

Морфологические изменения в ткани яичка при бесплодии

Н.Г. Кульченко¹, Г.А. Демяшкин²

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, 6;

²Научный клинический центр ОАО «Российские железные дороги»; Россия, Москва, 123567, Волоколамское шоссе, 84

Контакты: Нина Геннадьевна Кульченко kle-kni@mail.ru

Введение. Диагностика мужского бесплодия актуальна. Современные авторы считают, что на долю мужского бесплодия приходится до 40–50 % всех случаев. Наиболее тяжелым считается идиопатическое мужское бесплодие, распространенность которого в Европе достигает 31–44 %.

Цель исследования — выявить морфологические изменения в ткани яичка у мужчин с необструктивной формой бесплодия.

Материалы и методы. Были обследованы 26 больных с идиопатической необструктивной азооспермией (по данным спермограммы). Группу сравнения составили 22 практически здоровых мужчины.

Пациентам по показаниям выполняли биопсию яичка с последующим морфологическим анализом. Срезы ткани яичка подвергали окрашиванию гематоксилином и эозином. С помощью метода непрямого иммуногистохимического анализа выявляли универсальные факторы роста: инсулиноподобный фактор роста 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1), васкулярно-эндотелиальный фактор роста (vascular endothelial growth factor, VEGF), эпидермальный фактор роста (epidermal growth factor, EGF).

Результаты. По данным ультразвукового исследования мошонки в В-режиме выявлены достоверные различия структуры яичка: наличие эхопозитивных включений, неоднородность паренхимы, повышение ее эхогенности ($p < 0,05$). При окрашивании срезов яичка гематоксилином и эозином зафиксировали достоверные изменения в извитых семенных канальцах у пациентов с азооспермией: диаметр уменьшен в 1,5–2,0 раза (гипоплазия), базальная мембрана с выраженным волокнистым компонентом (фиброзирование) ($p < 0,05$). Уровень экспрессии IGF-1 в половых клетках — до 5 %. У пациентов основной группы экспрессию маркера EGF в половых клетках, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках не обнаружили («—»). Уровень экспрессии VEGF в половых клетках — до 10 %.

Выводы. Для определения репродуктивного потенциала яичек у пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией показано использовать биопсию яичка с оценкой морфологии клеток сперматогенеза и универсальных факторов роста для выявления нарушений в регуляции сперматогенеза.

Ключевые слова: необструктивное идиопатическое мужское бесплодие, морфология яичка, иммуногистохимическое исследование факторов роста

DOI: 10.17650/2070-9781-2016-17-3-38-42

Morphological changes in testicular tissue in infertility

N.G. Kul'chenko¹, G.A. Demyashkin²

¹Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow, 117198, Russia;

²Research Clinical Center, Russian Railways; 84 Volokolamskoe Shosse, Moscow, 123567, Russia

Background. Diagnosis of male infertility is relevant. Contemporary authors, believe that the share of male infertility accounts for up to 40–50 %.

Objective: to improve the results of diagnostics of male infertility.

Materials and methods. We studied 26 men with non-obstructive azoospermia. The comparison group consisted of healthy men 22. Patients according to indications performed testicle biopsy with subsequent morphological analysis of biopsy specimens. Sections of testicular tissue was subjected to staining with hematoxylin and eosin, indirect immunohistochemical study of universal growth factors: insulin-like growth factor-1 (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), epithelial growth factor (EGF).

Results. According to ultrasound of the scrotum in the b-mode we also noted a significant difference in the structure of the testis: the presence of echo-positive inclusions, inhomogeneity of the parenchyma, increase of its echogenicity ($p < 0.05$). The staining of sections of testis stained with hematoxylin and eosin, we recorded significant changes in convoluted seminiferous tubules in patients with azoospermia: the diameter is reduced in 1.5–2.0 times (hypoplasia), basal membrane with distinct fibrous component (the fibrosis) ($p < 0.05$). The level of expression of IGF-1 in the germ cells — up to 5 %. In patients of the main group, the expression of marker EGF in germ cells, Sertoli cells and Leydig, and in modnyh cells we did not find («—»). The level of VEGF expression in germ cells up to 10 %.

Conclusions. Severe forms of male infertility (non-obstructive idiopathic azoospermia) requires a comprehensive clinical and morphological examination.

Key words: non-obstructive idiopathic male infertility, morphology of testis, immunohistochemically the study of growth factors



Введение

Частота бесплодных пар в мире постоянно растет: в Европе и США она составляет 15 %, в Канаде — 17 %, а в России приближается к 20 % [1–3]. В последнее время распространенность мужского бесплодия достигла 40–50 % [1, 3, 4]. Современные методы диагностики мужского бесплодия расширяют диапазон возможностей и доказывают, что причинами нарушения фертильности спермы могут быть не только известные факторы (инфекции, передаваемые половым путем (22,1 %), варикоцеле (14,9 %), эндокринные нарушения (14,8 %), обструкция семявыносящих путей (2,9 %), генетические аномалии (2,8 %), аутоиммунный процесс (4,7 %)), но и фрагментация ДНК, метаболический синдром, оксидативный стресс [1, 2, 5–7].

Бесплодие с невыявленными (неизвестными) причинами нарушения фертильности называют идиопатическим [1, 3]. Согласно современным данным доля идиопатического мужского бесплодия в Европе составляет до 31–44 % всех случаев мужского бесплодия [3]. Лечение этой категории пациентов является самой сложной с клинической и психологической точек зрения, так как отсутствие видимых причин нарушения фертильности нередко представлено самыми тяжелыми формами патоспермии вплоть до азооспермии (необструктивной и обструктивной) [1, 3, 8], поэтому разработка дополнительных диагностических критериев, расшифровка соответствующих патогенетических механизмов и в конечном счете их ликвидация с помощью рациональной терапии — важные задачи не только урологов и андрологов, но и врачей других специальностей.

Цель исследования — выявить морфологические изменения в ткани яичка у мужчин с необструктивной формой бесплодия.

Материалы и методы исследования

Были обследованы 26 мужчин из бесплодных пар в возрасте 24–47 лет (средний возраст $35,5 \pm 11,5$ года). Эти пациенты составили основную группу. В группу сравнения вошли 22 практически здоровых мужчины. Критериями включения были: возраст младше 47 лет, установленный факт бесплодия без контрацепции, отсутствие патологии со стороны половой партнерши, отсутствие в анамнезе двусторонних поражений яичек и гипоплазии яичек с 2 сторон.

Критериями исключения являлись: обструктивная форма бесплодия, заболевания, передающиеся половым путем, варикоцеле, выявленные генетические и эндокринные факторы бесплодия, тяжелая сопутствующая патология на момент обследования.

В обязательное клиническое обследование всех мужчин входили: сбор анамнеза, стандартные клинико-лабораторные методы, определение гормонального профиля, двукратное исследование эякулята, определение

(методом MAR) процента сперматозоидов, покрытых атиспермальными антителами, ультразвуковое исследование (УЗИ) органов мошонки.

УЗИ мошонки проводили на аппарате Logiq 9 Expert GE с применением линейного датчика 7 МГц с использованием серошкального В-режима, цветового и доплеровского сканирования.

Пациентам по показаниям выполняли биопсию яичка с последующим морфологическим анализом биоптатов. Ткань яичка подвергали стандартной гистологической проводке с окрашиванием срезов гематоксилином и эозином. С помощью метода непрямого иммуногистохимического анализа выявляли универсальные факторы роста: инсулиноподобный фактор роста 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1), васкулярно-эндотелиальный фактор (vascular endothelial growth factor, VEGF), эпидермальный фактор (epidermal growth factor, EGF).

Статистическую обработку материала проводили с использованием электронных таблиц Excel и программы Statistica 6.0. При этом применяли следующие показатели: среднее значение (M) и среднеквадратичное отклонение (δ). Оценку достоверности различий между количественными показателями выполняли с помощью критерия Манна–Уитни. Для сравнения качественных параметров использовали точный критерий Фишера или χ^2 . Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

У 26 мужчин основной группы по данным спермограммы было зарегистрировано отсутствие сперматозоидов — необструктивная азооспермия. В этой группе пациентов первичное бесплодие отмечено у 16 (61,5 %) мужчин, вторичное — у 10 (38,5 %). Средний период вторичного бесплодия составлял $51,1 \pm 33,8$ (12–240) мес. Все пациенты отрицали в анамнезе перенесенные детские инфекции, вредные факторы на производстве.

Результаты клинического исследования больных основной группы (клинический анализ крови и мочи, анализ секрета предстательной железы, биохимический анализ крови, гормональный профиль, мазок из уретры на инфекции, передающиеся половым путем, определение антиспермальных антител, кариотипирование) патологических изменений не выявили. Таким образом, основную группу составили пациенты с идиопатическим бесплодием.

По данным УЗИ мошонки в В-режиме были обнаружены достоверные различия структуры яичка: наличие эхопозитивных включений, неоднородность паренхимы, повышение ее эхогенности ($p < 0,05$).

Большое внимание уделяли гистологическому исследованию ткани яичка. Во всех представленных фрагментах ткани яичка зафиксировали достоверные изменения в извитых семенных канальцах у пациентов с азооспермией: диаметр уменьшен в 1,5–2,0 раза

(гипоплазия), базальная мембрана с выраженным волокнистым компонентом (фиброзирование) ($p < 0,05$). Такие каналцы не имеют просвета и заполнены недифференцированными клетками Сертоли с отчетливо различимыми ядрышками, располагающимися местами в несколько слоев. В некоторых семенных каналцах определяются единичные сперматогонии. Базальные отсеки вакуолизированные, половые клетки отсутствуют (сперматогонии), на месте просветов содержатся деструктивные клетки, которые еще не лизировались. Признаков интратубулярной неоплазии половых клеток нет. Во многих извитых семенных каналцах отмечают морфологические признаки перитубулярного склероза с гиалинозом, прослойки интерстициальной ткани широкие (рис. 1). При серийных срезах в интерстиции выявлены области выраженной пролиферации клеток Лейдига (нодулярная гиперплазия).

Непрямой иммуногистохимический анализ IGF-1 у основной группы пациентов показал слабый его уровень экспрессии, который зафиксировали в единичных клетках Сертоли («+») и некоторых сохранившихся сперматогониях («±») (рис. 2). Уровень экспрессии IGF-1 в половых клетках — до 5 %. Роль IGF-1 в сперматогенезе, селекции мужских половых клеток и элементов микроокружения семенных извитых каналцев является крайне важной. IGF обладает широким спектром митогенных и метаболических эффектов [3]. Таким образом, при идиопатической азооспермии определяется слабая («±») экспрессия IGF в сперматогониях и клетках Сертоли [8].

При обнаружении IGF-1 в контрольной группе наиболее ярко маркируются половые и менее — соматические клетки семенного извитого каналца, а также его микроокружения ($p < 0,05$).

EGF играет важную роль в завершении процесса сперматогенеза. У пациентов основной группы экспрессию маркера EGF в половых клетках, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках не выявили («—») ($p < 0,05$). Уровень экспрессии EGF в половых клетках при необструктивной азооспермии составляет 0 %. Это во многом объясняет появление признаков, которые мы обнаружили при окрашивании срезов гематоксилином и эозином (практически полная деструкция клеток сперматогенного эпителия, перитубулярный склероз и гиалиноз), так как EGF ингибирует дифференцировку сперматогониев с одной стороны и повышает пролиферацию фибробластов интерстициальной ткани — с другой.

При исследовании EGF у мужчин контрольной группы была отмечена выраженная («+++») его экспрессия в половых клетках на всех этапах сперматогенеза ($p < 0,05$).

У пациентов основной группы высокий уровень экспрессии VEGF зафиксировали в эндотелии кровеносных сосудов («+++») и клетках Лейдига («+++»),

средний уровень экспрессии — в зрелых клетках Сертоли (до 80 % от общего числа) («+») и в сперматогониях (до 50 % от общего числа) («±»). Уровень экспрессии VEGF в половых клетках — до 10 % ($p < 0,05$).

Эндотелиоциты кровеносных сосудов вблизи семенных каналцев секретируют белок VEGF⁺, благодаря которому осуществляется регуляция пролиферации гладкомышечных клеток, фибробластов и интерстициальных эндокриноцитов. Эндотелиоциты участвуют в обмене веществ, необходимых для поддержания гомеостаза аутокринной и паракринной регуляции клеток тканей яичка. На поверхности эндотелиальных клеток имеются рецепторы к множеству циркулирующих в крови метаболитов, которые в дальнейшем при необходимости подвергаются элиминации в крови. Это подтверждает значимость эндотелиоцитов в конструктивном взаимодействии клеточных популяций тканей яичка. Взаимодействия между sustentocитами и кле-

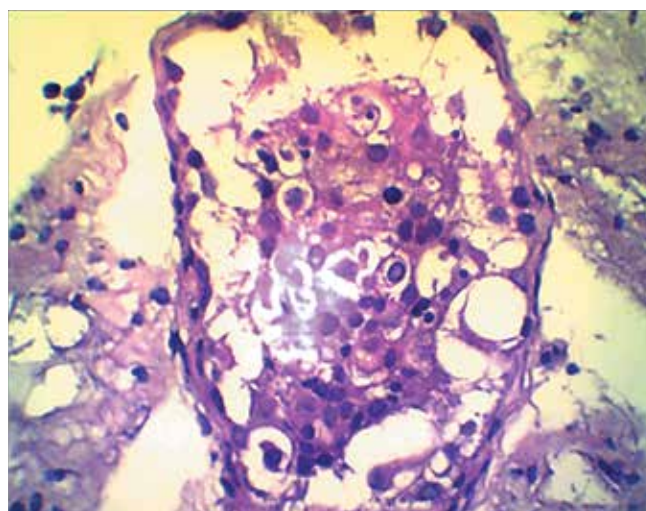


Рис. 1. Яичко, семенной каналец при идиопатическом бесплодии (окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 40$)

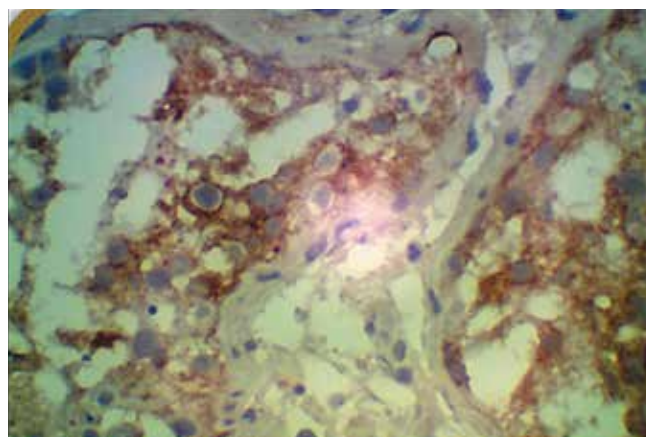


Рис. 2. Яичко, семенной каналец при идиопатическом бесплодии. Иммуногистохимическое исследование с антителами к IGF-1 (окрашивание ядер гематоксилином, $\times 100$)

точным микроокружением представляют собой один из самых сложных примеров межклеточных связей.

У пациентов контрольной группы при иммуногистохимической реакции на выявление VEGF метка в структурах яичка распределилась следующим образом: клетки Сертоли («++») и прилежащие к канальцу клетки интерстициальной ткани положительно маркируются на VEGF (рис. 3). Среди половых клеток слабо маркируется цитоплазма сперматогониев («+») и первичных сперматоцитов («+»). Также активно метится цитоплазма клеток перитубулярной интерстициальной ткани («++»). В клетках Лейдига маркируется только их цитоплазма.

В стенке кровеносных сосудов некоторые гладкомышечные клетки окрашиваются положительно («+++»). Эндотелиальные клетки всех кровеносных сосудов метятся положительно («+++») ($p < 0,05$).

Таким образом, значимость регионального механизма аутокринной и паракринной регуляции тканей гонад подтверждает активный синтез исследованных факторов роста как соматическими, так и половыми клетками. Отсутствие специфического маркирования стромы свидетельствует о ее вспомогательной роли в этих процессах.

Следовательно, активная экспрессия исследованных факторов роста как соматическими, так и половыми клетками гонад подтверждает их функциональную необходимость в региональном механизме аутокринной и паракринной регуляции процессов в яичке.

Обсуждение

Факторы роста — полипептиды с молекулярной массой 5–50 кДа, объединенные в группу трофических регуляторных субстанций. Эти белки влияют на клетки, обеспечивая, прежде всего, их пролиферацию.

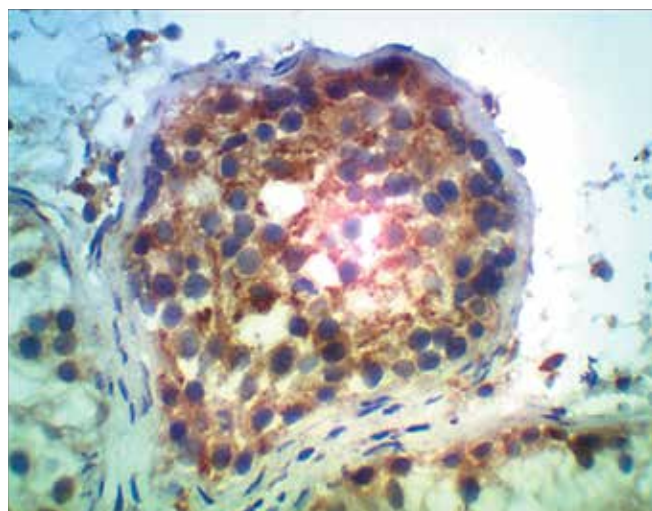


Рис. 3. Яичко, семенной каналец при идиопатическом бесплодии. Иммуногистохимическое исследование с антителами к VEGF (окрашивание ядер гематоксилином, $\times 40$)

Важную роль в регуляции сперматогенеза играют местные факторы — различные химические соединения, которые синтезируются в яичке и накапливаются в его структурах. К ним относятся факторы роста (IGF-1, EGF, VEGF), белки пролиферации и апоптоза (Ki-67), трансформирующие различные центральные сигналы и, таким образом, паракринно регулирующие сперматогенез [7].

Среди факторов роста лидирующим в воздействии на физиологию яичек является IGF [8], который синтезируется под влиянием хорионического гонадотропина человека [3]. Трансформирующие факторы роста α и β , синтезируемые клетками Сертоли, подавляют стероидогенез в клетках Лейдига, воздействуя на экспрессию рецепторов лютеинизирующего гормона [3, 9, 10]. В то же время образование трансформирующих факторов роста в клетках Сертоли тормозится фолликулостимулирующим гормоном [6].

EGF — глобулярный белок, который действует как сильный митоген на различные клетки эндодермального, эктодермального и мезодермального происхождения. EGF участвует в дифференциации мужской репродуктивной системы через модуляцию рецепторов андрогенов. Отмечено, что высокий уровень EGF очень важен для завершения сперматогенеза [11]. EGF регистрируют в зрелых половых клетках, расположенных в адлюминальных отсеках извитых семенных канальцев. По данным ряда исследований, концентрация EGF может сделать процесс бесплодия обратимым: эти эффекты опосредованы интерстициальными (стромальными) клетками яичек [12].

VEGF — гетеродимерный гликопротеиновый фактор роста, продуцируемый различными типами клеток и в первую очередь эндотелиоцитами [7]. Это потенциальный митоген для эндотелиальных клеток. Из-за способности VEGF воздействовать на проницаемость сосудов следует возможность вовлечения этого фактора роста в изменение функций гематотестикулярного барьера в субнормальных и патологических условиях.

Кровоснабжение яичка, а также сосудистая пролиферация играют важную роль для нормального сперматогенеза. Дифференциация различной экспрессии VEGF в пределах яичка весьма варьирует, что отражает эффекты VEGF в компартментах яичка [6]. Авторы приводят доказательства того, что сверхэкспрессия VEGF в яичке и придатке трансгенных мышей вызывает бесплодие. Полученные результаты свидетельствуют о том, что VEGF трансгенных органов содержат другие клетки-мишени эндотелия в яичке, и может регулировать мужскую фертильность [8].

Таким образом, можно сделать вывод о том, что в основе физиологического течения сперматогенеза лежит комплекс структурно-функциональных интрагонадных механизмов, важнейшими из которых явля-



ются тестикуло-соматические и перитубулярные отношения. Соматические структуры (интерстициальная ткань, микрососуды, нервные окончания) играют ключевую роль в регуляции сперматогенеза. Они осуществляют защиту и трофику мужских половых клеток, способствуют течению мейоза и спермиогенеза, воспринимают внешние и внутренние тестикулярные сигналы нервной, эндокринной и иммунной систем, тем самым локально регулируют нормальное функционирование эпителиоспермального пласта.

Заключение

Тяжелые формы мужского бесплодия требуют комплексного клинического и морфологического обследования.

Для определения репродуктивного потенциала яичка у пациентов с идиопатической необструктивной азооспермией показано выполнять биопсию яичка с оценкой морфологии клеток сперматогенеза, а также универсальных факторов роста в целях выявления нарушений в регуляции сперматогенеза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гамидов С.И., Попова А.Ю., Овчинников Р.И. Необструктивная азооспермия — клинические рекомендации. Русский медицинский журнал 2015;11(23):595–601. [Gamidov S.I., Popova A.Yu., Ovchinnikov R.I. Non-obstructive azoospermia — clinical recommendations. Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal 2015;11(23):595–601. (In Russ.)].
2. Al-Moushaly A. Recent acquisitions in the medical treatment of infertility caused by Chlamydia Trachomatis. J Med Life 2013;6(2):168–70.
3. Andersson A.M., Jorgensen N., Frydelund-Larsen L. et al. Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. J Clin Endocrinol Metab 2006;89(7):3161–7.
4. Абоян И.А., Грачев С.В., Павлов С.В. и др. Структура и корреляция мужского бесплодия. Материалы 8-го Конгресса «Мужское здоровье». Ереван, 26–28 апреля 2012 г. С. 10. [Aboyan I.A., Grachev S.V., Pavlov S.V. et al. Structure and correlation of men's infertility. Materials of the 8th Men's Health Congress. Erevan, April 26–28, 2012. P. 10. (In Russ.)].
5. Жуков О.Б., Ефремов Е.А., Красняк С.С. и др. Ретроградная рентгеноэндоваскулярная склеротерапия у больных с варикоцеле, осложненным патоспермией. Международный журнал интервенционной кардиоангиологии 2013;(35):44. [Zhukov O.B., Efremov E.A., Krasnyak S.S. et al. Retrograde roentgen-endovascular sclerotherapy at patients with varicocele, aggravated by pathospermia. Mezhdunarodnyy zhurnal intervencionnoy kardioangiologii = International Intervention Cardioangiology Journal 2013;(35):44. (In Russ.)].
6. Anniballo R., Ubaldi F., Cobellis L. et al. Criteria predicting the absence of spermatozoa in the Sertoli cell-only syndrome can be used to improve success rates of sperm retrieval. Hum Reprod 2000;15(11):2269–77.
7. Hutson J.M., Southwell B.R., Li R. et al. The regulation of testicular descent and the effects of cryptorchidism. Endocr Rev 2013;34(5):725–52.
8. Ivell R., Kotula-Balak M., Glynn D. et al. Relaxin family peptides in the male reproductive system — a critical appraisal. Mol Hum Reprod 2011;17(2):71–84.
9. Ivell R., Wade J.D., Anand-Ivell R. Insulin-like factor 3 (INSL3) as a biomarker of Leydig cell functional capacity. Biol Reprod 2013;88(6):147.
10. Siqin, Minagawa I., Okuno M. et al. The active form of goat insulin-like peptide 3 (INSL3) is a single-chain structure comprising three domains B-C-A, constitutively expressed and secreted by testicular Leydig cells. Biol Chem 2013;394(9):1181–94.
11. Kawamura K., Kumagai J., Sudo S. et al. Paracrine regulation of oocyte maturation and male germ cell survival. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101(19):7323–8.
12. Franke F.E., Pauls K., Rey R. et al. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. Anat Embryol 2004;209(2):169–77.