

DYNAMICS OF CD163+ MONOCYTE-MACROPHAGE CELLS IN THE RAT TESTICULAR INTERSTITIUM DURING ONE-YEAR ADMINISTRATION OF TRIPTORELIN WITH QUERCETIN

Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

Stetsuk78@gmail.com

The article examines changes in the quantitative index of cells of the monocyte-macrophage lineage in the connective tissue of the testis expressing CD163+ receptors during chemical castration with triptorelin over a one-year observation period with the addition of quercetin. In our study, we carefully traced the dynamics of the population of specific CD163+ macrophages in the testicular interstitium under conditions of triptorelin-induced chemical castration. These findings contribute to a better understanding of how the organ's immune system responds to profound hormonal alterations. Based on the performed morphometric and immunohistochemical analysis, it was established that prolonged administration of triptorelin leads to chronic immunoinflammatory remodeling of the testis. The accumulation of CD163+ macrophages represents a key link in the mechanism of replacement of the functional tissue of the organ with connective tissue, which ultimately results in an irreversible decline in reproductive potential in the experimental model. Administration of triptorelin combined with the addition of quercetin to the diet of experimental rats results in a stable and progressive increase in the population of CD163+ macrophages in the connective tissue of the testis throughout the entire one-year period. The dynamics demonstrate a nonlinear pattern, with acceleration observed between the 3rd and 6th months (days 90-180). The total increase in the indicator by day 365 reached 213.41% relative to the baseline level.

Key words: male reproductive system, testes, macrophages, CD163+, M1/M2, microscopic changes, immunohistochemical analysis, triptorelin, quercetin, fibrosis.

Connection of the publication with planned research works.

The study is a fragment of the research project “Experimental morphological study of the effects of Diphereline and cryopreserved placental transplants on the morphofunctional state of a number of internal organs,” state registration number 0124U003358.

Introduction.

Macrophages are not merely isolated defensive cells but rather an extensive homeostatic system integrated into all mammalian tissues from the embryonic period. They may be considered a dispersed organ that functions in parallel with the nervous and endocrine systems. In addition to classical antimicrobial defense, macrophages perform critical trophic, regulatory, and regenerative functions, clearing tissues of apoptotic cells and modulating metabolic responses, including the regulation of plasma protein biosynthesis in the liver [1].

Within the context of the male reproductive system, macrophages act as “guardians of fertility.” Since spermatozoa appear only during puberty, the immune system may recognize them as foreign entities. Testicular macrophages form a protective barrier by releasing specific molecules that restrain aggressive immune responses, thereby maintaining the so-called immune privilege of the testis [2].

Modern immunology has largely abandoned the simplified classification of macrophages into pro-inflammatory (M1) and anti-inflammatory (M2) types. In testicular tissue, these cells exist along a continuous functional spectrum, and the marker CD163+ cannot be considered an absolute indicator. Its expression density may vary, yet it often remains relatively stable even when the functional state of the cell changes [3, 4].

For accurate assessment, extended marker panels should be evaluated, including stimulatory markers (CD40, CD80, CD86) and inhibitory markers (CD206,

CD204, Arg1). In addition, metabolic reprogramming, particularly the shift from oxidative phosphorylation to glycolysis, is considered a more reliable indicator of macrophage activation than the expression of surface antigens alone [5, 6].

From the earliest stages of life, the human immune system learns to distinguish self-cells from potentially pathogenic foreign cells. However, in males, because spermatozoa appear only during sexual maturation, certain elements of the immune system may mistakenly identify them as foreign. Testicular macrophages are specialized immune cells that protect spermatozoa by releasing regulatory molecules that prevent other immune components from attacking germ cells and entering the testicular environment [7].

The functional state of macrophages is best defined by their behavior rather than phenotype alone. One of the key processes is efferocytosis, the ability to engulf apoptotic spermatogenic cells without triggering inflammation [8]. Another crucial aspect is their interaction with Leydig cells: when macrophages shift toward a pro-inflammatory state, they begin to suppress testosterone synthesis [9]. In chronic pathological conditions, such as orchitis, a functional drift may occur, in which resident macrophages start expressing activation markers (e.g., CD86), thereby promoting the development of autoimmune damage to the testis.

The traditional view of macrophage phenotype stability is currently being reconsidered. The decisive factor is not merely the presence of a specific marker (such as CD163), but the actual functional behavior of the cell. A shift of macrophages toward a pro-inflammatory state is accompanied by a “metabolic burst,” characterized by a transition from energy-efficient oxidative phosphorylation to glycolysis. This biochemical switch represents a more accurate indicator of aggressive cellular activation than changes in surface antigens alone. When mac-

rophages shift toward the pro-inflammatory spectrum, they begin to exert a negative effect on neighboring Leydig cells. Even with preserved CD163 expression, such activated macrophages may suppress testosterone biosynthesis, thereby creating conditions for the development of inflammation-associated hypogonadism [10].

The aim of the study.

To investigate the dynamics of the quantitative index of cells of the monocyte-macrophage lineage in the connective tissue of the testis expressing CD163+ receptors following triptorelin administration for one year with the addition of quercetin.

Object and research methods.

The experiments were conducted on 35 sexually mature male white rats. The animals were divided into two groups. The first group (control) consisted of 5 animals that received subcutaneous injections of 0.9% sodium chloride solution once every three months throughout the entire experimental period. The second group (experimental) consisted of 10 animals in which central suppression of luteinizing hormone synthesis was modeled [11, 12]. These animals received subcutaneous injections of triptorelin at a dose of 0.3 mg/kg of the active substance once every three months for one year. In addition, quercetin solution was administered enterally via a gastric tube, taking into account the body weight and weight gain of the animals. All manipulations involving laboratory animals were performed in strict accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Euthanasia of the animals was carried out by overdose of ether anesthesia.

Small fragments of the testes were fixed according to standard protocols and embedded in paraffin blocks. Sections 4 μm thick were prepared from these blocks and stained with hematoxylin and eosin [13] as well as with the Anti-CD163 antibody (Abcam).

Immunocytochemical staining for CD163 was performed using the rabbit Anti-CD163 antibody (ab87099), previously validated in PMA-treated THP1 cells. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (10 min) at room temperature and incubated with PBS containing 10% goat serum, 0.3 M glycine, 1% BSA, and 0.1% Triton for 1 hour at room temperature to ensure cell permeabilization and to block nonspecific protein-protein interactions. The cells were then incubated with antibody ab87099 at a concentration of 5 μg/mL and ab7291 diluted 1:1000 overnight at +4°C. Secondary antibodies included ab150081 (goat anti-rabbit IgG, pre-adsorbed) and ab150120 (goat polyclonal secondary antibody against mouse IgG H&L, pre-adsorbed), both used at a dilution of 1:1000 for 1 hour at room temperature. DAPI at a concentration of 1.43 μM was used for nuclear staining for 1 hour at room temperature.

The study protocol was approved by the Bioethics Committee of Poltava State Medical University (Protocol No. 195, dated June 24, 2021).

Comprehensive examination of the histological samples was performed using a BIOREX-3 light microscope (No. 5605). Quantitative cell counting was conducted in microscopic fields by visual assessment using a light microscope equipped with a digital microfilter and specialized software adapted for this study. Microphotography was carried out using a DCM 900 digital microcamera with appropriate imaging software.

Statistical processing of the obtained data was performed using Microsoft Excel with the Real Statistics 2019 add-in.

Research results and their discussion.

Examination of semithin sections of rat testes throughout the one-year experimental period demonstrated a progressive increase in the population of macrophages expressing CD163+ receptors in the connective tissue of the testis during the entire duration of triptorelin administration (table).

Table – Dynamics of the quantitative index of cells of the monocyte–macrophage lineage in the connective tissue of the testis expressing CD163+ receptors during triptorelin administration with the addition of quercetin

Period	CD 163+	% to control	% to previous period
control	9.02±0.872	-	-
30th day	10.92±1.332	+21.06	+21.06
90th day	13.33±1.119	+47.78	+22.07
180th day	18.81±2.129	+108.54	+41.11
270th day	21.65±2.781	+140.02	+15.10
365th day	28.27±1.459	+213.41	+30.58

After analyzing the dynamics of CD163+ macrophage expression in the connective tissue of the testis, structured according to the observation periods, we identified three stages in the formation of the immune cell response during triptorelin-induced chemical castration (fig., table).

1. *Early period* (days 30-90 of the experiment). During the first month of the experiment (day 30), the number of CD163+-positive cells increased by 21.06% compared with the control group. By day 90, the upward trend persisted, and the indicator became 47.78% higher than the control level and 22.07% higher than the previous observation period.

These findings indicate a gradual involvement of the monocyte-macrophage system in the pathological process. The moderate rate of increase at this stage suggests the initial phase of adaptation of testicular tissues to hormonal imbalance.

2. *Period of active proliferation* (days 180-270 of the experiment). The most pronounced shift in the dynamics was observed on day 180, when the number of cells increased to 208.54% of the control value. The increase relative to day 90 was the highest recorded during the entire observation period, reaching 41.11%.

By day 270, the indicator continued to rise, reaching 140% relative to the control values.

Such a marked increase in the number of M2 phenotype macrophages (CD163+) in the middle of the experiment indicates activation of chronic inflammatory processes and the onset of intensive stromal remodeling of the organ, involving fibroblast-associated cellular components.

3. *Late period* (day 365 of the experiment). The number of positive cells reached its maximum value of 28.27±1.459 per field of view, which is 3.13 times higher than in intact animals. The increase relative to day 270 remained high (30.58%).

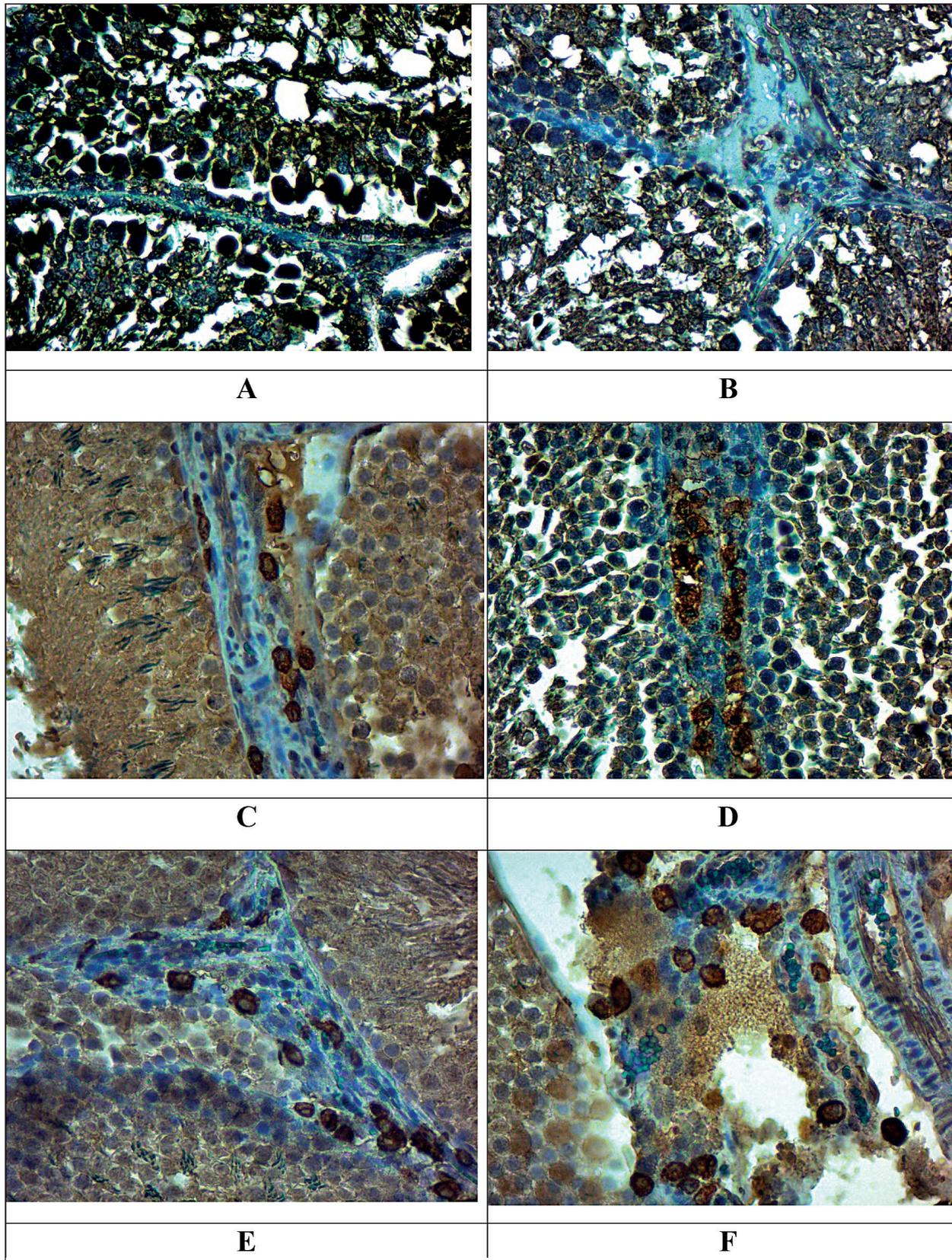


Figure – Expression of CD163+ cells of the monocyte–macrophage lineage in the connective tissue of the testis during triptorelin administration with the addition of quercetin: A – control; B – day 30; C – day 90; D – day 180; E – day 270; F – day 360. Magnification: $\times 400$.

The absence of a plateau in macrophage dynamics indicates the progressive nature of the observed changes. The testicular tissue remains in a state of profound structural remodeling, in which macrophages play a key regulatory role in fibrogenesis.

Macrophages were previously regarded as ordinary “scavengers” of bacteria (phagocytes). Today, however, science recognizes them as remarkably plastic cellular regulators that not only patrol the organism but also participate in controlling the “life and death” of tissues, from their embryonic development to processes of aging and fibrosis [14].

Beyond the traditional M1/M2 classification, macrophages were commonly divided into “harmful” (M1 – pro-inflammatory) and “beneficial” (M2 – reparative) cells. However, modern studies, particularly those using transcriptomic analysis, demonstrate that this model is overly simplified. Macrophages adapt to the specific microenvironment of each organ. They may originate either from embryonic progenitor cells or migrate from the bone marrow in adulthood, performing highly specialized functions depending on the physiological context [15].

In the context of male reproductive health, macrophages play a dual role:

1. Protective regulators. In acute injury, they initiate protective inflammatory cascades and subsequently activate anti-inflammatory pathways that promote tissue repair and regeneration.

2. Contributors to pathology. When macrophages remain in a state of chronic activation, normal regenerative processes are replaced by fibrosis, characterized by the substitution of functional tissue with connective tissue. This process represents a key mechanism in the development of chronic diseases [16].

Currently, researchers worldwide are exploring approaches to “reprogram” macrophages through adop-

tive cellular therapy in order to suppress inflammation and fibrotic remodeling. This approach is particularly relevant for addressing testosterone deficiency, a condition that is becoming increasingly prevalent.

In the present study, we carefully monitored changes in the population of specific CD163+ macrophages within the testicular interstitium under conditions of triptorelin-induced chemical castration. These findings provide a deeper understanding of how the immune system of the testis responds to profound hormonal alterations. Based on the performed morphometric and immunohistochemical analyses, it was established that long-term administration of triptorelin (up to 365 days) induces chronic immunoinflammatory remodeling of the testis. The accumulation of CD163+ macrophages represents a key mechanism in the replacement of functional testicular tissue with connective tissue, ultimately leading to an irreversible reduction in reproductive potential in the experimental model.

Conclusions.

Administration of triptorelin combined with dietary supplementation of quercetin in experimental rats results in a stable and progressive increase in the population of CD163+ macrophages in the connective tissue of the testis throughout the one-year experimental period. The dynamics demonstrate a nonlinear pattern, with acceleration observed between the 3rd and 6th months (days 90-180). The total increase in the indicator by day 365 reached 213.41% compared with the baseline level.

Prospects for further research.

Future studies may focus on investigating the interactions between macrophages, cells of the spermatogenic epithelium, and testosterone production by interstitial endocrinocytes, which may contribute to the development of innovative therapeutic approaches for certain forms of male infertility.

DOI 29254/2077-4214-2026-1-180-451-459

УДК 616.63:477 + 175.67:599.433/544.65

Стецук Є. В., Шепітько В. І., Білаш С. М., Борута Н. В.,
Вільхова О. В., Лисаченко О. Д., Волошина О. В.

ДИНАМІКА КІЛЬКОСТІ CD 163+ КЛІТИН МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО РЯДУ ІНТЕРСТИЦІЮ СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ТРИПТОРЕЛІНУ З ДОДАВАННЯМ КВЕРЦЕТИНУ ПРОТЯГОМ 1 РОКУ

Полтавський державний медичний університет (м. Полтава, Україна)

Stetsuk78@gmail.com

У статті розглядається зміна кількісного показника клітин моноцитарно-макрофагального ряду сполучної тканини яєчка за рецепторами CD163+ при хімічній кастрації триптореліном протягом 1 року спостереження з додаванням кверцетину. В нашому спостереженні ми детально простежили, як змінюється популяція специфічних CD 163+ макрофагів в інтерстиції сім'яника в умовах хімічної кастрації триптореліном. Ці дані допомагають краще зрозуміти, як саме імунна система органа реагує на глибокі гормональні зміни. На підставі проведеного морфометричного та імуногістохімічного аналізу встановлено, що тривале введення триптореліну спричиняє хронічну імунозапальну перебудову яєчка. Акумуляція CD163+ макрофагів є ключовим ланцюгом у механізмі заміщення функціональної тканини органа сполучною, що призводить до незворотного зниження репродуктивного потенціалу в експериментальній моделі. Введення триптореліну з додавання в раціон харчування експериментальних щурів кверцетину призводить до стабільного, прогресуючого збільшення популяції CD163+ макрофагів у сполучній тканині яєчка протягом усього річного циклу. Динаміка має нелінійний характер із прискоренням у період між 3-м та 6-м місяцями (90-180 доби). Сумарне збільшення показника на 365-ту добу складає 213,41% відносно вихідного рівня.

Ключові слова: чоловіча статева система, сім'яники, макрофаги, CD163+, M1/M2, мікроскопічні зміни, імуногістохімічні дослідження, трипторелін, кверцетин, фіброз.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом НДР «Експериментально морфологічне вивчення впливу дифереліну, кріоконсервованих трансплантатів плаценти на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів», номер державної реєстрації 0124U003358.

Вступ.

Макрофаги – це не просто поодинокі захисні клітини, а розгалужена гомеостатична система, що інтегрована в усі тканини ссавців ще з ембріонального періоду. Їх можна розглядати як дисперсний орган, що функціонує паралельно з нервовою та ендокринною системами. Окрім класичного захисту від мікробів, вони виконують критичні трофічні, регуляторні та регенеративні функції, очищуючи тканини від апоптотичних клітин і модулюючи метаболічні відповіді (наприклад, біосинтез білків плазми в печінці) [1].

В контексті чоловічої репродуктивної системи макрофаги виступають «охоронцями фертильності». Оскільки сперматозоїди з'являються лише в пубертаті, імунна система може ідентифікувати їх як чужорідні об'єкти. Тестикулярні макрофаги створюють захисний бар'єр, вивільняючи специфічні молекули, які стримують агресивні імунні реакції, забезпечуючи так званий імунний привілей [2].

Сучасна імунологія відмовилася від спрощеного поділу макрофагів на прозапальні (M1) та протизапальні (M2). У тканинах сім'яника ці клітини існують у вигляді безперервного спектра: маркер CD163+ не є абсолютним показником. Його щільність може змінюватися, але він часто залишається стабільним навіть при зміні функціонального стану [3, 4].

Для точної діагностики необхідно оцінювати розширені панелі: стимулюючі (CD40, CD80, CD86) та інгібуючі (CD206, CD204, Arg1) маркери. Метаболічний зсув: перехід клітини з окисного фосфорилування на гліколіз є значно надійнішим індикатором активації, ніж поверхневі антигени [5, 6].

З самого початку життя імунна система людини вчиться розрізняти власні, тобто рідні клітини, від інших, потенційно патогенних клітин. Але у чоловіків, оскільки сперматозоїди з'являються лише в період статевого дозрівання, певні елементи імунної системи можуть помилково сприйняти їх за чужорідні клітини. Тестикулярні макрофаги – це спеціальні імунні клітини, які поспішають захищати сперматозоїди. Вивільняючи специфічні молекули, ці охоронці фертильності запобігають потраплянню інших агентів імунної системи в яєчка [7].

Стан макрофагів найкраще визначається їхньою поведінкою, а не лише фенотипом. Ключовими аспектами є ефероцитоз, це здатність поглинати загинбі клітини сперматогенезу без провокації запалення [8]. Взаємодія з клітинами Лейдига – при зміщенні макрофага у прозапальну зону він починає пригнічувати синтез тестостерону [9]. При хронічних патологіях (наприклад, орхітах) спостерігається «функціональний дрейф», коли резидентні клітини починають експресувати маркери активації (наприклад, CD86), що відкриває шлях до аутоімунного ураження яєчка.

Традиційний погляд на стабільність фенотипу макрофагів сьогодні переглядається. Ключовим є не наявність певного маркера (наприклад, CD163), а реальна функціональна поведінка клітини. Зсув макрофага у прозапальний стан супроводжується «метаболічним вибухом» – переходом від енергоефективного окисного фосфорилування до гліколізу. Цей біохімічний перемикач є значно точнішим індикатором агресивної активації клітини, ніж проста зміна поверхневих антигенів. При зміщенні макрофага у прозапальну зону спектра він починає чинити негативний вплив на сусідні клітини Лейдига. Навіть при збереженні експресії CD163, такі активовані макрофаги починають пригнічувати біосинтез тестостерону, що створює підґрунтя для розвитку гіпогонадизму на тлі запалення [10].

Мета дослідження.

Дослідити динаміку кількісного показника клітин моноцитарно-макрофагального ряду сполучної тканини яєчка за рецепторами CD163+ при введенні триптореліну протягом 1 року з додаванням кверцетину.

Об'єкт і методи дослідження.

Експерименти проводилися на 35 статевозрілих білих щурах-самцях. Тварин розділили на 2 групи. Перша група з 5 тварин (контрольна) протягом усього експериментального періоду отримувала підшкірні ін'єкції 0,9% розчину хлориду натрію раз на три місяці. Друга група з 10 тварин (експериментальна), в якій моделювали центральне блокування синтезу лютеїнізуючого гормону [11, 12], отримувала підшкірні ін'єкції триптореліну в дозі 0,3 мг/кг активного компонента протягом одного року раз в три місяці. Також додавали ентерально за допомогою зонду розчин кверцетину з урахуванням маси тіла та приросту тварин. Всі маніпуляції з лабораторними тваринами проводилися в суворій відповідності до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Евтаназію тварин проводили шляхом передозування ефірним наркотом.

Невеликі шматочки яєчок фіксували за загальноприйнятою методикою і заливали в парафінові блоки. З цих блоків виготовляли зрізи товщиною 4 мкм і фарбували гематоксиліном та еозином [13], антитілом Anti-CD163 – Abcam.

Імуноцитохімічне фарбування CD163 з використанням кролячого антитіла Anti-CD163 ab87099, забарвленого в клітинах THP1, оброблених PMA. Клітини фіксували 4% параформальдегідом (10 хв) при кімнатній температурі та інкубували з PBS, що містить 10% козячої сироватки, 0,3 М гліцину, 1% BSA та 0,1% Triton протягом 1 години при кімнатній температурі для проникнення клітин та блокування неспецифічних взаємодій білок-білок. Потім клітини інкубували з антитілом ab87099 у концентрації 5 мкг/мл і ab7291, розведеним у пропорції 1/1000, протягом ночі при +4°C. Вторинними антитілами були ab150081, козяче антитіло до кролячого IgG, попередньо адсорбоване, та ab150120, козяче поліклональне вторинне

антитіло до мишачого IgG – H&L, попередньо адсорбоване, обидва використовувалися в розведенні 1/1000 протягом 1 години при кімнатній температурі. Для фарбування ядер клітин використовували DAPI в концентрації 1,43 мкМ протягом 1 години при кімнатній температурі.

Дослідження було схвалено та підтверджено Комітетом з біоетики Полтавського державного медичного університету (протокол № 195 від 24.06.2021 р.).

Комплексне дослідження гістологічних зразків проводилося за допомогою світлового мікроскопа BIOREX – 3 № 5605. Кількісний підрахунок клітин проводився в полях зору, шляхом візуальної оцінки, за допомогою світлового мікроскопа з цифровим мікрофільтром та програмним забезпеченням, адаптованим для цих досліджень. Мікрофотографування проводилося за допомогою цифрової мікрофотонасадки DCM 900, із застосуванням відповідного до цього дослідження програмного забезпечення.

Результати дослідження були статистично опрацьовані за допомогою Excel Microsoft Office та розширення Real Statistics 2019.

Результати дослідження та їх обговорення.

При дослідженні нами напівтонких зрізів сім'яників щурів протягом 1-го року експерименту показав прогресуюче збільшення популяції макрофагів із рецепторами CD163+ у сполучній тканині яєчка на тлі введення триптореліну протягом усього терміну експерименту (табл.).

Таблиця – Динаміка кількісного показника клітин моноцитарно-макрофагального ряду сполучної тканини сім'яника за рецепторами CD163+ при введенні триптореліну з додаванням кверцетину

Терміни	CD 163+	% до контролю	% до попереднього терміну
контроль	9,02±0,872	-	-
30-та доба	10,92±1,332	+21,06	+21,06
90- та доба	13,33±1,119	+47,78	+22,07
180-та доба	18,81±2,129	+108,54	+41,11
270-та доба	21,65±2,781	+140,02	+15,10
365-та доба	28,27±1,459	+213,41	+30,58

Проаналізувавши показники змін в динаміці експресії CD163+ макрофагів у сполучній тканині яєчка, структурований за термінами спостереження ми виділили три етапи в формуванні відповіді імунотивних клітин при хімічній кастрації триптореліном (рис.) та таблиця.

1. *Ранній період* (30-90 доби експерименту). У перший місяць експерименту (30-та доба) кількість CD163+-позитивних клітин зростає до на 21,06% перевищує показники контрольної групи. На 90-ту добу тенденція до зростання зберігається, а показник стає на 47,78% вищим за контроль і відповідно 22,07% з попереднім терміном.

Це свідчить про поступове залучення моноцитарно-макрофагальної системи до патологічного процесу. Помірний темп приросту на цьому етапі вказує на початкову фазу адаптації тканин сім'яника до гормонального дисбалансу.

2. *Період активної проліферації* (180-270 доби експерименту.) Найбільш виражений перелом у динаміці спостерігається на 180-ту добу. Кількість клітин зростає до 208,54% від контролю. Приріст відносно 90-ї доби є максимальним за весь період дослідження – 41,11%.

На 270-ту добу показник продовжує зростати до 140% відносно контрольних показників.

Таке стрімке збільшення кількості макрофагів M2-фенотипу (CD163+) у середині експерименту свідчить про активацію процесів хронічного запалення та початок інтенсивної перебудови строми органа з залученням фібробластичного осередку клітин.

3. *Пізній період* (365-та доба експерименту). Кількість позитивних клітин сягає свого максимуму 28,27±1,459 в полі зору. Це у 3,13 раза перевищує рівень інтактних тварин. Приріст відносно 270-ї доби залишається високим (30,58%).

Відсутність плато в динаміці макрофагальних клітин свідчить про прогресуючий характер змін. Тканина сім'яника перебуває у стані глибокої структурної перебудови, де макрофаги відіграють роль ключових регуляторів фіброгенезу.

Раніше ми сприймали макрофаги як звичайних «поглиначів» бактерій (фагоцитів). Сьогодні ж наука бачить у них неймовірно пластичних гравців, які не просто патрулюють організм, а буквально керують «життям і смертю» тканин: від їхнього зародження в ембріоні до процесів старіння та фіброзу [14].

Поза межами M1 та M2 ми звикли ділити макрофаги на «злих» (M1 – запалення) та «добрих» (M2 – відновлення). Проте сучасні дослідження (зокрема транскриптоміка) доводять: усе набагато складніше. Макрофаги адаптуються до конкретного органа. Вони можуть походити як із клітин-попередників ще з періоду ембріогенезу, так і «прибувати» з кісткового мозку вже у дорослому віці, виконуючи вузькоспеціалізовані завдання [15].

У контексті чоловічого репродуктивного здоров'я макрофаги виступають у двох ролях:

1. Рятувальники – при гострих травмах вони запускають захисні запальні каскади, а згодом – через протизапальні шляхи – латають пошкодження та стимулюють регенерацію.

2. Винуватці патології. Якщо макрофаги «зациклюються» у стані хронічної активації, замість нормального відновлення починається фіброз – заміщення функціональної тканини сполучною. Це прямий шлях до хронічних захворювань [16].

Сьогодні вчені всього світу шукають способи «перепрограмувати» ці клітини (адоптивна клітинна терапія), щоб зупинити запалення та фіброз. Це критично важливо для боротьби з дефіцитом тестостерону – проблемою, що стає дедалі поширенішою.

У нашому спостереженні ми детально простежили, як змінюється популяція специфічних CD 163+ макрофагів в інтерстиції яєчка в умовах хімічної кастрації триптореліном. Ці дані допомагають краще зрозуміти, як саме імунна система органа реагує на глибокі гормональні зміни. На підставі проведеного морфометричного та імуногістохімічного аналізу встановлено, що тривале (до 365 дів) введення триптореліну спричиняє хронічну імунотивну перебудову яєчка. Акумуляція CD163+ макрофагів є ключовим ланцюгом у механізмі заміщення функції-

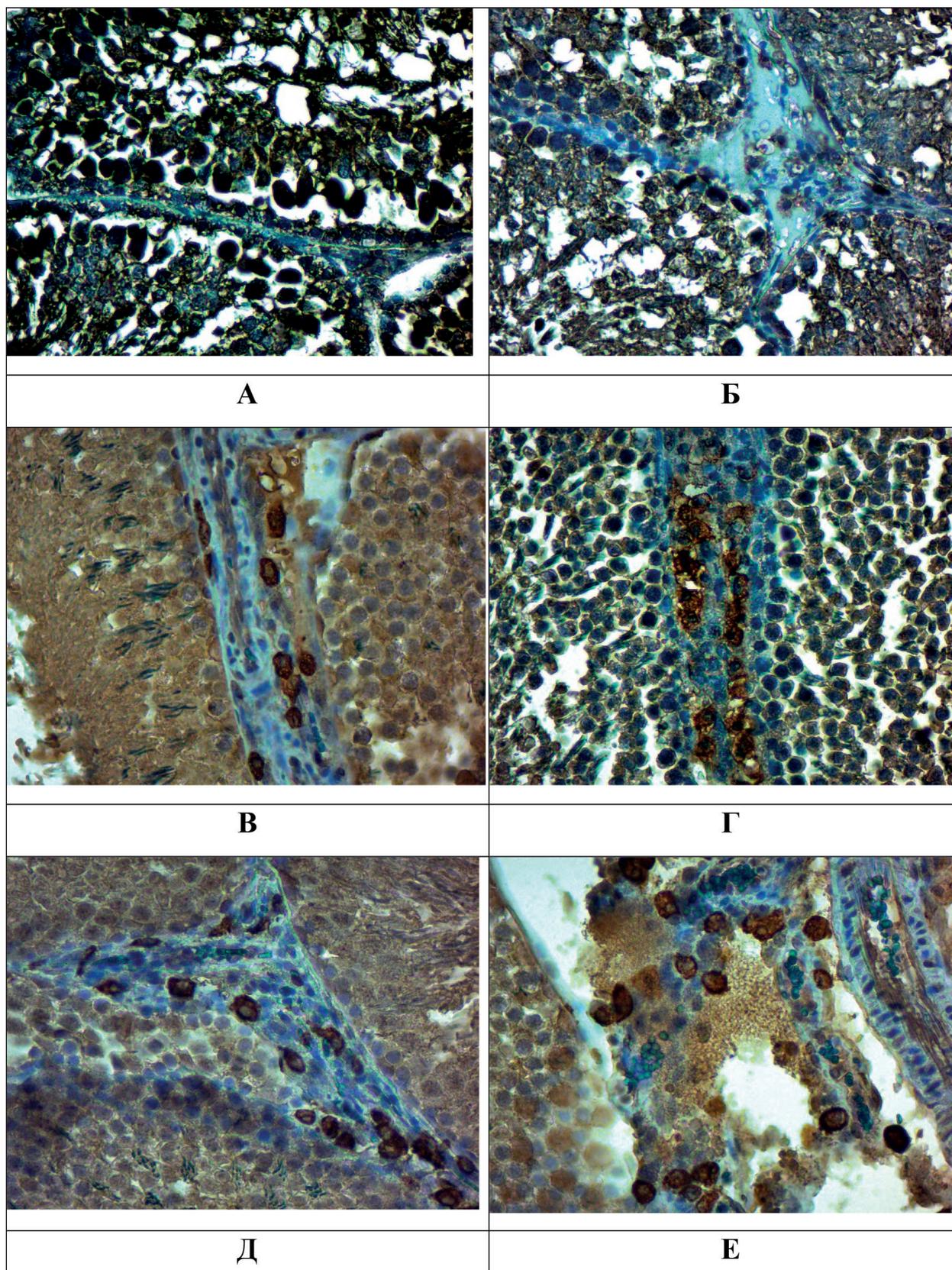


Рисунок – Експресія клітин CD163+ моноцитарно-макрофагального ряду сполучної тканини яєчка при введенні триптореліна з додаванням кверцетину: А – контроль, Б – 30-та доба, В – 90-та доба, Г – 180-та доба, Д – 270-та доба, Е – 360-та доба. Збільшення: x400.

ональної тканини органа сполучною, що призводить до незворотного зниження репродуктивного потенціалу в експериментальній моделі.

Висновки.

Введення триптореліну з додавання в раціон харчування експериментальних щурів кверцетину призводить до стабільного, прогресуючого збільшення популяції CD163+ макрофагів у сполучній тканині яєчка протягом усього річного циклу. Динаміка має нелінійний характер із прискоренням у період між

3-м та 6-м місяцями (90-180 доби). Сумарне збільшення показника на 365-ту добу складає 213,41% відносно вихідного рівня.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на взаємозв'язок між макрофагами, клітинами сперматогенного епітелію та виробленням тестостерону інтерстиційними ендокриноцитами, що може призвести до інноваційних методів в лікуванні певних видів чоловічого безпліддя.

References / Література

1. Wang M, Yang Y, Cansever D, Wang Y, Kantores C, Messiaen S, et al. Two populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult epididymis and testis. 2021;118(1):e2013686117. DOI: [10.1073/pnas.2013686117](https://doi.org/10.1073/pnas.2013686117).
2. Mossadegh-Keller N, Sieweke MH. Testicular macrophages: Guardians of fertility. Cell Immunol. 2018;330:120-125. DOI: [10.1016/j.cellimm.2018.03.009](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.03.009).
3. Likhachov VK, Vashchenko VL, Taranovska OO. Impact of preventive therapy on regulating mechanisms of decidual macrophage polarization in pregnant women with high risk of preeclampsia. Wiad Lek. 2021;74(9 cz 1):2123-2127.
4. Tkachenko IM, Dmytrenko MI, Cholovskiy MO, Korovina LD, Mamontova TV. Impregnation of oral mucosa over impacted teeth by subpopulations of macrophages M1 and M2. Wiad Lek. 2021;74(6):1451-1456.
5. Yemchenko YaO, Shynkevych VI, Ishcheikin KE, Kaidashev IP. PPAR-Gamma Agonist Pioglitazone Reduced CD68+ but Not CD163+ Macrophage Dermal Infiltration in Obese Psoriatic Patients. PP AR Res. 2020;2020:4548012.
6. Zelinka-Khobzey MM, Tarasenko KV, Mamontova TV, Shlykova OA. Characteristics of CD68+ and CD163+ expression in placenta of women with preeclampsia and obesity. Wiad Lek. 2021;74(9 cz 1):2152-2158.
7. Balgetir MK, Tektemur NK, Tektemur A, Türk G, Güngör İH, Cihangiroglu AC, et al. Determination of M1/M2 Macrophage Polarization in Ipsilateral and Contralateral Rat Testis Tissue Following Unilateral Torsion/Detorsion. Reprod Sci. 2024;31(7):2092-2102. DOI: [10.1007/s43032-024-01519-6](https://doi.org/10.1007/s43032-024-01519-6).
8. Tsai SJ, Li LH, Chen WJ, Huang EY, Huang CY, Brannigan RE, et al Prediction of microdissection testicular sperm extraction outcomes of azoospermic patients post-chemotherapy using cyclophosphamide equivalent dose. J Assist Reprod Genet. 2023;40(8):2013-2020. DOI: [10.1007/s10815-023-02870-4](https://doi.org/10.1007/s10815-023-02870-4).
9. Garza S, Chen L, Galano M, Cheung G, Sottas C, Li L, et al. Mitochondrial dynamics, Leydig cell function, and age-related testosterone deficiency. FASEB J. 2022;36(12):e22637. DOI: [10.1096/fj.202201026R](https://doi.org/10.1096/fj.202201026R).
10. Li S, Liu L, Luo G, Yuan Y, Hu D, Xiao F. The crosstalk between M1 macrophage polarization and energy metabolism disorder contributes to polystyrene nanoplastics-triggered testicular inflammation. Food Chem Toxicol. 2023;180:114002. DOI: [10.1016/j.fct.2023.114002](https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114002).
11. Botté MC, Lerrant Y, Lozach A, Bérault A, Counis R, Kottler ML. LH down-regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor, but not GnRH, mRNA levels in the rat testis. J Endocrinol. 1999;162(3):409-415. DOI: [10.1677/joe.0.1620409](https://doi.org/10.1677/joe.0.1620409).
12. Stetsuk YeV, Akimov OYe, Shepitko KV, Goltsev AN. Role of nitric oxide in development of fibrotic changes in rats' testes after 270 day central deprivation of testosterone synthesis. World of medicine and biology. 2020;73(3): 211-215. DOI: [10.26724/2079-8334-2020-3-73-211-215](https://doi.org/10.26724/2079-8334-2020-3-73-211-215).
13. Bahriy MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. Metodyky morfolohichnykh doslidzhen. Vinnytsya: Nova knyha; 2016. 328 s. [in Ukrainian].
14. Chung JY, Brown S, Chen H, Liu J, Papadopoulos V, Zirkin B. Effects of pharmacologically induced Leydig cell testosterone production on intratesticular testosterone and spermatogenesis. Biol Reprod. 2020;102(2):489-498. DOI: [10.1093/biolre/iox174](https://doi.org/10.1093/biolre/iox174).
15. Hotta Y, Kataoka T, Kimura K. Testosterone Deficiency and Endothelial Dysfunction: Nitric Oxide, Asymmetric Dimethylarginine, and Endothelial Progenitor Cells. Sex Med Rev. 2019;7(4):661-668. DOI: [10.1016/j.sxmr.2019.02.005](https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2019.02.005).
16. Zheng W, Zhang S, Jiang S, Huang Z, Chen X, Guo H, et al. Evaluation of immune status in testis and macrophage polarization associated with testicular damage in patients with nonobstructive azoospermia. Am J Reprod Immunol. 2021;86(5):e13481. DOI: [10.1111/aji.13481](https://doi.org/10.1111/aji.13481).

ДИНАМІКА КІЛЬКОСТІ CD 163+ КЛІТИН МОНОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО РЯДУ ІНТЕРСТИЦІЮ СІМ'ЯНИКІВ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ТРИПТОРЕЛІНУ З ДОДАВАННЯМ КВЕРЦЕТИНУ ПРОТЯГОМ 1 РОКУ

Стецук Є. В., Шепітько В. І., Білаш С. М., Борута Н. В., Вільхова О. В., Лисаченко О. Д., Волошина О. В.

Резюме. Макрофаги – це не просто поодинокі захисні клітини, а розгалужена гомеостатична система, що інтегрована в усі тканини ссавців ще з ембріонального періоду. Їх можна розглядати як дисперсний орган, що функціонує паралельно з нервовою та ендокринною системами. Метою дослідження було визначення динаміки змін кількісного показника клітин моноцитарно-макрофагального ряду сполучної тканини сім'яників щурів за рецепторами CD163+ при хімічній кастрації триптореліном протягом 1 року з додаванням кверцетину. Експеримент проведений на 35 статевозрілих білих щурах-самцях. Тварин було розділено на 2 групи. Перша група з 10 тварин (контрольна) отримувала підшкірні ін'єкції 0,9% розчину хлориду натрію протягом усього періоду експерименту. Друга група з 25 тварин (дослідна), у якій моделювали центральне блокування синтезу лютеїнізуючого гормону, отримувала підшкірні ін'єкції триптореліну в дозі 0,3 мг/кг + додавали ентерально кверцетин тричі на тиждень. Для іногістохімічного дослідження використовували антитіла Anti-CD163 від компанії Abscam. В нашому спостереженні ми детально простежили, як змінюється популяція специфічних CD 163+ макрофагів в інтерстиції сім'яника в умовах хімічної кастрації триптореліном. Ці дані допомагають краще зрозуміти, як саме імунна система органа реагує на глибокі гормональні зміни. На підставі проведеного морфометричного та імуногістохімічного аналізу встановлено, що тривале введення триптореліну спричиняє хронічну імунозапальну перебудову яєчка. Акумуляція CD163+ макрофагів є ключовим ланцюгом у механізмі заміщення функціональної тканини органа сполучною, що призводить до незворотного зниження репродуктивного потенціалу в експериментальній моделі. Введення триптореліну з додавання в раціон харчування експериментальних щурів кверцетину призводить до стабільного, прогресуючого збільшення популяції CD163+ макрофагів у сполучній тканині яєчка протягом усього річного циклу. Динаміка має нелінійний характер із прискоренням у період між 3-м та 6-м місяцями (90-180 доби). Сумарне збільшення показника на 365-ту добу складає 213,41% відносно вихідного рівня.

Ключові слова: чоловіча статева система, сім'яники, макрофаги, CD163+, M1/M2, мікроскопічні зміни, імуногістохімічні дослідження, трипторелін, кверцетин, фіброз.

DYNAMICS OF CD163+ MONOCYTE-MACROPHAGE CELLS IN THE RAT TESTICULAR INTERSTITIUM DURING ONE-YEAR ADMINISTRATION OF TRIPTORELIN WITH QUERCETIN

Stetsuk Ye. V., Shepitko V. I., Bilash S. M., Boruta N. V., Vilkhova O. V., Lysachenko O. D., Voloshyna O. V.

Abstract. Macrophages are not merely isolated defensive cells but rather an extensive homeostatic system integrated into all mammalian tissues from the embryonic period. They may be regarded as a dispersed organ functioning in parallel with the nervous and endocrine systems. The aim of the study was to determine the dynamics of changes in the quantitative index of monocyte-macrophage lineage cells in the connective tissue of the rat testes identified by CD163+ receptors during chemical castration with triptorelin for 1 year with the addition of quercetin. The experiment was conducted on 35 sexually mature white male rats. The animals were divided into two groups. The first group of 10 animals (control) received subcutaneous injections of 0.9% sodium chloride solution throughout the entire experimental period. The second group of 25 animals (experimental), in which central blockade of luteinizing hormone synthesis was modeled, received subcutaneous injections of triptorelin at a dose of 0.3 mg/kg, with quercetin additionally administered enterally three times per week. For the immunohistochemical study, Anti-CD163 antibodies from Abcam were used. In our observation, we traced in detail how the population of specific CD163+ macrophages in the testicular interstitium changes under conditions of chemical castration with triptorelin. These data help to better understand how the immune system of the organ responds to profound hormonal changes. Based on the performed morphometric and immunohistochemical analysis, it was established that prolonged administration of triptorelin causes chronic immunoinflammatory remodeling of the testis. The accumulation of CD163+ macrophages represents a key link in the mechanism of replacement of the functional tissue of the organ with connective tissue, leading to an irreversible decrease in reproductive potential in the experimental model. Administration of triptorelin in combination with dietary quercetin supplementation in experimental rats results in a stable, progressive increase in the population of CD163+ macrophages in the connective tissue of the testis throughout the entire annual cycle. The dynamics are nonlinear, with acceleration in the period between the 3rd and 6th months (days 90-180). The total increase of the parameter on day 365 amounts to 213.41% relative to the baseline level.

Key words: male reproductive system, testes, macrophages, CD163+, M1/M2, microscopic changes, immunohistochemical analysis, triptorelin, quercetin, fibrosis.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Stetsuk Ye. V.: <https://orcid.org/0000-0002-4239-2618>^{ABCDEF}

Shepitko V. I.: <https://orcid.org/0000-0001-5570-795X>^F

Bilash S. M.: <https://orcid.org/0000-0002-8351-6090>^C

Boruta N. V.: <https://orcid.org/0000-0002-9262-8967>^A

Vilkhova O. V.: <https://orcid.org/0000-0002-3371-9930>^E

Lysachenko O. D.: <https://orcid.org/0000-0001-8274-3008>^B

Voloshyna O. V.: <https://orcid.org/0000-0002-5291-0095>^B

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Stetsuk Yevhen Valeriovich Стецук Євген Валерійович

Poltava State Medical University / Полтавський державний медичний університет

Ukraine, 36024, Poltava, 23 Shevchenko str. / Україна, 36024, м. Полтава, вул. Шевченка 23

Tel. 0677576793 / Тел.: 0677576793

Email: Stetsuk78@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

This article is distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution (CC-BY) License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited © All authors, 2026 / Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Received 03.10.2025 / Стаття надійшла 03.10.2025 року

Accepted 02.03.2026 / Стаття прийнята до друку 02.03.2026 року

Published 27.03.2026 / Опубліковано 27.03.2026 року