеліна А.С. Вплив інтракавернозних ін'єкцій кісткомозкових мезенхімальних стовбурових клітин на морфологію та фосфатазну активність пещеристої тканини щурів-самців із стретозоточиніндукованим цукровим діабетом //Здоров'я чоловіки, № 4 (47), 2013, – С. 142-145.
18. Пат. № 98906 UA, МПК С12Q 1/42, G01N 33/50 (2006.01). Спосіб оцінки стану ендотелію пещеристої тканини статевого члена /Горпинченко І.І., Ситенко А.М., Ядловський О.Є., Матвієнко А.В. (UA); ДУ «ІНАМНУ», ДУ «ІФТНАМНУ» (UA); № u201412923, 03.12.2014; Опуб. 12.05.2015, Бюл. № 9.

Статья поступила в редакцию 20.12.17