

© Демяшкин Г.А., 2020

УДК 591.463.1

Демяшкин Г.А.

## Иммунофенотипическая характеристика сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия

ФГБУ «9 Лечебно-диагностический центр» Минобороны России,

119146, г. Москва, Россия, Комсомольский проспект, д. 13а;

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (Сеченовский Университет)

Минздрава России,

119434, г. Москва, Россия, ул. Трубецкая, д. 8

За последнее время бесплодие стало одной из распространенных причин для обращения к урологу-андрологу мужчин молодого репродуктивного возраста. Однако без понимания патогенеза нарушения сперматогенеза невозможно проводить диагностику и лечение бесплодия. **Цель исследования** – оценка сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия (иммуногистохимический аспект). **Методы.** Проводили анализ биоптатов яичек пациентов ( $n=53$ ) с идиопатическим бесплодием. У всех пациентов оценивали гормональный статус, анализировали спермограммы, проводили цитогенетическую и молекулярно-генетическую диагностику (исследование кариотипа, анализ крови на наличие микроделеций AZF локуса Y-хромосомы). Биоптаты яичек мужчин с бесплодием (возраст 22 – 35 лет,  $n=10$ ) и в качестве морфологического контроля аутопсийный материал семенников мужчин 22 – 35 лет ( $n=10$ , в анамнезе 1-2 деторождения) изучали иммуногистохимическим методом. Использовали первичные антитела Ki-67, Bcl-2, p53, caspase-9, PLAP, CD117, IGF-I, VEGF-A. **Результаты.** Показано, что при бесплодии митотическая активность сперматогоний была ниже ( $12.0\pm 0.1\%$ ), чем в норме ( $42.0\pm 0.34\%$ ) на фоне повышения активности каспазы-9 при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома ( $72.0\pm 0.41\%$ ) по сравнению с нормальным сперматогенезом ( $39.5\pm 0.33\%$ ). При бесплодии уровни проапоптотических белков (p53) были выше ( $40,0\pm 0.44\%$ ), чем антиапоптотических (Bcl-2) –  $1.0\pm 0.1\%$ . Факторы дифференцировки гамет (CD117) при бесплодии не обнаружены, в отличие от PLAP ( $10.2\pm 0.13\%$ ). При гипосперматогенезе отмечалось снижение в 8,8 раза интенсивности окрашивания на IGF-I в сперматогониях ( $7.0\pm 0.22\%$ ). При бесплодии было выявлено снижение уровней VEGF, что опосредованно приводит к активации проапоптотических факторов. **Заключение.** Комплексный анализ патологического сперматогенеза и его микроокружения при идиопатической форме мужского бесплодия может свидетельствовать о персонифицированных нарушениях чувствительности и специфичности половых клеток к биологически активным веществам, обеспечивающим их пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Морфологический анализ биоптатов яичек с использованием иммуногистохимических методов является одним из необходимых исследований в алгоритме диагностики и прогноза мужского бесплодия.

**Ключевые слова:** сперматогенез; пролиферация; апоптоз; факторы роста; мужское бесплодие.

**Для цитирования:** Демяшкин Г.А. Иммунофенотипическая характеристика сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 63-73.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.02.63-73

**Для корреспонденции:** Демяшкин Григорий Александрович, e-mail: doc.dga76@gmail.com

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 10.08.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Demyashkin G.A.

### Immunophenotypic characteristics of spermatogenesis in idiopathic male infertility

The 9<sup>th</sup> Therapeutic and Diagnostic Center of the Ministry of Defense of the Russian Federation,

Komsomolsky Prospekt 13a, Moscow 119146, Russia,

Department of Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University,

Trubetskaya Str. 8, Moscow 119048, Russia

In recent years, infertility has become a common complaint of approximately 8% of men of young, reproductive age in the everyday practice of urologists/andrologists. However, diagnostics and treatment of infertility are impossible without understanding the pathogenesis of spermatogenesis disorder. **Aim:** Evaluating the immunohistochemical aspect of spermatogenesis in the idiopathic form of male infertility. **Methods:** Analysis of testicular biopsy samples from patients aged 22-35 ( $n=53$ ) with idiopathic

male infertility. Evaluation of the hormonal status, analysis of spermogram, and pathogenetic and molecular genetic diagnostics (karyotype study and a blood test for the presence of microdeletions in the Y-chromosome AZF locus) were performed for all patients. Testicular biopsy samples from men with infertility and autoptotic testicular samples from men aged 22-35 (n=10, 1-2 children in history) as a morphological control were studied using an immunohistochemical method. Primary antibodies to Ki-67, p53, Bcl-2, caspase-9, CD117, PLAP, IGF-I, and VEGF-A were used. **Results.** Mitotic activity of spermatogonia in infertility ( $12.0 \pm 0.1\%$ ) was lower than normal ( $42.0 \pm 0.34\%$ ), which was associated with increased activity of caspase-9 in the focal variant of Sertoli-cell-only syndrome ( $72.0 \pm 0.41\%$ ) compared to normal spermatogenesis ( $39.5 \pm 0.33\%$ ). In infertility, levels of proapoptotic proteins (p53) were considerably higher ( $40.0 \pm 0.44\%$ ) than levels of anti-apoptotic proteins (Bcl-2),  $1.0 \pm 0.1$ . Factors of gamete differentiation (CD117) were not detected in infertility while PLAP was ( $10.2 \pm 0.13\%$ ). In hypospermatogenesis, the IGF-I staining in spermatogonia was decreased 8.8 times ( $7.0 \pm 0.22\%$ ). Infertility was associated with decreased levels of VEGF, which indirectly results in activation of proapoptotic factors. **Conclusion.** The comprehensive analysis of pathological spermatogenesis in idiopathic male infertility suggested individual impairment of sensitivity and specificity of germ cells to biologically active substances, which provide their proliferation, differentiation, and apoptosis. The immunohistochemical morphological study of testicular biopsy samples is a required test in the diagnostic algorithm for male infertility.

**Keywords:** spermatogenesis; proliferation; apoptosis; growth factors; male infertility.

**For citation:** Demyashkin G.A. Immunophenotypic characteristics of spermatogenesis in idiopathic male infertility. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 63-73. (in Russian).

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.02. 63-73

**For correspondence:** Grigory Demyashkin, PhD, MD; histologist-embryologist, pathologist; ass. professor of the Department of Pathology of the Sechenov University (Moscow, Russia); member of the European Association of Urology, Section of Andrological Urology (ESAU). E-mail: doc.dga76@gmail.com

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

#### Information about the author:

Demyashkin G., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

Received 10.08.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

## Введение

За последнее время бесплодие стало одной из распространенных причин обращения к урологу-андрологу. Эта патология затрагивает около 8% мужчин зрелого репродуктивного возраста (20 – 40 лет) и только у 10% из них удается достичь полного излечения. При этом, следует учитывать факторы риска: возраст (>45 лет), отягощенный урогенитальный анамнез, рак, крипторхизм, варикоцеле, орхит, воздействие гонадотоксинов, генитальные инфекции и др. (табл. 1) [1, 2].

Сравнительно недавно были достигнуты значительные успехи в диагностике и лечении некоторых форм мужского бесплодия. Генетические тесты позволили правильно классифицировать случаи необструктивной азооспермии (НОА), которые ранее считались идиопатическими. Микрохирургические вмешательства увеличили положительные показатели успешного восстановления репродуктивной функции мужчин (TESE, MESE, ICSI и др.). С появлением микроманипуляций с мужскими гаметатами у ранее считавшихся бесплодными мужчин, с тяжелой олигозооспермией или азооспермией, появились шансы на отцовство.

Уролог-андролог отвечает за диагностику, консультирование и лечение основной причины бесплодия. Однако только совместная коллегиальная работа андрологов с генетиками и морфологами позволяет достичь максимально положительного результата.

Морфологическая картина в поврежденном яичке при идиопатической форме мужского бесплодия чаще представлена Сертоли-клеточным синдромом (СКС) [3, 4]. Характерной гистопатологической особенностью СКС является отсутствие половых клеток в извитых семенных канальцах [3, 4]. Многие из этих пациентов с нормальным кариотипом и вторичными мужскими половыми признаками по данным спермограммы (азооспермия или тяжелая форма олигозооспермии) оказываются бесплодными. В последние десятилетия минувшего века в андрологическую практику была введена интрацитоплазматическая инъекция сперматозоидов (ИКСИ, ICSI), которая сделала актуальным применение биопсии яичек, превратив ее в терапевтическую, а также диагностическую процедуру. Так, были обнаружены новые гистопатологические признаки у мужчин с СКС, коррелирующие с успеш-

ными процедурами ИКСИ. Главным образом, это касается обнаружения фокальных кластеризированных семенных канальцев, содержащих единичные созревающие половые клетки (смешанная тестикулярная атрофия). Однако, по-прежнему, недостаточно изучены внутриорганные механизмы патогенеза идиопатической формы мужского бесплодия, особенно протеомика нарушения сперматогенеза (табл. 2). В контексте обозначенной проблемы важная роль отводится изучению белков-регуляторов в развитии Сертоли-клеточного синдрома и его форм. Необходимо также прогноз возможных осложнений, вплоть до малигнизации, при этом ключевая роль принадлежит иммуногистохимическому анализу [4].

**Цель исследования** – оценка сперматогенеза при идиопатической форме мужского бесплодия (иммуногистохимический аспект).

**Методика**

Ретроспективное исследование проводили в Научном клиническом центре ОАО «РЖД» и на кафедре патологической анатомии им. академика А.И. Струкова Сеченовского университета (май 2015 – январь 2017 г.).

**Пациенты и материал.** В качестве материала для исследования в работе использовали биопсийный ма-

териал яичек мужчин, страдающих идиопатическим бесплодием (клинически подтвержденная необструктивная азооспермия). Для морфологического контро-

Таблица 1

**Нозологические категории в группе мужского бесплодия**

категория	количество	%
Варикоцеле	629	26.4
Инфекции	72	3.0
Гормональные нарушения	54	2.3
Эякуляторная дисфункция	28	1.2
Системные заболевания	11	0.4
Идиопатическая форма	289	12.1
Иммунологические нарушения	54	2.3
Обструкция семявыносящих путей	359	15.1
Карцинома (рак)	11	0.5
Крипторхизм	342	14.3
Генетические аномалии	189	7.9
Тестикулярная дисфункция	345	14.5
<b>ВСЕГО:</b>	<b>2,383</b>	<b>100.0</b>

Таблица 2

**Белки-регуляторы сперматогенеза (протеомика сперматогенеза)**

Коллаген IV	Виментин	Ингибин	IGF
Коллаген II	Ингибин	Активин	FGF
Ламинин	Факторы роста	Фоллистатин	EGF
Фибулины	Колретинин		TGF α/β
	Фактор стволовой клетки	Другие химические группы:	NGF
	Цитокины	PLAP (97%)*	VEGF
	Факторы сертолиевых коммуникаций	ОСТ 3/4*	HepGF
	Манноза-6-фосфат (рецептор)	CD 117*	Антимюллеров гормон
	Цистатины	SALL 4*	
	WT1*	MAGE-A	
	CD10*	VASA	
	CD99*	GAGE	
	AE1 – AE3*		
	SMA*		
	CAM5,2*		
клетки Лейдига и перитубулярные клетки		<b>Inhibin*</b> ; CD99*; CD10*; AE1 – AE3*; CAM5,2*; SMA*	
Маркёры (другие)		PAS; p-53; ki-67, bcl	

**Примечание.** \* – маркёры иммуногистотипирования.

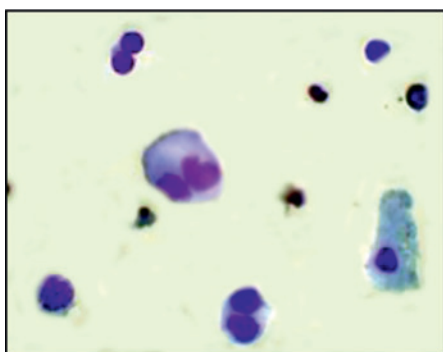
ля были исследованы аутопаты нормальных яичек без макроскопических признаков наличия/отсутствия воспалительного и/или опухолевого процесса. Материал для исследования получали не позднее 6 ч после констатации биологической смерти.

Работа выполнена в двух группах: 1-я – (аутопсийный материал,  $n=10$ ) группа с условным контролем физиологического течения сперматогенеза, в семейном анамнезе – одно и более деторождений, мужчины 22–35 лет; 2-я – мужчины 22 – 35 лет с верифицированной идиопатической азооспермией ( $n=53$  биоптата), бесплодие в браке более 2 лет.

Все обследуемые пациенты давали письменное информированное согласие на исследование. Критерии исключения из исследования – отягощённый лекарственный анамнез ( $n=8$ ); андрогены или анти-эстрогены ( $n=4$ ), гипогонадотропный гипогонадизм ( $n=9$ ), системные заболевания ( $n=11$ ), хромосомные транслокации ( $n=4$ ).

**Физикальные данные.** Все пациенты, страдающие бесплодием, были соматически здоровыми, без вредных привычек молодыми людьми в возрасте 22 – 35 лет; инфекционные заболевания, влияющие на сперматогенез (в том числе, эпидемический паротит в анамнезе), а также врожденные аномалии развития яичек у пациентов отсутствовали.

**Гормональный статус мужчин, страдающих бесплодием.** Кровь для анализа брали строго натощак из локтевой вены. Количественное содержание гормонов определяли после тестирования по методикам, утвержденным для данной биохимической лаборатории протоколам. У всех мужчин уровни ФСГ, ЛГ гормонов и тестостерона в сыворотке крови были в пределах возрастной физиологической нормы.



**Рис. 1.** Яичко (в норме).

Отпечаток, окраска по G. Giemsa. Увеличение  $\times 400$ . Половые клетки на разных стадиях сперматогенеза, справа – клетка Сертоли.

**Спермограмма.** Показатели эякулята оценивали согласно протоколу Всемирной организации здравоохранения [5]. В группе с нормальным сперматогенезом (I) для верификации мужских половых клеток (идентификации стадий мейоза) и клеток Сертоли в извитых семенных канальцах использовали метод цитологических отпечатков (**рис. 1**)

**Лабораторная цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика** (исследование кариотипа, анализ крови на наличие микроделетий AZF локуса Y-хромосомы). Кариотип: 46, XY; Y-микроделетии отсутствуют.

**Тестикулярная оценка (биопсия).** Биопсия яичка была выполнена с целью выявления причины азооспермии, определения степени поражения сперматогенеза и исключения обструкции выводящих семенных протоков. Биоптаты оценивали с использованием критериев S. Johnsen, J. Aafjes и соавт. и Г.А. Демяшкина [3, 4].

### **Морфологическое исследование**

Для гистологического исследования биоптатов и аутопатов яичек использовали стандартный метод (фиксация формалином, заливка в парафин, окраска гематоксилином и эозином).

**Иммуногистохимический метод (ИГХ).** После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов проводили ИГХ-исследование по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Германия). Используемые первичные антитела, их разведение и фирма производитель представлены в **табл. 3**. Вторичные антитела – универсальные (HiDef Detection™ HRP Polymer system, «Cell Marque», США), позволяющие выявлять мышинные и кроличьи первичные антитела, конъюгированные с ферментным комплексом на основе пероксидазы хрена. Результаты иммуногистохимических реакций оценивали количественными и полуколичественными методами. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера; срезы промывали под проточной водой; дегидратировали и заключали в бальзам.

Учитывая специфику исследуемого объекта (яички), где половые клетки при световой микроскопии «перекрывают» друг друга, а также особенность распределения внутриклеточных белков проводили подсчёт числа иммунопозитивных клеток. Подсчёт (в%) проводили в 100 клетках в 10 полях зрения светового микроскопа (при увеличении объектива  $\times 40$ ). Оценивали степень экспрессии (в баллах, ve +/–) [4, 6]. Анализ аутопсийного и биопсийного материалов выполняли с помощью светооптического микроскопа «Carl

Zeiss Lab.A1» (Carl Zeiss, Германия), совмещённого с видеокамерой «AxioCam ERc5s» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программным обеспечением ZEN Lite.

**Статистический анализ.** Полученные в результате подсчёта данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). Оценивали соответствие полученных результатов нормальному распределению с применением критерия Колмагорова–Смирнова. При статистической обработке для оценки значимости различий между группами использовали непараметрические критерии: U-критерий Манна–

Уитни, H-критерий Краскала–Уоллеса. При отсутствии нормального распределения данных использовали непараметрический критерий F. Wilcoxon (Statistical methods for research workers) с уровнем значимости  $p < 0.05$ .

### Результаты

**Микроскопическое описание яичек мужчин 1-й группы (с нормальным сперматогенезом).** Стенки семенных канальцев образованы клетками Сертоли и половыми клетками, находящимися на различных стадиях сперматогенеза. Во всех исследуемых образцах выявляются морфологические признаки нормального сперма-

Таблица 3

#### Характеристики первичных антител, используемых для иммуногистохимического исследования

Антитела (фирменное название)	Ig класс (фирма)	Специфичность и характеристика
<b>БЕЛКИ – МАРКЕРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ</b>		
Mouse Monoclonal Antibody Ki-67 Antigen	Clone MM1 IgG1 Novocastra™ 1:100	Ядерный антиген; выявляется во всех пролиферирующих клетках в G1 (поздней), S, M и G2 фазах клеточного цикла
Mouse Monoclonal Antibody p53 Protein	Clone DO-7 IgG2b Novocastra™ 1:100	Ядерный антиген; определяется при остановке клеточного цикла после повреждения генома в точке G1 – клетка восстанавливает целостность повреждённой ДНК до деления клетки или p53 запускает в клетке механизм апоптоза.
Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein	Clone bcl-2/100/D5 IgG1 Novocastra™ 1:100	Цитоплазматический антиген; белок внутренней митохондриальной мембраны, который действует в качестве ингибитора апоптоза.
Rabbit polyclonal Antibody caspasa-9	IgG Abcam 1:100	Цитоплазматический антиген внутреннего пути апоптоза; активирует гибель ядра и протеолитические процессы в клетке.
<b>ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ (МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК)</b>		
Primary Antibody Placental alkaline phosphatase (PLAP)	Clone 8A9 IgG1 Bond™ 1:100	Цитолеммальный антиген; в норме – визуализируется в мембране синцитиотрофобласта ворсин хориона и плаценты и в гонобластах/гоноцитах.
Mouse Monoclonal Antibody c-kit Oncoprotein (CD117)	Clone T595 IgG1 Novocastra™ 1:100	Цитоплазматический стволовой антиген; в норме – обнаруживается в гонобластах/гоноцитах, а также в глиоцитах, тучных клетках, меланоцитах и эпителии молочной железы. Слабое окрашивание также выявили в собирательных трубочках почек, иногда в эпителии предстательной железы и в коллоиде щитовидной и паразитовидных желез.
<b>ФАКТОРЫ РОСТА</b>		
Rabbit polyclonal Antibody Insulin-like Growth Factors-I	IgG1 Santa Cruz Biotechnology 1:100	Цитоплазматический антиген; показатель пролиферативной митотической активности клеток; аутокринный/паракринный стимулятор роста.
Mouse Monoclonal Antibody Vascular Endothelial Growth Factor	Clone pAb IgG1 Novocastra™ 1:100	Цитоплазматический антиген ангиогенный; показатель ангиогенеза – стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов.



тогенеза (8 – 10 баллов по шкале S. Johnsen). Сперматогонии локализируются на базальной мембране, образуя базальные отсеки семенных канальцев, клетки последующих стадий – в адлюминальном отсеке, а сперматозоиды – в просветах. В большинстве семенных канальцев гаметы образуют отдельную функциональную «колонку», в которой все они находятся на одной из шести стадий сперматогенного цикла. Сперматогонии, которые ещё не вступили в мейоз, несут функцию сперматогониальных стволовых клеток (SSC), пополняющих сперматогониальный пул (рис. 2, а).

*Микроскопическое описание яичек мужчин 2-й группы (идиопатическая форма бесплодия (n=53)).* В 11-и образцах выявлены признаки гипосперматогенеза (в семенных канальцах располагаются сперматогонии и разрушенные первичные сперматоциты), оценка сперматогенеза по шкале S. Johnson (JS) – 4 бала; в 1 – блок созревания с фокусами субтотальной аплазии гамет (единичные сперматогонии), JS=3 балла (рис. 2, б); у 12-ти – Сертоли-клеточный синдром, JS=2 балла; у 3-х – тубулярная атрофия канальцев, JS=1 балл (рис. 2, в). Также, во всех исследуемых случаях выявлена гиперплазия клеток Лейдига.

Результаты иммуногистохимического исследования представлены в таблицах 4 и 5, а также на рис. 3.

*Анализ маркеров клеточного цикла.* Белок Ki-67 был обнаружен во всех половых клетках, как при нормальном, так и патологическом сперматогенезе. Клетки Сертоли и Лейдига, миоидные клетки были иммунонегативны. Индекс пролиферации (Ki-67) сперматогоний мужчин 22 – 35 лет контрольной группы равен  $42.0 \pm 0.34\%$ , что в 3,5 раза выше чем при идиопатическом бесплодии ( $12.0 \pm 0.1\%$ ).

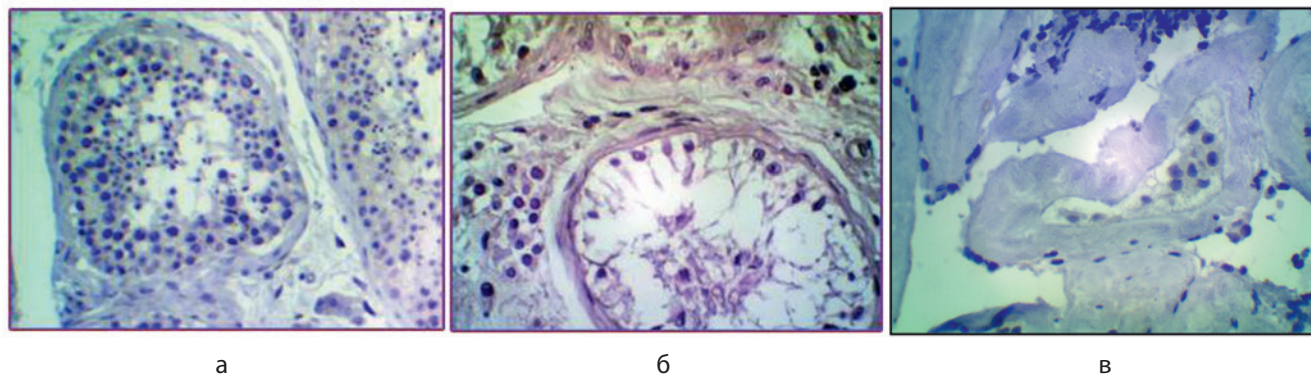
Проапоптотический индекс (p53) сперматогоний в контрольной группе ( $57.2 \pm 0.66\%$ ) выше, чему у спер-

матоцитов I в 2,0 раза ( $28.5 \pm 0.5\%$ ) и в 3,9 раза у сперматоцитов II ( $14.5 \pm 0.33\%$ ). Количество окрашенных на p53 сперматогоний при необструктивной азооспермии в 2,6 раза у мужчин 22 – 35 лет выше, чем в контроле.

Степень маркирования на caspase-9, активация которой происходит при реализации митохондриального пути апоптоза, в сперматогониях с нормальным сперматогенезом находится примерно на одном уровне (доля меченых сперматогоний составляет у молодых мужчин –  $39.5 \pm 0.33\%$ ) и снижен при идиопатической форме мужского бесплодия на стадии гипосперматогенеза ( $22.0 \pm 0.22\%$ ). При фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома этот показатель составляет  $72.0 \pm 0.41\%$ . Ни в одной из гистологических форм идиопатического бесплодия в клетках Лейдига и в миоидных клетках caspase-9 не выявлено (ve-). Анализ маркирования на Bcl-2 показывает, что антиапоптотическая активность превалирует в половых клетках у мужчин 22 – 35 лет ( $43.2 \pm 0.44\%$ ) и практически исчезает на всех стадиях нарушенного сперматогенеза ( $1.0 \pm 0.1\%$ ).

Учитывая данные пролиферации и апоптоза, а также про- и антиапоптотической активности сперматогоний при бесплодии можно говорить о выраженном дисбалансе – преобладании апоптоза над пролиферацией. При этом причина инициирования апоптоза в сперматогониях вероятнее всего связана с аутокринными нарушениями либо повреждениями митохондрий, а также с возрастанием уровня окислительного стресса.

*Анализ факторов дифференцировки половых клеток.* У мужчин среднего возраста CD117 выявляется уже в сперматогониях. Исследуемый маркер в сперматогониях при идиопатическом бесплодии не выявляется,



**Рис. 2.** Семенные канальцы. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение  $\times 200$ . а – нормальный сперматогенез, б – блок созревания (слущенные единичные сперматогонии, клетки Сертоли), в – СКС и тубулярная атрофия.

то есть, сперматогониальные клетки (SSC) в семенных канальцах отсутствуют, равно как и нет клеток, обладающих унипотентными свойствами и обновляющихся популяций половых клеток. Один из факторов эмбриональной дифференцировки мужских гамет (PLAP) у мужчин молодого возраста в норме не обнаружен, в то время, как в сохранившихся сперматогониях при гипосперматогенезе отмечается (в  $10.2 \pm 0.13$  %) положительная мембранная ИГХ-реакция с антителами к PLAP, что не исключает наличие в семенных канальцах единичных малодифференцированных клеток. А также, учитывая, что PLAP является маркером тестикулярной интродиплоидной неоплазии, нельзя исключить, что бесплодие попадает в группу риска по малигнизации.

**Анализ факторов роста.** В контрольной группе наиболее ярко на IGF-I маркируются половые и в меньшей степени соматические клетки семенных канальцев и их микроокружения. Выраженность иммунологической реакции с антителами к IGF-I в мужских гаметах снижается в процессе сперматогенеза: от сперматогоний («ve+/3») до сперматозоидов («ve+/2»). Окрашивание на IGF-I в половых клетках и клетках Сертоли подтверждает функциональную необходимость данного фактора роста в региональном механизме ауто- и паракриной регуляции текущих процессов в яичке и семенных канальцах в частности. Отсутствие специфического маркирования стромальных компонентов свидетельствует о её вспомогательной роли в этих процессах. В то время, как при идиопатическом бесплодии отмечается слабое окрашивание на IGF-I в

сперматогониях и снижение его количества в 8,8 раза по сравнению с возрастной группой в контроле. Более вероятно, что существует нарушение паракриной регуляции синтеза инсулиноподобного фактора роста-1 при бесплодии.

В контрольной группе ИГХ-реакцию с антителами к VEGF отмечали во всех половых клетках на разных стадиях сперматогенеза («ve+/2»), а также в клетках Сертоли («ve+/1») и Лейдига («ve+/2»). При бесплодии наблюдается следующая ИГХ-реакция: зрелые клетки Сертоли («ve+/2»); цитоплазма некоторых сохранившихся сперматогоний («ve+/1»); клетки Лейдига («ve+/3»). При этом, следует отметить, окрашивание в многочисленных популяциях клеток Лейдига, которые располагались вблизи кровеносных сосудов и семенных канальцев. Как известно, сосудистый эндотелиальный фактор роста влияет на баланс между про- и антиапоптотическими белками: понижает уровни p-53 и повышает уровни Bcl-2 [7]. При бесплодии нами выявлено снижение показателя VEGF.

### Обсуждение

Яички являются уникальным органом. В них заключено колоссальное количество структур, занимающих при этом мизерный объем – множество извитых семенных канальцев (длина одного семенного канальца составляет 80 см, а общая – 300 – 400 м). Несмотря на малые размеры органа, яички несут огромную функциональную нагрузку, вырабатывая сперматозоиды количеством до 200 млн в 1 мл (размер одного сперматозоида в пределах 5 мкм без жгутика). При этом жизнен-

Таблица 4

**Доля ИГХ- позитивных сперматогоний в семенных канальцах (на исследуемые маркеры) при нормальном сперматогенезе и идиопатическом бесплодии (%)**

Антитела	нормальный сперматогенез (22 – 35 лет)	идиопатическое бесплодие (22 – 35 лет)		
		гипо-сперматогенез	блок созревания	фокальный вариант СКС
Ki-67	42.0±0.34	15.0±0.1*	12.0±0.1* *	9.0±0.2*
p53	57.2±0.66	40.0±0.44*	64.3±0.39* *	72.0±0.41*
Bcl-2	7.5±0.44	1.0±0.1*	0	0
caspase-9	39.5±0.33	22.0±0.22*	64.3±0.39*	72.0±0.41*
PLAP	0	10.2±0.13% *	0	0
CD117	10.0±0.33	0	0	0
IGF-I	39.5±0.33	7.0±0.1*	5.3±0.6*	1.0±0.2*
VEGF-A	34.3±0.21	6.0±0.2*	4.2±0.4*	1.2±0.11*

**Примечание.** \* – статистически значимые различия (при  $p < 0.05$ ) между контрольной группой и группой лиц, страдающих бесплодием.

## Иммуногистохимическая характеристика семенных канальцев и их микроокружения в норме и при идиопатическом бесплодии

Белок	Природа клетки	Локализация (target sites)	Функции в сперматогенезе:		Примечание
			в норме	при бесплодии	
Ki-67	половые	ядро; сперматогонии («ve+/3»), первичные сперматоциты («ve+/1»), вторичные сперматоциты («ve+/2»), округлые сперматиды («ve±»)	пролиферация	положительная ИГХ-реакция отмечена в ядрах единичных сперматогоний («ve+/2»)	снижение пролиферации при бесплодии
p53	половые	ядро; сперматогонии («ve+/2»), первичные сперматоциты («ve+/1»), вторичные сперматоциты («ve±»)	проапоптоз	положительная ИГХ-реакция отмечена в ядрах сперматогоний («ve+/2»); клетки Сертоли («ve+/3»)	увеличение апоптоза при бесплодии
Bcl-2	половые	цитоплазма; единичные сперматогонии («ve±»), первичные сперматоциты («ve+/1»), вторичные сперматоциты («ve+/3»), сперматиды («ve+/2»)	анти-апоптоз внутренний путь (митохондрия)	сперматогонии («ve-»); зрелые клетки Сертоли («ve+/1») и незрелые клетки Сертоли («ve+/1»)	снижение антиапоптотической активности при бесплодии
caspase-9	половые	цитоплазма; сперматогонии («ve+/2»), единичные первичные и вторичные сперматоциты и сперматиды («ve+/2»), а также клетки Лейдига («ve+/2»)	апоптоз, инициация	ядра сперматогоний при гипосперматогенезе, блоке созревания и при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома («ve+/3»); клетки Сертоли («ve+/2») – в ядрах клеток Сертоли при классическом варианте с переходом в тубулярную атрофию	увеличение апоптотической активности при идиопатической форме мужского бесплодия
PLAP	половые	только в раннем эмбриогенезе – в единичных сперматогониях («ve+/3»)	дифференцировка	ИГХ-реакция визуализируется в цитолемме сперматогоний («ve+/2») до трети от общего их числа	риск малигнизации
CD117	половые	цитолемма; в эмбриогенезе – примордиальные, гоноциты («ve+/2») и промежуточные («ve+/2»), фетальные сперматогонии («ve+/1»); у взрослых – единичные сперматогонии («ve+/1»), некоторые первичные сперматоциты («ve+/1»), вторичные сперматоциты («ve+/3»), ранние сперматиды («ve+/2»); единичные клетки Лейдига («ve+/2»)	дифференцировка	ИГХ окрашивание не обнаружено («ve-»)	отсутствие плюри-потентных свойств у половых клеток при бесплодии; увеличение стволовых свойств в гаметах поздних стадий сперматогенеза
IGF-1	соматическая	цитоплазма; все мужские половые клетки («ve+/2») и соматические клетки интерстициальной ткани («ve+/1»), а также эндотелий кровеносных сосудов («ve+/1»)	паракринное воздействие на IGF1R и клетки Сертоли, что стимулирует размножение и рост гамет	аутокринный митогенный путь с экспрессией IGF-1 в клетках Сертоли; слабый уровень экспрессии в единичных клетках Сертоли («ve+/1») и в цитоплазме некоторых сохранившихся сперматогоний («ve±»)	снижение уровня контролируется связующими протеинами – расщепление IGFBP3, что снижает рост клеток при бесплодии
VEGF	соматическая	цитоплазма; сперматогонии («ve+/2»), сперматоциты I («ve+/2»); клетки Сертоли («ve+/1»); клетки Лейдига («ve+/2»); эндотелиальные клетки («ve+/3»)	влияние на гаметы не известно; ангиогенез.	зрелые клетки Сертоли («ve+/2»); цитоплазма некоторых сохранившихся сперматогоний («ve+/1»); клетки Лейдига («ve+/3»)	метастатическое распространение опухоли подавляется использованием анти-VEGF антител



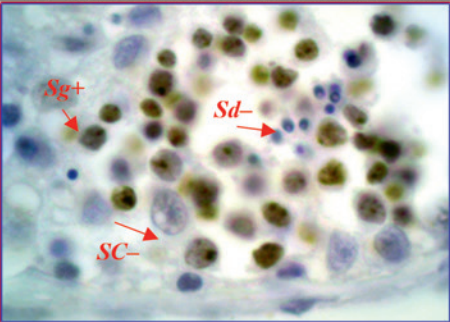
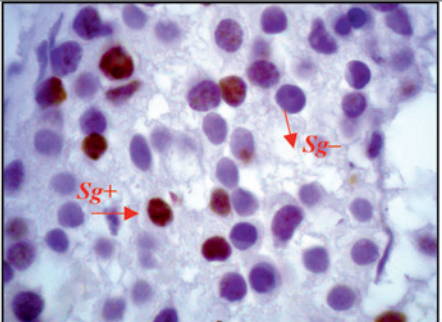
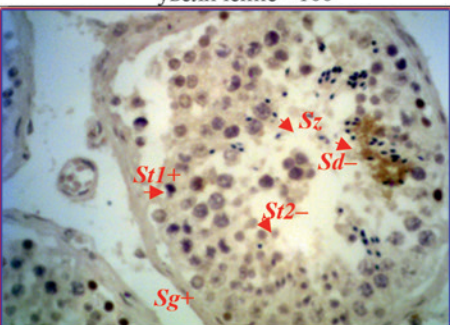
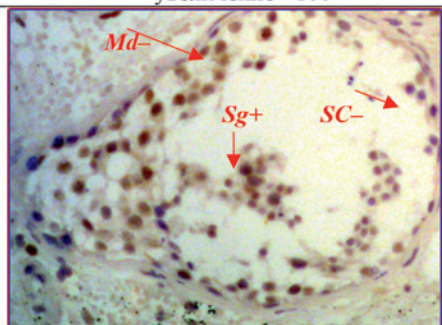

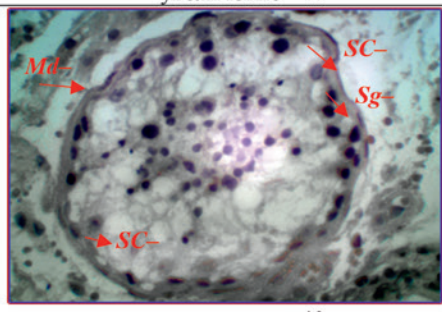
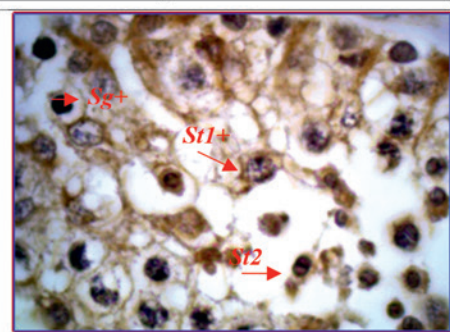
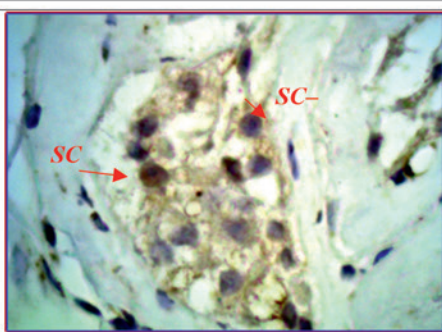
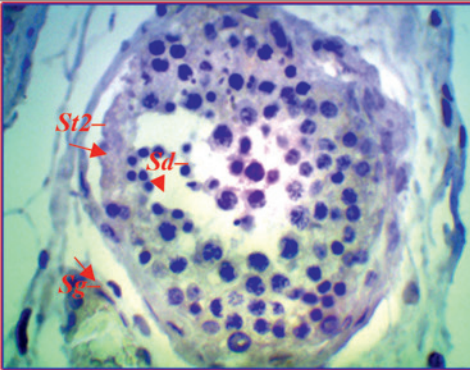
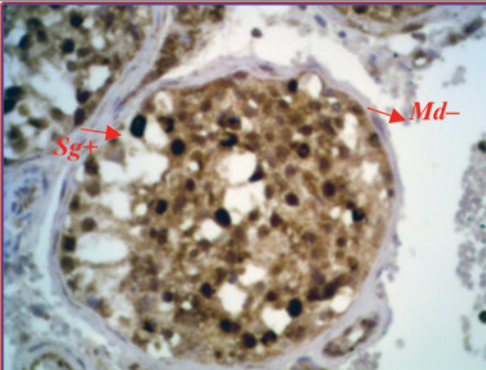
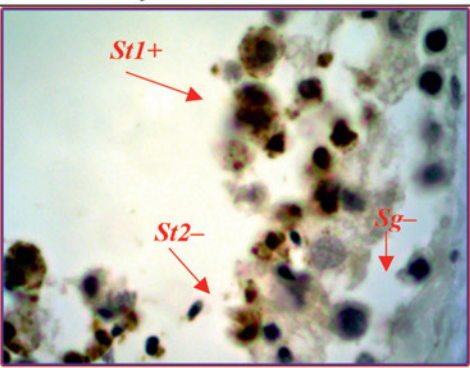
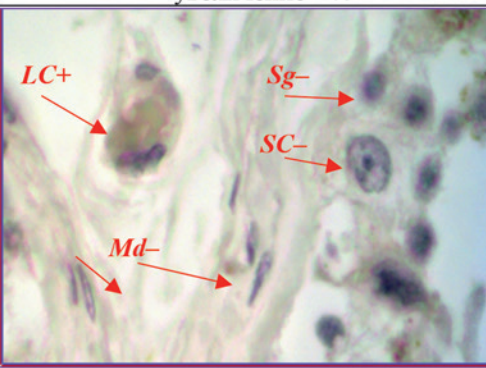
БЕЛКИ	нормальный сперматогенез (мужчины 22 – 35 лет, I группа)	идиопатическое бесплодие (мужчины 22 – 35 лет, II группа)
<b>A – БЕЛКИ-МАРКЕРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ</b>		
<p><b>Ki-67</b> В норме сперматогонии обладают более выраженной митотической активностью по сравнению с идиопатическим бесплодием</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×100</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×100</p>
<p><b>p53</b> Индекс готовности к апоптозу сперматогоний в норме выше чем в других гаметах, но в 2,6 раза ниже у лиц, страдающих бесплодием</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×40</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×40</p>
<p><b>Bcl-2</b> Показатели антиапоптоза преобладают в половых клетках у мужчин 22 – 35 лет и исчезает при идиопатическом бесплодии</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×40</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×40</p>
<p><b>caspase-9</b> в сперматогониях значения маркера иннициации апоптоза повышены при блоке созревания по сравнению с нормой</p>	 <p style="text-align: center;">увеличение ×100</p>	 <p style="text-align: center;">SCO-s; увеличение ×100</p>

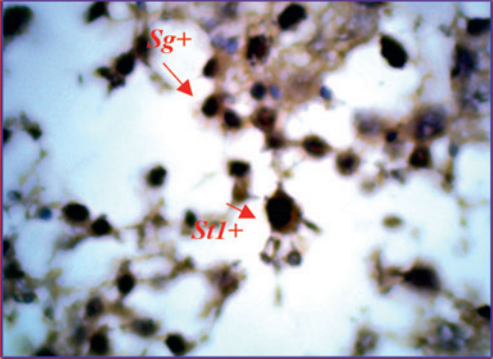
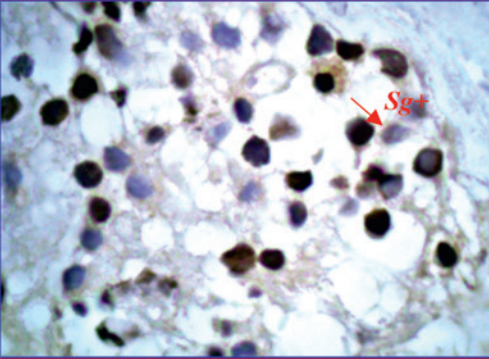
Рис. 3 А.



**Б – ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ (МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК)**

<p><b>PLAP</b> Один из факторов эмбриональной дифференцировки в нормальном сперматогенезе не обнаружен. При бесплодии – <math>10.2 \pm 0.13\%</math> среди сохранившихся сперматогоний</p>	 <p>увеличение <math>\times 40</math></p>	 <p>увеличение <math>\times 40</math></p>
<p><b>CD117</b> У молодых мужчин в норме показатели фактора дифференцировки преобладают в сперматогониях, первичных сперматоцитах, а при бесплодии отсутствуют</p>	 <p>увеличение <math>\times 100</math></p>	 <p>увеличение <math>\times 100</math></p>

**В – ФАКТОРЫ РОСТА**

<p><b>IGF-I</b> При бесплодии отмечается слабое окрашивание в сперматогониях (<math>7.0 \pm 0.22\%</math>) по сравнению с таковой возрастной группой в норме (<math>62.0 \pm 0.33\%</math>)</p>	 <p>увеличение <math>\times 100</math></p>	 <p>увеличение <math>\times 100</math></p>
---	---	--

**Рис. 3.** Иммуногистохимическая характеристика семенных канальцев и их микроокружения в норме и при идиопатическом бесплодии. А – БЕЛКИ – МАРКЕРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ; Б – ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК; В – ФАКТОРЫ РОСТА.

но важные процессы в органе проходят при относительно небольшом количестве соединительной ткани, тем самым ограничивая его защитные функции. Яички располагаются на периферии организма, как бы «автономно». Подобное «отдаленное» расположение яи-

чек не способствует защите от химических, биологических и физических (механических, температурных), в том числе радиационных воздействий [3, 4, 6]. Возможно, поэтому в них сформированы плотные волокнистые оболочки (*tunica albuginea*) и многоструктурные гемато-

тестикулярные барьеры. Учитывая вышеперечисленные органоспецифические особенности, остаётся весьма затруднительной диагностика и прогноз как воспалительных изменений, так и нарушений эндокринной функции сперматогенеза (бесплодие).

Преимущество биопсии яичка состоит в том, что исследование нативных половых клеток повышает качество прижизненной диагностики, даёт более объективную морфологическую картину интраорганных молекулярных взаимоотношений и обеспечит наибольшую информативность, в отличие от аутопсийного материала.

Проведенное ретроспективное исследование выявило выраженный дисбаланс между пролиферацией и апоптозом мужских половых клеток, а также возможное нарушение нейроэндокринной регуляции, что является одним из ключевых звеньев патогенеза идиопатической формы мужского бесплодия.

### Заключение

Комплексный анализ патологического сперматогенеза и его микроокружения при идиопатической форме мужского бесплодия может свидетельствовать о персонифицированных нарушениях чувствительности и специфичности половых клеток к биологически активным веществам, обеспечивающим их пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. Морфологическое исследование биопатов яичек с использованием иммуногистохимических реакций является одним из необходимых пунктов в алгоритме диагностики и прогноза мужского бесплодия.

### Литература

1. Esteves S.C., Miyaoka R., Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 2011; 66(4): 691-700.

#### Сведения об авторе:

**Демяшкин Григорий Александрович**, гистолог-эмбриолог, врач-патологоанатом, канд. мед. наук, доцент каф. патологической анатомии им. акад. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет); член European Association of Urology, Section of Andrological. Urology (ESAU).

2. Божедомов В.А., Громенко Д.С., Ушакова И.В., Тропцева М.В., Галимов Ш.Н., Александрова Л.А. и др. Оксидативный стресс сперматозоидов в патогенезе мужского бесплодия. *Урология*. 2009; 2: 51-5.
3. Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology*, 3rd Edition. 2014; P. 976.
4. Демяшкин Г. А. Апоптоз в семенных канальцах человека в норме и при идиопатическом бесплодии. *Цитология*. 2018; 60(3): 208-18.
5. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th edition, Geneva, 2010.
6. Демяшкин Г.А. Пролиферация и апоптоз мужских половых клеток в сперматогенном эпителии в норме и при необструктивной азооспермии. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2016; (2):19-32.
7. Caires K.C., de Avila J., McLean D.J. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction*. 2009; 138: 667-77.

### References

1. Esteves S.C., Miyaoka R., Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 2011; 66(4): 691-700.
2. Bozhedomov V.A., Gromenko D.S., Ushakova I.V., Troptseva M.V., Galimov Sh.N., Aleksandrova L.A. et al. Oxidative stress sperm in the pathogenesis of male infertility. *Urologiya*. 2009; 2: 51-5. (in Russian)
3. Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology*, 3rd Edition. 2014; P. 97
4. Demyashkin G.A. Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologiya*. 2018; 60(3): 208-18. (In Russian)
5. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*, 5th edition, Geneva, 2010.
6. Demyashkin G.A. Proliferation and apoptosis of male germ cells in the seminiferous epithelium in normal and nonobstructive azoospermia. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2016; (2):19-32. (In Russian)
7. Caires K.C., de Avila J., McLean D.J. Vascular endothelial growth factor regulates germ cell survival during establishment of spermatogenesis in the bovine testis. *Reproduction*. 2009; 1 38: 667-77.