

УДК 616.681

## СУЧАСНІ ДАНІ ПРО УЛЬТРАСТРУКТУРУ ГЕМАТО-ТЕСТИКУЛЯРНОГО БАР'ЄРУ ТА ЙОГО ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ ЗБЕРЕЖЕННЯ ФЕРТИЛЬНОСТІ ЧОЛОВІКІВ

*А. М. Спаська*

Кафедра анатомії і фізіології людини та тварин, Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника, Міністерство освіти і науки молоді та спорту України, 76018 м. Івано-Франківськ, вул. Шевченка 57, тел. 596170, e-mail: a\_spasskaya@mail.ru

*Електронно-мікроскопічним дослідженням препаратів яєчка чоловіків зрілого віку встановлено, що складовими гемато-тестикулярного бар'єру є клітини Сертолі, власна оболонка звивистих сім'яних трубочок і стінка гемокапілярів. Порушення гемато-тестикулярного бар'єру створює експозицію антигенів постмейотичних клітин імунній системі і спричинює формування антиспермальних антитіл, ініціює імунну відповідь з розвитком антиспермального імунітету, внаслідок чого відбувається масова загибель клітин сперматогенного епітелію.*

**Ключові слова:** яєчко, гемато-тестикулярний бар'єр, фертильність.

**Spaska A. M. Contemporary investigations on the hemato-testicular barrier ultrastructure and its contribution to the male fertility preservation.** *Electron microscopy of adult men's testis from discovered that hemato-testicular barrier formed mainly by 3 structures: Sertoli cells, convoluted seminiferous tubules wall, and hem capillaries wall. Ruination of hemato-testicular barrier exposes post meiotic cells antigens to immune system and causes antisperm antibodies formation, as well as initiates immune response together with antisperm immunity development. It results into total loss of cells in spermatogenic epithelium.*

**Key words:** testis, hemato-testicular barrier, fertility.

### Вступ

Численні фактори беруть участь у встановленні імунної толерантності в яєчку: гемато-тестикулярний бар'єр, локальне вироблення імуносупресивних молекул клітинами Сертолі, Fas - система як регулятор імунологічного гомеостазу у фізіологічних і патологічних умовах.

Більшість авторів [2, 5 та інші] вважають, що гемато-тестикулярним бар'єром є сукупність структур, розташованих між просвітами капілярів і звивистих сім'яних трубочок. Електронно-мікроскопічним дослідженням біоптатів яєчка чоловіків зрілого віку встановлено, що його складовими є клітини Сертолі, власна оболонка звивистих сім'яних трубочок і стінка гемокапілярів. Дослідження [7, 12] свідчать, що гемато-тестикулярний бар'єр перешкоджає потраплянню малих або гідрофільних молекул у паренхіму органа і захищає сперматозоїди, запобігаючи розвитку аутоімунної реакції. Оскільки останні з'являються у сперматогенному епітелії у пубертатному періоді, коли імунотолерантність вже встановлена і містять аутоімунний матеріал, який визначається як чужорідний власній імунній системі. Найбільш звичними причинами порушення гемато-тканинних бар'єрів є запальні процеси і пухлини.

Порушення гемато-тестикулярного бар'єру, згідно з дослідженнями [3], створює експозицію антигенів постмейотичних клітин імунній системі і спричинює формування антиспермальних антитіл, ініціює імунну відповідь з розвитком антиспермального імунітету, внаслідок чого відбувається масова загибель клітин сперматогенного епітелію.

Знання ультраструктурної будови гемато-тестикулярного бар'єру в нормі важливе для чіткої ідентифікації її змін при патологічних станах різної етіології. Тому метою досліджень було на ультраструктурному рівні вивчити характеристики компонентів гемато-тестикулярного бар'єру: клітин Сертолі, власної оболонки звивистих сім'яних трубочок, стінки капілярів яєчка практично здорових чоловіків репродуктивного віку.

### Матеріали і методи

Матеріалом для проведення електронно-мікроскопічних досліджень стали 8 препаратів яєчка забраних при некропсії чоловіків зрілого віку (22 – 35 років), що загинули від нещасних випадків. Комісією з питань біоетики Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника

(протокол № 3 від 04.09.2006р.) порушень морально-етичних норм при проведенні науково-дослідної роботи не виявлено.

Шматочки тканин яєчка розміром 1,0 мм<sup>3</sup> залишали на 1 год в 2% розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері (рН 7,4), промивали в такому ж буфері і фіксували у 1% розчині чотириокису осмію. Після фіксації матеріал знову промивали в 0,1 М фосфатному буфері і зневоднювали в спиртах зростаючої міцності. На етапі зневоднювання в 70<sup>0</sup> спирті тканини контрастували протягом 16-18 год. 2% розчином ураніацетату, приготованим на 70<sup>0</sup> спирті. Після дегідратації тканини послідовно просочували в суміші епону і аралдиту. Полімеризацію смол проводили в термостаті при температурі 56<sup>0</sup>С, протягом доби. Отримані на ультрамікромомі зрізи контрастували на сіточках цитратом свинцю і вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К з прискорюючою напругою 75 кВ і фотографували при збільшеннях від 2000 до 20000 раз.

### Результати та обговорення

На думку [2], гемато-тестикулярний бар'єр має три складові: перша – це фізико-хімічний бар'єр, який складається з стінок капілярів, клітин Сертолі у стінці трубочки, які зв'язані між собою вузькими щільними контактами, і шар міоїдних клітин навколо сім'яної трубочки, друга – це транспортний транс-мембранний бар'єр, що складається із глікопротеїнів базальних мембран клітин ендотелію капілярів, шару міоїдних клітин і базолатеральної поверхні клітин Сертолі сім'яних трубочок; третя – це імунологічний бар'єр, який складається з Fas-ліганду на поверхні клітин Сертолі. За даними [7], найчастіше гемато-тканинний бар'єр представлений епітеліальними клітинами у складі капілярів.

За даними наших досліджень, стінка гемокапілярів яєчка утворена базальною мембраною і одним суцільним шаром ендотеліоцитів, між якими відсутні отвори (рис. 1). Базальна мембрана оточує капіляр зовні і складається із тонкого шару гомогенної речовини. Шар ендотеліоцитів являється внутрішнім по відношенню до неї і на поперечному перерізі складається в середньому з 2 - 3 клітин, розміщених циркулярно. Ендотеліоцити – це сплюснені клітини, які мають велике ядро дещо витягнутої форми, з нерівними контурами і рівномірно розміщеним хроматином. Внутрішня цитолема ендотеліоцита може випинатися на різну глибину у просвіт капіляра. Органели, як правило, розміщені у навколоядерній зоні: комплекс Гольджі складається з цистерн, трубочок, дрібних міхурців, ендоплазматична сітка у вигляді системи каналців, рибосоми, невелика кількість мітохондрій і мікропіноцитозні міхурці. Периферійні відділи цитоплазми ендотеліоцитів стоншуються. Ендотеліоцити контактують між собою за допомогою пальцевидних міжклітинних з'єднань, які є, за даними [17], відносно непроникиними і можуть відкриватися лише випадково, щоб дозволити проходження макрофагів і нейтрофілів під час запалення. Одною з характерних ультраструктурних особливостей ендотеліоцитів капілярів вважають наявність мікрворсинок, кількість яких дещо зменшується в зоні міжклітинного замка. Діаметр мікрворсинок відносно постійний (95 нм), висота - не більше 0,1 нм. Цікавими є дані [6], які зазначають, що загалом у стінці капілярів яєчка були відсутні пори і фенестри. Але іноді вони спостерігали фенестровані ділянки у капілярах, що пронизували власну оболонку сім'яних трубочок. Такі ділянки були обернуті в сторону трубочки. Капіляри з не-фенестрованим ендотелієм містили велику кількість транцитозних везикул і каналів. Велика кількість таких ендотеліоцитів містилась у районах розташування клітин Лейдіга.

Зовні від базальної мембрани, по периметру кровеносних капілярів, зустрічаються перицити. Ядро перицита овальної форми, з рівномірно розміщеним хроматином. Поблизу від нього розміщені комплекс Гольджі, гранулярна ендоплазматична сітка, мітохондрії та поодинокі вільні рибосоми і міхурці.

За нашими даними, власна оболонка звивистих сім'яних трубочок утворена базальною мембраною сперматогенного епітелію і 4-ма циркулярними шарами міоїдних клітин. Базальна мембрана являється її внутрішнім шаром, що безпосередньо контактує із клітинами Сертолі і клітинами сперматогенного епітелію. Вона складається з гомогенної речовини, пронизаної сіткою колагенових волокон. Товщина базальної мембрани більш-менш рідномірна, лише деколи спостерігаються її колбоподібні потовщення або невисокі вирости всередину сім'яної трубочки. Виявлено [5], що базальна мембрана сім'яних трубочок складається із модифікованого екстрацелюлярного матриксу і є важливою для переміщення сперматогенних клітин у адлюмінальний компартмент, бо динаміка з'єднань клітин Сертолі залежить від її гомеостазу.

За даними [4, 11], товщина базальної мембрани власної оболонки сім'яних трубочок близько 80 нм. Із 5 – 7 шарів клітин, які розміщуються назовні від неї, внутрішні 3 – 4 утворені міофібробластами (міоїдними клітинами), які забезпечують ритмічні скорочення стінки трубочок і сприяють виведенню сперматозоїдів, а решта зовнішніх утворені фібробластами, тому вони вважаються частиною інтерстицію.

За нашими даними, міоїдні клітини сплюсненої форми, розміщуються циркулярними шарами зовні від базальної мембрани. Проміжки між шарами клітин містять колагенові волокна. Міоїдні клітини характеризуються товстою цитолемою і незначним вмістом цитоплазми. Їх ядро видовжене, веретеноподібне, хроматин в нуклеоплазмі конденсований у вигляді грудок, розміщених біля нуклеолеми. Органели не мають закономірного розташування у цитоплазмі. Під плазмалеомою спостерігається велика кількість мікропіноцитозних везикул. У цитоплазмі виявляються тонкі паралельно розміщені міофіламенти, які посилюють її електронну щільність, особливо у місцях контактів між

клітинами. Наші дані доповнюють [14], які виявили у цитоплазмі міоїдних клітин тонкі скоротливі актинові філаменти, розташовані поздовжньо і циркулярно, а також інші цитоскелетні білки: міозин, десмін, альфа-актинін.

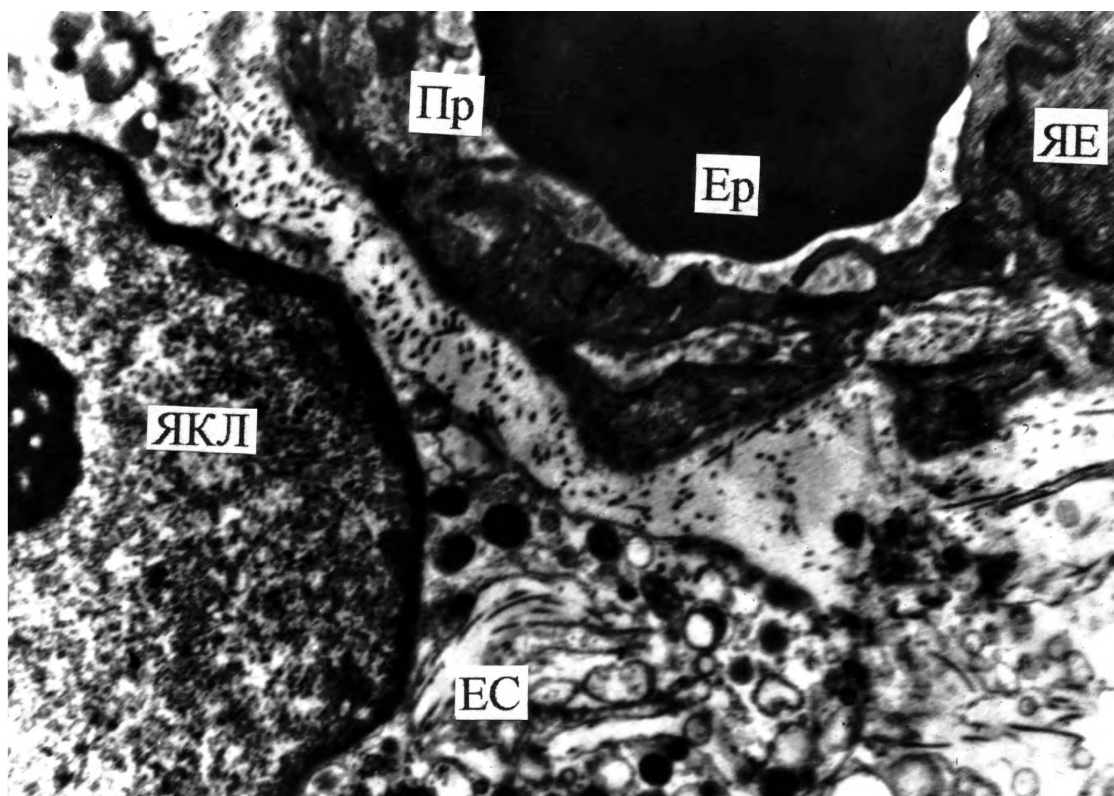


Рис. 1. Ультраструктура гемокапіляра та клітини Лейдіга яєчка чоловіка 28 років в нормі. Ер – еритроцит; ЯЕ – ядро ендотеліоцита; Пр – просвіт капіляра; ЯКЛ – ядро клітини Лейдіга; ЕС – гладка ендоплазматична сітка. Зб.: X5000.

Міоїдні клітини контактують між собою шляхом накладання тонких периферичних відростків цитоплазми, або кінець-в-кінець, не утворюючи складних з'єднань (типу десмосом або злиття мембран). За даними Dym M., Fawcett D.W. (1970), контакти між міоїдними клітинами мають міжмембранну щілину 20 нм і носять в деякій мірі бар'єрну функцію, хоча у 10 – 15 % випадків крізь них проходили лантанові треки.

Окремі автори [10 та інші] розглядають клітини Сертолі і їх спеціалізовані з'єднання, як найважливіший структурний компонент гемато-тестикулярного бар'єра.

Наші дослідження показують, що клітини Сертолі або підтримуючі епітеліоцити розміщені всередині звивистих сім'яних трубочок і щільно прилягають своєю основою до базальної мембрани (рис. 2). Серед клітин сперматогенного епітелію вони виділяються еухроматичним овоїдною формою ядром з чітким ядерцем. Дослідження [9] свідчать, що ядерця клітин Сертолі за будовою трьохчленні (ядерце і дві групи біляядерцевого хроматину). Ядро розташовується переважно у базальній частині цитоплазми, його нуклеолема має глибокі інвагінації. У цитоплазмі клітин Сертолі помітні мітохондрії витягнутої форми з помірною кількістю крист, добре розвинуті каналці агранулярної ендоплазматичної сітки, елементи комплексу Гольджі. У цитоплазмі багато крапель ліпідів, великого розміру вакуолей. Місцями виражені елементи цитоскелету (мікротрубочки і мікрофіламенти), роль яких, за даними [1] важлива у динаміці щільних з'єднань між клітинами.

У цитоплазму клітин Сертолі занурені клітини сперматогенного епітелію різних етапів розвитку. Підтримуючі епітеліоцити порівнюють з деревом, основа якого прилягає до власної оболонки сім'яної трубочки, а численні бокові розгалуження цитоплазми контактують зі статевими клітинами, що розвиваються. Апікальна їх частина досягає просвіту трубочки. На бокових поверхнях суспендоцитів утворюються бухтоподібні заглиблення, в яких розміщуються сперматоцити і сперматиди, що диференціюються. Розрізняють дві форми клітин Сертолі. До першої відносять клітини, що характеризуються світлою цитоплазмою з невеликою кількістю рибосом, мітохондрій, зернистої ендоплазматичної сітки, ліпідних включень. Друга форма клітин має щільну цитоплазму з великою кількістю рибосом, добре розвинутою гладкою ендоплазматичною сіткою, великою кількістю мітохондрій. Вважається, що світлі клітини виробляють фактор інгібін, який гальмує секрецію ФСТ

аденогіпофізом, а темні клітини, багаті ферментами, виробляють фактор, що стимулює поділ статевих клітин.

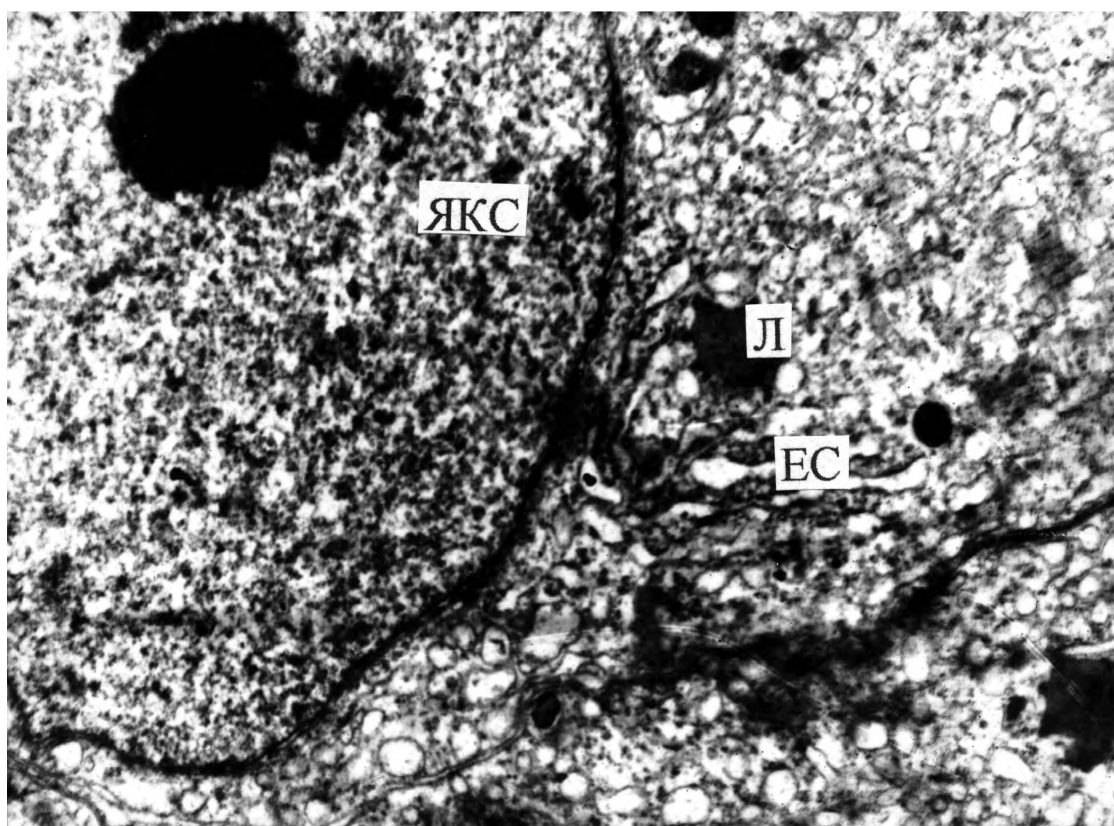


Рис. 2. Ультраструктура клітини Сертолі (а) звивистої сім'яної трубочки яєчка чоловіка 22 років в нормі. ЯКС – ядро клітини Сертолі; ЕС – ендоплазматична сітка; ЯС – ядро сперматогонії; Л – ліпіди. Зб.: X6000.

Клітини Сертолі контактують між собою у базальній частині трубочки за допомогою спеціалізованих з'єднань, утворених плазмалемами клітин, паралельно до яких розміщуються цистерни шорсткої ендоплазматичної сітки і пучки актинових мікрофіламентів. Присутність в зоні контакту пучків філаментів і підповерхневих цистерн ендоплазматичного ретикулуму формує гребінчастість цитоплазматичної мембрани, що дозволяє "защипнути" контакт [2, 12, 15]. Дані з'єднання здійснюють компартменталізацію внутрішньотрубочкового простору і, за даними [7, 10, 16], і є найважливішим компонентом гемато-тестикулярного бар'єру. Зони щільних з'єднань у базальній частині клітин Сертолі фактично відмежовують їх апексні частини. Вони створюють особливе середовище для розвитку клітин сперматогенного епітелію [8, 9, 13]. Переміщення сперматоцитів із базального компартменту у адлюменальний, за даними ряду авторів [8, 13, 16], відбувається без порушення замкнутості бар'єра, в результаті реструктуризації з'єднань.

За даними досліджень [15], паралельні контакти клітин Сертолі дуже щільні (щілина між сусідніми плазмалемами з'єднань має близько 12 нм).

Структурно комплекс з'єднань клітин Сертолі складається з різних їх типів. Виявлено три основних типи з'єднань клітин Сертолі, один з яких включає два підтипи. За даними [17], гемато-тестикулярний бар'єр складається з співіснуючих щільних з'єднань, розташованих над актиновими прилягаючими контактами, під якими розташовані десмосомоподібні з'єднання, побудовані з проміжних філаментів.

Значна кількість досліджень останніх років присвячена ультраструктурній організації і динаміці з'єднань клітин Сертолі під час сперматогенезу, і впливу на неї патологічних станів. Існує велика кількість досліджень регуляторних молекул, які впливають на процеси "відкривання і закривання" контактів.

#### Висновки

Хоча до складу гемато-тестикулярного бар'єра фактично відносять усі структури, які розділяють сперматогенний епітелій і кровоносне русло яєчка, цілком очевидно, що клітини Сертолі і їх спеціалізовані з'єднання можна розглядати як найважливіший його компонент. Клітини Сертолі, міоїдні клітини власної оболонки сім'яних каналців та ендотеліоцити капілярів яєчка чоловіків зрілого віку

мають в нормі характерну ультраструктурну будову яка відображає їх функціональний стан, і зокрема їх бар'єрну функцію, яка є ключовою для збереження фертильності.

### Література

1. *Aumiller G.* Intermediate filaments in Sertoli cells / *Aumiller G., Schulze C., Vienbahn C.* // *Microsc. Res. Tech.* - 1992. - № 20. - P. 50 - 72.
2. *Bart J.* An oncological view on the blood-testis barrier / *Bart J., Groen H. J., van der Graaf W.T., Hollema H., Hendrikse N.H., Vaalburg W., Sleifer D.T., de vries E. G.* // *Lancet. Oncol.* - 2002. - № 3(6). - P. 357 - 363.
3. *Cavicchia J. C.* The human blood-testis barrier in impaired spermatogenesis / *Cavicchia J.C., Sacerdote F.L., Ortiz L.* // *Ultrastructural pathology.* - 1996. - № 20 (3). - P. 211 - 218.
4. *Davidoff M. S.* Cellular architecture of the lamina propria of the human seminiferous tubules / *Davidoff M.S., Breucker H., Holstein A.F., Seidl K.* // *Cell and Tissue Res.* - 1990. - № 262 (2). - P. 253-261.
5. *Dym M.* Basement membrane regulation of Sertoli cells // *Endocr. rev.* - 1994. - №15. - P. 102 - 115.
6. *Ergun S.* Capillaries in the lamina propria of human seminiferous tubules are partly fenestrated / *Ergun S., Davidoff M., Holstein A.F.* // *Cell. Tissue. Res.* - 1996. - № 286(1). - P. 93 - 102.
7. *Fronlich E.* Structure and function of blood-tissue barriers // *Dtsch. Med. Wochenschr.* - 2002. - № 127(49). - P. 2629 - 2634.
8. *Goosens S., van Roy F.* Cadherin-mediated cell-cell adhesion in the testis // *Front. Biosci.* - 2005. - № 10. - P. 398 - 419.
9. *Griswold M. D.* The central role of Sertoli cells in spermatogenesis // *Semin Cell. Dev. Biol.* - 1998. - № 4. - P. 411 - 416.
10. *Holstein A. F., Davodoff M.* Compartmentalization of the intertubular space in the human testis // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 1997. - № 424. - P. 161 - 162.
11. *Holstein A. F.* Myofibroblasts in the lamina propria of human seminiferous tubules are dynamic structures of heterogenous phenotype / *Holstein A.F., Maekawa M., Nagano T., Davidoff M. S.* // *Arch. Histol. Cytol.* - 1996. - № 59. - P. 109 - 125.
12. *Itoh M.* Tissue microcircumstances for leucocytic infiltration into the testis and epididymis in mice / *Itoh M., Terayama H., Naito M., Ogawa Y., Tainosho S.* // *J. Reprod. Immunol.* - 2005. - № 67 (1-2). - P. 57 - 67.
13. *Lee N. P., Cheng C. Y.* Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development // *Hum. Reprod.* - 2004. - № 10 (4). - P. 349 - 369.
14. *Maekawa M.* Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function / *Maekawa M., Kamimura K., Nagano T.* // *Arch. Histol. Cytol.* - 1996. - № 59 (1). - P. 1 - 13.
15. *Parreira G. G.* Relationship of Sertoli-Sertoli tight junctions to ectoplasmic specialization in conventional and en face views / *Parreira G. G., Melo R. C., Russell L. D.* // *Biol. Reprod.* - 2002. - № 67(4). - P. 1232 - 1241.
16. *Pelletier R. M., Byers S. W.* The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural construction // *Microsc. Res. Tech.* - 1992. - № 20 (1). - P. 3 - 33.
17. *Yan H. H., Cheng C.Y.* Blood-testis barrier dynamics are regulated by an engagement/disengagement mechanism between tight and adherens junctions via peripheral adaptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2005. - № 102 (33). - P. 11722 - 11727.

Стаття поступила до редакції 10.09.2011 р. Стаття прийнята до друку 21.10.2011 р.

**Спаська А. М.** – кандидат біологічних наук, доцент кафедри анатомії і фізіології людини та тварин Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

**Рецензент:** доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри анатомії і фізіології людини та тварин Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника **Грициук Б. В.**