

© Пивторак В.И., Смиуха А.А.  
УДК: 616.681-007.23: 616-092+611.165

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОСОБЕННОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КЛЕТОК СЕРТОЛИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВАРИКОЦЕЛЕ

*В.И. Пивторак, А.А. Смиуха*

Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова, г. Винница

**В работе установлены анатомические морфометрические особенности клеток Сертоли при моделировании варикоцеле и после его лечения. После моделирования варикоцеле периметр и диаметр клеток и их ядер достоверно уменьшались с увеличением сроков варикоцеле. После операции по Иванисевичу увеличивались показатели площади, периметра и диаметра клеток Сертоли и их ядер, однако недостаточно для нормализации их функции. Операция формирования межвенозных анастомозов с использованием микрососудистого метода дает лучшие результаты регенерации клеток Сертоли по сравнению с традиционными обструктивными операциями, поскольку она нормализует ядерно-цитоплазматическое соотношение и создает тем самым более благоприятные условия для восстановления сперматогенной функции.**

**Ключевые слова:** *яичко, варикоцеле, моделирование, лечение, клетки Сертоли.*

По данным различных литературных источников, от бесплодия в мире страдает около 50-100 млн. человек [3, 10], то есть одна из 5-7 пар репродуктивного возраста является бесплодной [1]. Варикоцеле является наиболее распространенной причиной мужского бесплодия [5, 8]. Понятие «репродуктивная функция» складывается в первую очередь из процесса формирования половых клеток. Причиной мужского бесплодия и снижения сперматогенной функции яичка являются острые и хронические расстройства кровообращения в нем, потому что развивающиеся половые клетки очень чувствительны к гипоксии [2, 7]. Собственно, сперматогенез происходит в извитых канальцах, выстланных клетками Сертоли и герминогенными клетками, окружёнными перитубулярными клетками и миоцитами. Основной функцией, выполняемой клетками Сертоли, является обеспечение развития половых клеток - сперматозоидов, кроме того

они формируют гематотестикулярный барьер за счёт плотных соединений между собой, выполняют опорную, трофическую, фагоцитарную функции [6].

В литературе дебатировались вопросы о степени эффективности оперативной коррекции варикоцеле, а также о влиянии этого заболевания на уровень сперматогенеза и фертильности мужчин.

Цель исследования: установить анатомические морфометрические особенности клеток Сертоли при моделировании варикоцеле и после его лечения.

### **Материалы и методы**

Экспериментальные исследования проведены на двадцати беспородных собаках-самцах, массой от 9 до 12 кг. На проведение эксперимента получено разрешение комиссии по биоэтике Винницкого национального медицинского университета им. Н.И. Пирогова (протокол № 1 от 13 января 2011), которой установлено, что проведенные исследования соответствуют

этическим и морально-правовым требованиям согласно приказу МЗО Украины № 281 от 01.11.2000 г.

При проведении исследований придерживались основных правил надлежащей лабораторной практики GLP (1981), закона Украины № 3447-IV «О защите животных от жестокого обращения» от 21 февраля 2006 г.

Собак распределили на контрольную и опытную группы. В контрольной группе животных двум беспородным собакам (контроль 1) никаких вмешательств не проводили; трем животным (контроль 2) под тиопенталовым наркозом проводили вскрытие брюшной полости, после чего послойно ушивали брюшную стенку и через 30 суток выполняли рассечение и ушивание левого пахового канала.

Животным опытной группы (пятнадцать собак) создавали модель варикоцеле. Моделирование варикоцеле проводили на беспородных собаках-самцах. Парентерально вводили гонадотропин 300 ед/кг и 0,2 мл 1% раствора прогестерона в течение 10-ти суток. На следующие сутки проводили срединную лапаротомию, накладывали лигатуру на левую почечную вену на 2/3 ее диаметра в месте между нижней полой и яичковыми венами. Введенным через почечную вену бужом разрушали клапаны яичковой вены. Рану послойно зашивали. Операцию проводили под тиопенталовым наркозом: внутриплеврально в области заднего угла правой лопатки вводили 2% раствор тиопентала натрия из расчета 1,5-2 мл на 1 кг массы тела животного (30-40 мг/кг). Для премедикации использовали внутримышечное введение 2% раствора димедрола из расчета 0,2 мл на 1 кг массы тела животного (3-5 мг/кг) и 2,5% раствора аминазина из расчета 0,2 мл на 1 кг (5-7,5 мг/кг).

Животных опытной группы разделили на три подгруппы. Животным первой подгруппы (пять собак) после создания модели варикоцеле никаких вмешательств не проводили. Животным второй опытной подгруппы (пять собак) через 30 суток после создания модели варикоцеле проводи-

ли хирургическое вмешательство по методике Иваниссевича. Операция выполнялась следующим образом. Проводился разрез кожи длиной 4 см. разрезался апоневроз наружной косой мышцы живота (длина разреза 2 см) по направлению волокон. Мышцы (внутренняя косая и поперечная) расслаивались над внутренним кольцом пахового канала. Варикозно расширенные яичковые вены находили между брюшной и мышечной стенкой. Яичковые вены пережимались двумя зажимами Кохера, перевязывались и пересекались.

Животным третьей опытной подгруппы (пять собак) через 30 суток после создания модели варикоцеле проводили оперативное вмешательство по собственной методике [4].

Формировали межвенозные анастомозы для улучшения оттока крови из гроздевидного сплетения. Паритетальную брюшину отводили медиально. Забрюшинно находили яичковую вену и глубокую вену, огибающую подвздошную кость, пересекали их таким образом, чтобы проксимальный конец ветви глубокой вены, огибающей подвздошную кость, имел полноценный клапан. С помощью прецизионной техники почечный конец яичковой вены и проксимальный конец глубокой вены, огибающей подвздошную кость, сшивали между собой, формируя анастомоз по типу «конец-в-конец». Яичковый конец яичковой вены и проксимальный конец дополнительной поверхностной вены (или поверхностной вены, огибающей подвздошную кость) тоже сшивали между собой, формируя анастомоз по типу «конец-в-конец». Дистальные концы глубокой вены, огибающей подвздошную кость, и дополнительной поверхностной вены (или поверхностной вены, огибающей подвздошную кость) перевязывали. Интраоперационно при проведении реконструктивных операций вводили 0,3-0,5 мл гепарина, 5 мл трентала.

Через 60 суток после создания модели варикоцеле животным контрольной и опытной групп исследовали оба яичка. Для забора материала животных после предварительной премедикации повторно вводили в

наркоз, фиксировали на операционном столе и проводили обработку операционного поля как для оперативного вмешательства. Операционную рану обрабатывали антисептиками и закрывали ее стерильными салфетками. После этого проводили операцию по удалению яичек, и забирали материал для морфологического исследования.

Для электронно-микроскопического исследования кусочки яичка фиксировали в 2,5%-ном растворе глutarальдегида на 0,1 М фосфатном буфере и дофиксировали в 1%-ном растворе четырехоксида осмия на фосфатном буфере, 1% растворе танниновыми кислотами, обезживали в батарее спиртов возрастающей концентрации и ацетоне, проводили в смесях ацетона и эпона и заливали в смесь эпона и аралдита. Морфологические структуры контрастировали в процессе обезживания материала насыщенным раствором уранилацетата, а на срезах – цитратом свинца. Срезы толщиной 40-60 нм, полученные на ультрамикротоме УМТП-7, изучали в электронном микроскопе ПЭМ-125 К.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием параметрических и непараметрических методов оценки полученных результатов.

#### Результаты и обсуждение

В контрольной группе поддерживающие клетки (клетки Сертоли) были неправильной формы с отростками, плазмолемма основы лежала на базальной мембране. Крупные округло-овальные ядра с единичными инвагинациями кариолемы имеют электропрозрачную кариоплазму в связи с тем, что в ней преобладает эухроматин. Имеются осмиофильные ядрышки, много рибосомальных гранул (рис. 1). Цитоплазма эозинофильная. В перинуклеарном участке цитоплазмы имеются органеллы, небольшие митохондрии, отдельные каналцы гранулярной эндоплазматической сети, рибосомы, преимущественно первичные лизосомы, наблюдаются микрофиламенты.

Морфометрический анализ параметров клеток Сертоли животных контрольной группы (контроль 1 и 2) показал следующие

характеристики: диаметр клеток колебался от 11,77 мкм до 14,42 мкм, средний диаметр клеток составил  $13,21 \pm 0,11$  мкм. Площадь самых малых клеток соответствовала  $108,77$  мкм<sup>2</sup>, крупнейших –  $163,33$  мкм<sup>2</sup>, в среднем равнялась  $137,49 \pm 2,27$  мкм<sup>2</sup>. Клетки имели достаточно большие ядра, диаметр которых колебался от 5,99 мкм до 8,29 мкм и в среднем составлял  $7,29 \pm 0,10$  мкм. Маленькие ядра имели площадь  $28,15$  мкм<sup>2</sup>, самые большие  $53,94$  мкм<sup>2</sup>, средняя площадь ядра была равна  $42,03 \pm 1,17$  мкм<sup>2</sup>. Ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло  $0,44 \pm 0,01$ .

Через 30 суток после моделирования варикоцеле (животные первой опытной группы) наблюдается деструкция поддерживающих клеток. Часть из них имеет осмиофильную карио- и цитоплазму. Ядра неправильной формы, пикнотически изменены, с инвагинацией кариолемы и очагово-расширенными перинуклеарными пространствами. В кариоплазме определяются мелкодисперсный хроматин и плохо различимые ядрышки. Определяется деструкция органелл, каналцы эндоплазматической сети расширены, на отдельных участках значительно, и образуют светлые полости неправильной формы. Поврежденные митохондрии имеют электронно-прозрачный матрикс, редуцированные кристы. Цитоплазматические отростки истончены, в них также имеется деструкция органелл (рис. 2). Морфология клеток Сертоли животных после моделирования варикоцеле соответствовала результатам исследования других авторов [9].

Морфометрический анализ параметров клеток Сертоли через 30 суток после моделирования варикоцеле показал значительные изменения по сравнению с контролем. Площадь клеток была меньше ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем в 1,43 раза, периметр клеток – в 1,2 раза ( $P < 0,05$ ), диаметр клеток – в 1,2 раза. Параметры ядер клеток через 30 суток тоже уменьшались. Площадь ядра через 30 суток была меньше ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем в 2,45 раза, периметр ядра – в 1,58 раза ( $P < 0,05$ ), диаметр ядра – в 1,57

раза. Ядерно-цитоплазматическое соотношение клеток Сертоли после моделирования варикоцеле составило  $0,21 \pm 0,01$ .

У животных второй опытной подгруппы через 30 суток после операции по Иваниссевичу площадь клеток Сертоли сравнено с 30-дневным сроком модели выросла - в 1,1 раза и составила в среднем  $108,71 \pm 2,48$  мкм<sup>2</sup>, однако была меньше ( $P < 0,05$ ) по сравнению с контролем в 1,3 раза. Периметр клеток в среднем равнялся  $38,36 \pm 0,43$  мкм, что больше показателей 30-дневного срока модели - в 1,1 раза, но меньше показателей контроля в 1,1 раза. Возрос также диаметр клеток. Он был большим по сравнению с 30-дневным варикоцеле - в 1,1 раза, но меньше показателей контроля в 1,1 раза, а в среднем -  $11,74 \pm 0,13$  мкм. Площадь ядер клеток через 30 суток тоже была больше ( $P < 0,05$ ) по сравнению с 30-дневным сроком модели в 1,3 раза и составила  $22,87 \pm 0,87$  мкм<sup>2</sup>, но была меньше показателей контроля в 1,8 раза. Периметр ядер клеток в среднем был меньше показателей контроля в 1,4 раза, но больше показателей 30-дневного срока модели - в 1,2 раза ( $P > 0,05$ ). Увеличивался также диаметр ядер клеток. Он был меньше показателей контроля в 1,4 раза, но меньше по сравнению с 30-дневным варикоцеле - в 1,2 раза, в среднем  $5,37 \pm 0,10$  мкм ( $P < 0,05$ ). Ядерно-цитоплазматического соотношения клеток Сертоли через 30 суток после операции по Иваниссевичу составило  $0,27 \pm 0,01$ .

Венозный застой в яичке приводит к структурным изменениям клеток Сертоли. Отмечаются осмиофильные поддерживающие клетки грушевидной и овальной формы, однако в ядрах могут быть крупные ядрышки. Ядра более светлые по сравнению с контрольной группой. По сравнению с ультраструктурой клеток через 30 суток после моделирования варикоцеле лучше сохранены органеллы цитоплазмы, вакуолизация также менее выразительна (рис. 3).

У животных третьей опытной подгруппы через 30 суток после операции по собственному методу площадь клеток Сертоли сравнено с 30-дневным сроком модели

выросла - в 1,5 раза, по сравнению с операцией по Иваниссевичу была больше в 1,3 раза, имела недостоверную разницу по сравнению с контролем и составляла, в среднем,  $141,86 \pm 3,38$  мкм<sup>2</sup>. Периметр клеток в среднем равнялся  $43,64 \pm 0,55$  мкм, что больше показателей 30-дневного срока модели - в 1,2 раза, и в 1,1 раза - по сравнению с операцией по Иваниссевичем, был также незначительно больше ( $P > 0,05$ ) от показателей контроля. Увеличился также диаметр ядер клеток. Он был большим по сравнению с 30-дневным варикоцеле в 1,6 раза, по сравнению с операцией по Иваниссевичу - в 1,4 раза, в среднем равнялся  $7,27 \pm 0,08$  мкм, незначительно отличаясь от параметров контроля. Площадь ядер через 30 суток после операции по собственному методу составила  $41,63 \pm 0,90$  мкм<sup>2</sup>, что в 2,4 раза больше ( $P < 0,05$ ) по сравнению с 30-дневным сроком модели и в 1,8 раза больше ( $P < 0,05$ ) по сравнению с операцией по Иваниссевичу (рис. 4).

Ядерно-цитоплазматического соотношения клеток Сертоли через 30 суток после формирования межвенозных анастомозов по собственному методу составило  $0,42 \pm 0,01$ , приближается к показателям контроля.

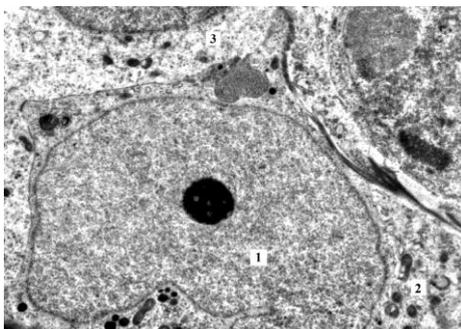
Базальная мембрана четко контурирована, умеренной толщины. Многие поддерживающие клетки с крупными округлыми ядрами с эухроматином в кариоплазме. В цитоплазме небольшие митохондрии, преимущественно первичные лизосомы, имеются фагосомы.

#### **Выводы**

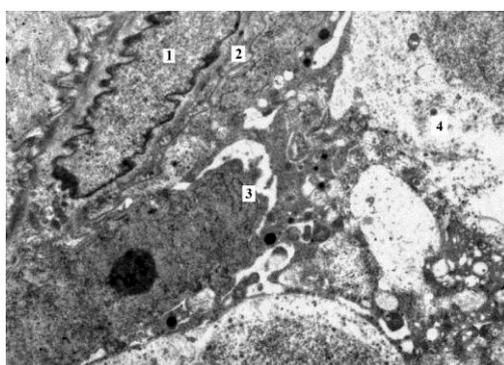
Морфометрический анализ параметров клеток Сертоли яичка после моделирования варикоцеле показал, что по сравнению с контролем площадь, периметр и диаметр клеток и их ядер достоверно уменьшались с увеличением сроков варикоцеле.

После операции по Иваниссевичу увеличивались показатели площади, периметра и диаметра клеток Сертоли и их ядер, однако недостаточно для нормализации их функции.

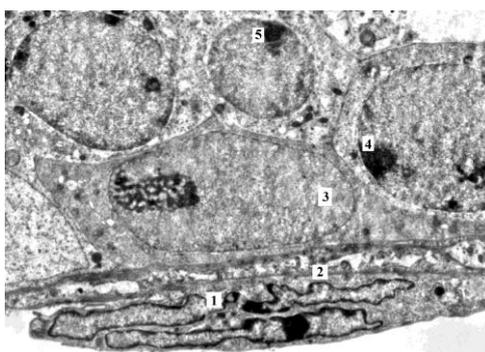
Операция формирования межвенозных анастомозов с использованием микрососудистого метода дает лучшие результаты регенерации клеток Сертоли по срав-



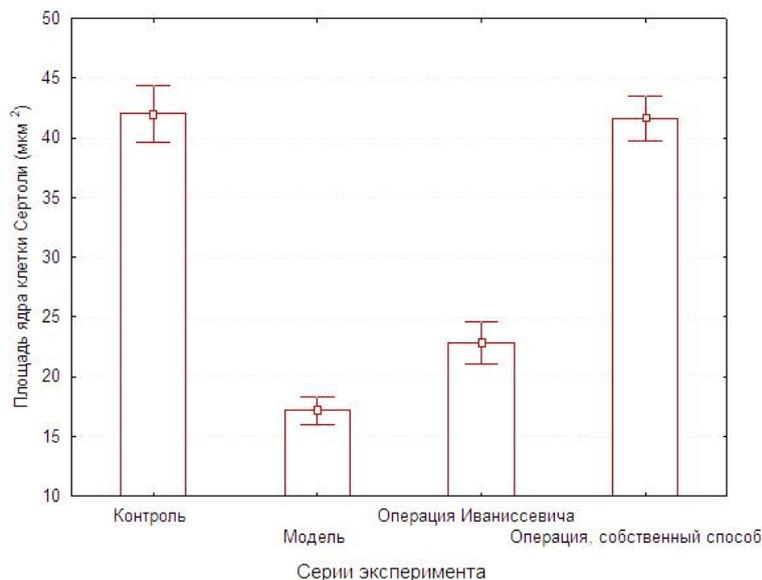
**Рис. 1.** Субмикроскопическая организация внутреннего расположения клеток извилистого семенного канальца яичка интактного животного. Ядро (1) и цитоплазма (2) поддерживающей клетки, сперматоцит первого порядка (3). x7000



**Рис. 2.** Субмикроскопическая организация стенки извилистого канальца и нижней части его внутреннего клеточного состава у животных при моделировании варикоцеле. Ядро (1) и цитоплазма (2) миоидной клетки, sustentоцит (3), сперматоцит I типа (4). x7000



**Рис. 3.** Субмикроскопическая организация извилистого семенного канальца и сперматогенного эпителия после моделирования варикоцеле и операции по Иванисевичу. Миоидна клетка (1), базальная мембрана (2), sustentоцит (3), сперматоцит I (4), и II (5) типов, x4000



**Рис. 4.** Сравнение показателей площади ядер клеток Сертоли у интактных животных, через 30 суток после создания модели варикоцеле, через 30 суток после выполнения операции по Иванисевичу и через 30 суток после выполнения операции по собственному методу

нению с традиционными обструктивными операциями, поскольку она нормализует ядерно-цитоплазматическое соотношение и создает тем самым более благоприятные условия для восстановления сперматогенной функции.

При проведении дальнейших исследований перспективно провести морфометрию клеток Лейдига и изучить влияние на них изменений гемомикроциркуляторного русла.

#### Литература

1. Горпинченко И.И. Мужское бесплодие: метод. пособие / И.И. Горпинченко; Укр. ин-т сексологии и андрологии. – Киевская мед. акад. последипл. обучения им. П.Л. Шупика. – Киев, 2005. – 82 с.
2. Евдокимов В.В. Нарушение сперматогенеза при варикоцеле: патогенез и прогноз лечения / В.В. Евдокимов, Т.О. Селиванов // Андрология и генитальная хирургия. – 2006. – №3. – С. 12-13.
3. Нишлаг Э. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы / Э. Нишлаг; под ред. Э. Нишлаг, Г.М. Бере. – М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2005. – 554 с.
4. Пат. 58808 U Украина, МПК А 61В17/00. Способ дифференцированного хирургического лечения больных варикоцеле / А.А. Смиуха, В.В. Погорельый, В.И. Пивторак, В.М. Монастырский. – заявитель и патентообладатель Винницкий национальный медицинский университет им. М.И. Пирогова. – № u-201011754. – заявл. 04. 10. 2010; опубл. 26.04.11, Бюл. № 8. – 2 с.
5. Варикоцеле у подростков: проблема мужской фертильности / А.Г. Пугачев [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2010. – № 3. – С. 43-46.
6. Чен П.Т.К. Секреты репродуктивной медицины: пер. с англ. / П.Т.К. Чен, М. Гоулдстайн, З. Роузенвэкс; под общ. ред. акад. РАМН, проф. В.И. Кулакова. – М.: МЕДпресс-информ, 2006. – 448 с.

7. Eisenberg M.L. Varicocele-induced infertility: Newer insights into its pathophysiology / M.L. Eisenberg, L.I. Lipshultz // Indian J. Urol. – 2011. – Vol. 27, № 1. – P. 58-64.
8. Lee H.S. Advances in Surgical Treatment of Male Infertility / H.S. Lee, J.T. Seo // World J Mens Health. – 2012. – Vol. 30, № 2. – P. 108-113.
9. Ozgur H. Ultrastructure of the seminiferous tubules in human testes before and after varicocelectomy / H. Ozgur, M. Kaya, S. Doran, S. Solmaz // Anat. Embryol. – 2003. – Vol. 207. – P. 343-353.
10. Weber R.E. Clinical laboratory evaluation of male subfertility / R.E. Weber, O.K. Dohle, J.C. Romijn // Advances Clinical Chemist. – 2005. – № 40. – P. 317-364.

#### MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND FEATURES IN SERTOLI CELL ULTRASTRUCTURE EXPERIMENTAL VARICOCELE

*V.I. Pivtorak, O.A. Smiyukha*

**Established anatomical morphometric characteristics of Sertoli cells in the simulation of varicocele and after treatment. After modeling varicocele perimeter and diameter of the cells and their nuclei was significantly decreased with increasing periods of varicocele. After undergoing surgery to Ivanissevich increased performance area, perimeter and diameter of Sertoli cells and their nuclei, but not enough to normalize their function. Forming operation between veins microvascular anastomosis using the method gives better results Sertoli cell regeneration compared to traditional obstructive operations because it normalizes the nuclear-cytoplasmic ratio and thereby creating more favorable conditions for the restoration of spermatogenic function.**

*Keywords: testis, varicocele, modeling, treatment, Sertoli cells.*

Пивторак В.И. – д-р мед. наук, проф. кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии ВНМУ им. Н.И. Пирогова.

E-mail: admission@vsmu.vinnica.ua.