

УДК: 616.69-008.6

© Коллектив авторов, 2016

Тканевой ингибин-В — маркер сперматогенеза

Демяшкин Г.А.^{1,2}, Коган Е.А.¹, Демур Т.А.¹

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Кафедра патологической анатомии им. академика А.И. Струкова, г.Москва, Россия

² Научный клинический центр ОАО «РЖД», патологоанатомическое отделение с цитологической лабораторией, г.Москва, Россия

Ингибин-В является одним из важных сывороточных маркёров сперматогенеза, в то время как тестикулярная его экспрессия мало изучена. Кроме того, чувствительность и прогнозирование степени выраженности этого маркёра в сперматогенезе в пожилом возрасте находятся на этапе обсуждения. **Цель исследования:** изучение роли ингибина-В в нормальном сперматогенезе, при Сертоли-клеточном синдроме и при фокальном сперматогенезе (необструктивная азооспермия). **Методы.** В ретроспективном исследовании проводили анализ биоптатов яичек, пациентов ($n = 82$) с необструктивной азооспермией. Кроме того, изучали влияние ингибина-В на половые клетки у здоровых мужчин в возрасте 22–35 лет ($n = 10$) и 64–75 лет ($n = 10$). Ингибин-В определяли иммуногистохимическим методом. Уровень ингибина-В оценивали в процентах количества иммуномеченных клеток относительно всех исследованных клеток в образце. **Результаты.** При фокальных повреждениях сперматогенеза (смешанной атрофии) наблюдается выраженное накопление ингибина-В в клетках Сертоли ($98,0 \pm 2,7\%$) и Лейдига ($94,0 \pm 1,5\%$) по сравнению с молодыми здоровыми мужчинами ($65,9 \pm 0,4\%$ и $12,0 \pm 0,4\%$ соответственно). Количество иммуномеченных по ингибину-В клеток в сперматогониях было сходным у молодых и пожилых мужчин ($4,0 \pm 0,2\%$ и $5,0 \pm 0,3\%$), а у пациентов с азооспермией резко повышено и составляло $45,0 \pm 0,4\%$. У мужчин пожилого возраста положительная реакция на антитела к ингибину-В в клетках Сертоли составляет $83,0 \pm 0,8\%$. **Заключение.** Результаты проведённого исследования указывают на аккумуляцию ингибина-В клетками Сертоли и Лейдига при необструктивной азооспермии, что исключает возможность его компенсаторного действия на половые клетки по принципу отрицательной обратной связи. Уровни экспрессии ингибина-В зависят от вариантов Сертоли-клеточного синдрома, связанных с морфологией клеток Сертоли. Показатели степени экспрессии тканевого ингибина-В можно использовать в качестве дифференциально-диагностического маркёра азооспермии и других форм бесплодия.

Ключевые слова: ингибин-В, ФСГ, мужское бесплодие, азооспермия, спермограмма, TESE, клетки Сертоли, клетки Лейдига.

Для цитирования: Демяшкин Г.А., Коган Е.А., Демур Т.А. Тканевой ингибин В — маркер сперматогенеза. Патогенез. 2016; 14(4): 43–50.

Для корреспонденции: Григорий Александрович Демяшкин, старший преподаватель, врач патологоанатом, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Кафедра патологической анатомии им. академика А.И. Струкова. Москва. Россия. dr.dga@mail.ru.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: пациентам, участвующим в клиническом исследовании (кровь на гормоны и биоптаты); эту статью посвящаем научному руководителю и наставнику — академику РАН д.м.н., профессору О.В. Волковой, как дань за её огромный вклад в развитие отечественной эмбриологии и репродуктологии; д.б.н., профессору Г.Г. Кругликову; д.м.н., профессору А.Ю. Цибулевскому.

Поступила 22.09.2016

Tissue testicular inhibin-B as a marker of spermatogenesis

Demyashkin G.A.^{1,2}, Kogan E.A.¹, Demura T.A.¹

¹ Sechenov I.M. First Moscow State Medical University, Department of Pathology, Moscow

² Scientific clinical center of Russian Rail ways, Department of Pathology. Moscow, Russia

Inhibin-B is one of the most important serum markers of spermatogenesis, but its testicular expression has been studied to a relatively low extent. More over, its sensitivity as well as our ability to forecast the level of its intensity in spermatogenesis of elderly males are still subject to discussion. **Objective:** to study the role of inhibin-B in normal spermatogenesis, with Sertoli-cell syndrome and focal spermatogenesis (nonobstructive azoospermia). **Methods.** In a retrospective study were analyzed biopsies of testicular, in patients ($n = 82$) with non-obstructive azoospermia. In addition, we studied the effect of inhibin-B in the germ cells in healthy men aged 22–35 years ($n = 10$) and 64–75 years ($n = 10$). Inhibin-B was determined by immunolabeling immunohistochemistry. The level of inhibin-B was assessed by the number of the immunolabeling cells, which was calculated as a percentage of total cells in the sample. **Results.** When focal damage of spermatogenesis (mixed atrophy) is observed an pro-

nounced accumulation of inhibin-B in Sertoli cells ($98.0 \pm 2.7\%$) and in Leydig cells ($94.0 \pm 1.5\%$) compared to young healthy men ($65.9 \pm 0.4\%$ and $12.0 \pm 0.4\%$, respectively). Number of immunolabeling cells for inhibin-B into spermatogonia was similar in young and elderly men ($4.0 \pm 0.2\%$ and $5.0 \pm 0.3\%$), and in patients with azoospermia sharply increased and was $45.0 \pm 0.4\%$. In older men positive reaction for antibodies against inhibin-B in Sertoli cells was $83.0 \pm 0.8\%$. **Conclusion.** The results of the study indicate accumulation of inhibin-B in Sertoli and Leydig cells in non-obstructive azoospermia, which eliminates the possibility of a compensatory effect on germ cells by a negative feedback loop. Expression levels of inhibin-B depend on the options syndrome of Sertoli cells associated with the Sertoli cell morphology. Indicators of the degree of tissue expression of inhibin-B can be used as a differential diagnostic marker azoospermia and in the other forms of infertility.

Key words: Inhibin B, FSH, male infertility, spermogram, TESE, azoospermia, the Sertoli's cells, the Leydig's cells.

For citation: Demyashkin G.A., Kogan E.A., Demura T.A. Tissue testicular inhibin-B as a marker of spermatogenesis. *Patogenez*. 2017; 14(4): 43–50 (In Russian).

For correspondence: Grigory Demyashkin, senior lecturer, doctor pathologist, 8 (SIC, 5th floor), Trubetskaya st., 119048, Moscow, Russian Federation, dr.dga@mail.ru.

Funding. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 22.09.2016

Введение

Азооспермия, по данным мировой литературы, встречается с частотой 1% в общей популяции и у 10–20% у мужчин с бесплодием [1, 2]. Необструктивная, или секреторная азооспермия превалирует над обструктивной и составляет около 80–90% всех случаев азооспермии [2]. Таким образом, азооспермия, причины и особенности развития которой не установлены, будет оставаться перспективной в плане диагностики, профилактики и целенаправленного лечения до тех пор, пока не будут раскрыты и обоснованы морфогенетические механизмы её развития.

Морфологическая картина тканей яичка при биопсии имеет важное диагностическое и прогностическое значение и исследования в этом направлении с целью получения нормальных и функционально активных половых клеток для дальнейшего оплодотворения остаются актуальными и в настоящее время. Необходимо рассматривать гистофизиологию половых клеток и их микроокружения с применением передовых методов, таких, как иммуногистохимические и молекулярно-биологические. При этом важно выбрать максимально достоверную панель антител, которые способны максимально отразить состояние сперматогенеза.

Одним из белков интраорганной регуляции сперматогенеза является ингибин-В. Ингибин относится к семейству β -трансформирующего фактора роста (β -TGF). Он представляет собой белок, вырабатываемый в яичках и является аутокринным и/или паракринным регулятором тестикулярной функции. Ингибин состоит из α - и β -субъединиц, соединенных дисульфидными связями, последняя представлена двумя формами — β_A и β_B . Несмотря на наличие в кровотоке молекулярных форм (субъединиц), биологической активностью обладают димерные соединения ингибина-А (α - β_A) и ингибина-В (α - β_B) [3].

В настоящее время совершенно очевидно, что ингибин-В является единственной формой ингибина, который присутствует в мужском организме и синтезируется клетками Сертоли, что показано в экспериментах на крысах и павианах [4, 5]. В ряде исследований показано, что половые клетки и клетки Лейдига также способны синтезировать ингибин [15, 16]. Это связано с функциональным состоянием половых клеток и клеток Сертоли, а также с возрастом [17, 18]. Принято считать, что ингибин является регулятором дифференцировки клеток Лейдига в эмбриогенезе [19].

Сывороточные уровни ингибина-В отражают функциональное состояние сперматогенеза, так как он участвует в обратной связи гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси, что показано во многих клинических исследованиях различных физиологических и патологических процессов. Хотя эти исследования и проливают свет на биологические свойства ингибина, но многие данные о синтезе и секреции ингибина-В, а также о механизмах его действия на половые клетки остаются необъяснёнными и, иногда, противоречат друг другу. До сих пор неоднозначно интерпретируют показатели сывороточного ингибина-В при выборе инвазивных диагностических вмешательств [6, 7]. Ещё меньше данных об экспрессии ингибина-В в структурах яичка. Без ответа остаются два вопроса: в какой степени сывороточный ингибин-В является надёжным и клинически обоснованным биомаркером сперматогенеза и какова его прогностическая значимость?

Цель исследования состояла в изучении роли ингибина-В в нормальном сперматогенезе, при Сертоли-клеточном синдроме и при фокальном сперматогенезе (необструктивная азооспермия).

Методика

Исследования проводились на кафедре гистологии и эмбриологии педиатрического факультета РГМУ, на кафедре патологической анатомии им. академика А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова и в Научном клиническом центре ОАО «РЖД», Москва, Россия.

Пациенты и материал. С октября 2014 г. по ноябрь 2015 г. было обследовано 114 мужчин, обратившихся на приём к урологам-андрологам с проблемами фертильности (возраст 22–35 лет). Из дальнейшего исследования были исключены 32 пациента: по отягощённому лекарственному анамнезу (андрогены или анти-эстрогены), гипогонадотропный гипогонадизм, системные заболевания или хромосомные транслокации.

В качестве материала для исследования в работе использовались ткани яичек здоровых (контрольная группа) мужчин и биопсийный материал у лиц с патологией — идиопатическое бесплодие (клинически обоснованная азооспермия).

Информированное согласие. Исследование было одобрено Этическим комитетом Российского национального

исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (протокол № 2 от 18.04.2007), а также соответствовало требованиям Хельсинкской декларации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October, 2013).

Работа выполнена на трех группах мужчин: 2 группы мужчин с условным контролем физиологического течения сперматогенеза, в семейном анамнезе — одно и более деторождений: молодые мужчины 22—35 лет ($28,5 \pm 6,5$, $n = 10$) и пожилые мужчины 64—75 лет ($69,5 \pm 5,5$, $n = 10$); 3-я группа — мужчины 22—35 лет ($28,5 \pm 6,5$, $n = 82$) с идиопатической азооспермией и бесплодием в браке более двух лет.

Объект исследования: во всех группах — правые семенники (яички) — биоптаты.

Гормональный анализ мужчин, страдающих бесплодием. За сутки до исследования исключались физическая нагрузка и приём алкоголя. Анализ крови забирался строго натощак между 7 и 10 часами утра из локтевой вены (10,0 мл). Сыворотку крови до использования хранили при -20°C . Количественное содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ, FSH) и лютеинизирующего гормона (ЛГ, LH) проводили методом иммунохемилюминесценции с помощью автоматического анализатора Access 2 (Beckman Coulter, США) с использованием реагентов Access hFSH и Access hLH соответственно (Beckman Coulter, США). Измерение концентрации свободного тестостерона (F-Testo) и В-ингибина (Inhibin-B) определяли методом иммуноферментного анализа (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), используя наборы реагентов — Free Testosterone ELISA Kit (Competitive ELISA) — CAN-FTE-260 (Diagnostics Biochem Canada, Канада) и Human INHBB/Inhibin Beta B ELISA Kit (Sandwich ELISA) — LS-F4944 (LifeSpan BioSciences, США). Чувствительность метода, коэффициент вариации (CV) и диапазон определения (DR) составили: для ФСГ — $0,2$ мЕд/мл, CV $<10\%$ и $0,2$ — $200,0$ мЕд/мл соответственно; для ЛГ — $0,2$ мЕд/мл, CV $<10\%$ и $0,2$ — $250,0$ мЕд/мл; для ингибина В — $5,5$ пг/мл, CV $<10\%$ и $15,6$ — $1000,0$ пг/мл; для свободного тестостерона — $0,188$ пг/мл, CV $<10\%$ и DR — $0,313$ — 20 пг/мл. У всех исследуемых мужчин уровень ЛГ в сыворотке крови составлял $6,22 \pm 0,4$ мЕд/мл при норме $1,24$ — $8,62$ мЕд/мл, тестостерона $12,7 \pm 2,1$ пг/мл при норме $1,0$ — $28,28$ пг/мл, то есть в пределах возрастной физиологической нормы. В то

же время содержание ФСГ было значительно увеличено — $26,58 \pm 0,37$ мЕд/мл при норме для мужчин 20—50 лет $2,0$ — $11,0$ мЕд/мл.

Спермограмма. Эякулят оценивали согласно протоколу Всемирной организации здравоохранения [10]. Семенную жидкость каждый пациент сдавал дважды, с интервалом в 22 дня (половое воздержание 3—5 дней до сдачи). При этом учитывали результаты близкие к дате сдачи крови на гормоны. У всех 82 исследуемых мужчин по показателям спермограммы диагностирована идиопатическая необструктивная азооспермия (табл. 1).

Таким образом, была сформирована группа мужчин по следующим критериям: азооспермия и уровень ФСГ $\geq 11,0$ мЕд/мл. В этой группе также рассматривалась связь показателей ФСГ с уровнем ингибина-В.

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

Физикальные данные. Все пациенты, страдающие бесплодием, являются молодыми людьми в возрасте 22–35 лет, соматически здоровы, без вредных привычек. Инфекционные заболевания, влияющие на сперматогенез (в том числе, эпидемический паротит), а также врожденные аномалии развития яичек у пациентов отсутствовали. Обследованные молодые люди имели нормальное либидо и были сексуально активны. Аллергический и наследственный анамнезы не отягощены.

Физическая экспертиза показала: оволосение на лобке по мужскому типу; мужской голос взрослого; высота 175 — 182 см и вес 68 — 84 кг. Локальное исследование (объём оценивали при помощи орхидометра Prader): оба яичка в мошонке, обычных размеров (средний объём органа: справа — 18 мм³, слева — 20 мм³), мягкие по консистенции и безболезненные; варикоцеле не обнаружено; семейный анамнез по поводу варикозного расширения вен не отягощён.

Тестикулярная оценка (биопсия). Биопсия яичка была выполнена с целью выявления причины азооспермии, определения степени поражения сперматогенеза и исключения обструкции выводных семенных протоков. Критериями для биопсии яичка были: азооспермия, сопровождающаяся нормальным или повышенным уровнем ФСГ или количество сперматозоидов ≤ 5 млн/мл эякулята. Открытая биопсия яичка проводилась в амбулаторных условиях с соблюдением всех правил асептики. Биоптаты

Таблица 1

Результаты спермограммы в группе мужчин с бесплодием

Показатель	Значение
Объём эякулята, мл	$\leq 1,5$
pH	7,2
Общее количество сперматозоидов, млн	Не обнаружены
Концентрация сперматозоидов, млн в 1 мл	—
Общая подвижность сперматозоидов, %	—
Сперматозоидов с прогрессивным движением, %	—
Жизнеспособность, %	—
Концентрация лейкоцитов	≤ 1 млн/мл
Антиспермальные антитела (для сперматозоидов, ассоциированных с ACAT, выявленных методами MAR либо ImunnoBeat)	Исследование не проводилось

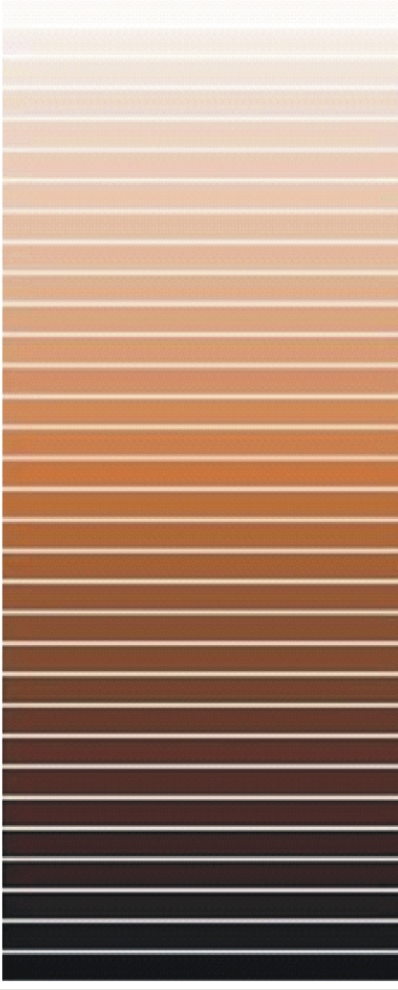
оценивали с использованием метода, описанного S. Johnsen [11], с изменениями, внесенными J. Aafjes с соавт. [12]. Поперечные срезы семенных канальцев были оценены по баллам от 1 до 10, на основе наиболее продвинутых стадий сперматогенеза. Средний балл рассчитывали в 10 полях зрения микроскопа, при увеличении $\times 400$. Шкала S. Johnsen (MJS): 10 баллов — сперматогенез полностью сохранён; 9 — незначительные нарушения сперматогенеза — дезорганизация сперматогенного эпителия, много поздних сперматид; 8 — меньше пяти сперматозоидов в канальце, немного поздних сперматид; 7 — отсутствие сперматозоидов и поздних сперматид, много ранних сперматид; 6 — отсутствие сперматозоидов и поздних сперматид, мало ранних сперматид; 5 — отсутствие сперматозоидов и сперматид, много сперматоцитов; 4 — отсутствие сперматозоидов и сперматид, мало сперматоцитов; 3 — только сперматогонии; 2 — отсутствие половых клеток, только клетки Сертоли; 1 — отсутствие элементов сперматогенного эпителия (тубулярная атрофия). Ранее было показано, что спонтанная беременность возможна при оценке биоптата не ниже 8 баллов [12].

Морфологическое исследование биоптатов яичек. Фрагменты ткани и биоптаты яичек фиксировали в забуференном 10% формалине (Tris-HCl до pH = 7,2, от 5 до 24 ч); дегидратировали в батарее спиртов восходящей концентрации, заливали парафином. Срезы тканей яичка, толщиной $4-6 \times 10^{-6}$ м ($\approx 5 \mu\text{m}$), помещали на обычные, а для иммуногистохимического анализа (ИГХ) — на специальные адгезивные предметные стёкла Super Frost Plus (xx), депарафинировали, согласно принятой стандартной методике. Впоследствии срезы либо окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для гистологического исследования или использовали для ИГХ. Кроме того, препараты окрашивали пикрофуксином по методам *Van Gieson* и *Masson* для выявления компонентов соединительной ткани и по *Weigert* для оценки эластических структур интерстициальной ткани и стенки сосудов.

Иммуногистохимический метод (ИГХ) определения уровня ингибина-В [8, 9] проводили после депарафинизации и регидратации парафиновых срезов. Для восстановления антигенных свойств ткани яичка после фиксации в формалине проводили тепловую индукцию эпитопного

Таблица 2

Шкала интенсивности окрашивания (качественная оценка)

Знаковая система оценки (+/-)	Комментарий	Цветная шкала детекции*
«-»	Нет экспрессии	
«+»	Слабая экспрессия	
«++»	Умеренная экспрессия	
«+++»	Выраженная экспрессия	

* Комментарий. Цветовая гамма составлена по степени насыщенности и соотношения чёрного или белого цветов и адаптирована для оценки интенсивности экспрессии маркёров в структурах (клетках).

(ангитгенного) восстановления (HIER — heat induction of epitope retrieval). Для этого стёкла нагревали в цитратном буфере (pH = 6,0) в автоклаве ($t^{\circ} = 121^{\circ}\text{C}$; время — 8 минут) с симметричным их расположением в кювете.

В качестве первичных, использовали мышинные моноклональные антитела α -Inhibin NovocastraTM (Leica Biosystems Newcastle Ltd, Великобритания); выполнялось контрольное исследование с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Титр антител подбирали с использованием раствора для разведения антител (antibody diluents). Разведение 1:100; срезов на стекле — по два. Вторичные антитела, которые содержали большое количество молекул пероксидазы хрена, наносили на срезы и инкубировали во влажных камерах на протяжении 30' с промыванием в растворе Tris-buffer между каждым этапом на протяжении 10'.

После аппликации каждого реактива стекла со срезами отмывали в 0,1 М растворе фосфатного буфера в сосуде с мешалкой. Для детекции и визуализации реакции добавляли на каждый срез 1—3 капли 3,3'-диаминобензидина пероксидазы хрена (DAB Substrate Chromogen) (Novolink, Leica Biosystems, Великобритания). Инкубировали от 30 секунд до 20' под контролем микроскопа до появления темно-коричневого окрашивания специфических структур (цитоплазматическая реакция). Ядра клеток докрашивали гематоксилином Mayer; срезы подвергали деградации и заключали в гель «Aquatex»[®] (aqueous mounting agent, «Andwin Science», Франция).

Интенсивность окрашивания срезов оценивали, согласно рекомендациям [13] и с использованием цветовой шкалы детекции, разработанной нами (табл. 2).

На следующем этапе с помощью морфометрического анализа определяли содержание иммуномеченных по ингибину-В половых клеток в одном семенном канальце. Количественные и качественные показатели позитивно окрашенных половых, соматических и эндокринных клеток, а также кровеносных сосудов перитубулярного реги-

она яичка оценивали в поле зрения (п/зр.) светового микроскопа при работе с объективом x40/ окуляром x10; в 10 ограниченных полях зрения ($1,2 \times 10^{-7} \text{ м}^2$). Применяли полуколичественный метод оценки интенсивности окрашивания половых клеток с помощью табл. 2. Интенсивность окрашивания иммуномеченных клеток оценивали как уровень экспрессии ингибина-В, который рассчитывали в процентах содержания таких клеток от общего числа окрашенных половых клеток в одном извитом семенном канальце (в %) по 3-бальной системе.

• 0 баллов — нет экспрессии — $\leq 1\%$ окрашенных половых клеток в срезе;

• 1 балл — 1—10% окрашенных половых клеток в срезе;

• 2 балла — 10—50% окрашенных половых клеток в срезе;

• 3 балла — $\geq 50\%$ окрашенных половых клеток в срезе.

Индекс экспрессии (ИЭ) оценивали в 100 клетках в 10 полях зрения светового микроскопа при увеличении в 400 раз. Его рассчитывали по формуле [13]:

$$\text{ИЭ} = \frac{P(i) \cdot i}{100},$$

где:

i — интенсивность окрашивания в баллах от 0 до 3 (нулевая, слабая, умеренная и максимальная);

$P(i)$ — процент клеток, окрашенных с разной интенсивностью;

100 — количество клеток.

Статистический анализ. Полученные данные статистически обрабатывали с использованием программного пакета SPSS 7.5 for Windows (IBM Analytics, США). Рассчитывали средние арифметические и среднеквадратические отклонения. Соответствие данных нормальному распределению подтвердили с применением критерия Колмогорова—Смирнова. Для сравнения двух выборок использовали t-критерий с уровнем значимости $p < 0,05$.

Таблица 3

Экспрессия ингибина-В в структурах яичка в норме и при азооспермии

Статус сперматогенеза	n	Шкала Johnson (баллы)	Экспрессия ингибина в структурах яичка (%)		
			Сперматогонии	Клетки Сертоли	Клетки Лейдига
Нормальный (22-35 лет)	10	10	4,0 ± 0,22	65,9 ± 0,44	12,0 ± 0,44
Нормальный (64-75 лет)	10	10	5,0 ± 0,33	83,0 ± 0,77*	25,0 ± 0,33*
Идиопатическая азооспермия (28,5 ± 6,5 лет, n = 82)					
Сертоли-клеточный синдром с фокальным сперматогенезом (субтотальная аплазия мужских половых клеток)	62	3	45,0 ± 0,44	98,0 ± 2,66 [®]	94,0 ± 1,55 [®]
Сертоли-клеточный синдром со зрелыми клетками Сертоли	10	2	—	61,0 ± 2,16	48,0 ± 2,21 [°]
Сертоли-клеточный синдром с незрелыми клетками Сертоли	1	2	—	Ингибиновые тельца	Отсутствует
Сертоли-клеточный синдром с дисгенетическими клетками Сертоли	4	2	—	56,0 ± 1,23	34,0 ± 3,14 ⁺
Сертоли-клеточный синдром с инволютирующими клетками Сертоли	0	—	—	—	—
Сертоли-клеточный синдром с дедифференцированными клетками Сертоли	0	—	—	—	—
Тубулярная атрофия	6	1	—	35,2 ± 4,76	Отсутствует

Примечание. * $< 0,05$ — достоверные различия между молодыми и пожилыми мужчинами; [®] $< 0,05$, [°] $< 0,05$ и ⁺ $< 0,05$ — соответственно достоверные различия между мужчинами с азооспермией и контролем.

Уровень ингибина-В оценивали по количеству иммуномеченных клеток, которое рассчитывали в процентах от всех клеток в образце.

Результаты

Гистология яичек здоровых мужчин. В обеих контрольных подгруппах — нормальный сперматогенез (MJS = 10 баллов). Яички молодых и пожилых мужчин покрыты белочной оболочкой, от которой отходят вглубь органа соединительнотканые перегородки и делят его на дольки, вершины которых обращены к средостению.

Стенка извитых семенных канальцев аутопатов описываемой группы образованы клетками Сертоли и половыми клетками, находящимися на различных стадиях сперматогенеза (рис. 1 а,б). При окраске по Van Gieson (рис. 1 г,д) и Masson (рис. 1 ж,з) в стенках семенных канальцев прокрашиваются коллагеновые протофибриллы и тонкие эластические волокна. Гистохимическая реакция по Weigert демонстрирует прокрашивание эластических структур стенки кровеносных сосудов и семенных канальцев (рис. 1 к,л).

Гистология яичек мужчин с азооспермией (n = 82). У 62 мужчин в биоптатах визуализируется морфологическая картина субтотальной аплазии мужских половых клеток (GCA) (рис. 1 в), или фокального Сертоли-клеточного синдрома; оценка сперматогенеза по шкале Johnson в модификации J. Aafjes и соавт. — 3 балла (рис. 1 е, и, м, п). У 14 мужчин в семенных канальцах отмечаются признаки Сертоли-клеточного синдрома (MJC = 2 балла) (рис. 1 в) и у 6 пациентов обнаружена тубулярная атрофия канальцев (MJC = 1 балл) (рис. 1 в — слева). Кроме того, во всех исследуемых случаях — выраженная гиперплазия клеток Лейдига (табл. 3). Гистохимические реакции (по Van Gieson (рис. 1 е), по Masson (рис. 1 и) и по Weigert (рис. 1 м) показывают утолщение стенок семенных канальцев за счёт выраженного содержания коллагеновых волокон и стратификацию эластических волокон с последующей деформацией при тубулярной атрофии.

Данные иммуногистохимического исследования. Проведенный анализ экспрессии ингибина в группе здоровых мужчин 22—35 лет показал стабильно умеренную её выраженность в клетках Сертоли («+++») (ближе к адлюминальному отсеку), в некоторых клетках Лейдига («+»), непосредственно контактирующих с сосудами, и в единичных сперматогониях («+») (рис. 1н). В то же время в группе пожилых мужчин отмечена выраженная экспрессия ингибина в клетках Сертоли («+++»), в меньшей степени в клетках Лейдига («+») и в сперматогониях («±»), расположенных в базальном отсеке (рис. 1'о').

У лиц, страдающих идиопатической азооспермией высокая степень экспрессии ингибина отмечена во всех зрелых клетках Сертоли («+++») и в меньшей степени в незрелых их формах («+»), расположенных ближе к базальной мембране извитого семенного канальца. Во всех клетках Лейдига также определяется выраженная экспрессия ингибина («+++»), равно как и в половых клетках («+++») (рис. 1п).

Из табл. 3 видно, что степень экспрессии ингибина-В зависит от вариантов Сертоли-клеточного синдрома, связанных с морфологией клеток Сертоли, степени развития семенных канальцев, а также от наличия или отсутствия перитубулярных или интерстициальных поражений яичка. В случаях тяжёлого повреждения семенных канальцев (на-

пример, тубулярная гиалинизация) в клетках Сертоли отмечается самый низкий уровень ингибина-В, в то время как иммуномечение в клетках Лейдига указывает на незначительные изменения. Статистические данные позволяют утверждать, что количество сперматогоний с положительной реакцией на антитела к ингибину-В у лиц, страдающих бесплодием, почти в 10 раз больше, чем у молодых и пожилых мужчин. Иммуномечение на ингибин-В в клетках Сертоли в 1,5 раза больше при необструктивной азооспермии, чем у молодых людей. Кроме того, выяснилось, что у мужчин 22—35 лет с идиопатическим бесплодием содержание ингибина-В в клетках Лейдига увеличено в 7,8 раза по сравнению с аналогичной возрастной группой в контроле. При этом, как видно из той же таблицы, содержание ингибина-В в клетках Лейдига у пожилых немного меньше, чем при Сертоли-клеточном синдроме с дисгенетическими клетками Сертоли. По мере развития повреждения сперматогенеза с отрицательной динамикой отмечается снижение общего количества половых клеток, клеток Лейдига, а затем и клеток Сертоли, а следовательно и угасание синтеза ингибина-В (при тубулярной атрофии).

Обсуждение результатов

Клетки Сертоли являются основным источником синтеза ингибина-В [14]. В проведённом исследовании отмечается экспрессия ингибина-В в цитоплазме клеток Сертоли. При этом особое внимание отводится распределению ингибина-В в цитоплазме клеток Сертоли у мужчин молодого возраста — ближе к адлюминальному отсеку семенных канальцев, в проекции сперматоцитов. Этот факт показывает тубулярную секрецию ингибина с последующим транспортом в кровеносное русло. Кроме того, возможно, что некоторые фазы синтеза ингибина-В (димеризации) происходят в сперматоцитах на стадиях мейоза. Как уже отмечалось, есть данные, что половые клетки и клетки Лейдига также способны синтезировать ингибин-В [15, 16]. Наши результаты согласуются с предположениями, что не только клетки Сертоли, но и половые клетки, влияют на уровень ингибина В.

Согласно данным литературы, обнаруженную экспрессию ингибина-В в единичных первичных сперматоцитах в группе контроля можно связать с особенностью строения белка. Принято считать, что в половых клетках при этом локализуется β_v-ингибин, тогда как в клетках Сертоли — α и β (α-β_v), которые объединяются в зрелую форму [20—22]. Таким образом, отсутствие половых клеток на поздних стадиях сперматогенеза, которое мы наблюдаем в семенных канальцах при необструктивной азооспермии, может привести к получению биологически неактивной α цепи, что выражается в повышении уровня сывороточного ФСГ. Наличие же при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома экспрессии ингибина-В в сохранившихся сперматогониях, возможно, также связано с β_v формой ингибина-В. Выявленное иммуномечение в цитоплазме сперматогоний, может свидетельствовать о вовлечении их в транспорт ингибина-В. Кроме того, ретроспективно, нельзя не исключить наличие изначально более продвинутых стадий сперматогенеза, для которых и предназначался ингибин-В, что впоследствии привело к развитию Сертоли-клеточного синдрома (фокального варианта).

В современной оценке состояния сперматогенеза и клиническом подтверждении мужского бесплодия ключевыми

показателями являются: уровни сывороточного ФСГ, результаты спермограммы и морфологическая картина биоптата яичек [23, 24]. Однако не всегда гистоархитектоника яичка находится в зависимости от уровня ФСГ и наоборот. Например, при мейоз-блокированном сперматогенезе на поздних его стадиях уровни ФСГ не меняются. В редких случаях, содержание сывороточного ФСГ остаётся нормальным даже у пациентов с фокальным вариантом Сертоли-клеточного синдрома или гипосперматогенезе [25–28]. Можно говорить о том, что результаты гормонального анализа дают лишь приблизительную морфологическую картину, лежащую в основе нарушений сперматогенеза (идиопатическое бесплодие). Таким образом, содержание ФСГ в сыворотке кро-

ви не может быть абсолютным показанием для TESE у мужчин с азооспермией. При этом уровни ФСГ по отдельности или в комбинации с ингибином-В не могут с большой уверенностью говорить об отсутствии физиологически активных половых клеток в яичке [29, 30].

Анализ положительной реакции с антителами к ингибину-В в структурах яичка при гипосперматогенезе указывает на аккумуляцию ингибина-В клетками Сертоли и Лейдига, что исключает возможность его даже компенсаторного действия на сперматогонии, обеспечивая необходимый баланс сперматогенеза из-за отсутствия половых клеток и тем самым нарушая принцип отрицательной обратной связи в гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси.

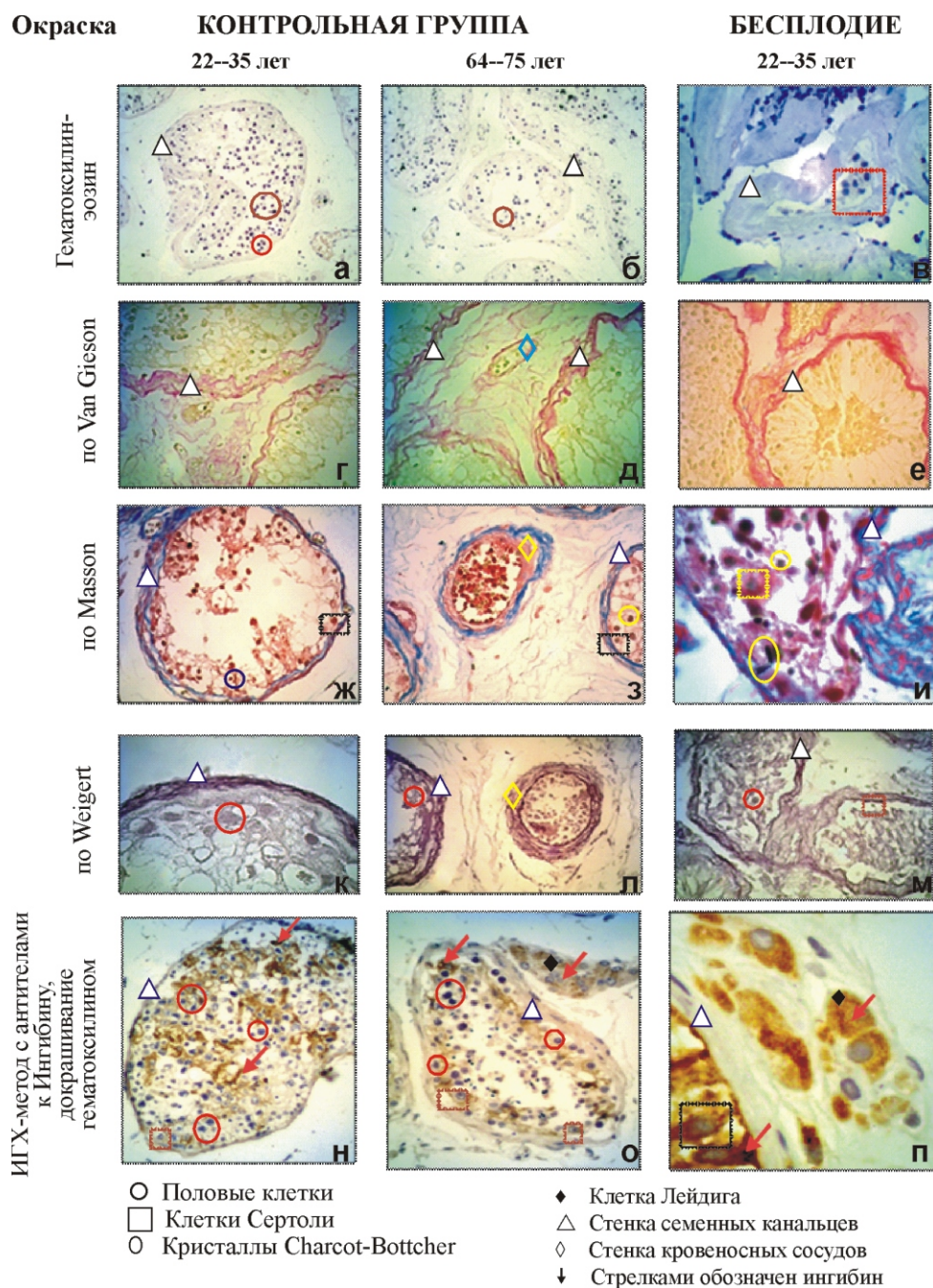


Рис. 1. Структуры яичка в норме (контрольная группа) и при патологическом сперматогенезе (бесплодие). а, б, г, д, ж, к, н, о – в центре – извитой семенной каналец; в – Сертоли-клеточный синдром (MJS = 2 балла); е, и, м, п – фокальный сперматогенез (блок созревания, MJS = 3 балла). Увеличение: а–з, к–о – $\times 400$; и, п – $\times 1000$.

Таким образом, мы показали, что низкие уровни ингибина-В в сыворотке крови были в значительной степени связаны с высоким уровнем ФСГ и зависят от тяжести поражения (при тубулярной атрофии они самые низкие и высокие соответственно). При этом, проведение гистологического исследования клеток Сертоли необходимо, так как определение степени экспрессии ингибина-В может быть полезным маркером функции клеток Сертоли.

Заключение

Относительно высокая и сходная активность иммунотечения клеток Сертоли и клеток Лейдига на ингибин-В у пожилых мужчин и у мужчин с идиопатическим бесплодием указывают на определенную роль повышенного образования ингибина как в подавлении активности сперматогенеза в процессе старения, так и у пациентов с идиопатическим бесплодием.

References

1. Jarow J.P., Espeland M.A., Lipshultz L.I. Evaluation of the azoospermic patients. *J Urol.* 1989; 142: 62-5.
2. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R., Giwercman A., Kopa Z., Tournaye H., Krausz C. *The updated EAU guidelines on Male Infertility.* EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands. 2015.
3. Burger HG. Clinical review 46: Clinical utility of inhibin measurements. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1993; 76: 1391-6.
4. Grootenhuis A.J., Timmerman M.A., Hordijk P.L., de Jong F.H. Inhibin in immature rat Sertoli cell conditioned medium: a 32 kDa alpha beta-B dimer. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1990; 70: 109-16.
5. Handelsman D.J., Spaliviero J.A., Phippard A.F. Highly vectorial secretion of inhibin by primate Sertoli cells in vitro. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1990; 71: 1235-8.
6. Kadyrov Z.A., Moskvichev D.V., Astakhova M.A. Prognostic significance of inhibin B in infertile patients (review). *Andrologiya i genital'naya khirurgiya.* 2015; 1: 8-12. (in Russian)
7. Meachem S.J., Nieschlag E., Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *European Journal of Endocrinology.* 2001; 145 (5): 561-71.
8. Demyashkin G.A. Paracrine mechanisms of regulation of the male reproductive system. *Vestnik Rossiiskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2006; 2: 359a-359. (in Russian)
9. Demyashkin G.A., Amirov N.Sh. Paracrine mechanisms regulate testis function (immunocytochemistry aspect). *Fundamental'nye issledovaniya.* 2009; 2: 88-9. (in Russian)
10. «WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen», 5th edition, Geneva, World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research; 2010. 287 p.
11. Johnsen S.G. Testicular biopsy score count — a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones.* 1970; 1: 2-25.
12. Aafjes J.H., van der Vijver J.C., Schenck P.E. Value of a testicular biopsy rating for prognosis in oligozoospermia. *Br Med J.* 1978; 1: 289-90.
13. D.J. Dabbs «*Diagnostic immunohistochemistry*», 3rd Edition. 2010. 952 p.
14. Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology*, 3rd Edition. 2014. 976 p.
15. Risbridger G.P., Clements J., Robertson D.M., Drummond A.E., Muir J., Burger H.G. et al. Immuno- and bioactive inhibin and inhibin alpha-subunit expression in rat Leydig cell cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1989; 66: 119-22.
16. Andersson A.M., Muller J., Skakkebaek N.E. Different roles of prepubertal and postpubertal germ cells and Sertoli cells in the regulation of serum inhibin B levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1998; 83: 4451-8.
17. Majdic G., McNeilly A.S., Sharpe R.M., Evans L.R., Groome N.P., Saunders P.T. Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology.* 1997; 138: 2136-47.
18. Jorgensen N., Liu F., Andersson A.M. et al. Serum Inhibin-B in fertile men is strongly correlated with low but not high sperm counts: a coordinated study of 1,797 European and US men. *Fertil Steril.* 2010; 94: 2128-34.
19. Ledger E.N., Muttukrishna W. *Inhibin, Activin, and Follistatin in Human Reproductive Physiology.* World Scientific; 2001. 340 p.
20. de Kretser D.M., McLachlan R.I., Robertson D.M. et al. Serum inhibin levels in normal men and men with testicular disorders. *J Endocrinol.* 1989; 120: 517-523.
21. Bergada I., Rojas G., Ropelato G. et al. Sexual dimorphism in circulating monomeric and dimeric inhibins in normal boys and girls from birth to puberty. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999; 51: 455-60.
22. Meunier H., Rivier C., Evans R.M. et al. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 247-51.
23. Datta A., Nayini K., Eapen A. et al. Serum inhibin-b may predict successful sperm retrieval in azoospermic men with normal gonadotropin and testosterone levels. *Hum Reprod.* 2012; 27(Suppl 2).
24. Huang X., Bai Q., Yan L.Y. et al. Combination of serum inhibin B and folliclestimulating hormone levels can not improve the diagnostic accuracy on testicular sperm extraction outcomes in Chinese nonobstructive azoospermic men. *Chin Med J (Engl).* 2012; 125(16): 2885-9.
25. Manzoor S.M., Sattar A., Hashim R., Khan F.A., Younas M., Dilawar A.A. M., Ijaz A. Serum inhibin B as diagnostic marker of male infertility. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2012; 24(3-4): 113-6.
26. Bergmann M., Behre H.M., Nieschlag E. Serum FSH and testicular morphology in male infertility. *Clinical Endocrinology.* 1994; 40: 133-6.
27. Grunewald S., Glander H.J., Paasch U., Kratzsch J. Age-dependent inhibin B concentration in relation to FSH and semen sample qualities: a study in 2448 men. *Reproduction.* 2013; 145(3): 237-44.
28. Weller O., Yogev L., Yavetz H. et al. Differentiating between primary and secondary Sertoli-cell-only syndrome by histologic and hormonal parameters. *Fertility and Sterility.* 2005; 83: 1856-8.
29. von Eckardstein S., Simoni M., Bergmann M., Weinbauer G.F., Gassner P., Schepers A.G. et al. Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1999; 84: 2496-501.
30. Moradi M., Alemi M., Moradi A. et al. Does inhibin-B help us to confidently refuse diagnostic testicular biopsy in azoospermia? *Iran J Reprod Med.* 2012; 10(3): 243-8.

Сведения об авторах:

Демяшкин Григорий Александрович: старший преподаватель, врач патологоанатом. «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, кафедра патологической анатомии им. академика А.И. Струкова. dr.dga@mail.ru

Коган Евгения Алтаровна: докт. мед. наук, профессор, зав. кафедрой патологической анатомии им. академика А.И. Струкова.

Демура Татьяна Александровна: докт. мед. наук, профессор. Кафедра патологической анатомии им. академика А.И. Струкова