

Особливості стану гематотестикулярного бар'єра при різних формах чоловічої неплідності

С.В. Базалицька

Державна установа «Інститут урології НАМН України», м. Київ

Вивчені імуногістохімічні (ІГХ) особливості експресії протеїну Claudin 11 в тканині яєчка 28 хворих при екскреторно-обтураційній та секреторній формах чоловічої неплідності. Виявлене достовірне зниження рівня ІГХ-експресії протеїну Claudin 11 при секреторній формі чоловічої неплідності та синдромі „лише клітини Сертолі”, порівняно із екскреторно-обтураційною неплідністю. Результати свідчать про значні порушення гематотестикулярного бар'єра, які є основою розвитку додаткового імунного компонента та поглиблення патологічних змін тканини яєчка у хворих при секреторній формі чоловічої неплідності.

Ключові слова: чоловіча неплідність, протеїн Claudin 11.

У чоловічій репродуктивній системі існує гематотестикулярний бар'єр, утворений щільними контактами між клітинами Сертолі (головний компонент) та структурами, які відокремлюють зрілі сперматозоїди від периферійної крові і запобігають їх взаємодії з імунокомпетентними клітинами. Різні фактори, що порушують цей бар'єр, призводять до виникнення імунних реакцій з утворенням у крові антитіл до епітелію сім'яних каналців та розвитку автоімунної неплідності, оскільки сперматозоїди з'являються під час статевого дозрівання вже після того, як сформувалась імунна толерантність до власних тканин організму. Антиспермальні антитіла – це імуноглобуліни G, A та M, які при взаємодії зі сперматозоїдами здатні їх іммобілізувати, аглютинізувати, блокувати процес пенетрації (проникнення) в яйцеклітину, унеможливаючи процес запліднення, або блокувати процес імплантації ембріона, навіть у разі використання допоміжних репродуктивних технологій [1, 2]. Лабораторна діагностика імунної неплідності на сьогоднішній день включає дослідження крові та сім'яної рідини на антиспермальні антитіла – імуноглобуліни G, A та M, хоча ці імуноглобуліни не є специфічними маркерами автоімунної неплідності [3, 4]. Крім того, гематотестикулярний бар'єр виконує трофічну функцію, а також забезпечує в каналцях специфічне гормональне середовище, необхідне для сперматогенезу. У зв'язку з цим, порушення гематотестикулярного бар'єра – важливий чинник виникнення порушень сперматогенезу (оліго-, терато- і азооспермії). Тому стан гематотестикулярного бар'єра – важливий діагностичний і прогностичний фактор, який необхідно враховувати в лікуванні чоловічої неплідності.

Молекулярними дослідженнями останніх років встановлено, що трансмембранні білки сімейства claudins складають основу міжклітинних щільних замикальних контактів, які утворюють тканинні бар'єри, в тому числі гематотестикулярний бар'єр, що наявний в чоловічій репродуктивній системі [5–8]. Результати нещодавно проведених досліджень свідчать, що протеїн Claudin 11, який експресує переважно в щільних контактах між клітинами Сертолі відіграє важливу роль в регуляції гематотестикулярного бар'єра та може бути як маркером стану гематотестикулярного бар'єра та сперматогенезу при чоловічій неплідності різної етіології [9, 10].

Мета дослідження – визначити особливості стану гематотестикулярного бар'єра за імуногістохімічною експресією протеїну Claudin 11 у хворих із екскреторно-обтураційною та секреторною формами чоловічої неплідності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліджено матеріал 28 хворих на азооспермію, отриманий під час інцизійної біопсії, з наступним гістологічним та імуногістохімічним дослідженням біоптату. Для встановлення клінічного діагнозу форми неплідності користувались загальноприйнятою класифікацією [11]. При визначенні заключного діагнозу враховували дані морфологічного дослідження біоптату яєчка та результати гормональних досліджень. Згідно з встановленим діагнозом пацієнтів було розподілено на три групи:

1-а група – 11 хворих, у яких було встановлено діагноз екскреторно-обтураційної неплідності. Середній вік хворих – 33,6 року.

2-а група – 12 пацієнтів, у яких було встановлено діагноз секреторної неплідності із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1-го і 2-го порядку чи сперматид. Середній вік хворих – 29,5 року.

3-я група – 5 пацієнтів, у яких було встановлено діагноз секреторної неплідності із синдромом «лише клітини Сертолі». Середній вік хворих – 28,5 року.

Для гістологічного дослідження біоптату тканини яєчка фіксували в рідині Буена і заливали в парафін. Із парафінових блоків виготовляли зрізи завтовшки 5 мкм, які фарбували гематоксилін-еозином.

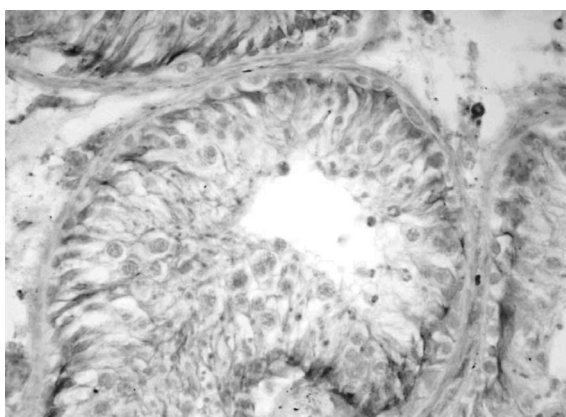
Імуногістохімічний (ІГХ) аналіз здійснювали з використанням стандартного авідин-біотинного методу. Для ІГХ-дослідження біоптату фіксували у 12% забуференому формаліні, заливали в парафін і виготовляли зрізи завтовшки до 5 мкм. Зрізи інкубували з первинними антитілами Claudin 11 (DAKO, Glostrup, Данія) в розведенні 1:50. Наприкінці препарати проявляли 1–2 хв у 0,05% розчині діамінбензидину (DAB), дофарбовували гематоксиліном та вміщували в канадський бальзам. Як позитивний контроль використовували зрізи тканин із відомим заздалегідь високим вмістом Claudin 11. Ті самі зрізи служили негативним контролем, але без оброблення первинними антитілами. У кожному випадку для ІГХ-дослідження аналізували 12–16 зрізів. Поширеність та інтенсивність ІГХ-реакції оцінювали за напівкількісним методом в балах [12]. Поширеність реакції або кількість забарвлених ядер чи цитоплазми клітин оцінювали від 0 до 3 балів за такими критеріями: 0 – відсутність клітин із видимим забарвленням, 1 – забарвлено менше 10% клітин, 2 – забарвлено більше 10%, але менше 50% клітин, 3 – рівномірно забарвлено більше 50% клітин клітинного шару. Інтенсивність забарвлення ядер або цитоплазми оцінювали за такими критеріями: 0 – відсутність видимого забарвлення, 1 – слабо забарвлені ядра або цитоплазма, 2 – помірно забарв-

МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ

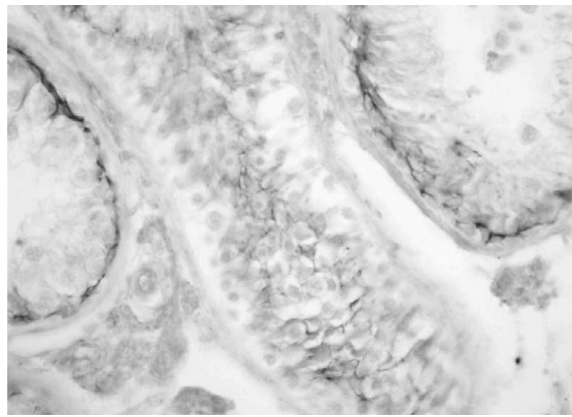
Показники ІГХ-експресії протеїну Claudin 11 в біоптатах яєчка у хворих із різними формами чоловічої неплідності

| Структурні елементи біоптату яєчка | Форми неплідності у чоловіків | | |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| | Екскреторно-обтураційна, n=11 | Секреторна, n=12 | Синдром «лише клітини Сертолі», n=5 |
| Клітини Сертолі | 7,4±0,45* | 5,3 ±0,42* | 0,8±0,6* |
| Ендотелій гемокапілярів | 7,2±0,45* | 5,3 ±0,42* | 0,8±0,6* |
| Сперматогонії | 2,1±0,18 | 1,5±0,17 | - |
| Сперматоцити | 2,1±0,18 | 1,5 ±0,17 | - |
| Сперматиди | 0 | 0 | - |
| Сперматозоїди | 0 | - | - |

* – достовірно між групами; p<0,001.



Мал. 1. Екскреторно-обтураційна неплідність. Виражена мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (8 балів) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. × 200



Мал. 2. Секреторна неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматоцитів 1-го порядку. Помірна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (4 бали) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. × 200

лені ядра або цитоплазма, 3 – інтенсивно забарвлені ядра або цитоплазма. Загальний результат ІГХ-реакції визначали за показниками імуногістохімічного коефіцієнта (ІГХК) від 0 до 9 балів, який одержували перемноженням оцінок поширеності та інтенсивності забарвлення. Проводили статистичний аналіз отриманих результатів.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні ІГХ-експресії протеїну Claudin 11 в групі хворих на екскреторно-обтураційну неплідність із збереженим сперматогенезом (всього 11 пацієнтів), спостерігали помірне мембранозно-цитоплазматичне забарвлення (4–6 балів) клітин Сертолі в 6 спостереженнях (54,5%), в 5 випадках (45,5%), було виявлено виражену мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (7–9 балів) (мал. 1). Середнє значення ІГХК дорівнювало 7,4±0,45 бала.

Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії, сперматоцити 1-го і 2-го порядку виявляли слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 1–3 бали в усіх 11 спостереженнях (100%) даної групи. Середнє значення ІГХК становило 2,1±0,18. Необхідно зазначити, що сперматиди та зрілі сперматозоїди характеризувались відсутністю ІГХ-експресії протеїну Claudin 11 (0 балів) в усіх 11 випадках (100%).

В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів виявляли виражену мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (7–9 балів) у 5 випадках

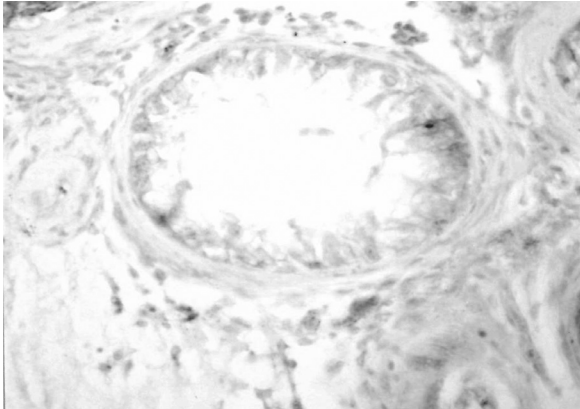
(45,5%), а в 6 спостереженнях (54,5%) даної групи спостерігали помірну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 4–6 балів. Середнє значення ІГХК дорівнювало 7,2±0,45 бала (таблиця).

У групі хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1-го і 2-го порядку чи сперматид (усього 12 пацієнтів) спостерігали помірну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (4–6 балів) в клітинах Сертолі у 8 спостереженнях (66,7%) (мал. 2) в 4 випадках (33,3%) було виявлено слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (1–3 бали) в суспендоцитах. Середнє значення ІГХК становило 5,43±0,42.

Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії та сперматоцити 1-го і 2-го порядку, що виявлені в цій групі пацієнтів, характеризувались слабкою мембранозно-цитоплазматичною експресією протеїну Claudin 11 в 1–3 бали в усіх спостереженнях (100%) даної групи. Середнє значення ІГХК для цих клітин сперматогенного епітелію становило 1,5±0,17.

В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів виявляли помірну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (4–6 бали) у 8 випадках (66,7%), а в 4 випадках (33,7%) даної групи спостерігали слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 1–3 бали. Середнє значення ІГХК дорівнювало 5,3±0,42 бала (див. таблицю).

У групі хворих на секреторну неплідність із синдромом „лише клітини Сертолі” (всього 5 пацієнтів) в клітинах Сертолі



Мал. 3. Секреторна неплідність із синдромом “лише клітини Сертолі”. Слабка мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (2 бали) в клітинах Сертолі. Імунопереоксидазний АВС-метод. $\times 200$

спостерігали слабку мембранозно-цитоплазматичне забарвлення протеїну Claudin 11 в 1–3 бали в 2 спостереженнях (40%) (мал. 3), у 3 випадках (60%) мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 в суспензіях була відсутня (0 балів). Середнє значення ІГХ становило $0,8 \pm 0,6$ бала.

В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів спостерігали слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 1–3 бали у двох спостереженнях (40%) даної групи; в інших 60% випадків експресія протеїну Claudin 11 була відсутня (0 балів). Середнє значення ІГХ також дорівнювало $0,8 \pm 0,6$ бала.

Таким чином, встановлено статистично достовірне зниження показників ІГХ-експресії протеїну Claudin 11 в клітинах Сертолі та ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів в групах хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматоцитів 1-го і 2-го порядку чи сперматид та із синдромом “лише клітини Сертолі” порівняно із пацієнтами із екскреторно-обтураційною неплідністю.

Сучасними молекулярними дослідженнями встановлено, що протеїни сімейства claudins – це трансмембранні білки, які є найважливішим компонентом міжклітинних щільних замикальних контактів, що виконують бар’єрну функцію, утворюючи тканинні бар’єри в різних органах. Крім них, у складі щільних контактів виявляються трансмембранний протеїн occludin, цитоплазматичні білки zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) та junctional adhesion molecule (JAM), але в значно в меншій кількості. Отже, клаудини є головним компонентом міжклітинних щільних замикальних контактів, молекула клаудину має чотири трансмембранних домени, дві позаклітинні та одну внутрішньоклітинну петлі та N- і C-кінці, що розташовуються в цитоплазмі. У людини відомі 24 члени цього сімейства. Але, саме Claudin 11 експресує в щільних контактах між клітинами Сертолі. Це специфічний для гематотестикулярного бар’єра протеїн [5, 6–8, 13, 14].

Виявлені в нашому дослідженні особливості ІГХ-експресії протеїну Claudin 11, які характерні для різних форм чоловічої неплідності, свідчать про значні порушення гематотестикулярного бар’єра в групах хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматоцитів 1-го і 2-го порядку чи сперматид та з синдромом “лише клітини Сертолі” порівняно із пацієнтами із екскреторно-обтураційною неплідністю. Ураховуючи важливі функції, що виконує Claudin 11 у формуванні цілісності гема-

тотестикулярного бар’єра, стає очевидним, що пошкодження компонента цього бар’єра лежать в основі розвитку імунного компоненту та поглиблення патологічних змін тканини яєчка при чоловічій неплідності. Наводимо приклади практичного застосування ІГХ-визначення протеїну Claudin 11.

Приклад 1. Хворий Д., історія хвороби № 549 та № 1039, 33 років, безплідний шлюб протягом 3 років. Спермограма: клітин сперматогенезу та сперматозоїдів не виявлено, лейкоцити 1–2 в полі зору, фруктоза 13 ммоль/л. При лабораторних дослідженнях уrogenітальної інфекції не виявлено. Гормональні дослідження: ФСГ (фолікулостимулювальний гормон), ЛГ (лютеїнізувальний гормон), пролактин, тестостерон – в нормі. Виконана інцизійна біопсія правого яєчка. При гістологічному дослідженні в сім’яних каналцях виявлені численні сперматозоїди. ІГХ-експресія протеїну Claudin 11 та показники ІГХ в структурних елементах біоптату яєчка становили: в клітинах Сертолі – 7,3, в ендотелії гемокапілярів – 7,1 бала. Установлений діагноз екскреторно-обтураційної неплідності (імунний компонент відсутній). Виконана операція епідидимовазоанастомозу Через три місяці в спермограмі виявлені сперматозоїди $1 \times 10^6 - 1,5 \times 10^6$ /мл.

Приклад 2. Хворий К., історія хвороби № 425, 29 років, безплідний шлюб протягом 4 років. В анамнезі двосторонній епідидиміт. Спермограма: клітин сперматогенезу та сперматозоїдів не виявлено, лейкоцити 1–3 в полі зору, фруктоза – 11 ммоль/л. При лабораторних дослідженнях уrogenітальної інфекції не виявлено. Гормональні дослідження: ФСГ, ЛГ, пролактин тестостерон – в нормі. Виконана інцизійна біопсія правого яєчка. При гістологічному дослідженні в сім’яних каналцях виявлені поодинокі зрілі сперматозоїди. ІГХ-експресія протеїну Claudin 11 та показники ІГХ в структурних елементах біоптату яєчка становили: в клітинах Сертолі – 4,4 бала, в ендотелії гемокапілярів – 4,3 бала. Установлений діагноз екскреторно-обтураційної неплідності з ознаками пригнічення сперматогенезу, імунний компонент. Виконана операція епідидимовазоанастомозу. При контрольних дослідженнях після операції сперматозоїди в спермограмі не виявлені. Призначене лікування для ліквідації імунного компонента та корекції сперматогенезу: преднізолон в дозі 1,2 мг на 1 кг маси тіла протягом 5 діб, потім – курс плазмафереза (10–15 сеансів через день), а також аевіт – 1 капсула на день протягом місяця; пентоксифілін по 800 мг протягом місяця; магнітотерапія (10–15 сеансів через день).

Приклад 3. Хворий С., історія хвороби № 224, 36 років, безплідний шлюб протягом 7 років. Спермограма: клітин сперматогенезу та сперматозоїдів не виявлено, лейкоцити 0–2 в полі зору, фруктоза 13 ммоль/л. При лабораторних дослідженнях уrogenітальної інфекції не виявлено. Дані гормональних до-сліджень (ФСГ, ЛГ, пролактин, тестостерон) в нормі. Виконана інцизійна біопсія правого яєчка. При гістологічному дослідженні в сім’яних каналцях сперматозоїди не виявлені. ІГХ-експресія протеїну Claudin 11 та показники ІГХ в структурних елементах біоптату яєчка становили: в клітинах Сертолі – 3,4 бала, в ендотелії гемокапілярів – 3,3 бала. Установлений діагноз секреторної неплідності з імунним компонентом. Призначене лікування для корекції сперматогенезу та імунного компонента: аевіт – 1 капсула на день протягом місяця; пентоксифілін по 800 мг протягом місяця; магнітотерапія (10–15 сеансів через день), а також преднізолон в дозі 1,2 мг на 1 кг маси тіла протягом 5 діб, потім – курс плазмафереза (10–15 сеансів через день).

Таким чином, при морфологічному дослідженні біоптату яєчка встановлена доцільність визначення стану гематотестикулярного бар’єра за ІГХ-експресією протеїну Claudin 11 як

важливого діагностичного і прогностичного показника, що дозволяє визначати наявність або відсутність імунного компонента та обирати патогенетично зумовлене лікування чоловічої неплідності і корекцію порушень в кожному конкретному випадку та визначати подальший прогноз щодо відновлення сперматогенезу.

ВИСНОВКИ

1. Дослідження протеїну Claudin 11 виявило статистично достовірне зниження показників експресії ПГХК в клітинах Сертолі та ендотеліальних клітинах перитубулярних гемоканілярів в групах хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1-го і 2-го порядку чи сперматид та із синдромом „лише клітини Сертолі”, порівняно з пацієнтами із екскреторно-обтураційною неплідністю.

2. Зіжнення рівня ПГХ-експресії протеїну Claudin 11 при секреторній формі чоловічої неплідності та синдромі „лише клітини Сертолі” свідчить про значні порушення гематотестикулярного бар'єра, які є основою розвитку додаткового імунного компонента та поглиблення патологічних змін тканини яєчка у хворих при цих формах чоловічої неплідності.

3. При морфологічному дослідженні біоптату яєчка є доцільним визначення ПГХК-експресії протеїну Claudin 11 як інформативного діагностичного і прогностичного показника стану гематотестикулярного бар'єра, який необхідно враховувати при діагностиці та лікуванні чоловічої неплідності.

Особенности состояния гематотестикулярного барьера при различных формах мужского бесплодия

С.В. Базалицкая

Изучены иммуногистохимические (ИГХ) особенности экспрессии протеина Claudin 11 в ткани яичка 28 больных при экскреторно-обтурационной и секреторной формах мужского бесплодия. Выявлено достоверное снижение уровня ИГХ-экспрессии протеина Claudin 11 при секреторной форме мужского бесплодия и синдроме «только клетки Сертоли», по сравнению с экскреторно-обтурационным бесплодием. Результаты свидетельствуют о значительных нарушениях гематотестикулярного барьера, которые являются основой развития дополнительного иммунного компонента и углубления патологических изменений у больных при секреторной форме мужского бесплодия.

Ключевые слова: мужское бесплодие, протеин Claudin 11.

Features of blood-testis barrier at various forms of male infertility

S. V. Bazalytska

Immunohistochemical (IHC) features of an expression of protein Claudin 11 in testicular tissue of 28 patients with obstructive and

secretory forms of male infertility are studied. Authentic depression of level IHC of an expression of protein Claudin 11 at the secretory form of male infertility and a syndrome «only Sertoli cells» is taped in comparison with obstructive form of male infertility. Results testify to appreciable disturbances of blood-testis barrier, which a basis of development additional immune component and excavation of pathological changes in patients at the secretory form of male infertility.

Key words: male infertility, protein Claudin 11.

ЛІТЕРАТУРА

- Allegretti C., Ronquist G., Ove Nilsson B. et al. Circulating human anti-sperm antibodies recognize prostasomes. *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2001. – 46 (3). – P. 211–219.
- Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. *Mol. Hum. Reprod.* – 2001. – 7 (2). – P. 113–118.
- Bohring C, Krause W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis. *Hum. Reprod.* – 2003. – 18 (5). – P. 915–24.
- Chiu W.W., Chamley L.W. Use of antisperm antibodies in differential display Western blotting to identify sperm proteins important in fertility. *Hum. Reprod.* – 2002. – 17 (4). – P. 984–989.
- Wu X, Peppi M, Vengalil MJ, Maheras KJ, Southwood CM, Bradley M, Gow A. Transgene-mediated rescue of spermatogenesis in Cldn11-null. *Biol. Reprod.* – 2012. – 86 (5), 139. – P. 1–11.
- Mazaud-Guittot S, Gow A, Le Magueresse-Battistoni B. Phenotyping the claudin 11 deficiency in testis: from histology to immunohistochemistry. *Methods Mol. Biol.* – 2011, 763. – P. 223–36.
- Mazaud-Guittot S, Meugnier E, Pesenti S, Wu X, Vidal H, Gow A, Le Magueresse-Battistoni B. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biol. Reprod.* – 2010. – 82 (1). – P. 202–13.
- Florin A, Maire M, Bozec A, Hellani A, Chater S, Bars R, Chuzel F, Benahmed M. Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells. *Endocrinology.* – 2005. – 146 (3). – P. 1532–40.
- Nah WH, Lee JE, Park HJ, Park NC, Gye MC. Claudin-11 expression increased in spermatogenic defect in human testes. *Fertil. Steril.* – 2011. – 95 (1). – P. 385–8.
- Fink C, Weigel R, Fink L, Wilhelm J, Kliesch S, Zeiler M, Bergmann M, Brehm R. Claudin-11 is over-expressed and dislocated from the blood-testis barrier in Sertoli cells associated with testicular intraepithelial neoplasia in men. *Histochem. Cell. Biol.* – 2009. – 131 (6). – P. 755–64.
- Юнда И.Ф., Иванюта Л.И., Им-шинцевская Л.П. Бесплодие в супружестве. – К.: Здоровья. – 1990. – 464 с.
- Malmstrum P.U., Busch C., Norben B.J., Andersson B. Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma. *Scand. J. Urol. Nephrol.* – 1998. – Vol. 22. – P. 265–270.
- Chihara M, Otsuka S, Ichii O, Hashimoto Y, Kon Y. Molecular dynamics of the blood-testis barrier components during murine spermatogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* – 2010. – 77 (7). – P. 630–9.
- Xu J, Anuar F, Ali SM, Ng MY, Phua DC, Hunziker W. Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility. *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – 20 (20). – P. 4268–77.