

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

**ДЕМЯШКИН
ГРИГОРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СПЕРМАТОГЕНЕЗА –
ОСНОВА ДИАГНОСТИКИ МУЖСКОГО
ИДИОПАТИЧЕСКОГО БЕСПЛОДИЯ
(ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)**

14.03.02. – Патологическая анатомия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель –
доктор медицинских наук,
профессор
Евгения Алтаровна КОГАН

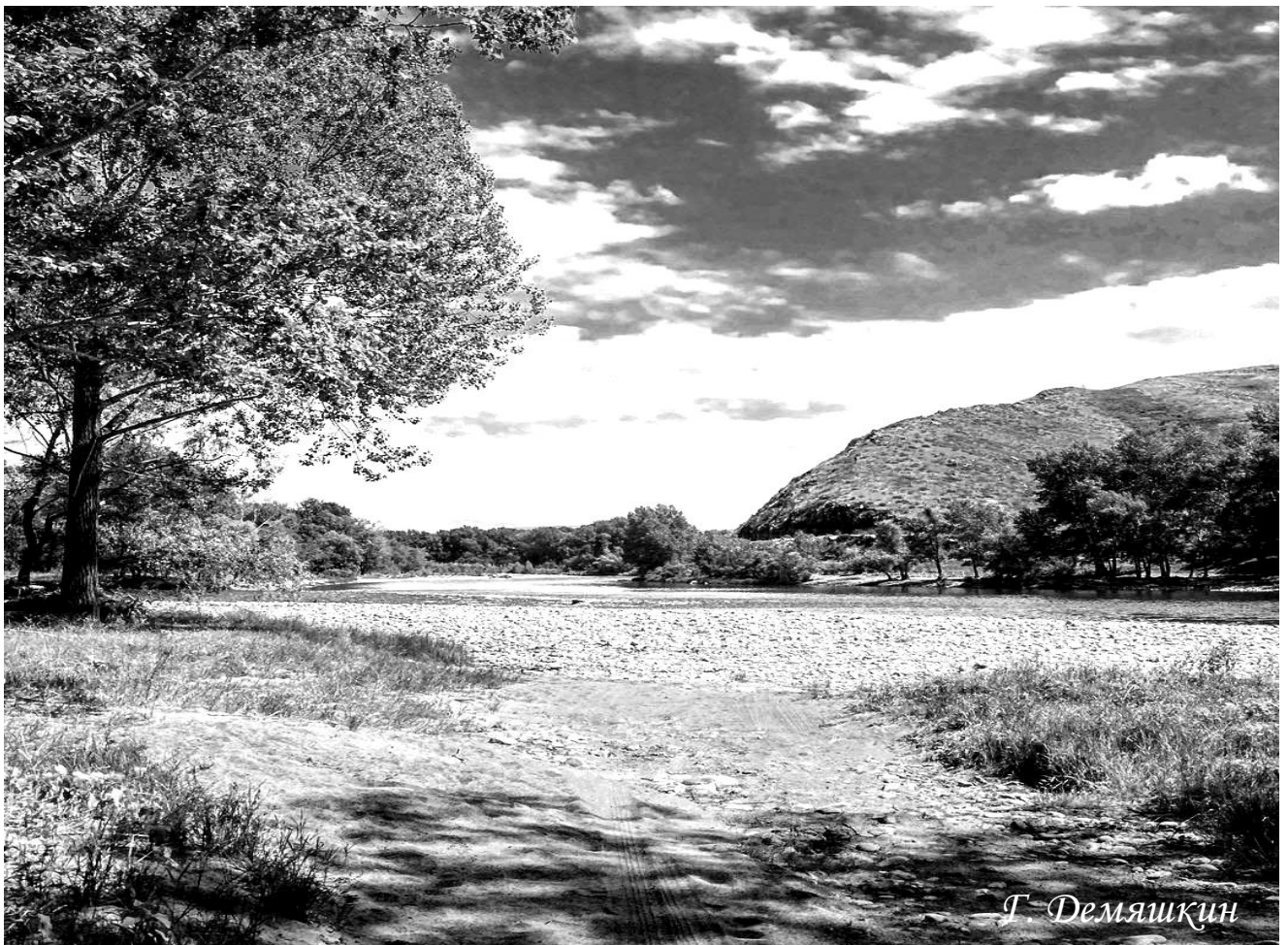
г. Москва
2017 г.

Моей семье посвящается....

**"...I know the price of success: dedication,
hard work, and an unremitting devotion to
the things you want to see happen..."**

Frank Lloyd Wright

*«Я знаю цену успеха: настойчивость, упорный труд и
безраздельная преданность тому, чего вы хотите добиться»*



ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1 (I). Сперматогенез (обзор специализированной литературы)	
1.1. Мужское идиопатическое бесплодие.....	15
1.2. Центральные механизмы регуляции сперматогенеза	19
1.3. Клетки Сертоли	20
1.4. Мужские половые клетки	26
1.5. Маркёры иммунофенотипирования структур яичка в норме и при патологии	35
Глава 2 (II). МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Клиническое обоснование мужского идиопатического бесплодия	41
2.2. Морфологический метод исследования	46
2.3. Метод непрямого иммуногистохимического исследования	48
2.4. Морфометрический метод исследования	56
2.5. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени	64
2.6. Статистические методы и обработка данных	65
Глава 3 (III). РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ....	67
3.1. Морфофункциональное исследование структур яичка у мужчин в возрасте 22 – 35 лет в норме	67
3.2. Морфофункциональное исследование структур яичка у мужчин в возрасте 61 – 74 лет в норме	75
3.3. Морфофункциональное исследование структур яичка у мужчин в возрасте 22 – 35 лет при идиопатическом бесплодии	80
3.4. Статистический анализ	87
Глава 4 (IV). ОБСУЖДЕНИЕ СОБСТВЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ (Протеомика сперматогенеза)	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	112
ВЫВОДЫ	119
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	120
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	121
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	122
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	141

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

С каждым годом прослеживается неуклонный рост частоты мужского бесплодия как в России, так и в других странах Мира при сопутствующей низкой эффективности распознавания причин идиопатических форм. Объяснением роста бесплодия служат: прогрессивное ухудшение экологической обстановки, оказывающей существенное влияние на репродуктивное здоровье населения, повторяющиеся экономические кризисы и потрясения, негативно влияющие на психику человека, массовое употребление некачественных продуктов и лекарств, содержащих малополезные и даже вредные ингредиенты, неблагоприятная радиационная обстановка на Планете из-за аварий на Чернобыльской и Фукусимской атомных станциях, сомнительное качество морепродуктов из-за нарушения экологии моря, ухудшение состояния атмосферы по причине вредных выбросов и др. Перечисленные факторы негативно влияют на репродуктивную систему, в том числе (что в высокой степени вероятно и опасно), – на дифференцировку мужских половых клеток. О состоянии репродуктивного здоровья мужской части населения свидетельствуют данные ряда исследований. Около 30% всех случаев мужского бесплодия составляют идиопатические формы, причины которых не выяснены и не понятны (Брагина Е.Е. и соавт., 2002; ВОЗ, 1992, 2000) [8, 27]. По мнению Райциной С.С. (1969), Кагана С.А. (1985), А.И. Лысенко (2008), Астраханцева А.Ф. (2011), Курило Л.Ф. и соавт. (2000) [2, 17, 20, 31], совокупность нейро-эндокринных и локальных механизмов составляет репродуктивную стратегию защиты генома развивающихся половых клеток [7, 8, 16, 20] и до 20% случаев нарушений мужской репродуктивной системы связаны с количественными или структурными аномалиями хромосом. Нет также единогласия в отношении этиологии, патогенеза, диагностики и лечения мужского бесплодия [13, 14, 19]. Актуальность проблемы мужского

бесплодия становится все более значимой и требует новых современных научных разработок, способных конкретизировать ведущие патогенетические звенья в развитии той или иной формы бесплодия.

Анализ отечественной и зарубежной научной литературы по этиологии и патогенезу мужского бесплодия свидетельствует о дефиците информации. Существенным недостатком в подходе к проблеме является то, что большинство исследований выполняются на экспериментальных животных и экстраполировать их результаты на человека не правомерно. Более того, экспериментальный подход к изучению идиопатической формы бесплодия у мужчин не приемлем – ибо в этих случаях должен анализироваться исключительно клинический материал, что не всегда оказывается возможным.

Как известно, в физиологии половых желез (не только мужских, но и женских) существует тесная связь между генеративной и эндокринной функциями – если страдает одна из них, вторая, как правило, не бывает полноценной. Результаты исследований последних десятилетий (Волковой О.В. и Боровой Т.Г.) значительно расширили рамки понимания эндокринной активности половых желез [11, 12, 26, 37]: сегодня эта функция представляется более широкой и включает не только образование и секрецию половых стероидных гормонов, но и выработку множества других биологически активных соединений, источниками которых в половых железах являются клетки-эндокриноциты, сами половые клетки, клетки Сертоли и даже клетки стромы, не принадлежащие к категории эндокринных. Все выявляемые биологически активные вещества способны эффективно влиять на гаметогенез; их влияния, конечно же, подконтрольны центральным нейро-иммуно-гуморальным механизмам и действию гормонов периферических эндокринных желез, однако роль местных факторов может быть настолько значимой, что даже при сохранной экстрагонадной регуляции, нарушения внутригонадных звеньев могут иметь крайне

негативные последствия для сперматогенеза. Кроме того, мало изучена роль метаболитов распадающихся клеток, которые возможно также выступают как аутокринные и паракринные регуляторы (Ярыгин К.Н., Холоденко И.В., Скворцова В.И. и др., 2009) [38]. Таким образом, мужские половые железы относятся к динамичным системам организма, характеризующимся не только сложностью происходящих в них морфогенетических процессов [11, 12], но и многообразием механизмов регуляции функций. Сперматогенез протекает под контролем специфических генов развивающихся гамет и регулируется совокупностью гормонов, цитокинов, факторов роста, синтезируемых как в органах самой половой системы, так и вне её [8, 10, 11, 12, 37].

Несмотря на совершенствование методов диагностики с каждым годом в развитых странах прослеживается неуклонный рост мужского бесплодия в виде азооспермии (секреторная и обструктивная формы). При азооспермии диагностически наиболее доказательным является гистологический анализ биопсийного материала тканей яичка, выявляющий степень поражения половых клеток, а также возможный риск малигнизации. Используемые на практике критерии оценки степени поражения половых клеток были разработаны ещё в 70-х годах прошлого века (критерий Johnson, De Kretser, Holstein), поэтому они нуждаются в модернизации с учётом современных методов морфологического исследования.

Без глубокого познания факторов, воздействующих на мужскую половую железу и оказывающих позитивное либо негативное влияние на его сперматогенную и эндокринную функции, невозможно решать вопросы мужского бесплодия, в том числе, – идиопатических форм, и, соответственно, вести поиск путей лечения в правильном направлении. Широкая перспектива в исследовании морфофизиологии половых желез открылась с внедрением методов иммуноцито- и иммуногистохимии, которые позволили адресно исследовать *in situ* процессы синтеза разных биологически активных модуляторов гаметогенеза. Имеющиеся в мировой литературе результаты

исследований указывают на важнейшее значение пара- и аутокринных факторов яичек и яичников в реализации мужского и женского гаметогенеза. Однако в проблеме идиопатических форм мужского бесплодия возможности иммуногистохимического метода до конца не реализованы, крайне недостаточно работ в этом направлении проводится как в России, так и за рубежом.

Комплексное изучение особенностей физиологического состояния мужских половых клеток, эндокриноцитов и клеток стромы яичек при данной патологии, несомненно, способствовало бы прогрессу знаний в области патогенеза идиопатических форм мужского бесплодия и такое изучение может быть проведено в том числе при использовании комплексного иммуногистохимического анализа, охватывающего общие и специфические аспекты метаболизма всех клеточных компонентов извитых семенных канальцев и интерстициальной ткани семенников.

Цель исследования

Выявление патоморфологических и молекулярных механизмов нарушения сперматогенеза при идиопатическом бесплодии.

Задачи исследования:

1. Оценить активность иммуногистохимического маркирования мужских половых клеток и соматических клеток яичек на факторы пролиферации и апоптоза (Ki-67, Bcl-2, p53, каспазы-9), факторы дифференцировки (PLAP, CD117) при идиопатическом бесплодии (при необструктивной азооспермии).
2. Провести сравнительный иммуногистохимический анализ перечисленных выше факторов в структурах яичек лиц молодого и пожилого возрастов, отметив сходство и/или отличия от аналогичных показателей при идиопатическом бесплодии.
3. Выявить степень активности инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-I) в мужских половых клетках, клетках Сертоли и клетках Лейдига в норме

и при идиопатическом форме мужского бесплодия с использованием иммуногистохимического метода.

4. Определить степень экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла мужских гамет при идиопатическом бесплодии (проапоптотические *BAK* и *BAX* и антиапоптотические *BCL2* и *BCLW*).
5. Разработать алгоритм клинико-морфологического исследования для диагностики идиопатическом бесплодия.

Научная новизна

Выявлены молекулярно-биологические особенности пролиферации, дифференцировки и апоптоза мужских гамет (прежде всего сперматогоний) при патологическом сперматогенезе в сравнении с нормальным гаметогенезом в молодом и пожилом возрастах:

Впервые доказано, что в сперматогониях при мужском идиопатическом бесплодии на фоне низкой степени пролиферации ($Ki-67 - 12.0 \pm 0.34\%$, $p < 0.05$) отмечается увеличение показателей готовности к апоптозу ($Bcl-2 - 1.0 \pm 0.1\%$; $p53 - 40,0 \pm 0.44\%$; $p < 0.05$) в то время, когда закономерность течения нормального сперматогенеза демонстрирует значительное преобладание процесса пролиферации над апоптозом у молодых мужчин по данным иммуногистохимического анализа и ПЦР-РВ.

Впервые установлено, что в норме соотношение активности иммунофенотипирования клеток на факторы пролиферации и апоптоза сперматогенеза меняется в зависимости от возраста: у молодых лиц показатели пролиферации ($Ki-67 - 42.0 \pm 0.34\%$, $p < 0.05$) и апоптоза ($caspasa-9 - 25.2 \pm 0.44\%$, $p < 0.05$) выше чем у пожилых ($Ki-67 - 34.1 \pm 0.6\%$, $p < 0.05$; $caspasa-9 - 18.1 \pm 0.3\%$, $p < 0.05$). Факторы антиапоптоза также преобладают у молодых мужчин ($p53 - 8.1 \pm 0.22\%$, $p < 0.05$; $Bcl-2 - 14.1 \pm 0.2\%$, $p < 0.05$).

Впервые выявлено, что в сперматогониях при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома (гипосперматогенезе, субтотальной герминальной аплазии) позитивная реакция на PLAP (ve «+»), в норме

экспрессируемого только в сперматогониях в антенатальном развитии, является характерным для идиопатического бесплодия и указывает на присутствие в семенных канальцах малодифференцированных форм сперматогоний (гоницитов).

В сперматогониях при необструктивной азооспермии впервые показана отрицательная иммунологическая реакция на антитела к CD117, что свидетельствует об отсутствии перспективы вступления их в мейоз. Впервые обнаружено, что положительная реакция на CD117 в гаметях мужчин пожилого возраста (начиная со второго (эквационного) мейотического деления) на стадии вторичного сперматоцита указывает на снижение уровней половой дифференцировки, в отличие от лиц молодого возраста, где данный фактор выявляется уже на стадии митоза сперматогоний.

Впервые доказано, что уровни иммуномечения в сперматогониях на ИФР 1 у лиц с идиопатическим бесплодием значительно ниже ($7.0 \pm 0.22\%$) или отсутствует по сравнению со здоровыми мужчинами молодого возраста ($40.0 \pm 0.33\%$).

Появление и последующее усиление фактора митохондриального (внутреннего) пути апоптоза (каспазы-9) в клетках Сертоли напрямую зависит от степени поражения семенных канальцев при необструктивной азооспермии в динамике: гипосперматогенез → Сертоли-клеточный синдром → тубулярная атрофия.

Теоретическая и практическая значимость

Патогенез идиопатической формы мужского бесплодия связан с нарушением регуляции сперматогенеза под действием митогенов и факторов роста, цитокинов, гормонов и факторов стресса и реализуется по трем сигнальным путям: MAPK, NF-κB, каскад каспаз. Передача MAPK (митоген-активирующая протеинкиназа), вызывающая стресс, может приводить к гибели клеток. Транскрипционный фактор клеточного цикла NF-κB запускает широкий спектр биологических реакций, включая

дифференцировку и воспаление. Апоптоз индуцируется активацией каспаз. В результате реализации одного из трех путей снижается пролиферация и дифференцировка гамет, активируется апоптоз, приводящий к бесплодию.

Клинико-морфологический алгоритм диагностики идиопатической формы мужского бесплодия включает в себя комплекс морфологических, иммуногистохимических и молекулярных методов исследования. На первом этапе диагностического поиска при обращении к урологу-андрологу осуществляется: сбор анамнеза, физикальный осмотр, лабораторная цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика, гормональный статус. На втором этапе проводится биопсия яичка, по результатам которой выставляется предварительный диагноз на основе гистологического анализа. Для окончательной верификации, на третьем этапе, проводят иммуногистохимические реакции (Ki-67, Vcl-2, p53, каспаза-9, PLAP, CD117, IGF-I) и ПЦР-диагностику.

Разработанная схема морфометрической оценки (стандарты сперматогенного эпителия и периваскулярной области) сперматогенеза рекомендована врачам-патологоанатомам и гистологам-эмбриологам при анализе степени поражения яичек при идиопатической форме мужского бесплодия.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Идиопатическая форма мужского бесплодия характеризуется снижением уровня пролиферации сперматогоний на ранних стадиях (гипосперматогенез, блок созревания) по сравнению с нормальными показателями и полным отсутствием пролиферации сперматогоний на более поздних стадиях развития этой патологии (фокальный вариант Сертоли-клеточного синдрома). При этом в семенных канальцах наблюдается гипосперматогенез с резким снижением численности сперматогоний и их отсутствие при блоке созревания. В сперматогониях, в которых определяется PLAP-позитивная реакция, расцениваются как эмбриональные, а отсутствие мечения на фактор

дифференцировки CD117 указывает на бесперспективность дальнейшего развития этих клеток.

2. Патогенез блока созревания мужских половых клеток при гипосперматогенезе связан со снижением содержания IGF-I в сперматогониях.

3. Физиологический сперматогенез характеризуется доминированием процесса пролиферации сперматогоний над их апоптозом. Данная закономерность присутствует и в популяции первичных сперматоцитов у мужчин пожилого возраста, что отличает механизм старения от патогенеза идиопатического бесплодия.

4. Клинико-морфологическая диагностика идиопатической формы мужского бесплодия должна включать в себя комплекс морфологических и молекулярных методов исследования: биопсия яичек, иммуноцитохимический, иммуногистохимический (Ki-67, Bcl-2, p53, каспазы-9, PLAP, CD117, IGF-I), ПЦР-РВ (на гены *BAK*, *BAX*, *BCL2*, *BCLW*).

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обусловлена адекватностью сформированных контрольных групп в сочетании с достаточным количеством пациентов, отражённых в настоящем клиническом ретроспективном научном исследовании и сравнением результатов, полученных различными гистологическими методами, закреплены предложенными количественными тестами морфометрии и подтверждены проведённым статистическим анализом.

Для анализа микроморфометрических структур – площади межканальцевой соединительной ткани, извитых семенных канальцев, сперматогенного эпителия, просвета капилляров, использована программа «Видео-Тест 4.0 Морфология».

Основные результаты исследования докладывались и обсуждались на: I съезде физиологов СНГ (г. Сочи, 2005 г.); Всероссийской научной

конференции «Человек и лекарство» (г. Москва, 2005 г.); Всероссийской научной конференции «Бабухинские чтения в Орле» (г. Орел, 2006 г.); совместной научной конференции кафедр гистологии, цитологии, эмбриологии лечебного и педиатрического факультетов РГМУ (г. Москва, 2009 г.), заседании Учёного совета Факультета социальной медицины ГКА им. Маймонида (г. Москва, 2014 г.); заседании Учёного совета НУЗ НКЦ ОАО «РЖД» (г. Москва, 2016 г.); семинаре ФГБНУ НИИ Морфологии человека РАН (г. Москва, 2016 г.); семинаре в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (г. Москва, 2016 г.); «International Conference and Exhibition on Cytology & Histology» (Birmingham, UK, 2016); 23rd Meeting of the EAU Section of Urological Research (Parma, Italy, 2016); European Association of Urology (EAU), Section of Andrological Urology (ESAU). Scientific Meeting (Turkey, Bodrum, May, 2017).

Апробация диссертации состоялась на научной конференции кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова «01» «ноября» 2017 года.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, постановки цели и задач, в их клинико-морфологической реализации. Выполненное морфологическое исследование, анализ и интерпретация, полученных данных ретроспективной научной работы проведены автором самостоятельно на базе кафедры патологической анатомии имени академика А.И. Струкова лечебного факультета ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (ректор – академик РАН, д.м.н., профессор П.В. Глыбочко) и в НУЗ «Научный клинический центр ОАО «Российские железные дороги» (директор центра – д.м.н., профессор С.Ю. Шеховцов). При заборе биопсийного материала урологом-андрологом у пациентов, соискатель принимал непосредственное участие с целью разработки наиболее эффективных разных подходов диагностики мужского идиопатического

бесплодия. Автором лично были освоены и применены методы иммуногистохимического анализа; компьютерного моделирования структур яичка, проведено исследование морфофункционального состояния яичек условно здоровых мужчин разных возрастов (контрольная группа) и страдающих бесплодием, для сравнения с результатами клинико-лабораторных исследований пациентов; математическая обработка полученных данных; выбор и описание иллюстративного материала, написание выводов и практических рекомендаций. Вклад автора является определяющим в обсуждении результатов исследования в научных публикациях и их внедрения в практику. Автором установлены определённые патогенетические механизмы идиопатической формы мужского бесплодия, а также иммунофенотипические признаки интраорганной регуляции сперматогенеза в норме.

Публикации результатов работы

Основное содержание диссертации отражено в 12 научных работах соискателя, в том числе в 9 статьях в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 2 из которых индексируемы SCOPUS, а также 1 тезис на английском языке в журнале, индексируемом SCOPUS.

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, собственных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 145 источников отечественных (38) и зарубежных (107) авторов. Материалы диссертации изложены на **141** странице машинописного текста и иллюстрированы 57 микрофотографиями, 16 графиками, 24 таблицами, а также приложение (7 страниц иллюстративного материала).

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты исследований используются при диагностики идиопатических форм мужского бесплодия в Центральном патологоанатомическом отделении

ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова и патологоанатомических отделениях Департамента здравоохранения ОАО «Российские железные дороги», при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре патологической анатомии им. академика А.И. Струкова.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.03.02. – Патологическая анатомия, а также области исследования согласно пунктам 1, 2, 3, и 4.

Глава I

ОБЗОР СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. МУЖСКОЕ ИДИОПАТИЧЕСКОЕ БЕСПЛОДИЕ

Бесплодие в браке – важная медико-социальная проблема. В настоящее время примерно 10% супружеских пар являются *бесплодными* [14, 16, 33]. Так бесплодие встречается в среднем у 1 из 5 супружеских пар репродуктивного возраста, причём, в 10 – 20% случаев причины нарушения фертильности выявить не удаётся. Существуют тенденции увеличения данных негативных показателей [13, 15, 18, 30, 42, 58, 117, 134].

Роль мужского фактора в бесплодном браке составляет не менее 40% [14, 34, 35]. Надо думать, что некоторые различия в процентном диапазоне мужского бесплодия обусловлены числом исследованных больных. Возможно также, что здесь имеют место и иные причины: географические (климатические), этнические, профессиональные и социально-классовые.

Мужское бесплодие – многофакторное заболевание, которое может быть результатом различных расстройств. Так, на долю хромосомных нарушений приходится до 4,0 – 5,0% среди причин инфертильности. При этом, около 2/3 составляют анеуплоидия и структурные aberrации половых хромосом – X и Y [13, 14, 27, 29, 117].

В настоящее время не существует единой классификации мужского бесплодия. В практической медицине используют классификацию, разработанную И.Ф. Юндой (1991), согласно которой принято выделять:

1) секреторное:

- ✓ секреторно-эндокринное – этиологически возникает на фоне первичной, вторичной и дискорреляционной недостаточности половых желез;
- ✓ секреторно-токсическое – вследствие экзогенной интоксикации;

2) экскреторное:

- ✓ экскреторно-токсическое – после воспалительной или другой интоксикации семявыносящих путей;

- ✓ экскреторно-обтурационное – как результат длительной обструкции семявыносящих путей приобретённого и/или врождённого характера;
- 3) смешанное – при этом секреторная недостаточность половых желез разного генеза в сочетании с явлениями обструкции и/или интоксикации;
- 4) иммунологическое. Причиной может служить нарушение гемато-тестикулярного барьера (аутоиммунный орхит);
- 5) неклассифицируемые формы (идиопатическое бесплодие).

Так, по данным ВОЗ (2000) идиопатические нарушения качества спермы составляют 75,1 %, по данным E. Nieschlag, H.M. Behre (2001 г.) – 31,3 %; В. Божедомова и соавт. (2004 г.) – 38,0 % [15, 16, 18, 19, 24, 27, 42, 58, 84, 135].

Диагностика мужского бесплодия основана на комплексной оценке состояния мужской репродуктивной системы и включает в себя клинические и лабораторно-диагностические методы. В последние годы предложены компьютерные методы анализа репродуктивной ценности параметров спермограммы (Гончаров Н.П. и соавт., 2006; Calamera J. et al., 1994; Kruger T. et al., 1995; Hofman G. et al., 1996).

Среди лабораторных методов, прежде всего, следует выделить:

- спермограмма;
- исследование на заболевания, передающиеся половым путём (ЗППП): венерические (сифилис, гонорея, трихомоноз); инфекции мочевыводящих и половых органов (кандидоз, генитальный герпес, гарднереллёз); кожные заболевания (контагиозный моллюск, педикулез, чесотка); вирусные и СПИД;
- бактериологическое исследование эякулята;
- определение антиспермальных антител;
- определение содержания гормонов (ФСГ, ЛГ, тестостерон и других) в периферической крови;
- микроскопия секрета предстательной железы (при необходимости);
- генетическое обследование.

Основным исследованием в определении мужской фертильности является *цитоморфологический анализ эякулята – спермограмма*. Для окончательной

верификации нозологии, её вариантов и степени поражения, при азооспермии и олигозооспермии тяжелой степени выполняют диагностическую биопсию ткани яичка.

В настоящее время, согласно оценкам, у 30 % мужчин, обратившихся за помощью по поводу бесплодия, существует олигозооспермия или азооспермия неизвестной этиологии [18, 24, 28, 33, 50].

Сложным в диагностике и последующем лечении остаётся **идиопатическая форма мужского бесплодия**. И здесь важная роль в исследовании состояния мужских половых клеток, изучении степени их пролиферации и их гибели принадлежит *иммуногистохимическому методу*. Вторым, фактом в пользу иммуногистохимического анализа – это исследование сперматозоидов для интрацитоплазматической инъекции их в яйцеклетку (ICSI).

Не менее важным является корреляция степени экспрессии определённой панели антител в мужских половых клетках у лиц пожилого возраста с физиологическими инволюционными изменениями и мужского бесплодия, которое чаще всего наблюдается в половозрелом возрасте [50].

В биоптатах при тестикулярной форме бесплодия при патогистологическом анализе семенных канальцев отмечена гиперплазия клеток Сертоли (аплазия герминативного эпителия, s. синдром только клеток Сертоли, s. синдром Дель Кастилио, s. SCO-syndrome) и единичные сперматогонии [48].

Синдром только клеток Сертоли впервые описан в 1947 г. аргентинским морфологом Е. В. del Castillo у мужчин с бесплодием (азооспермией), с нормальным мужским фенотипом и кариотипом и с сохраненной эректильной функцией. Аплазия герминативного эпителия не является диагнозом, а лишь характеризует гистопатологический фенотип. Такое состояние паренхимы яичка описано как синдром, включающий незначительно уменьшенные в размерах яички нормальной консистенции, азооспермию и повышенный уровень фолликулостимулирующего гормона.

Большинство исследователей относят этот синдром к врожденной первичной гипергонадотропной форме гипогонадизма с ранней атрофией герминативного

эпителия. При полной аплазии половых клеток, уменьшенные в диаметре каналцы, содержат только клетки Сертоли и полностью лишены половых клеток. При очаговой форме разное количество семенных каналцев содержат половые клетки, но и в этих каналцах сперматогенез часто нарушен как качественно, так и количественно [25, 27, 48, 114].

Ki-67 в яичках при идиопатическом бесплодии. Анализ научных работ по исследуемой тематике показал, что маркировании на Ki-67 отмечали в единичных сперматогоний [128].

p53 в яичках при идиопатическом бесплодии. По литературным данным, есть предположение, что p53 играет роль в патогенезе бесплодия, в связи с его экспрессией в первичных сперматоцитах [54, 75, 100]. Ряд исследований показало, что родственный ген TP53 Arg72Pro может быть связан с нарушением сперматогенеза при идиопатическом бесплодии у мужчин на юго-востоке Китая [86].

Bcl-2 в яичках при идиопатическом бесплодии. В исследовании А.Е. Оми и др. (2008 г.), антиапоптотический белок Bcl-2 более интенсивно экспрессирует при нормоспермии, чем при олигозооспермии [113].

Каспаза в яичках при идиопатическом бесплодии. Обнаружение активированных каспаз в мужских половых клетках может быть полезным при оценке мужского бесплодия. Большинство сперматогоний экспрессируют каспазы-3, -8 и -9 [58].

IGF в яичках при идиопатическом бесплодии. Взаимодействия гормона роста (GH) и его основного медиатора инсулиноподобного фактора роста-I (IGF-I) с элементами гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси, и их роли в сперматогенезе были исследованы *in vitro* на различных видах животных (мышей и крысы). Исследования *in vivo* на незрелых и зрелых гипофизэктомированных крыс и GH-дефицитных мутантных мышьях самцах и крысах показали, что IGF-I играет важную роль в регуляции стероидогенеза и сперматогенеза. Кроме того, несмотря на то, что ФСГ и ЛГ являются основными регуляторами синтеза IGF-I в яичках, GH может играть косвенную роль в

потенцировании действия гонадотропинов в регуляции содержания IGF-I в яичках. В настоящее время продолжают исследования на животных и на человеке о роли IGF-I при идиопатическом бесплодии. Так, после лекарственной терапии гормоном роста, отмечался положительный эффект среди 10% мужчин, страдающих идиопатическим бесплодием [103]. Однако, недостаточно работ, исследующих патогенез бесплодия, связанный с эффектами гормона роста и/или IGF-I в яичках, и возможно, являющихся причиной мужского бесплодия [39].

Анализ современных литературных данных показывает, что среди имеющихся исследований речь идёт больше о постнатальном сперматогенезе в период препубертата или половой зрелости и реже о пожилом/старческом возрасте, а также о плюропотентности мужских половых клеток в разные периоды онтогенеза (стволовые маркёры). При этом, мало сведений о бесплодии и возможной онкологической предрасположенности нормального сперматогенеза в различных возрастных группах (использование онкомаркёров).

Таким образом, изучение механизмов патогенеза мужского идиопатического бесплодия тесно связано с выявлением факторов интраорганной регуляции сперматогенеза.

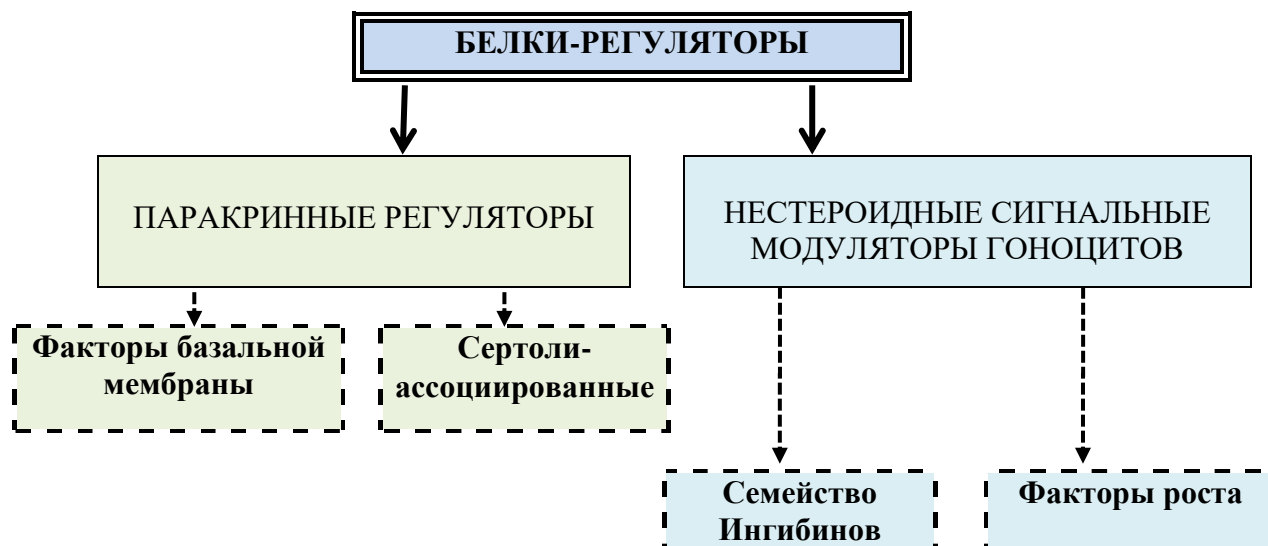
1.2. ЦЕНТРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ – Гипоталамо-гипофизарно-тестикулярная ось

Нейрогуморальная регуляция сперматогенеза является хорошо изученной к настоящему времени. Нейросекреторные ядра (преимущественно мелкоклеточные) гипоталамуса вырабатывают ключевые факторы регуляции сперматогенеза – люлиберины. Они активируют базофильные клетки аденогипофиза, которые импульсно выделяют в кровь гонадотропные гормоны (фоллитропин и лютропин). Клетками-мишенями, опосредующими его стимулирующие влияния на ход сперматогенеза, являются *клетки Сертоли*. Под влиянием фоллитропина они синтезируют ряд биологически активных

соединений: ингибин, активин, трансферин, цитокины и андрогенсвязывающий белок и другие (табл. 1).

Таблица 1

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	<i>Другие химические группы:</i>	NGF
	Цитокины	PLAP (97%)*	VEGF
	Факторы сертолиевых коммуникаций	ОСТ 3/4*	НерGF
	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	Inhibin* ; CD99*; CD10*; AE1 – AE3*; CAM5,2*; SMA*
--	---

Маркёры (другие)	PAS; p-53; ki-67, bcl
------------------	-----------------------

* – маркёры иммуногистотипирования

Тестостерон оказывает прямой эффект на сперматиды, стимулируя их к трансформации в сперматозоиды. Важнейший эффект тестостерона заключается также в репрессии генов апоптоза в половых клетках, что крайне важно для сохранения и формирования полноценного количества зрелых спермиев. Недавно открыто действие тестостерона на миоидные (гладкомышечные) клетки, окружающие извитые семенные канальцы. Роль и значение клеток Лейдига разнообразна. Кроме тестостерона клетки Лейдига выделяют небольшое количество эстрогенов. Помимо половых гормонов они вырабатывают β -эндорфин, небольшие количества окситоцина (стимулирующего сокращения перитубулярных миоидных клеток извитых семенных канальцев), а также интерлейкин 1, действующий как фактор роста на сперматогонии типа В.

1.3. СЕРТОЛИ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ПАРАКРИННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ

клетки Сертоли (сустентоциты)

В 1865 году Enrico Sertoli первым предположил, что клетки Сертоли функционируют в семенном канальце как «питающие клетки». Другими словами, эти клетки обеспечивают трофическими веществами мужские половые клетки, а также различными модуляторами, выполняя задачу опосредованных регуляторов сперматогенеза. Это обеспечивается тесной связью цитолеммы клеток Сертоли и половых клеток.

Клетки Сертоли – крупные многоотростчатые клетки с хорошо развитым цитоскелетом (промежуточные филаменты) и бухтообразными углублениями цитоплазмы. Они лежат на базальной мембране извитого семенного канальца, являются компонентом гемато-тестикулярного барьера. В извитом семенном канальце количество клеток Сертоли достигает до 7% от общего числа клеток – Сертоли-клеточный индекс (количество клеток Сертоли на поперечный срез канальца), имеет важное диагностическое значение (при изменении индекса – подозрение на бесплодие, крипторхизм). Цитоплазма сустентоцитов содержит кристаллоиды Charcot-Bottcher (пучки микрофиламентов). Ядра клеток овальной формы с выраженными ядрышками [54].

При некоторых патологических состояниях (бесплодие, семинома) принято различать следующие виды клеток Сертоли: зрелые, незрелые и дегенеративные и реже эмбриональные. При дифференциальной диагностике и верификации нозологии учитывается соотношение видов клеток Сертоли.

Клетки Сертоли синтезируют и секретируют большое разнообразие факторов, включая стероиды, белки, цитокины, факторы роста, опиоиды, протеазы, простагландины, модуляторы клеточного деления и так далее. Таким образом, клетки Сертоли контролируют процесс сперматогенеза во всех его аспектах, обеспечивая развитие половых клеток от стволовых сперматогоний до поздних сперматид.

1.3.1. Механизмы взаимодействий половых клеток с клетками Сертоли ещё недостаточно изучены.

1.3.1.1. ЦИТОКИНЫ. Это секреторные клеточные белки с небольшой массой, которые синтезируются в основном иммунными клетками и оказывают местное провоспалительное действие на соседние клетки-мишени. Эти белки участвуют в биорегуляции (вызывают пролиферацию и дифференцировку клеток), хеморегуляции и иммунорегуляции.

Интерлейкины влияют только на фазу размножения сперматогоний: интерлейкин-1 стимулирует её, а интерлейкин-6 – тормозит [3, 53, 75, 121].

1.3.1.2. ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ /Tumor Necrosis Factor (TNF-а). Роль TNF-а в Сертоли-герминативных межклеточных коммуникациях заключается в аутокринном контроле пролиферации клеток Сертоли [75] .

1.3.1.3. ИНТЕРФЕРОНЫ (IFN). Эти белки обладают антипролиферативным и иммунорегуляторным действием, решающая роль им принадлежит в противовирусной деятельности. Клетки Сертоли и перитубулярные клетки секретируют значительное количество интерферонов I-го типа. Тогда как, мейотические пахитенные сперматоциты и гаплоидные ранние сперматиды продуцируют низкие уровни интерферонов I-го типа [141].

Экспрессия многих IFN-индуцируемых генов стимулируется и другими цитокинами: IL (IL-3 , IL-4 , IL-5 , IL-6 , IL-10) [63, 75], фактором некроза

опухолей (TNF) [75], тромбоцитарным фактором роста (PDGF) [75], эпидермальным фактором роста (EGF) [63, 75], гранулоцит-макрофаг колониестимулирующим фактором (GM-CSF) и другими [89, 131, 141].

1.3.1.4. ФАКТОР-ИНГИБИТОР ЛЕЙКЕМИИ (LIF). Эти белки относятся к семейству интерлейкинов-6 и плеiotропны к семейству факторов роста. Они ингибируют дифференциацию эмбриональных стволовых клеток и индуцируют тубулогенез в почке эмбрионов, регулируют дифференцировку сперматозоидов. Содержание LIF м-РНК выражено в соматических (Сертоли и Лейдига) и специфических половых клетках (сперматогонии, пахитенные, круглые и поздние сперматиды) семенников грызунов [121].

1.3.1.5. ФАКТОРЫ РОСТА. Среди факторов роста лидирующим в воздействии на физиологию семенников является инсулиноподобный фактор роста (IGF), который синтезируется под влиянием хорионического гонадотропина человека. Трансформирующие факторы роста альфа и бета, синтезируемые клетками Сертоли, подавляют стероидогенез в клетках Лейдига, воздействуя на экспрессию рецепторов ЛГ. В то же время образование трансформирующих факторов роста в клетках Сертоли тормозится ФСГ.

Факторы роста вызывают активацию сигнальных путей трансдукции, участвующих в деления клеток и клеточной дифференцировке. Некоторые из этих факторов (IGF, FGF) были обнаружены в клетках Сертоли и в половых клетках. Клетки Сертоли и половые клетки производят FGF-подобные белки. FGF рецепторы присутствуют в клетках Сертоли. Трансформирующий фактор роста (TGF- α) синтезируется и секретируется клетками Сертоли и Лейдига. Многочисленное семейство TGF- β факторов роста, которое также включает в себя ингибины и активины, является наиболее универсальной группой с наибольшим многофункциональным спектром среди всех известных факторов роста. Рецепторы EGF присутствуют на клетках Сертоли и Лейдига и клетках перитубулярных зон [75].

1.3.1.6. ФАКТОР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (SCF). В отличие от цитокинов, необходимость в SCF для сперматогенеза чётко установлена. Клетки Сертоли

является единственными клетками в семенных канальцах, которые продуцируют SCF [65, 73]. Так, в эксперименте на мутантных мышах, лишённых c-kit или SCF, их гонады являются стерильными, половые клетки не образуются. Экспрессия SCF в семенниках находится под контролем ФСГ. Исследования последних лет доказали, что система c-kit/SCF является ключевой для сперматогенной дифференциации у грызунов и у человека. SCF – является важным местным регулятором, этот белок играет важную роль в миграции, адгезии, пролиферации и выживании эмбриональных стволовых клеток и сперматогоний [55]. В яичке c-kit присутствует в сперматогониях, а SCF – в клетках Сертоли [138]. Существует корреляция между уровнем SCF и количеством сперматогоний, а также последующим клеточным составом семенной жидкости у мужчин [75, 79].

Маноза-6-фосфат-рецептор. Клетки Сертоли секретируют гликопротеины, содержащие маннозу-6-фосфат для транспорта их за пределы гематотестикулярного барьера, например в гепатоциты [75]. Клетки Сертоли обеспечивают протеогликанами половые клетки, их цитолемму, в основном гепарансульфат (HSPG) [75].

Трансферрин. В настоящее время недостаточно изучена роль трансферрина в сперматогенезе. Он, скорее всего, выполняет сложную физиологическую роль, связанную с дифференциацией и пролиферацией половых клеток. Этот белок, синтезируется не только в гепатоцитах, но и в клетках Сертоли, в эпителиальных клетках сосудистого сплетения у грызунов и в олигодендроглиоцитах всех видов периферических анализаторов [75, 145]. Клетки Сертоли участвуют в циркуляции железа, активно транспортируя его через плотные контакты в развивающиеся половые клетки.

Тестикулярный паракринный фактор – P-Mod-S. Это паракринный и мезенхимальный фактор, который модулирует функции клеток Сертоли [75]. Белок называется P-Mod-S, так как его аббревиатура образована из: перитубулярные клетки (P), моделирующие (Mod) клетки Сертоли (S). Он стимулирует продукцию трансферрина, АСБ и других белков. Этот белок не

обладает митотической активностью, он чувствителен к трипсину [49]. Другие известные медиаторы, такие как IGF-I, β -FGF, цитокины и херегулин, способны имитировать некоторые эффекты, характерные для P-Mod-S [49, 59, 75, 137].

1.3.2. СЕРТОЛИ-СПЕРМАТОГЕННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Клетки Сертоли и мужские половые клетки находятся в тесном функциональном и морфологическом взаимодействии, для чего клетки Сертоли обладают специфическими механизмами влияния на гоноциты. С другой стороны, существуют данные, что половые клетки также способны влиять на деятельность клеток Сертоли, так как после экспериментального удаления определённой половой клетки специфическими токсинами, происходили изменения в секреции ингибина клетками Сертоли [49, 59]. К белкам-регуляторам можно отнести: ядерные протеин-киназы (гаспин), α 2-макроглобулин, сперматогенный иммуноглобулин и другие.

Клетки Сертоли секретируют целый ряд пептидов, действующих на клетки Лейдига. Во-первых, ингибин, активин и IGF-I, усиливающие экспрессию рецепторов ЛГ клетками Лейдига и тем самым активируют стероидогенез. Стимулятором синтеза ингибина, активина и IGF-1 в клетках Сертоли является хорионический гонадотропин. Во-вторых, трансформирующие факторы роста α и β – подавляют стероидогенез в клетках Лейдига. В то же время, образование трансформирующих факторов роста в клетках Сертоли тормозится ФСГ. Сперматогонии стимулируют синтез ингибина и подавляют синтез эстрадиола в клетках Сертоли. Сперматоциты II порядка и сперматиды усиливают действие фолликулостимулирующего гормона на клетки Сертоли [78].

Учитывая биологические характеристики клеток Сертоли, и их опосредованную роль в самообновлении половых клеток, их дифференциацию, де-дифференциацию, апоптоз и транс-дифференциацию стволовых сперматогониальных клеток [75], целесообразно оценить связь между нарушением функции клеток Сертоли и повреждением сперматогенеза. Разрешение существующих спорных моментов о взаимодействии sustentоцитов и половых клеток позволило бы идентифицировать новые цели для генной

терапии мужского бесплодия, а также искать более эффективные и безопасные стратегии для мужской контрацепции.

1.3.3. МИОИДНЫЕ КЛЕТКИ

Исследования *in vitro* продемонстрировали, что миоидные клетки секретируют ряд веществ, в том числе компоненты внеклеточного матрикса (фибронектин, коллагены I и IV типов, протеогликаны) и факторы роста (PModS, TGF-бета, IGF-I, активин-A). Некоторые из этих соединений влияют на функции клетки Сертоли [101].

1.4. МУЖСКИЕ ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: НЕСТЕРОИДНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ

1.3.1. Семейство ингибинов

Ингибин и активин являются димерными гликопротеинами, отличающиеся лишь β -субъединицей.

Некоторые исследования показывают наличие β_B -ингибина в ядрах сперматоцитов-I [37, 75]. Предполагается, что активин может участвовать в митотическом делении на ранних стадиях сперматогенеза [47, 82]. Доказательства наличия иммунореактивного ингибина и его регулирующей роли на круглые сперматиды были представлены в результатах исследований различных авторов [54]. Активин стимулирует пролиферацию половых клеток, тогда как ингибин уменьшает её [106]. Это даёт основание предполагать, что роль ингибина/активина направлена на поликлеточную кооперацию [47, 106].

ПРОЛИФЕРАЦИЯ СОМАТИЧЕСКИХ и ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

Клеточное обновление в любой ткани является результатом воздействия многочисленных стимулирующих и подавляющих сигналов, получаемых клетками её составляющими. В нормальном и патологическом сперматогенезе эти сигналы являются результатом активации ряда генов, что нередко сопровождается инактивацией одного или нескольких генов-супрессоров неоплазии (например, при гипоплазии, гиперплазии, метаплазии и дисплазии) [129].

Методы выявления антигенов, специфичных фазам клеточного цикла, являются в настоящее время самыми распространёнными. Почти в 90% работ, в которых изучалась пролиферация, использовались методы, в основе которых лежит выявление антигенов, специфичных фазе клеточного цикла с помощью моноклональных антител с последующей визуализацией их методами иммуногистохимии [57]. Широкому распространению иммуногистохимических методов способствовали их простота, наличие большого спектра антител, стандартная методика визуализации и высокая воспроизводимость результатов. В настоящее время в качестве маркёров пролиферации используют несколько антигенов.

1.4.1.1. Ядерный антиген пролиферирующих клеток (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) был открыт К. Miyachi в 1978 году, когда он обнаружил, что в сыворотке крови больных системной красной волчанкой содержатся антитела, избирательно связывающиеся с белком пролиферирующих клеток. Белок PCNA необходим для синтеза ДНК. Несмотря на то, что PCNA животных и человека отличаются определённой последовательностью аминокислот, тем не менее, функционально они взаимозаменяемые. Существуют несколько клонов антител к PCNA: PC9 – распознаёт PCNA только в ядрышках; 19A2 – преимущественно в S-фазе клеточного цикла; PC10 – определяет PCNA в клетках, находящихся в клеточном цикле (G1, S, G2 и M) [102, 108]. В настоящее время имеются свидетельства, что PCNA участвует не только в пролиферации клеток, но и в «ремонте» ДНК после её повреждения [91, 120, 124].

PCNA в яичках. По литературным данным, наблюдалась экспрессия PCNA в ядрах сперматогоний-А-светлых (в мета-, ана- и телофазы митоза) и сперматоцитов, а также в некоторых клетках Сертоли в препубертатном периоде постнатального онтогенеза [139].

1.4.1.2. Белок Ki-67 (MIB-1). Белок, кодирующийся одним геном, расположенным на 10-й хромосоме [52]. Экспрессия Ki-67 наступает во время фазы G1, затем в течение клеточного цикла нарастает и резко уменьшается после митоза. Ki-67 играет важное прогностическое в онкологии [83, 111].

При сравнении экспрессии PCNA и Ki-67 существует определённая корреляция (табл. 2), однако при сравнительных исследованиях этих маркеров с бромдеоксиуридином (маркер S-фазы) оказалось, что экспрессия Ki-67 более точно соответствовала распределению метки бромдеоксиуридина [57, 62, 104].

Таблица 2

Сравнительная характеристика методов оценки пролиферации

Признаки	PCNA	Ki-67
фаза клеточного цикла	G1, S, G2 (G0)	G1, S, G2
материал	любой	любой/замороженный
окраска цитоплазмы	Да	Нет
однородность окрашивания	-	+

Ki-67 в яичках. В ряде наблюдений при иммуногистохимическом исследовании семенных канальцев, отмечалась положительная экспрессия Ki-67 в ядрах А- и В-сперматогоний после воздействия MIB-1 в G1-фазе, направленного против белка Ki-67 [56, 57]. Экспрессия белка Ki-67 отсутствовала во время лептотены и зиготены, но обнаруживалась во время пахитены мейоза-I [128, 142].

АПОПТОЗ СОМАТИЧЕСКИХ и ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

Во время развития человека, образуется необходимое количество клеток. После того, когда клетки полностью израсходуют свои жизненные ресурсы, они совершают «самоубийство» путем активации внутриклеточной программы смерти. Происходящие при этом события носят упорядоченный характер, поэтому этот процесс часто называют генетически запрограммированной клеточной гибелью (PCD), или апоптозом.

1.4.1.3. Каспазы. Они представляют собой семейство протеаз, которые в активной части содержат цистеин (цистеиновая протеаза); во время апоптоза они обеспечивают процессинг цитокинов. После активации каспазы, они расщепляют клеточные белки, проявляя определённые цитологические признаки апоптоза. Каспазы-9 активизируют другие каспазы, запуская каскад биохимических реакций и создавая увеличение протеолитической активности, что приводит к разрушению структурных белков в цитоплазме, фрагментации хромосомной ДНК, и гибели клеток (табл. 3) [21, 44, 46, 76, 86, 132].

Основные компоненты механизма апоптоза в животной клетке

компонент	Внутренний путь (способ)	Наружный путь (способ)
Промоутеры апоптоза	только белки Вах/ВНЗ	Fas/FasL, TNFR1/TNF- α
Ингибиторы апоптоза	Bcl-2, Bcl-x,	FLIP
Адапторы (посредники)	Araf- 1	FADD, TRADD
Каспазы-инициаторы	каспаза-9	каспаза-8
Каспазы-ингибиторы	ингибиторы апоптоза (IAP)	ингибиторы апоптоза (IAP)
Каспазы-эффекторы	каспаза-3, каспаза-7	каспаза-3, каспаза-7

АПОПТОЗ и СПЕРМАТОГЕНЕЗ

Судьба мужских половых клеток в яичках регулируется сложной системой внешних и внутренних сигналов, которые включают: фактор стволовых клеток (SCF), лейкемия-ингибирующий фактор (LIF), и сигнальный белок Dhh, а также эндокринные сигналы (гонадотропины гипофиза и тестостерон). Точная причина запуска апоптоза в мужских половых клеток остаётся малоизученной, так как при этом не отражается классическая цитологическая картина этой гибели. Сперматогонии и ранние сперматиды почти наверняка погибают от апоптоза, так как их гибель отображает многие классические морфологические и биохимические особенности [44, 86, 118].

Комплекс Araf-1+АТФ+цитохром-С активирует каспазы. Предполагается, что цитохром С в семеннике является опосредованным фактором апоптоза [81].

1.4.1.4. Белок Bcl-2, кодирующийся геном *Bcl-2 (B-cell lymphoma gene-2)* был открыт в 1984 году при изучении хромосомной транслокации t [69], которая часто встречается при неходжкинских фолликулярных лимфомах. Он локализуется во внутриклеточных мембранах, а основная его функция – регуляция апоптоза [52]. Его открытие и дальнейшее изучение позволило предположить, что нарушение экспрессии этого гена увеличивает продолжительность жизни клеток без влияния на их пролиферацию. Блокада апоптоза под действием Bcl-2 может наступить в любую фазу клеточного цикла [69, 88], однако механизм, с помощью которого белок блокирует апоптоз, до сих пор не раскрыт.

Bcl-2 в яичках. Fas/FasL системы и белки семейства Bcl-2 участвуют в регуляции апоптоза половых клеток [88]. При иммуногистохимических

реакциях на Bcl-2 было показано, что апоптоз отмечается в первичных сперматоцитах и сперматиде и в единичных сперматогониях [69, 79, 88, 97, 112, 143]. Многие исследования на млекопитающих и в меньшей степени на человеке, доказывают, что Bcl-2 ингибирует гибель сперматогоний [130]. Однако достоверных данных об антиапоптотической активности Bcl в половых клетках и в первую очередь в сперматогониях, в современных исследованиях недостаточно.

1.4.1.5. Белок p53 был описан в 1979 году, он выявляется во многих трансформированных клетках [52]. Ген *p53* расположен у человека на 17-ой хромосоме и имеет близкую структуру у всех позвоночных. Более половины всех злокачественных опухолей человека связаны с мутацией гена *p53*. Белок *p53* локализуется в ядре клеток и очень нестабилен [100, 127]. Этот белок называют «сторожем генома» или «аварийным тормозом пролиферации».

Было показано, что по сравнению с PCNA, Ki-67 более чувствительный и специфичный в различных анализируемых опухолях. Подобная корреляция наблюдается и при использовании *Bcl* и *p53* [100, 104].

p53 в семенниках млекопитающих и человека. В экспериментах на мышах при нормальном сперматогенезе *p53* в сперматогониях не экспрессирует (ПЦР-анализ) и появляется в них только после радиоактивного воздействия [127]. *p53* играет важную роль в контроле размножения половых клеток при нормальном сперматогенезе, скорее всего, за счёт регулирования процесса апоптоза в сперматогониях. Кроме того, после облучения, *p53* участвует в удалении поврежденных клеток.

В экспериментах на крысах была обнаружена экспрессия *p53* в сперматоцитах, вступивших в мейоз (прелептотенные, зиготенные, пахитенные). Этот белок также был обнаружен в работах по его изучению в половых клетках яичек [54, 75, 140].

Таким образом, существует тонкая система равновесия между пролиферацией и апоптозом, которая контролируется двумя семействами генов, и мутация в одном из них может приводить к драматическим последствиям для

организма в целом. То есть, либо мутация только *p53*, либо мутация *p53* и *BCL2* не способны привести половые клетки к апоптозу и это является основной причиной выживания клеток с повреждённым геномом.

1.4.1.6. Факторы роста

Факторы роста – это полипептиды с молекулярной массой 5–50 кДа, объединённые в группу трофических регуляторных субстанций. Эти белки обладают разнообразными свойствами и влияниями на клетки, обеспечивая, прежде всего, их пролиферацию (Таб. 1.2.).

1.4.1.6.1. IGF (инсулиноподобный фактор роста)

Семейство инсулиноподобных факторов роста – IGF, по структуре и функциям похожих на инсулин и включает в себя несколько представителей [52, 80]. В их функцию входит эндокринная, аутокринная и паракринная регуляция процессов пролиферации и дифференцировки клеток и тканей организма. Они увеличивают транспорт аминокислот и глюкозы в цитоплазму, запуская каскад фосфорилирования белков и ингибируя внутриклеточные протеиназы. IGF-I в основном синтезируется в гепатоцитах [80]. При этом инсулин, андрогены, эстрогены повышают секрецию IGF-I в печени, а глюкокортикоиды её снижают [61]. IGF-I воздействует на развитие организма всю жизнь, но его уровень в крови непостоянный: наиболее низкий отмечается в детстве и в старости, а самый высокий – во время подросткового периода жизни [61].

IGF в яичках. IGF-I и его рецепторы обладают множеством эффектов на мужские половые клетки, в том числе стимулируют пролиферацию, влияют на стероидогенез и этапы половой дифференцировки сперматогоний в первичные сперматоциты [74, 109, 125], его концентрация прямо коррелирует с числом сперматоцитов, находящихся на стадии пахитены [75]. У человека именно эти сперматоциты продуцируют больше всего IGF-I, который стимулирует синтез ДНК в делящихся митозом в половых клетках. IGF-I также обнаружен в клетках Лейдига. Миоидные клетки вырабатывают производные инсулиноподобного фактора роста, влияющего на клетки Лейдига [74, 109, 116, 144].

1.4.1.6.2. EGF (эпидермальный фактор роста)

EGF – глобулярный белок, который действует как сильный митоген на различные клетки эндодермального, эктодермального и мезодермального происхождения. Основным местом синтеза EGF являются слюнные железы (гландулоциты). EGF играет также важную роль в канцерогенезе. В определенных условиях он может провоцировать малигнизацию клеток. Он повышает активность внутриклеточных тирозинкиназ, концентрацию внутриклеточного кальция и усиливает гликолиз [70].

EGF в яичках участвует в дифференциации мужской репродуктивной системы через активирование рецепторов андрогенов [105]. Было отмечено, что высокий уровень EGF является важным для завершения сперматогенеза [90, 105]. EGF обнаружен в сперматоцитах II и сперматиде, расположенных в адлюминальных отсеках семенных канальцев. В результате ряда исследований, концентрация EGF может сделать процесс бесплодия обратимым: эти эффекты опосредованы интерстициальными (стромальными) клетками яичек [70]. EGF может стимулировать пролиферацию клеток Сертоли и имеет аддитивный эффект с другими факторами роста. Клетки Лейдига – экспрессируют рецепторы EGF и трансформирующий фактор роста- α , отвечающие на действие EGF или TGF стимуляцией стероидогенеза и ростом половых клеток [107]. Данное явление находит отражение в антенатальном периоде. Существует предположение, что структуры семени также способны синтезировать EGF, это вызывает дифференцировку сперматогоний-A при крипторхизме [94], ингибируя митотическую активность в сперматогониях. EGF был также обнаружен в сперме человека, где он необходим для стимуляции последующей капацитации, путём активации тирозинкиназы EGF-R, которая регулирует фосфорилирование [70].

Таким образом, на сегодняшний момент нет достаточных данных о роли EGF в сперматогенезе. Однако, достоверно известно, что он присутствует в клетках Сертоли и Лейдига (табл. 4).

1.4.1.6.3. VEGF (васкулярно-эндотелиальный фактор роста)

VEGF – гетеродимерный гликопротеиновый ростовой фактор, продуцируемый различными типами клеток и в первую очередь, эндотелиоцитами [45, 51, 52, 115].

VEGF – это потенциальный митоген для эндотелиальных клеток. Он принимает участие в процессах неоваскуляризации в патологических ситуациях. Из способности VEGF воздействовать на проницаемость сосудов появляется возможность вовлечения этого ростового фактора в изменение функций гематотестикулярного барьера в пограничных (субнормальных) и патологических условиях [45, 51, 60, 67, 71, 126].

VEGF в яичке человека. В исследовании яичек плодов человека, подвергшихся различной степени ишемии, связанной с острыми нарушениями маточно-плацентарного и пуповинного кровообращения, были выявлены многочисленные участки экспрессии VEGF в ядрах и цитоплазме отдельных эндотелиоцитов новообразованных сосудов, что указывает на интенсивность ангиогенеза в ответ на выраженную гипоксию, как проявление компенсаторного механизма [60].

Кровоснабжение яичка, а также сосудистая пролиферация играет колоссальную роль для нормального сперматогенеза [60, 85, 115]. Уровень экспрессии VEGF в яичке варьирует, что отражается различными эффектами в зависимости от компартмента. Тем не менее, Korpelainen et al, (1998) приводят доказательства того, что чрезмерный синтез VEGF в семенниках и придатках трансгенных мышей вызывает бесплодие [75]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что VEGF в трансгенных органах содержат другие клетки-мишени эндотелия в яичках и что VEGF может регулировать мужскую фертильность.

Отмечена экспрессия VEGFR-1 в половых клетках и в клетках Сертоли, а VEGFR-2 визуализируется в цитоплазме сперматогоний-А. Кроме того, VEGFR-1 обнаружили в акросоме сперматид и сперматозоидов. При этом, в пахитенных сперматоцитах данные белки не определяются [110].

Паракринное влияние факторов роста на половые клетки

факторы роста	локализация в яичке	эффекты (влияние на половые клетки)
IGF 1	клетки Сертоли	пролиферация
IGF 2	клетки Сертоли	дифференцировка
TGF - α	клетки Сертоли	стимуляторы роста
TGF- β	клетки Сертоли	ингибиторы роста
EGF	перитубулярные клетки	посредники роста
IL 1	клетки Сертоли	регуляторы роста
VEGF	эндотелиоциты	(нео-) ангиогенез

VEGF, вероятно, способствует избирательной пролиферации и дифференцировки в зависимости от рецепторного подтипа. Функциональные исследования ведутся, чтобы установить конкретную роль VEGF в процессе сперматогенеза, особенно у человека [110].

1.5. МАРКЁРЫ ИММУНОГИСТОТИПИРОВАНИЯ СТРУКТУР ЯИЧКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

1.5.1. МАРКЁРЫ ГОНОБЛАСТНОЙ АКТИВНОСТИ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

1.5.1.1. PLAP (Placental alkaline phosphatase, плацентарная щелочная фосфатаза)

PLAP – это аллостерический опухолеспецифический изофермент щелочной фосфатазы человека [52]. Он был впервые описан у больного раком лёгких и позже выявлен в сыворотке больных другими формами рака и идентифицирован как плацентарная щелочная фосфатаза (PLAP) [119].

Плацентарную щелочную фосфатазу (ПЩФ) относят к белкам, ассоциированным с беременностью и опухолевым ростом [23].

PLAP, согласно регламенту European group on tumor markers и ВОЗ, является одним из основных маркёров герминогенных опухолей и в первую очередь семиномы [4, 32, 36, 42, 43, 55, 66, 68, 77, 98, 129]. Следует отметить также описанную положительную экспрессию PLAP у пациентов с крипторхизмом (в возрасте 14 – 18 лет), что свидетельствует о наличии потенциала стволовых

клеток [93, 94]. Эти наблюдения говорят о плюрипотентных свойствах гоноцитов в канцерогенезе (табл. 5).

Таблица 5

Частота положительных реакций герминогенных опухолей яичка с различными антителами [3, с изменениями и дополнением].

антитела к:	ОПУХОЛИ (%):			
	Семинома	Эмбриональный рак	Опухоль желточного мешка	Незрелая тератома
OCT 3/4	99	95	0	0
PLAP	86	91	80	0
CD 117	86	4	17	0
Vimentin	20,7	19	16	0
MAGEA 4	0	0	0	0

PLAP в яичках. PLAP экспрессирует в норме в половых клетках яичек плода и новорождённого [133, 136]. В мужских половых клетках в постнатальном периоде в норме PLAP не определяется

1.5.1.2. CD 117

Рецептор фактора роста тучных и стволовых клеток (SCFR), или тирозинкиназа CD117 (c-kit) – рецепторная тирозинкиназа, продукт гена *Kit*. Существует несколько изоформ белка. Впервые этот фактор описан в 1987 году [52, 54, 75, 77, 123].

CD117 – фактор дифференцировки, играющий важную роль в гемопоэзе, сперматогенезе и меланогенезе; экспрессирует в клеточной мембране. c-kit регулирует развитие некоторых типов клеток (меланоциты, половые клетки, лейкоциты, эритроциты, глиальные клетки Кахаля) [75]. Различные опухоли часто имеют низкий уровень экспрессии этого белка. Положительными по экспрессии CD117 являются практически 100% семином, а в смешанных опухолях он окрашивает компонент семиномы [43, 68, 72, 90, 95, 96]. Однако, при проведении дифференциальной диагностики необходимо учитывать, что только 40% случаев сперматоцитарной семиномы – опухоли, которые встречаются в яичках пожилых мужчин, являются положительными при реакции с антителами к CD117 [23, 72, 92, 96, 122, 136].

В нормальных яичках, экспрессия CD117 наблюдается в клетках Лейдига и частично в сперматогониях [90].

Номенклатура видов мужских половых гамет в пренатальном онтогенезе, принятые ещё в середине прошлого века,* за последнее десятилетие претерпели значительные изменения благодаря активному использованию методов иммунофенотипирования и молекулярной биологии (FISH, CISH и ПЦР-диагностики). При этом, идентификация гамет основывается на использовании таких маркеров как OCT-4, CD117 (c-kit) и MAGEA4, реже PLAP. В современных условиях, протеомика дифференцировки мужских половых клеток в антенатальном развитии выглядит следующим образом: примордиальные, гоноциты (OCT4⁺⁺/PLAP⁺/MAGEA4⁻/CD117⁺⁺), промежуточные (OCT4⁺/MAGEA4⁻/CD117⁻), фетальные сперматогонии (OCT4⁻/MAGEA4⁺/CD117⁻). Трансформация примордиальных половых клеток в гоноциты является первым шагом на пути дифференцировки мужских половых клеток [72, 98].

* Мужские половые клетки в антенатальном сперматогенезе, согласно номенклатурам Fukuda, Hedinger (1975) и Wartenberg, Holstein, Vossmeier (1971, 1978): гоноциты, примитивные, примордиальные, пресперматогонии – M (multiplying), T1 (transitional nonproliferating) и T2 (transitional proliferating).

Резюме

Единство функции и структуры является непреложным законом. Естественно, что при изучении патологии сперматогенеза нельзя ограничиться функциональным аспектом проблемы – необходимо изучать и структурные изменения.

Особенно значительный прогресс в современных представлениях о строении, физиологии и развитии мужских половых клеток был достигнут за последние 10 – 15 лет благодаря применению методов иммуногистохимии и молекулярной биологии. На примере сперматогенеза выяснены важные

закономерности молекулярной и цитологической дифференцировки мужских гамет. Изучение нормального сперматогенеза особенно актуально для выяснения причин и патогенеза мужского идиопатического бесплодия, совершенствования методов искусственного оплодотворения, разработки мероприятий профилактики бесплодия.

Анализируя вышеизложенные литературные данные можно заключить, что возможная роль биологических соединений в мужском идиопатическом бесплодии нуждается в уточнении. Кроме того, мало данных о возможной положительной экспрессии онкомаркёров в половых клетках при идиопатическом бесплодии. А также, существует мало научных доказательств этиопатогенетического подхода в лечении идиопатического бесплодия.

Следовательно, мужское идиопатическое бесплодие, бесспорно, является предметом всестороннего изучения (патогенез) и в первую очередь необходимо дать максимально возможную в современных условиях морфологическую картину заболевания, основываясь на течении нормального сперматогенеза. Полученные структурно-функциональные данные позволят в дальнейшем обозначить вектор в изучении патогенеза и разработке адекватных терапевтических подходов лечения (прежде всего консервативного), а также проведении возможной профилактики.

В связи со сказанным возникла необходимость в обобщении и возможной систематизации имеющихся данных, переоценке прежних результатов в свете современных представлений, а также в освещении новых перспективных направлений исследований.

Глава II

МАТЕРИАЛ и МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ретроспективные исследования материала проводили на базах: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), кафедра патологической анатомии имени академика А. И. Струкова (заведующая кафедрой – д.м.н., профессор Е.А. Коган); Негосударственное частное учреждение здравоохранения «Научный клинический центр ОАО «РЖД», урологический центр (руководитель – д.м.н., профессор О.В. Теодорович).

С целью проведения ретроспективного исследования клинико-морфологического материала были сформированы две группы:

I. – группа с условным контролем физиологического течения сперматогенеза, в семейном анамнезе – одно и более деторождений (возрастная выборка проводилась по Г.Г. Автандилову, 1998; А.С. Леонтьук с соавт., 2000) [1]: А – мужчины 22–35 лет (28.5 ± 6.5 , $n=10$); Б. – мужчины 64–75 лет (69.5 ± 5.5 , $n=10$);

Объектом исследования в этой группе служил аутопсийный материал яичек, полученные при ранних вскрытиях трупов мужчин (не более 6 часов после констатации биологической *exitus letalis*). Он был собран в патологоанатомическом отделении НКЦ ОАО «РЖД» и судебно-медицинском морге №10 г. Москвы (при ГКБ им. Боткина) у мужчин, погибших от случайных причин или умерших вследствие заболеваний, не связанных с патологией органов полости таза. Причину смерти устанавливали по заключению врача-патологоанатома или судебно-медицинской экспертизы. Яички исследовали макроскопически на предмет наличия/отсутствия воспалительного и/или опухолевого процесса.

II. В группу были включены мужчины зрелого возраста 22–35 лет (28.5 ± 6.5) с клинически (и морфологически) подтверждённым диагнозом идиопатического бесплодия (азооспермия) ($n=30$).

Объектом исследования в этой группе служили биоптаты правых яичек (чаще выбор в пользу яичка большего объема – пальпаторно и по данным ультразвуковой диагностики). Медицинскими показаниями для получения биоптатов яичек была азооспермия. От пациентов при получении биоматериала и использовании результатов его исследования в дальнейшей работе и публикациях были оформлены информированные добровольного согласия (согласно Бюллетеня ВОЗ).

Материал изучали на гистологических препаратах и отпечатках методом световой микроскопии.

Все исследования проведены с соблюдением требований протокола № 10-16 от 09.11.16, одобренного Этическим комитетом Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, а также соответствуют Хельсинкской декларации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical principles for Medical research involving Human subjects, 64th WMA General assembly, Fortaleza, Brazil, October, 2013).

М Е Т О Д Ы И С С Л Е Д О В А Н И Я

Использован следующий комплекс методов: морфологические, морфометрические, гистохимические, иммуногистохимические (ИГХ), полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и статистические методы исследования.

В качестве рутинных критериев оценки полученных результатов выступали стадии сперматогенеза, предложенные Clermont Y. (1963), балльная система оценки сперматогенеза по Johnsen S. G. (1970), балльная шкала нарушений сперматогенеза по доли семенных канальцев, содержащих вытянутые сперматиды (при их наличии), предложенная Bergmann M. (1998), осуществление оценки компенсаторно-приспособительных реакций по

морфометрическим характеристикам тканей яичка [Е. А. Дубова и др. «Морфологическая характеристика биоптатов яичка при бесплодии»; И.Ю. Саяпина и др. «Опыт использования программы видеотест – морфология 4.0 в системном анализе структурно-функционального состояния семенников»], а также способ диагностики состояния структур яичка по расчёту индекса сперматогенеза, рекомендованный Астраханцевым А. Ф. (2001) [2].

2.1. Клиническое (клинико-лабораторное) обоснование мужского идиопатического бесплодия (II-я группа)

Согласно основным Положениям различных Комитетов, в том числе и под эгидой ВОЗ для оценки физиологической зрелости потомства животных контрольной и опытной групп использовали следующие показатели: пол, возраст, весовые параметры яичек; клинико-лабораторные данные (анамнез, спермограмма, первичная биопсия).

Клинический материал (биоптаты яичек у 30 мужчин, страдающих идиопатическим бесплодием) был получен при биопсии под местной анестезией (урологический центр НКЦ ОАО «РЖД», Клиника урологии им. Р.М. Фронштейна Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, клиника «Мать и дитя»). Я выражаю благодарность врачам урологам-андрологам: к.м.н. А.В. Краснову (заведующий андрологическим кабинетом), к.м.н. Н.Г. Кульченко, к.м.н. Д.В. Москвичёву. Причиной обращения в медицинские учреждения пациенты называли нарушение фертильности (первичное бесплодие) (n=24), а также невынашивания беременности, неудач экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов или неудач интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI) (n=6). Изначально было обследовано 50 мужчин, обратившихся на приём к урологам-андрологам с проблемами фертильности (возраст 22 – 35 лет). Из дальнейшего исследования были исключены 20 пациентов (критерии исключения): отягощённый лекарственный анамнез (n=4; андрогены или анти-эстрогены), системные заболевания (n=9), хромосомные транслокации (n=1), гипогонадотропный

гипогонадизм (n=6), а также другие эндокринные заболевания, ведущие к снижению секреции тестостерона: гипотиреоз, тиреотоксикоз, гиперпролактинемия (определяется на основании уровней тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина (Т₄), пролактина), декомпенсация сахарного диабета, гиперкортицизм, а так же почечная или печеночная недостаточность, воспалительные заболевания урогенитального тракта в стадии обострения.

АНАЛИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ДАННЫХ

(Протокол обследования мужчин с азооспермией):

Исследовались выписки из медицинских карт пациентов, включавшие в себя следующие данные: паспортные сведения, жалобы, анамнестические, физикальные, лабораторные и инструментальные.

Анамнез.

1. Употребление лекарственных средств (см. инструкцию к применению каждого лекарственного средства), в том числе длительная антибактериальная терапия инфекций, передающихся половым путём.
2. Употребление наркотических средств (в том числе марихуаны).
3. Наследственная отягощенность (выявление у отца и братьев бесплодия или применения вспомогательных репродуктивных технологий).
4. Наличие в анамнезе воспалительных заболеваний урогенитального тракта.
5. Частое посещение саун и прием горячих ванн. Объективный осмотр
6. Измерение роста и массы тела, окружности талии и расчет индекса массы тела.
7. Пальпация грудных желез.
8. Осмотр оволосения андрогензависимых зон.
9. Оценка пропорций скелета (евнухоидные пропорции, сниженный рост).
10. Исследование органов мошонки (пальпация и оценка объема яичек, выявление опухолей яичек, наличие семявыносящего протока и исследование состояния придатков яичек).
11. Выявление признаков варикоцеле, проба Вальсальвы.

12. Исследование паховых региональных лимфатических узлов.

13. Оценка размеров и аномалий развития наружных половых органов, в том числе пениса (наличие гипоспадии, крипторхизма).

Инструментальная диагностика.

14. УЗИ яичек и органов мошонки, семенного канатика (вне зависимости от наличия или отсутствия пальпируемых образований в яичках).

15. УЗИ + доплеровское исследование вен мошонки на предмет варикоцеле.

16. УЗИ трансректальным датчиком предстательной железы и семенных пузырьков.

Лабораторная диагностика.

17. Клинический анализ крови.

18. Биохимический анализ крови (АлТ, АсТ, билирубин, креатинин, мочевины, общий белок, альбумин), расчет скорости клубочковой фильтрации.

19. Анализ эякулята (биохимическое исследование эякулята, микроскопическое исследование спермы, оценка лейкоцитспермии, кинезиграмма сперматозоидов, морфограмма сперматозоидов).

Значения эякулята оценивались согласно протоколу Всемирной организации здравоохранения («WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen», 5th edition, Geneva, 2010). Семенную жидкость каждый пациент сдавал дважды, с интервалом в 22 дня. У всех (30-ти) исследуемых мужчин по заключению спермограммы – идиопатическая азооспермия (табл. 6).

20. MAR-тест или ImmunoBead-тест с целью выявления антител к сперматозоидам в эякуляте для сперматозоидов, ассоциированных с АСАТ (по ВОЗ, 5-е изд., 2010 г.) – не проводили в виду отсутствия половых клеток в эякуляте (сперматозоидов).

Таблица 6

Результаты спермограммы во II-й группе.

Показатель	Значение
Объем эякулята, мл	≤ 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 АСАТ, выявленных методами MAR, либо ImunnoBeat)	исследование не проводилось

21. *Гормональный анализ мужчин, страдающих бесплодием (ФСГ, ЛГ, тестостерон).*

За сутки до исследования исключались физическая нагрузка и приём алкоголя. Анализ крови забирался строго натощак между 7⁰⁰ и 10⁰⁰ часами из локтевой вены (10,0 мл). Сыворотку крови до использования хранили при – 20°С. Количественное содержание фолликулостимулирующего гормона (ФСГ, FSH), лютеинизирующего гормона (ЛГ, LH) и свободного тестостерона (F-Testo) определяли в образцах сыворотки крови мужчин методом иммуноферментного анализа (ELISA). Определение концентрации ЛГ, ФСГ производили на автоматическом иммунохимическом анализаторе Beckman Coulter Access-2 (США) с использованием оригинальных реактивов Beckman Coulter; свободного тестостерона – наборами фирмы LifeSpan BioSciences (США). Чувствительность метода, коэффициент вариации (CV) и диапазон определения (DR) составили: для ЛГ – 0,2 мЕд/мл, CV <10 %, DR – 0.2 – 250 мЕд/мл; для ФСГ – 0,2 мЕд/мл, CV <10 %, DR – 0.2 – 200 мЕд/мл; для свободного тестостерона – 0,188 нг/мл, CV <10 %, DR – 0.313 – 20 нг/мл. У всех исследуемых мужчин уровни гормонов ЛГ (10.22±0.4 мЕд/мл) и тестостерона (12.7±2.1 нмоль/мл) в сыворотке крови в пределах возрастной физиологической нормы; количество ФСГ – 26.58±0.37 мЕд/мл (норма для мужчин 20 – 50 лет составляет 2.0 – 11.0 мЕд/мл).

22. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) мазка из ладьевидной ямки с целью выявления инфекций, передающихся половым путём.

23. Посев эякулята на питательную среду с целью выявления патогенной флоры и определение чувствительности микробов к антибактериальным препаратам.

24. *Лабораторная цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика* (исследование кариотипа, анализ крови на наличие микроделений AZF локуса Y-хромосомы). Кариотип: 46, XY. Патологические изменения кариотипа (робертсоновская транслокация – 45,XY,der(13;14)(q10;q10)) и другие Y-микроделеции отсутствуют.

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

Все пациенты, страдающие бесплодием, являются молодыми людьми в возрасте 22 – 35-ти 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.

Тестикулярная оценка (биопсия).

Биопсия яичка была выполнена с целью выявления причины азооспермии, определения степени поражения сперматогенеза и исключения обструкции семенных выводных 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 оценивали с использованием метода, описанного S. Johnsen [87], с изменениями, внесенными J. Aafjes и соавт. [40]. Поперечные срезы семенных канальцев были оценены со счетом от 1 до 10, на основе наиболее продвинутых стадий сперматогенеза. Средний балл рассчитывали в 10-ти полях зрения микроскопа (f.v.m.), 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 чем пять 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-ми баллов [38].

В итоге, после проведения комплексного исследования (по протоколу), причины патоспермии у всех обследованных мужчин не выявлены, был выставлен диагноз «Идиопатическая необструктивная азооспермия», в связи чем, с диагностической целью (для окончательной верификации нозологии) пациентам было показано проведение биопсии яичка.

Таким образом, была сформирована группа мужчин, учитывая следующие критерии: необструктивная азооспермия и ФСГ ≥ 11 мЕд/мл.

2.2. Морфологические методы исследования яичка

Морфологическое исследование биопсийного и аутопсийного материала (тканей яичек) производили в патологоанатомическом отделении.

Фрагменты яичек (1,0 \times 1,0 см; биопат – до 1,0 см в длину) фиксировали в забуференном HCl 10% формалине* (pH=7,2; от 5 до 24 часов); дегидратировали в батарее спиртов восходящей концентрации (аппарат гистологической проводки тканей фирмы «Pool Scientific Instruments»),

Швейцария) и заливали в парафин. Срезы тканей яичка, толщиной $4-6 \times 10^{-6}$ м, помещали на обычные, а для иммуногистохимического исследования (ИГХ) – на специальные адгезивные предметные стёкла Super Frost Plus («Mainzel Glaser», Polylysine, Германия), депарафинировали согласно принятой стандартной методике. Впоследствии, срезы ($\approx 5 \mu\text{m}$) либо окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для гистологического исследования или использовали для ИГХ.

Кроме того, препараты окрашивали с использованием гистохимических методов: пикрофуксином по *Van Gieson* и *Masson* для выявления компонентов соединительной ткани и по *Weigert* для оценки эластических структур интерстициальной ткани и стенки сосудов, а также *PAS* – для обнаружения гликогена (углеводов).

* В выборе фиксатора мы учитывали определенные характеристики химических растворов и специфику нашего исследования. Принято считать, что наиболее часто применяемый способ фиксации образцов ткани яичка в растворе формалина может вызывать выраженное сжатие ткани и связанные с этим артефакты, затрудняющие гистологическое исследование. В тоже время М. Bergmann (*Evaluation of testicular biopsy samples from clinical perspective. Andrology for the clinician. Berlin: Springer-Verlag; 2006 г.*) предложил фиксировать биоптаты тканей яичка в жидкостях Bouin или Steve с последующей их заливкой в парафин. На начальных этапах настоящего исследования также использовались эти фиксаторы, но был выбран формалин. При этом, целесообразность его использования была оправдана спецификой выполняемой научной работы, особенно для дальнейшего ИГХ-исследования.

Морфометрические методы исследования яичка

Оценку морфометрических (размер, вес) данных яичка в норме и при патологии производили с использованием общепринятых критериев. По их результатам отмечено, что морфометрические показатели всех яичек во всех исследуемых группах в пределах возрастной нормы.

Морфологическая оценка в норме (контроль) и нарушенном сперматогенезе основывалась на результатах:

1. Морфометрический анализ извитых семенных канальцев и окружающих их тканей производили на поперечных и продольных срезах семенных извитых канальцев.

2. Определяли относительные площадь, занятую половыми клетками и компонентами интерстициальной ткани с кровеносными сосудами с использованием шкалы-микрометра (цена деления 10 мкм). Измерения проводили в 30 – 50 поперечных срезах каждого фрагмента яичка.

Перерасчёт относительной площади, занятой половыми клетками, производили на одном срезе извитого семенного канальца.

Окраску срезов яичка гематоксилин-эозином производили с целью предварительной оценки качества (и соответственно – пригодности) материала для последующих количественного анализа и постановки иммуногистохимических реакций.

2.3. Метод непрямого иммуногистохимического анализа

С помощью метода непрямого иммуногистохимического анализа выявляли:

- а) белки пролиферации и апоптоза (Ki-67, p-53, Bcl-2, caspasa-9);
- б) инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-I);
- в) маркёры эмбрионального и постнатального сперматогенеза (PLAP, CD117) для оценки функции дифференцировки половых клеток, а также вероятной онкологической предрасположенности при идиопатическом бесплодии;

В качестве первичных антител использовали мышинные моноклональные антитела компании «Leica Biosystems Newcastle Ltd», Великобритания (табл. 7)*. Вторичные антитела (универсальные) – *Cell Marque*. Для каждого маркёра выполнялись контрольные исследования для исключения псевдопозитивных и псевдонегативных результатов. Титр антител подбирали с использованием раствора для разведения антител (antibody diluents).

*Исключения при выборе фирм-производителей первичных антител (табл. 7):

- 1) *anti-Caspase 9 antibody* – кроличьи антитела (Rabbit polyclonal к Caspasa-9).
Производитель – Abcam.
- 2) *Insulin-like Growth Factors-I* – кроличьи антитела (Rabbit polyclonal к IGF-I).
Производитель – Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Иммуногистохимическое исследование (используемые антитела)

Антитела (фирменное название)	клон, Ig-класс, фирма, разведение	Специфичность и характеристика
БЕЛКИ – МАРКЕРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ		
<i>Mouse Monoclonal Antibody Ki-67 Antigen</i>	Clone MM1 IgG1 <i>Novocastra™</i> 1:100	Ядерный антиген; выявляется во всех пролиферирующих клетках в G1 (поздней), S, M и G2 фазах клеточного цикла
<i>Mouse Monoclonal Antibody p53 Protein</i>	Clone DO-7 IgG2b <i>Novocastra™</i> 1:50	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.
<i>Mouse Monoclonal Antibody Bcl-2 Oncoprotein</i>	Clone bcl-2/100/D5 IgG1 <i>Novocastra™</i> 1:100	Цитоплазматический антиген; белок внутренней митохондриальной мембраны, который действует в качестве ингибитора апоптоза.
<i>Rabbit polyclonal Antibody caspasa-9</i>	IgG <i>Abcam</i> 1:200	Цитоплазматический антиген внутреннего пути апоптоза; активирует гибель ядра и протеолитические процессы в клетке.
ФАКТОРЫ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК		
<i>Primary Antibody Placental alkaline phosphatase (PLAP)</i>	Clone 8A9 IgG1 <i>Bond™</i> 1:100	Цитолеммальный антиген; в норме – визуализируется в мембране синцитиотрофобласта ворсин хориона и плаценты и в гонобластах/гоноцитах.
<i>Mouse Monoclonal Antibody c-kit Oncoprotein (CD117)</i>	Clone T595 IgG1 <i>Novocastra™</i> 1:100	Цитоплазматический 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 парашитовидных желез.
ФАКТОР РОСТА		
<i>Rabbit polyclonal Antibody Insulin-like Growth Factors-I</i>	IgG1 <i>Santa Cruz Biotechnology</i> 1:100	Цитоплазматический антиген; показатель пролиферативной митотической активности клеток; аутокринный/паракринный стимулятор роста.

Для выявления белков использовали единую схему реакций. После депарафинирования и повторной гидратации. Для восстановления антигенных свойств структур яичка после фиксации в формалине проводили тепловую индукцию эпитопного (антигенного) восстановления (HIER – heat induction of epitope retrieval). Для этого, стекла инкубировали в 10мМ растворе цитратного буфера (Citrate buffer 0,01M, pH≈6,0) в водяной бане с микропроцессором pT Link (Dako, Дания) (t=95°C) в течение 40 минут с симметричным их расположением в кювете и с последующим охлаждением в этом же холодном растворе (t=20°C) в течение 20 минут и промывкой в Aqua distillate (3 раза по 2'). После этого срезы на предметном стекле ограничили жирным карандашом Liquid blocker super rap pen. Затем на каждый срез последовательно добавляли по одной капле Hydrogen Block Peroxidase (при t=20°C, дважды по 5') и Serum block на 20 минут, предварительно промыв в PBS 10x Solution (0,01M, pH≈7,4) 2 раза по 3 минуты. После этого срезы инкубировали с первичными антителами класса IgG к человеческим антигенам 7-ми исследуемых факторов в течение часа. Промывали в PBS 10x Solution (0,01M, pH≈7,4) 2 раза по 3 минуты. 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. Их наносили на срезы и инкубировали во влажных камерах на протяжении 30'. Вновь промывали в PBS 10x Solution (0,01M, pH≈7,4) 2 раза по 3 минуты и инкубировали Streptavidin Peroxidase в течение 30 минут. Для детекции и визуализации реакции (выявления комплекса антиген-антитело) добавляли на каждый срез 1 – 3 капли 3,3'-диаминобензидина пероксидазы хрена (DAV Substrate Chromogen) (Novolink, Leica Biosystems, Великобритания). Инкубировали от 30 секунд до 20' под контролем микроскопа до появления темно-коричневого окрашивания специфических структур в зависимости от маркера (ядерная, цитоплазматическая, мембранная реакция) и промывали в

Aqua distillate в течение 2-х минут, помешивая. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Mayer; стекла промывали под проточной водой; дегидратировали (спирт 96%); срезы заключали в гель «Aquatex»® (aqueous mounting agent, «Andwin Science», Франция) под покровные стекла.

Статистическую обработку полученных данных проводили по общепринятым методам медико-биологической статистики (см. ниже).

Оценка иммуногистохимических реакций базировалась на интенсивности окрашивания и разделении иммунопозитивных (положительных) клеток согласно рекомендациям D.J. Dabbs «Diagnostic immunohistochemistry» (4th Edition, 2014) в модификации [64].

Описанные выше метод иммуногистохимического анализа предварительно апробировали на образцах семенников и некоторых других органов (лёгкие, головной мозг, сердце) белых беспородных крыс-самцов (кафедра гистологии и эмбриологии педиатрического факультета РГМУ им. Н.И. Пирогова, заведующая – академик РАН, д.м.н., профессор О.В. Волкова).

Шкала интенсивности окрашивания (качественная оценка):

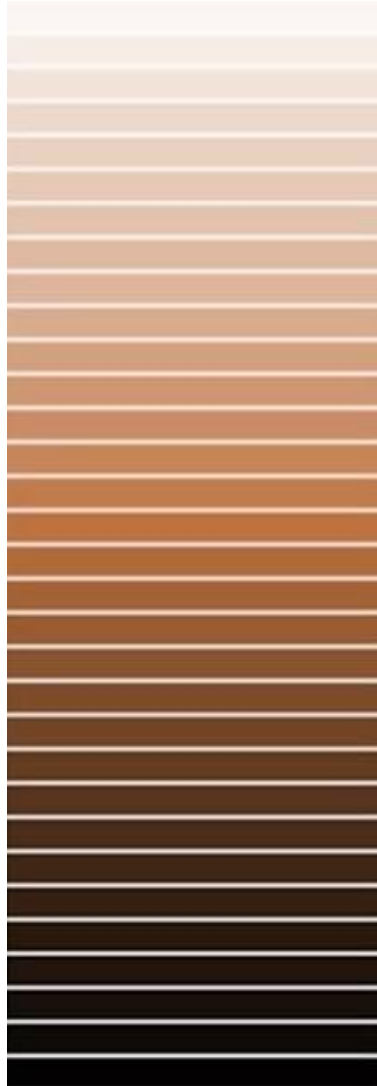
Степень выраженности реакции оценивали визуально в половых клетках на разных стадиях сперматогенеза (сперматогонии, первичные сперматоциты, вторичные сперматоциты, сперматиды, сперматозоиды). Также определяли уровень накопления белка в соматических и эндокринных клетках яичка (табл. 8).

Шкала оценки окрашивания половых клеток (полуколичественная оценка):

Оценивали относительное содержание общего числа окрашенных половых клеток в одном извитом семенном канальце (в %).

- ✓ 0 баллов – нет реакции – $\leq 1\%$ 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.

Шкала интенсивности окрашивания (качественная оценка)

знаковая система оценки (+/ -)	комментарий	Цветная шкала детекций*
«-»	нет реакции	
«+»	слабая экспрессия	
«++»	умеренная экспрессия	
«+++»	выраженная экспрессия	

*Комментарий. Шкала интенсивности составлена на основании степени соотношения и насыщенности чёрного или белого цветов и адаптирована для оценки интенсивности экспрессии маркёров в структурах (клетках).

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

$$ИЭ = \frac{\sum P(i) \times i}{100}$$

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.

Индекс пролиферации, готовности к апоптозу, индекс апоптоза, антиапоптотический индекс определяли путём подсчета количества Ki-67, каспаза-9, p53 и Bcl-2-позитивных клеток на 100 клеток соответствующих структур во всех группах при увеличении $\times 40$ с последующим вычислением показателя в процентах.

Таким образом, 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 (в %) и оценивали степень экспрессии (*ve +/-*).

Идентификация мужских половых клеток – цитологический метод исследования яичек

Для идентификации мужских половых клеток на разных стадиях сперматогенного цикла (6 стадий) и фаз мейоза в частности, а также клеток Сертоли в извитых семенных канальцах использовали метод отпечатков органа (ткани).

Резецированный участок яичка (1,0 \times 1,0 см) отпечатывали на чистом предметном стекле. Высушенный отпечаток фиксировали метанолом – 1 – 2 капли на стекло. После промывания стёкл с отпечатком под дистиллированной водой, их окрашивали по методу Романовскому-Гимза (Д.Л. Романовский и G. Giemsa) (прилож. IV).

Метод отпечатков предварительно апробировали на образцах семенников Rattus Wistar (рис.1 – 4).

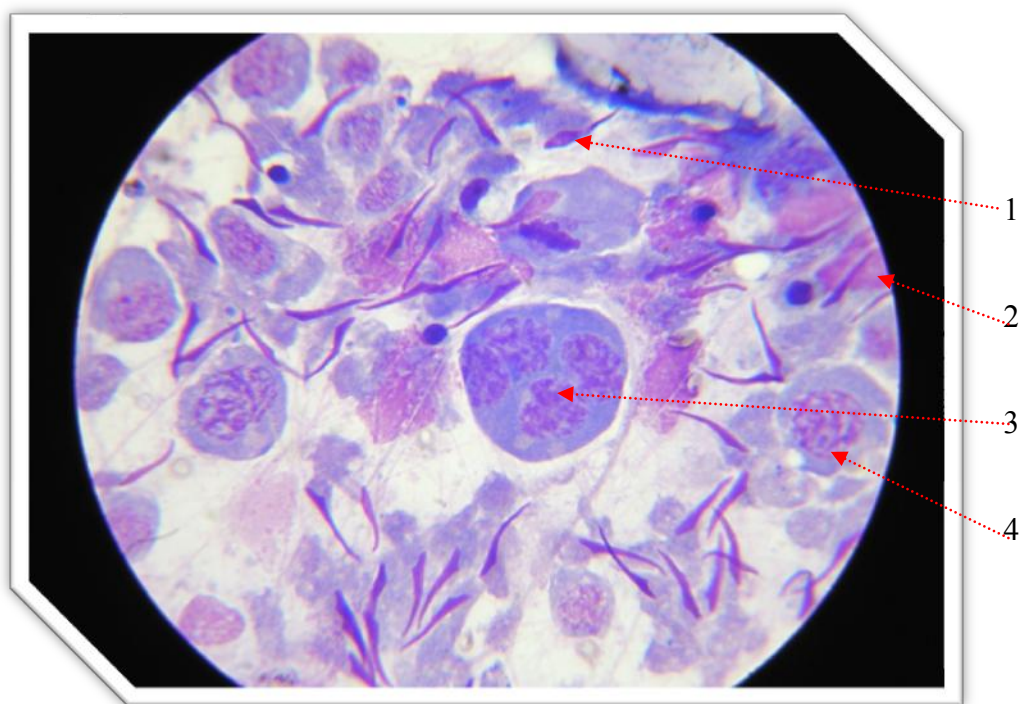


Рис. 1. Семенник *Rattus Wistar*, стадии мейоза. Отпечаток, окраска по G. Giemsa $\times 40$.
1 – сперматозоид, 2 – сперматиды, 3 – сперматоцит I, 4 – сперматоцит II.

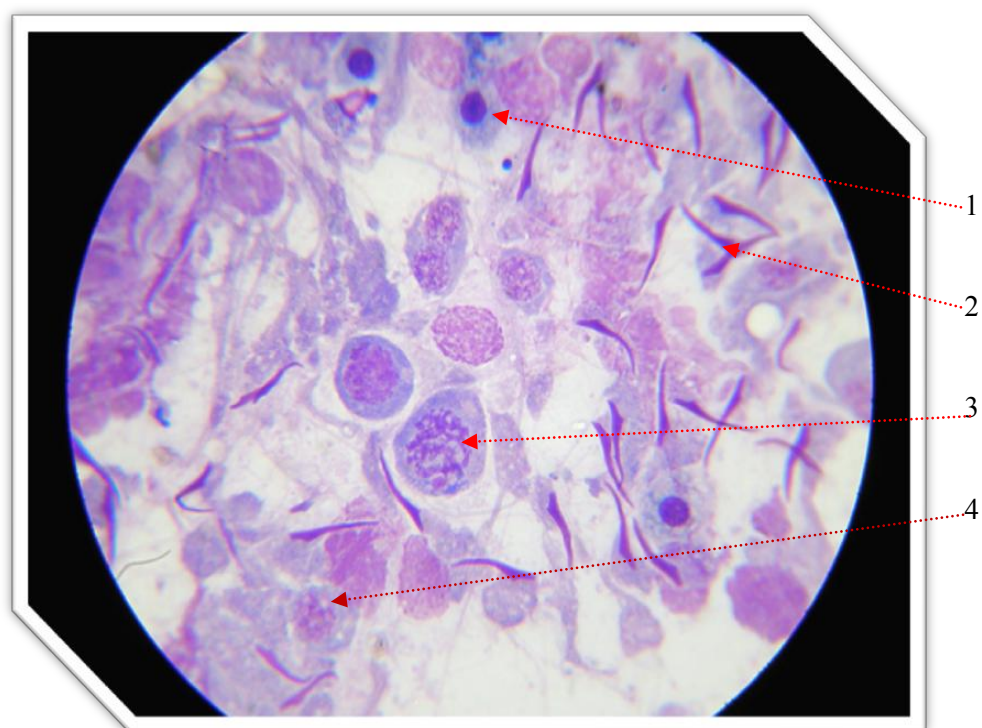


Рис. 2. Семенник *Rattus Wistar*, стадии мейоза. Отпечаток, окраска по G. Giemsa $\times 40$.
1 – сперматогония, 2 – сперматозоид, 3 – сперматоцит I, 4 – сперматоцит II.

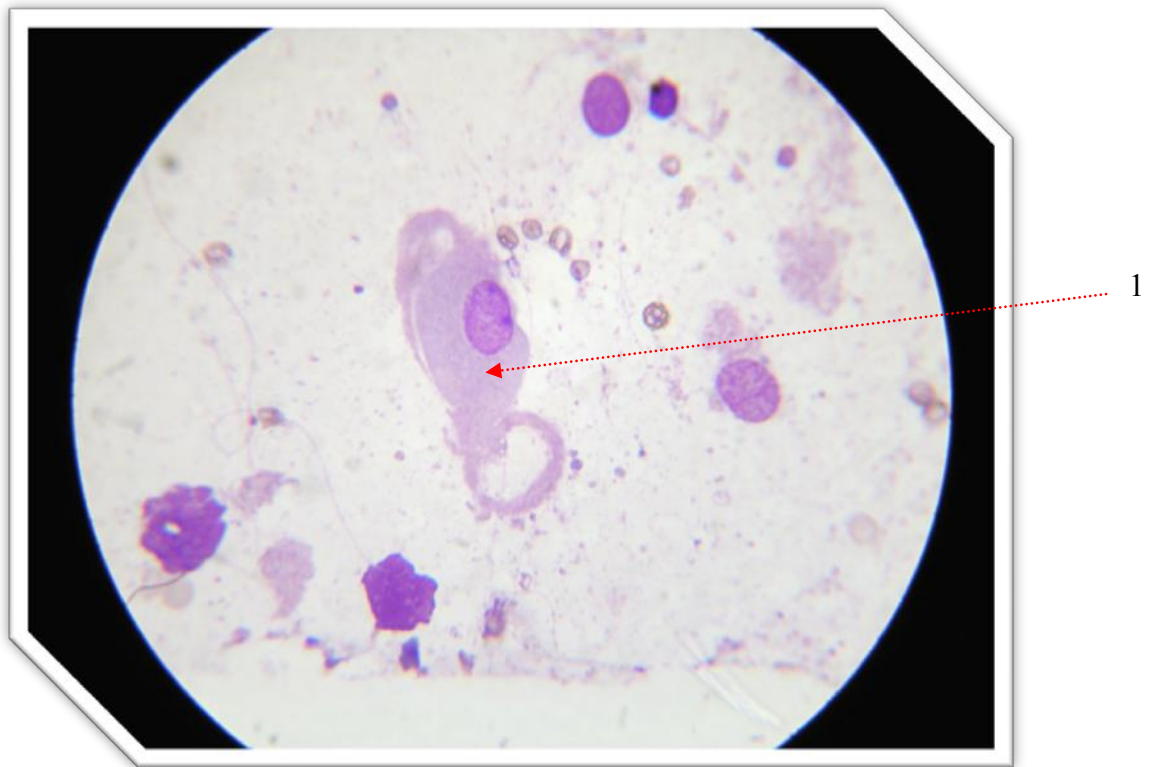


Рис. 3. Семенник *Rattus Wistar*, стадии мейоза. Отпечаток, окраска по G. Giemsa $\times 40$.
1 – клетка Сертоли.

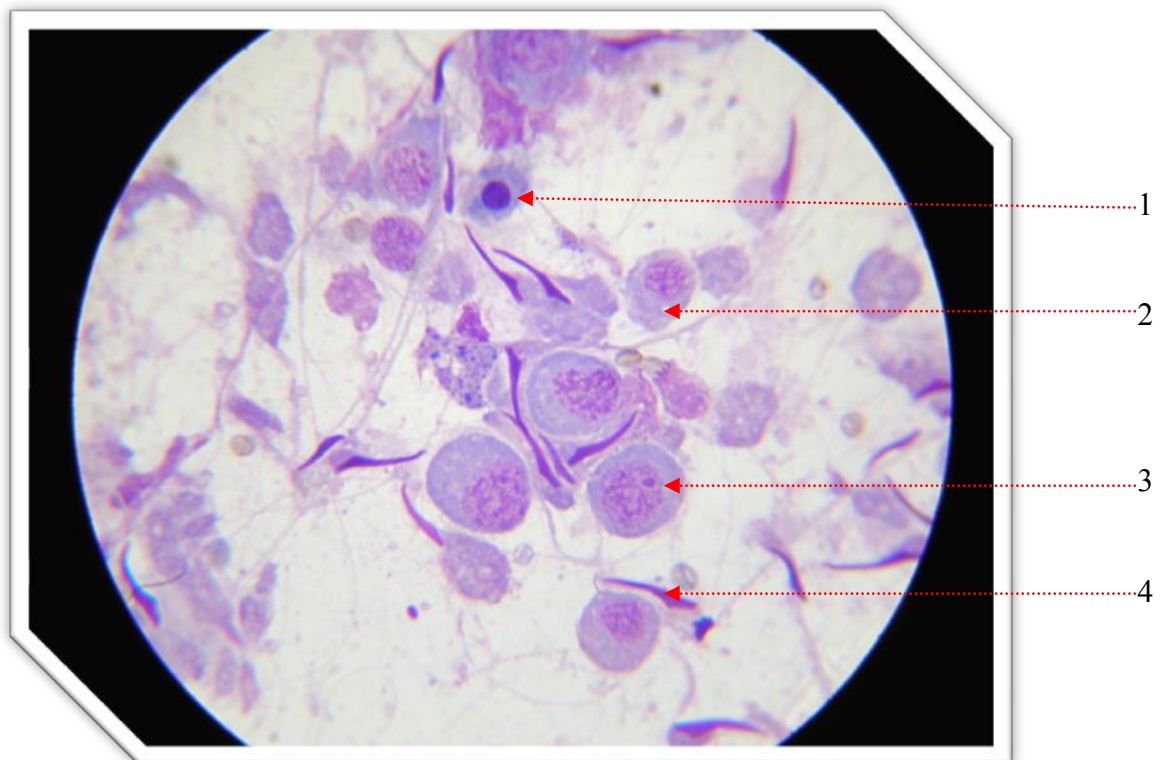


Рис. 4. Семенник *Rattus Wistar*, стадии мейоза. Отпечаток, окраска по G. Giemsa $\times 40$.
1 – сперматида, 2 – сперматоцит II, 3 – сперматоцит I, 4 – сперматозоид.

2.4. Морфометрическое исследование сперматогенеза

Срезы, окрашенные гематоксилин и эозином (Н&Е) изучали в стандартном сегменте стенки извитого семенного канальца (стандарт сперматогенного эпителия), шириной до 50 мкм. На малом увеличении в центр поля зрения микроскопа устанавливали базальный отсек семенного канальца; отмечали стандартную ширину, через концы которой условно проводили по одной линии с каждой стороны отрезка по направлению к просвету канальца.

Стадии сперматогенеза. Стадия I характеризуется наличием округлых сперматид, сперматогоний и сперматоцитов I. Стадия II представлена сперматогониями, сперматоцитами I, сперматидами, а также резидуальными тельцами. Для стадия III характерно начало конденсации ядер сперматид и вступлением сперматогоний типа В в стадию созревания – мейоз (фазу прелептотены). На стадиях IV и V отмечаются дальнейшая конденсация ядер сперматид и первичные сперматоциты на стадии пахитены. Выявление сперматоцитов 1-го порядка в фазу лептотены свидетельствует о стадии IV, а в фазу зиготены – стадии V. Стадия VI характеризуется наличием сперматоцитов II.

Для идентификации клеточного состава семенного канальца мы работали микровинтом, попеременно поворачивая его по и против часовой стрелки, при увеличении светового микроскопа на $\times 400$. Вначале фокусировали и изучали половые клетки, а потом ядра клеток Сертоли, их топографию и морфологию (рис. 5).

Подсчёт суммарного количества половых клеток в семенных канальцах проводили на 10 строго поперечных срезах извитых семенных канальцев.

Согласно данным литературы [10, 25], более объективным морфологическим критерием активности сперматогенеза является содержание сперматогоний. Мы провели количественный анализ сперматогоний типа А (овальное ядро с диффузным, равномерно распределенным по ядру хроматином и одним или двумя чётко очерченными

ядрышками). Мы производили подсчёт первичных и вторичных сперматоцитов, сперматид и сперматозоидов также в 10-ти полях зрения произвольно взятых поперечных срезов извитых семенных канальцев. Половые клетки считали при $\times 400$ (объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$) увеличении светового микроскопа.

Одним из показателей нарушения сперматогенеза при азооспермии является визуализация большого количества канальцев со слущенным и вакуолизированным эпителием, заполненных отёчной жидкостью (рис. 6).

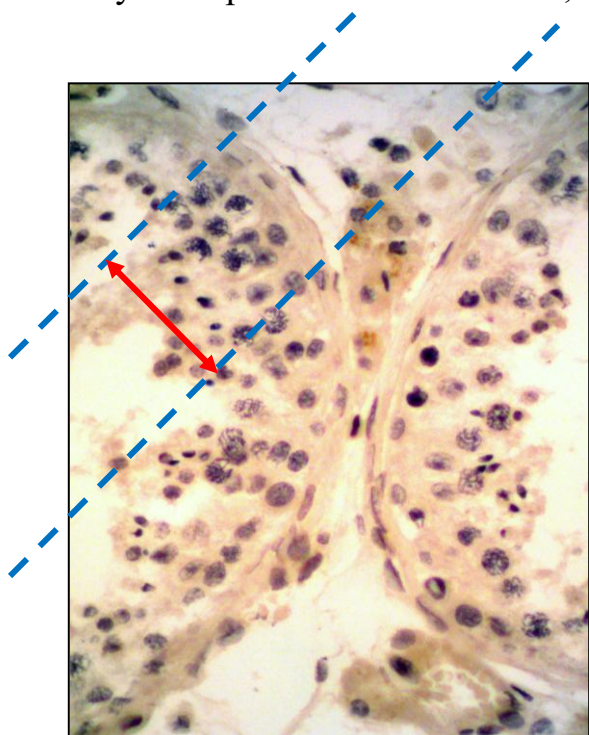


Рис. 5. Яичко. Извитой семенной каналец, сперматогенез в норме, ИГХ-реакция с антителами к Vcl-2, $\times 40$. Объяснения в тексте.

←

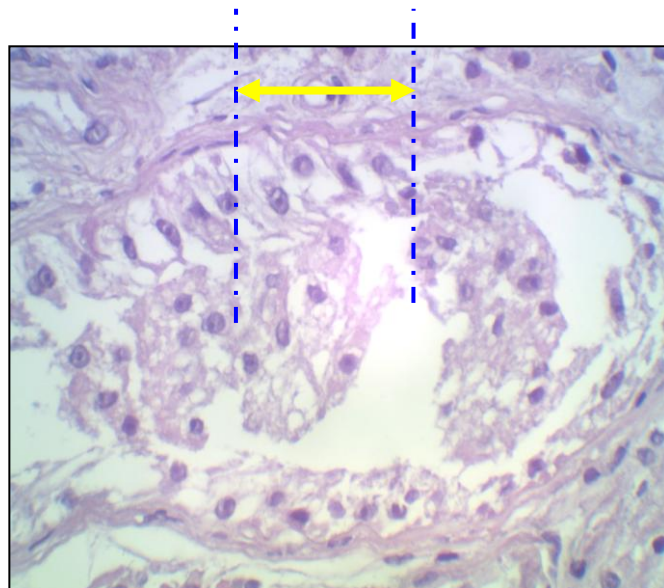


Рис. 6. Яичко. Извитой семенной каналец при азооспермии, Н&Е, $\times 40$.

→

Просвет семенного канальца заполнен отёчной жидкостью и слущенными клетками; хорошо определяются зрелые и дистрофические клетки Сертоли

При азооспермии проводили анализ поперечных срезов извитых семенных канальцев в 10 полях зрения при увеличении $\times 400$ (объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$), среди которых выявляли канальцы с клетками, потерявшими морфофункциональную связь с клетками своего клона и «слущенными» в

просвет канальца. Было проанализировано около 30-ти поперечных срезов семенных канальцев при увеличении $\times 400$, в некоторых определяли гигантские сперматогенные одно- или многоядерные клетки, диффузно лежащие в просвете семенных канальцев с дистрофическими изменениями (в виде фрагментированных и пикнотизированных ядер). Производили подсчёт общего количества таких клеток.

Таким образом, для подсчёта и дальнейшей статистической обработки количества мужских половых клеток и клеток Сертоли использовали стандарт сегмента, шириной до 50 мкм в одном поперечном срезе одного семенного канальца (рис. 11).

Для подсчёта и дальнейшей статистической обработки клеток Лейдига использовали стандарт периваскулярной области.

В центр поля зрения светового микроскопа при увелич. $\times 400$ помещали кровеносный сосуд (с 1 – 2 эритроцитами), соответственно диаметр его будет составлять около 10 – 12 мкм. От верхнего и нижнего края сосуда условно проводили линии вверх и вниз на расстоянии до 75 мкм. Такие же линии проводили по боковым краям кровеносного сосуда и отступя от них на ≈ 100 мкм, так чтобы общая длина не превышала 250 мкм (рис. 7 и 12).

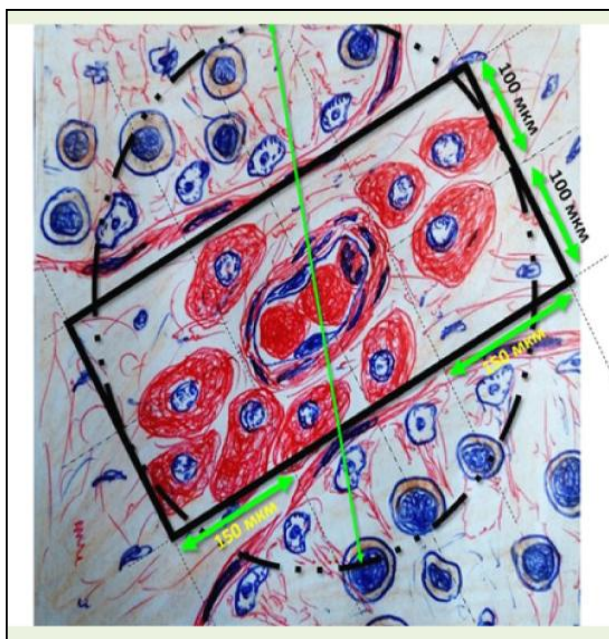


Рис. 7. Схема извитого семенного канальца при идиопатическом бесплодии (мужчина 22–35 лет). Измерение площади ареала клеток Лейдига. Окраска Н&Е, увеличение $\times 40$. Чёрными контурами отмечены области подсчёта клеток Лейдига: пунктиром – по окружности кровеносного сосуда, сплошной прямоугольник – в периваскулярном регионе. В центре рисунка визуализируется кровеносный сосуд, вокруг которого группками располагаются клетки Лейдига (крупные клетки с выраженной оксифильной цитоплазмой и круглым ядром). Сверху и снизу – поперечные срезы семенных канальцев, где ближе к базальной мембране определяются ядра клеток Сертоли с выраженным, округлой формы ядрышком; сохранившиеся единичные сперматогонии находятся на разных уровнях; на фоне выраженного отёка обнаружены дегенеративные клетки.

ядрышком; сохранившиеся единичные сперматогонии находятся на разных уровнях; на фоне выраженного отёка обнаружены дегенеративные клетки.

Микроморфометрическое исследование яичка

Анализ морфометрии проводили с использованием модифицированной методики, предложенной сотрудниками ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии» д.м.н., профессором А.Е. Доросевичем, к.м.н. К.В. Буньковым и др. [9]. При изучении параллельных срезов в произвольно выбранном участке находили гистотопографически удаленные друг от друга кровеносные сосуды, что исключало возможность «перекрывания» периваскулярных зон разных кровеносных сосудов.

Морфометрию клеток осуществляли в одном и том же поле зрения (выбранном участке) и в каждом последующем участке (поле зрения), центром которого служили кровеносные сосуды.

В каждом поле зрения измеряли площадь извитых семенных канальцев, площадь ареала мужских половых клеток, площадь интерстициальной соединительной ткани. Для полного и унифицированного отображения преобладания одного показателя относительно другого использовали два индекса – канальцево-интерстициальный ($I_{кс}$) и герминально-интерстициальный ($I_{ги}$).

Расчет канальцево-стромального индекса (КСИ):

$$I_{кс} = \frac{\Sigma \text{площадь извитых семенных канальцев (мкм}^2\text{)}}{\text{площадь интерстициальной ткани (мкм}^2\text{)}}$$

Расчет эпителиально-стромального индекса (ЭСИ):

$$I_{ги} = \frac{\Sigma \text{площадь ареала мужских половых клеток (мкм}^2\text{)}}{\text{площадь интерстициальной ткани (мкм}^2\text{)}}$$

Расчёт индексов проводили в каждом исследуемом поле зрения. Оценка клеточных популяций подразумевала подсчёт ареала половых клеток семенного канальца и соматических клеток в исследуемых полях зрения, центром каждого из полей зрения служил кровеносный сосуд

(гемокапилляр). Для статистического анализа клеточных популяций при бесплодии взяты суммарные количества следующих элементов яичка:

- 1) сперматогонии;
- 2) клетки Сертоли;
- 3) клетки Лейдига.

Морфометрическое исследование аутопсийного и биопсийного материалов выполняли на светооптическом микроскопе «Carl Zeiss Lab.A1» (Carl Zeiss, Германия), совмещённом с видеокамерой «AxioCam ERc5s» (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программным обеспечением ZEN Lite. Документирование результатов осуществляли при помощи компьютерной программы «Видео Тест 4.0. Морфология» (г. Санкт-Петербург), площадь каждого поля зрения при данном увеличении микроскопа $\times 400$ (объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$) составила ≈ 96238 мкм².

Последовательность микроморфометрии и обработки изображения

1. Изображения, полученные в полях зрения микроскопа, обрабатывали с помощью фильтров программы, где по заданным параметрам (площадь объекта, цветовая гамма, размеры по осям X, Y, яркость, оптическая плотность и другое) производили измерение объектов (согласно «маске»).

2. В нашем случае измерение площади исследуемых структур проводили при увеличении $\times 400$ (объектив $\times 40$, окуляр $\times 10$), измеренные объекты выдавались в реальных величинах (мкм). На основании параметров увеличения проводили калибровку.

3. Для измерения площади интерстициальной соединительной ткани на панели инструментов выбирали опцию «выделение по контуру», позволяющую обводить интересующий нас контур, в частности площадь, приходящуюся на межканальцевую соединительную ткань, площадь просвета сосудов (капилляров) в центре каждого поля зрения. В итоге получали интересующий нас параметр морфометрического исследования –

площадь (S) (рис. 8., рис. 9). Для кровеносных сосудов – площадь просвета, периметр и диаметр капилляров (максимальный и минимальный размер просвета капилляров).

4. Измерение площади ареала мужских половых клеток осуществляли в режиме полуавтоматического выделения объектов с помощью предложенных в окне «выделение масок объектов» с режимами «добавления и вычитания», что помогало решить задачу о селективности измерения исключительно площади, приходящейся на половые клетки, сводя погрешность измерений к минимуму (рис. 10).

Кроме того, подсчёт половых клеток осуществляли в пределах условного квадрата: по латеральным поверхностям первой и последней из четырёх сперматогониев проводили две параллельные прямые, по направлению к просвету канальца. Определяли площадь квадрата (рис. 11).

5. Для подсчёта клеток Лейдига использовали площади прямоугольника и окружности вокруг кровеносного сосуда (рис. 12).

6. Использование в компьютерной программе закладки «Фильтры» помогло решить проблему нечёткости изображения, затрудняющей подсчёт количества клеток и выделения границ исследуемых структур (площади межканальцевой интерстициальной ткани, извитых семенных канальцев, ареала половых клеток, параметров сосудистого – капиллярного компонента).

Анализ генеративной функции яичек во всех группах

О генеративной функции семенных извитых канальцев мы судили на основании показателей диаметра и площади поперечного сечения извитых семенных канальцев, индекса сперматогенеза, среднего числа сперматогоний, спермацитогаммы с использованием клеточного индекса Сертоли, цитологического профиля сперматогенеза, количества канальцев со слущенным эпителием и числа гигантских сперматогенных клеток (если они есть).

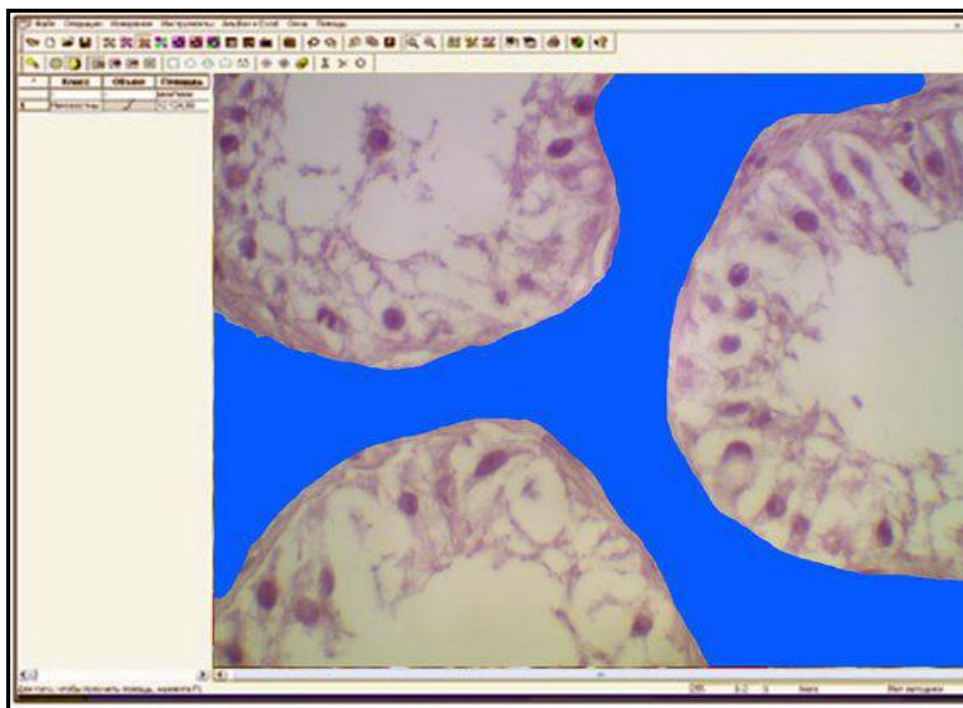


Рис. 8. Измерение площади межканальцевой интерстициальной ткани яичка с использованием программы «Видео Тест 4.0. Морфология». ИГХ, увеличение $\times 400$ (синим цветом закрашена межканальцевая интерстициальная ткань).

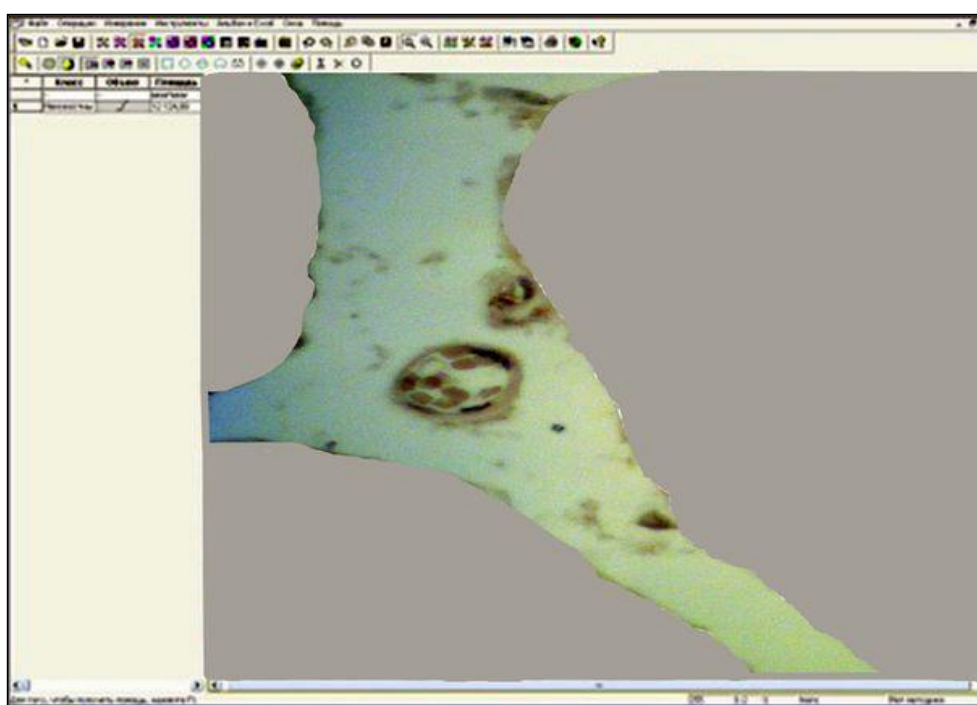


Рис. 9. Измерение компонентов интерстициальной ткани, клеток Лейдига и кровеносных сосудов с использованием программы «Видео Тест 4.0. Морфология». ИГХ, увеличение $\times 400$ (серым цветом закрашены извитые семенные канальцы).

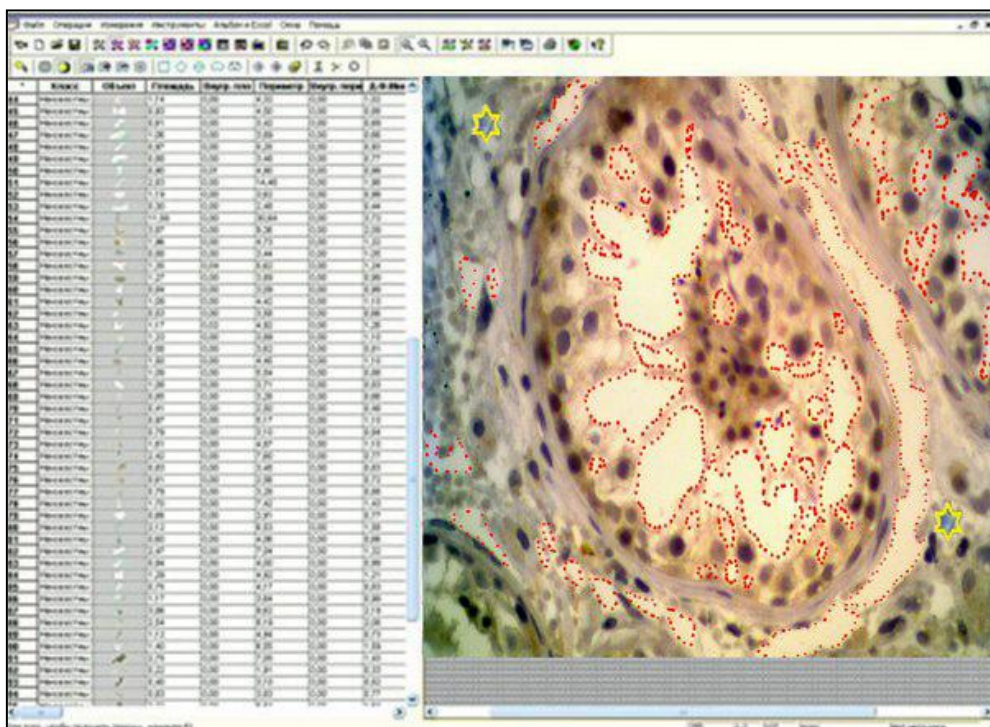


Рис. 10. Измерение площади ареала половых клеток в извитых семенных канальцах яичка с использованием программы «Видео Тест 4.0. Морфология». ИГХ, увеличение $\times 400$. Красным контуром отмечена площадь ареала лишённая мужских половых клеток. Звёздочками отмечены кровеносные сосуды (артерия мелкого калибра).

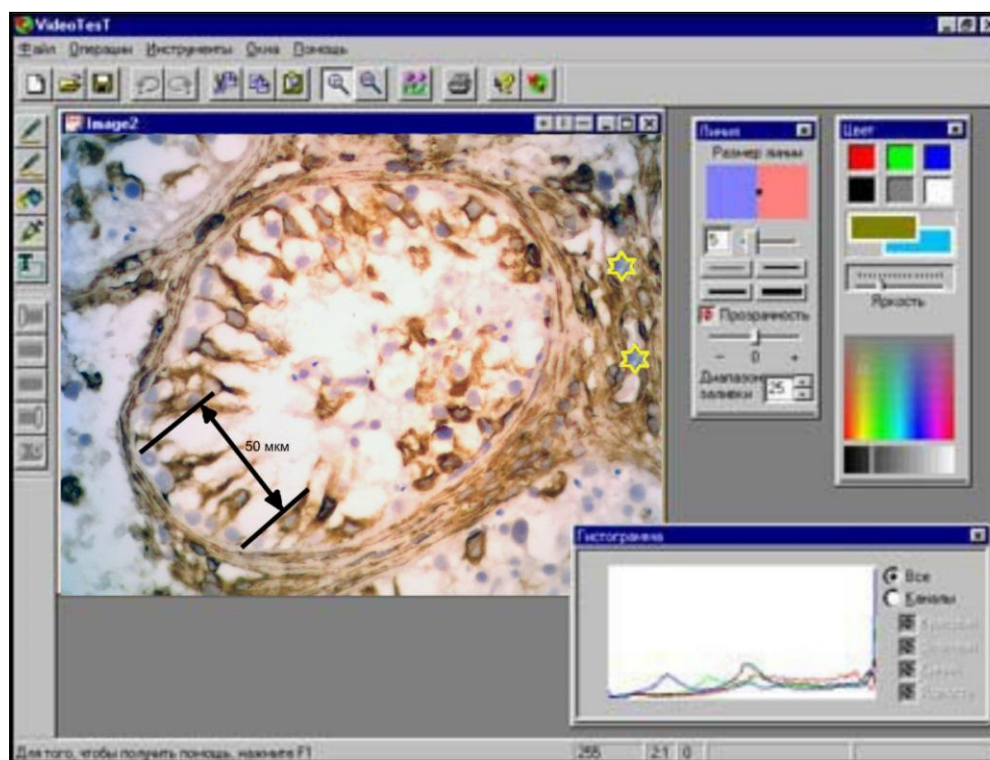


Рис. 11. Стандарт подсчёта (50 мкм) половых клеток в извитых семенных канальцах яичка с использованием программы «Видео Тест 4.0. Морфология». ИГХ, увеличение $\times 400$. Чёрным контуром отмечен квадрат подсчёта половых клеток. Звёздочками отмечены кровеносный сосуд (артерия мелкого калибра).

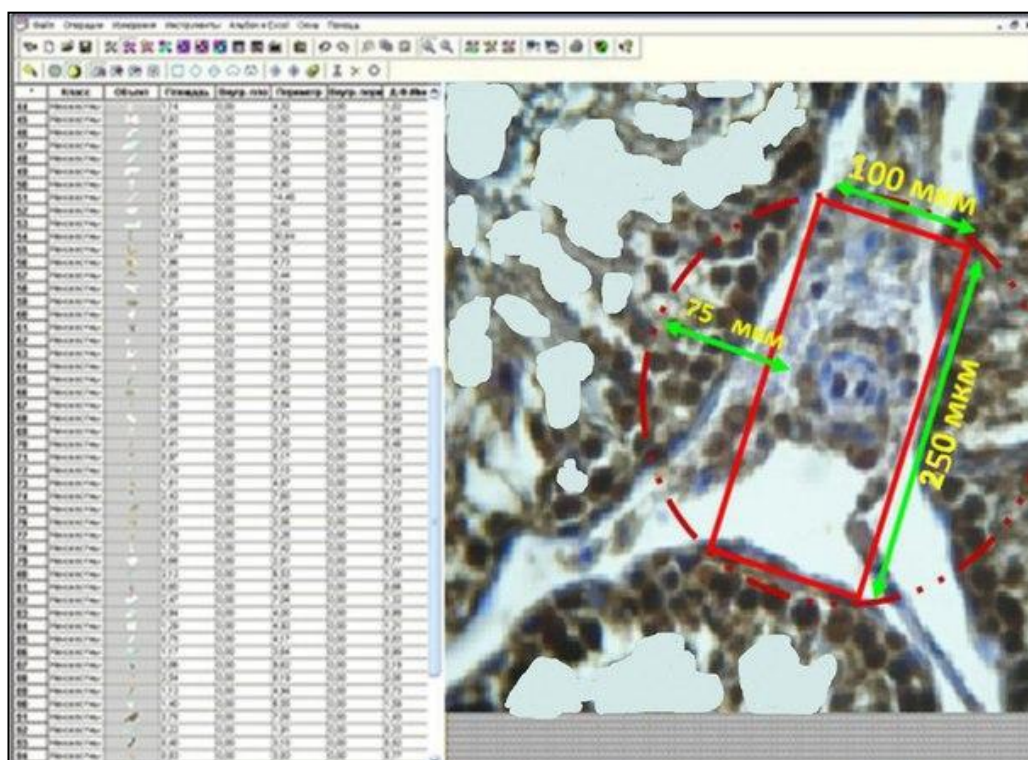


Рис. 12. Измерение площади ареала и количества клеток Лейдига с использованием программы «Видео Тест 4.0. Морфология». ИГХ, увеличение $\times 400$. Красными контурами отмечены области подсчёта клеток Лейдига: пунктиром – по окружности кровеносного сосуда, сплошной прямоугольник – в париваскулярном регионе.

2.6. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Фрагменты биоптатов яичек были помещены в стабилизирующий раствор RNAlater (QIAGEN, Нидерланды) и хранились при -70°C . Впоследствии образцы подвергли гомогенизации согласно стандартному протоколу. Экстракцию тотальной РНК производили с использованием набора готовых реактивов RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) с матрицы полученной РНК осуществляли с помощью набора SuperScript™ VILO™ Master Mix (Invitrogen). Выделенные кДНК подверглись ПЦР-РВ с использованием готовой смеси реагентов Absolute Blue QPCR Mix (Thermo Scientific, США) с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green I. ПЦР-РВ проводилась с использованием StepOne System (Applied Biosystems, США) и штатного программного обеспечения. Анализ экспрессии генов проведен с

использованием метода определения порогового цикла (Ct) и вычисления относительной экспрессии генов согласно протоколу [10]. Нормирование и внутренний контроль выполняли относительно референсного гена *GAPDH*. Статистический контроль проводился относительно I.A. группы с нормальным сперматогенезом (аналогичного возраста с бесплодными мужчинами). Подбор праймеров был осуществлён на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST (табл. 9).

Таблица 9. Используемые праймеры

Ген	5'-праймер	3'-праймер
<i>BAK</i>	CACGGCAGAGAATGCSTATGA	CCCAATTGATGCCACTCTCAA
<i>BAH</i>	GTCGCCCTTTTCTACTTTGCCAG	TCCAGCCCAACAGCCGCTCC
<i>BCL2</i>	TCCGATCAGGAAGGCTAGAGTT	TCGGTCTCCTAAAAGCAGGC
<i>BCLW</i>	TCCAGCCCAACAGCCGCTCC	CAGTGGTTCATCTCCTTGTTG
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	GAAGATGGTGATGGGATTTC

2.7. Статистические методы и обработка данных

Полученные в результате подсчёта данные статистически обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 7.5 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). При этом определяли вариационные ряды, среднюю арифметическую, среднеквадратическое отклонения, среднюю ошибку и вероятность различия. Затем оценивали соответствие/несоответствие полученных результатов нормальному распределению с применением критерия Колмагорова-Смирнова. При статистической обработке для оценки достоверности различий средних значений между группами использовались следующие 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 $p < 0.05$.

Количественные данные, полученные в ходе ПЦР-РВ, были проанализированы с использованием рангового дисперсионного анализа ANOVA.

Литературные источники для проведённого статистического анализа: Кобзарь А. И. «Прикладная математическая статистика: для инженеров и научных работников», 2012; Гланц С. «Медико-биологическая статистика», 1998; Стрелков Р.Б. «Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала: методические рекомендации», 1980; Гублер Е. В., А.А. Генкин «Применение непараметрических методов статистики в медико-биологических исследованиях», 1973.

Глава III

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Морфофункциональная характеристика структур яичка мужчин

I.A. группы (при нормальном сперматогенезе)

Стенка извитого семенного канальца образована половыми клетками. На базальной мембране семенных канальцев располагаются крупные, судя по размерам ядер, клетки Сертоли (суспендоциты) с неправильными и нечёткими контурами. В них можно видеть одно (реже несколько) ядрышек округлой формы, а также мелкодисперсное распределение хроматина (рис. 13 – 16).

В базальном отсеке семенных канальцев на уровне ядер суспендоцитов располагаются сперматогонии. Второй ряд ядер в извитых семенных канальцах занимают сперматоциты первого порядка, находящиеся в мейозе I, о чём свидетельствуют их размер и строение хроматина. Примерно на том же уровне в канальцах находятся сперматоциты второго порядка. Сперматиды, клетки первоначально округлой формы и небольших размеров. Хроматин этих клеток неравномерно распределён по площади их ядер. В просвете семенных канальцев визуализируются сперматозоиды, головки их обращены чаще в сторону апикального полюса клеток Сертоли.

Перитубулярная интерстициальная ткань представлена рыхлой неоформленной волокнистой соединительной тканью с множеством кровеносных сосудов, вокруг которых группками располагаются полигональные или округлой формы оксифильные клетки с округлыми ядрами – клетки Лейдига. Хроматин в ядрах этих клеток образует сетчатую структуру, на фоне которой чётко определяется ядрышко. Цитоплазма таких клеток часто вакуолизована. Эти клетки вырабатывают мужской половой гормон и другие биологически активные вещества.

Описанная морфологическая картина соответствует физиологическому сперматогенезу – в большинстве семенных канальцах в изучаемом поперечном срезе обнаружены одна, реже две (из шести) стадии сперматогенного цикла (рис. 14), а также резидуальные тельца.

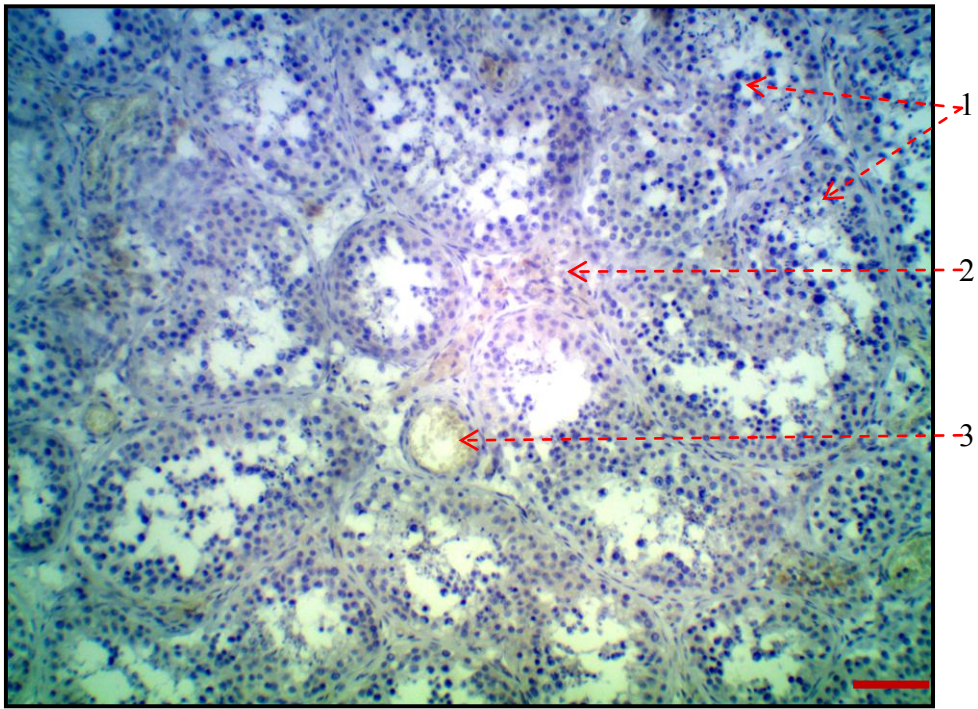


Рис. 13. Яичко (группа I.A.). Н&Е, $\times 20$, м.о. – 150 мкм. 1 – извитые семенные канальцы, 2 – интерстициальная ткань с клетками Лейдига, 3 – кровеносный сосуд (артерия).

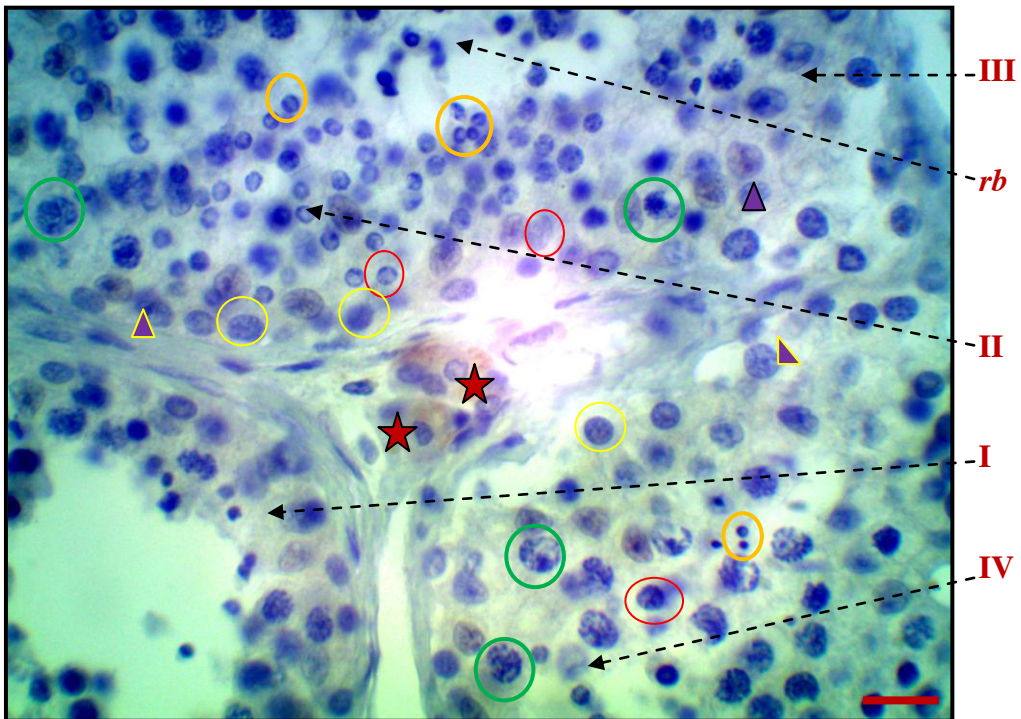


Рис. 14. Яичко (группа I.A.). Н&Е, $\times 40$, м.о. – 50 мкм.
 Сперматогония (●), сперматоцит I (●), сперматоцит II (●); сперматиды (●);
 клетка Сертоли (ядро) (▲); клетка Лейдига (★);
 I – VI – этапы сперматогенеза, *rb* – резидуальные тельца.

Сравнительная гистология семенников человека и *Rattus Wistar*:

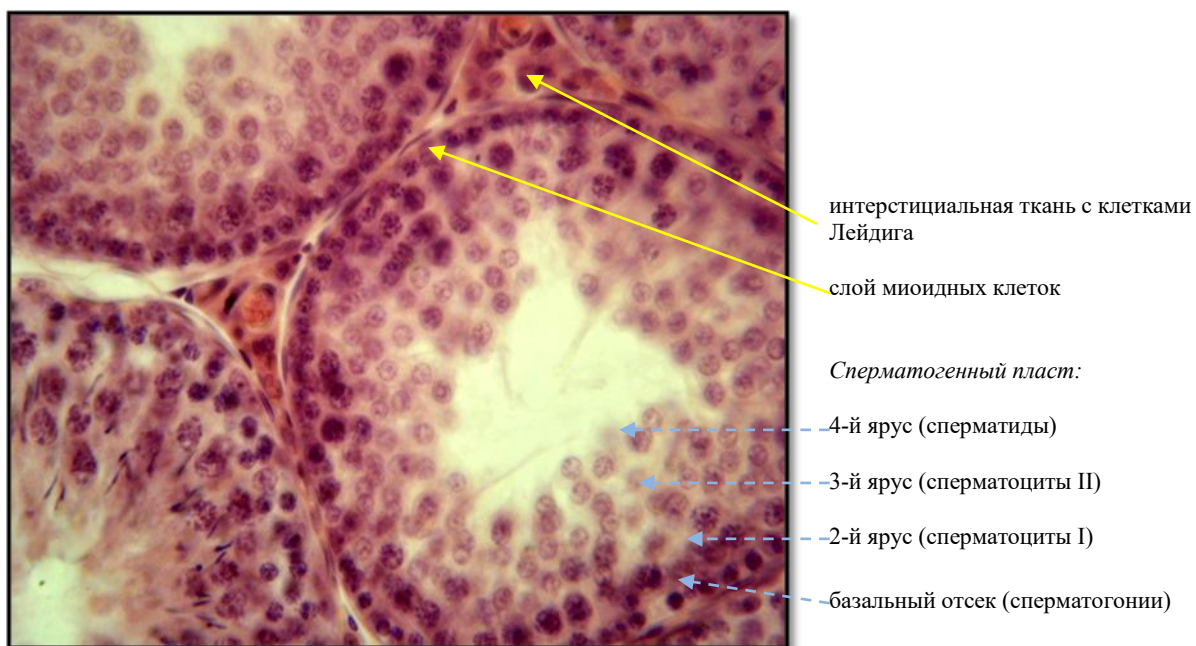


Рис. 15. Семенник *Rattus Wistar*, извитой семенной каналец. Н&Е, $\times 20$.

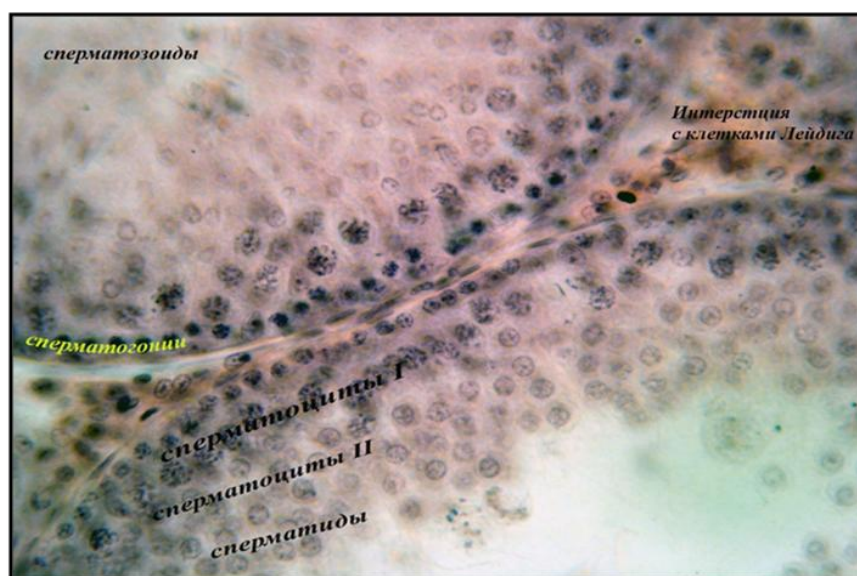


Рис. 16. Семенник *Rattus Wistar*, извитой семенной каналец. Н&Е, $\times 20$.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ И АПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

При иммуногистохимическом исследовании проводили оценку биологических характеристик мужских половых клеток в семенных канальцах, уровень их пролиферативной активности и апоптоза, а также элементов микроокружения.

Ki-67 (белок клеточной пролиферации)

Положительная нуклеарная реакция с антителами к Ki-67 отмечалась в S-фазу митоза-сперматогониях («+++») на II и III этапах сперматогенеза, в некоторых первичных («+») и вторичных («+») сперматоцитах и круглых сперматидах («±»). В популяциях остальных половых клеток различных стадий сперматогенеза, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках экспрессии Ki-67 не обнаружено («-») (табл. 13) и (рис. 17, 18).

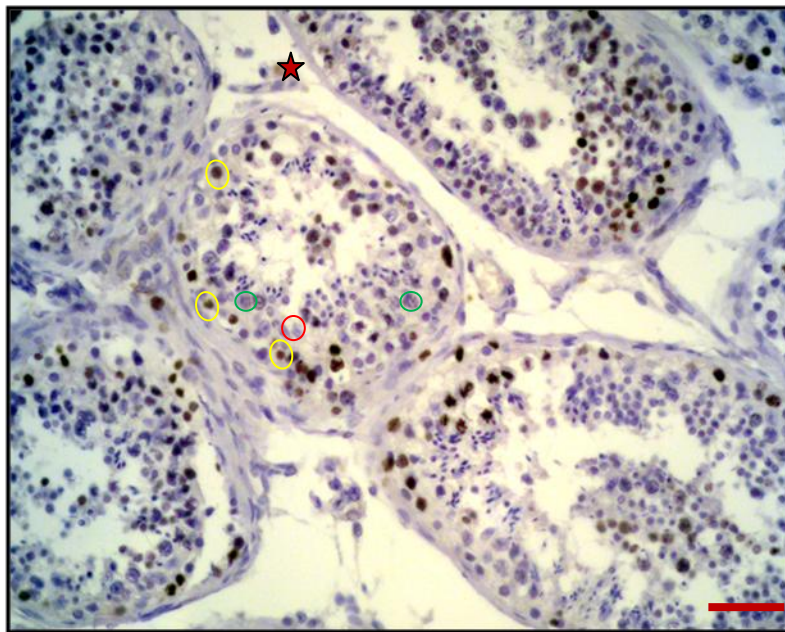


Рис. 17. Яичко (группа I.A.), интрануклеарная реакция с Ki-67 высокой интенсивности в отдельных клетках сперматогенного эпителия (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм). Сперматогония (○), сперматоцит I (○), сперматоцит II (○); клетка Сертоли (ядро) (▲); клетка Лейдига (★).

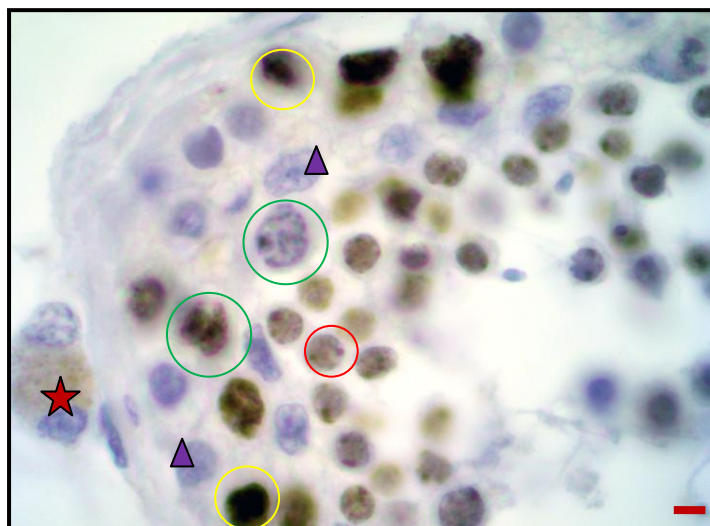


Рис. 18. Яичко (группа I.A.), интрануклеарная реакция с Ki-67 высокой интенсивности в некоторых половых клетках, II стадия сперматогенеза (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 100$, м.о. – 10 мкм). Обозначения см. рис. 17.

p53 (белок проапоптотической активности)

Умеренная экспрессия p53 выявлена в сперматогониях («+++»), первичных сперматоцитах («+»), слабая – во вторичных сперматоцитах («±»). В популяциях остальных половых клеток различных стадий сперматогенеза, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках экспрессии p53 не обнаружено («-») (табл. 14) и (рис. 19, 20).

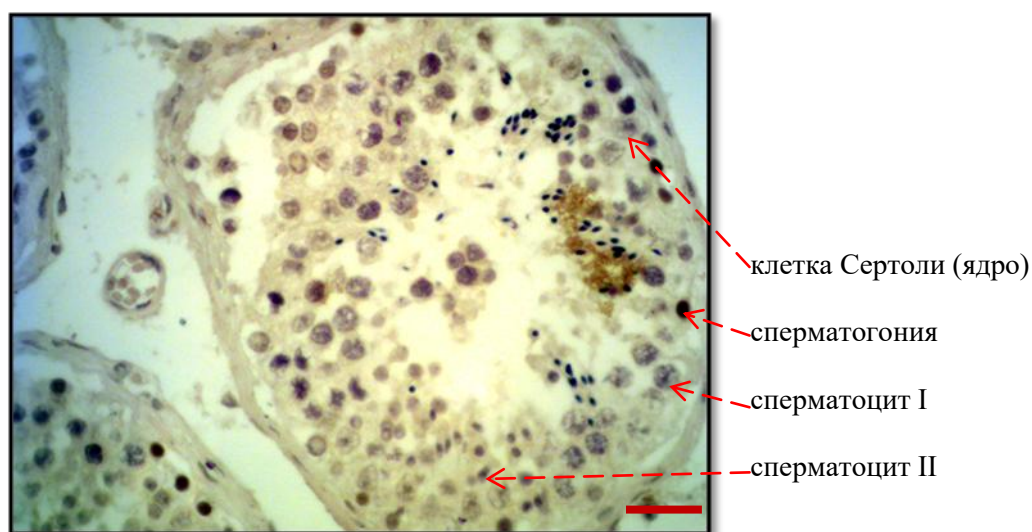
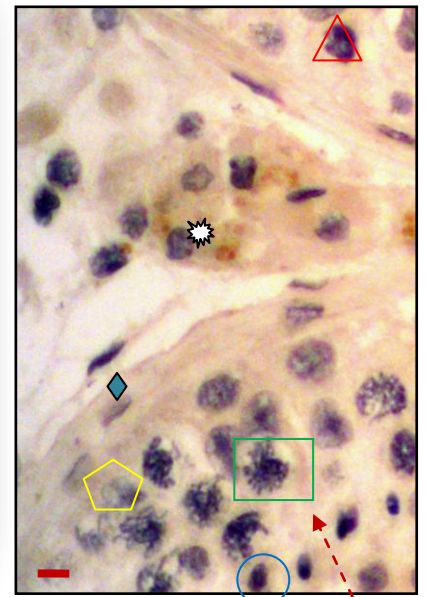
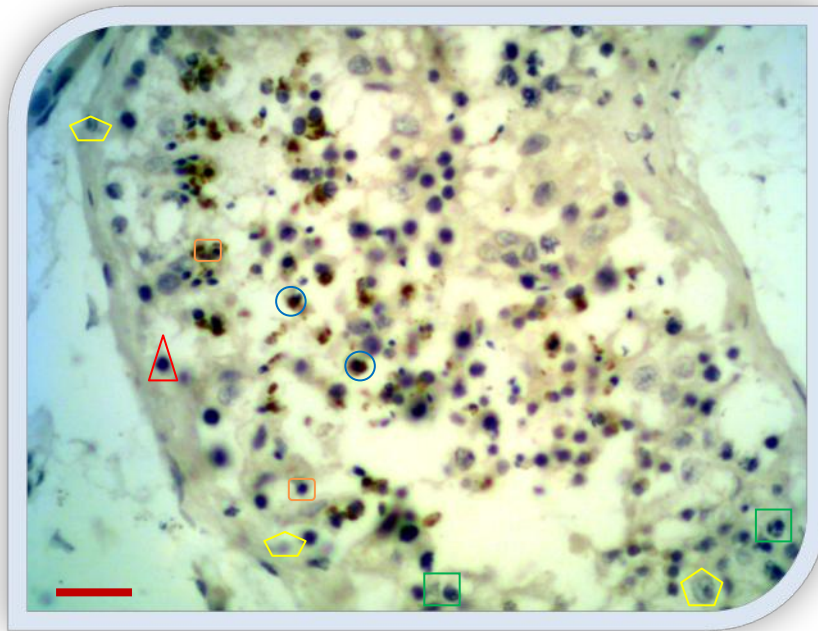


Рис. 19. Яичко (группа I.A.), интрануклеарная реакция с p53 средней интенсивности в отдельных клетках сперматогенного эпителия (ИГХ метод, дополнительное окрашивание гематоксилином, $\times 40$, м.о. – 50 мкм).

Bcl-2 (маркёр антиапоптотической активности)

Иммуномечение белка Bcl-2 отмечали во вторичных сперматоцитах («+++»), сперматидах («+++»), первичных сперматоцитах («+»), а также в единичных сперматогониях («±»). В сперматозоидах, в клетках Сертоли, а также в миоидных клетках экспрессии Bcl-2 не обнаружено («-»). Обнаружена положительная реакция на Bcl-2 в цитоплазме некоторых клеток Лейдига, расположенных ближе к семенным канальцам (табл. 15) и (рис. 20, 21).

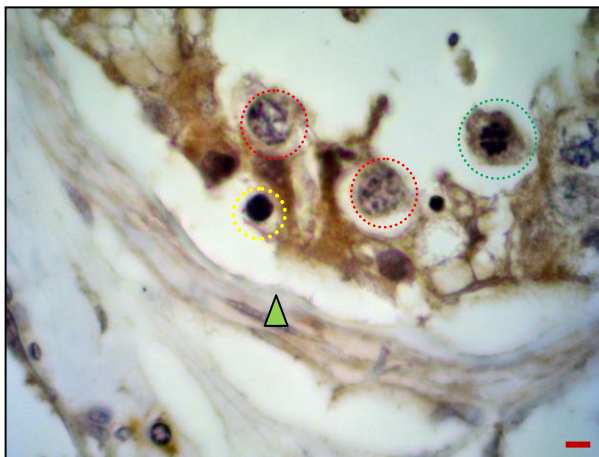


IV стадия сперматогенеза

Рис. 20. (слева)/21. (справа) Яичко (группа I.A.), семенной каналец; ИГХ с антителами к Vcl-2, докрасивание гематоксилином; рис. 20 $\times 40$, м.о. – 50 мкм, рис. 21. $\times 100$, м.о. – 10 мкм. Сперматогония (▲), сперматоцит I – профаза мейоза I (■), сперматоцит II (■), сперматиды (●); клетка Сертоли, ядро (⬡); клетка Лейдига (★); миоидная клетка (◆).

Caspase-9 (каспаза-9, маркёр апоптотической активности)

В извитых семенных каналцах стабильно положительная реакция с антителами к caspasa-9 отмечена в ядрах сперматогоний («+++») и в цитоплазме сперматоцитов I («+++»). Сперматоциты II и сперматиды в разных участках каналцев демонстрируют различную ИГХ-реакцию: часть из них положительная, а в других отрицательная экспрессия к caspasa-9 («±/+»). Миоидные клетки стенки семенных каналцев и клетки фибробластического ряда на caspasa-9 не окрашиваются. Неодинаково маркируются и клетки Лейдига: существуют клетки, цитоплазма и ядро которых не содержит caspasa-9, другие же оказываются позитивные к данному фактору (табл. 16 и табл. 16а) и (рис. 22).



- сперматоцит II, метафаза («+++») ○
- сперматоцит I («→») ○
- сперматогония, ядро («+++») ○
- миоидная клетка, ядро ▲

Рис. 22. Яичко (группа I.A.), положительная реакция с caspasa-9; ИГХ метод, докрасивание гематоксилином, $\times 100$, м.о. – 10.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТВОЛОВОЙ АКТИВНОСТИ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

PLAP (Плацентарноподобная щелочная фосфатаза)

Окрашивание цитолеммального маркёра PLAP в половых клетках, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках не обнаружено («←») (рис. 23).

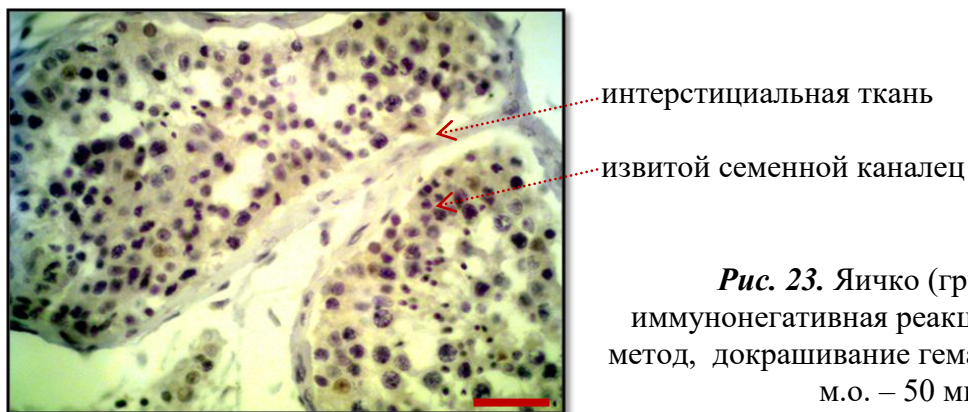


Рис. 23. Яичко (группа I.A.), иммунонегативная реакция с PLAP; ИГХ метод, докрасивание гематоксилином, $\times 40$, м.о. – 50 мкм.

CD 117

Экспрессия маркёра дифференцировки CD117 отмечена в единичных сперматогониях («+»), в некоторых первичных сперматоцитах («+»), во вторичных сперматоцитах («+++») и в ранних сперматидах («+++»), а также в единичных клетках Лейдига («+++»), располагающихся ближе к извитому семенному каналцу. В популяциях остальных половых клеток различных стадий сперматогенеза, в клетках Сертоли, а также в миоидных клетках экспрессии CD117 не обнаружено («←») (табл. 17) и (рис. 24, 25).

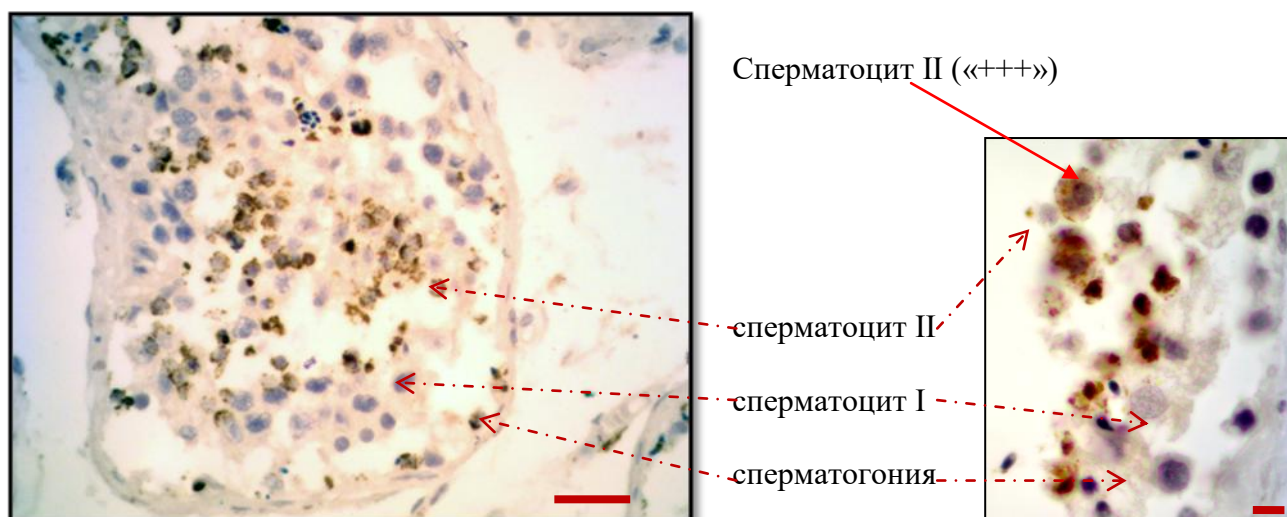


Рис. 24. (слева)/ 25. (справа). Яичко (группа I.A.), иммунопозитивная цитоплазматическая реакция с CD117 в извитом семенном канальце; ИГХ метод, докрасивание гематоксилином, слева $\times 20$, м.о. – 100 мкм, справа $\times 100$, м.о. – 10 мкм.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФАКТОРА РОСТА

IGF-1 (инсулиноподобный фактор роста-1)

При выявлении IGF-1 наиболее ярко маркируются все половые клетки («+++») и соматические клетки интерстициальной ткани («+»), а также эндотелий кровеносных сосудов («+»). Иммуномечением (аффинитетом) обладает цитоплазма половых клеток, а ядра – базофильные. Уровень (степень) экспрессии IGF-1 снижается в процессе сперматогенеза от сперматогоний («++++») до сперматозоидов («+++»). Не чувствительны к IGF-1 клетки Сертоли и клетки миоидного слоя стенки семенного канальца (табл. 18) и (рис. 26).

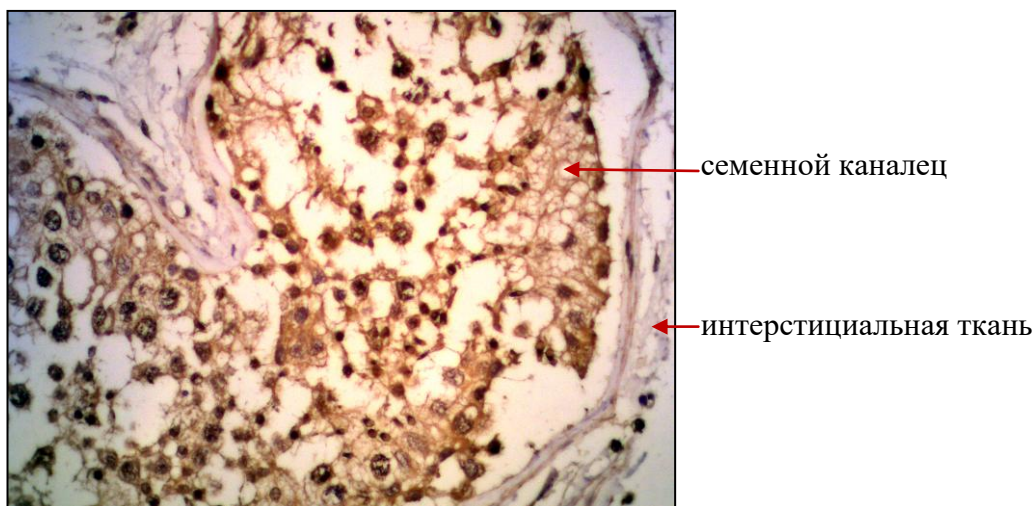


Рис. 26. Яичко (группа I.A.); ИГХ с антителами к IGF-1, докрасивание ядер гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм.

3.2. Морфофункциональная характеристика структур семенника мужчин I.B. группы (при нормальном сперматогенезе)

В отличие от молодых людей у пожилых отмечают слабовыраженные дистрофические изменения половых клеток и клеток Сертоли в некоторых семенных канальцах. Площадь ареала половых клеток незначительно снижена по сравнению с таковой в I-ой группе (см. Статистические данные) (табл. 9, 10, 11) и (рис. 27, 28).

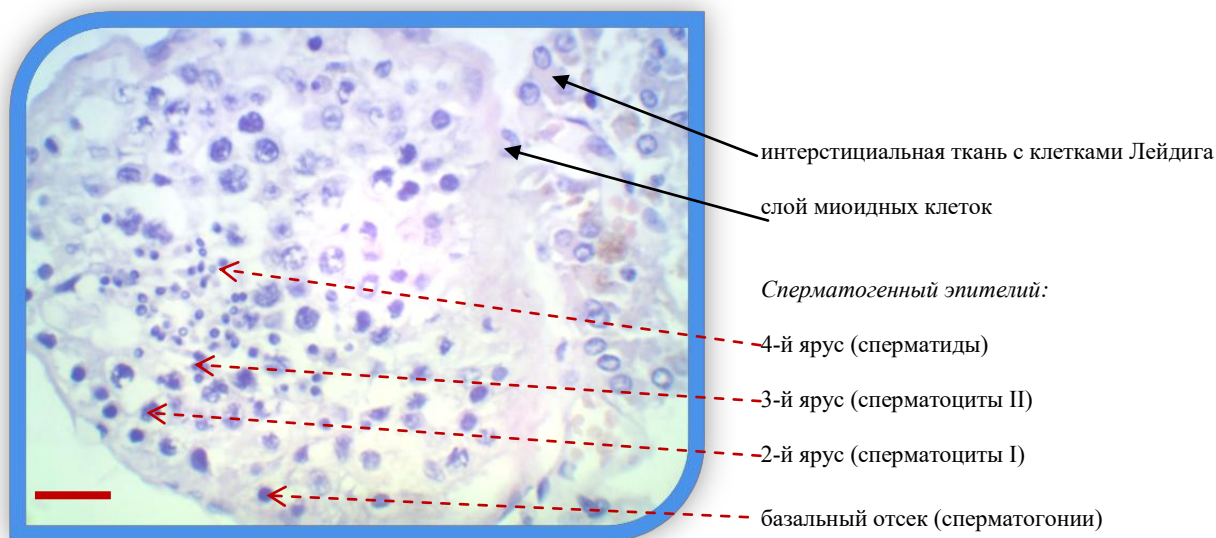


Рис. 27. Яичко, извитой семенной каналец при нормальном сперматогенезе (подгруппа мужчин 61–74 лет), Н&Е, $\times 20$, м.о. – 100 мкм.

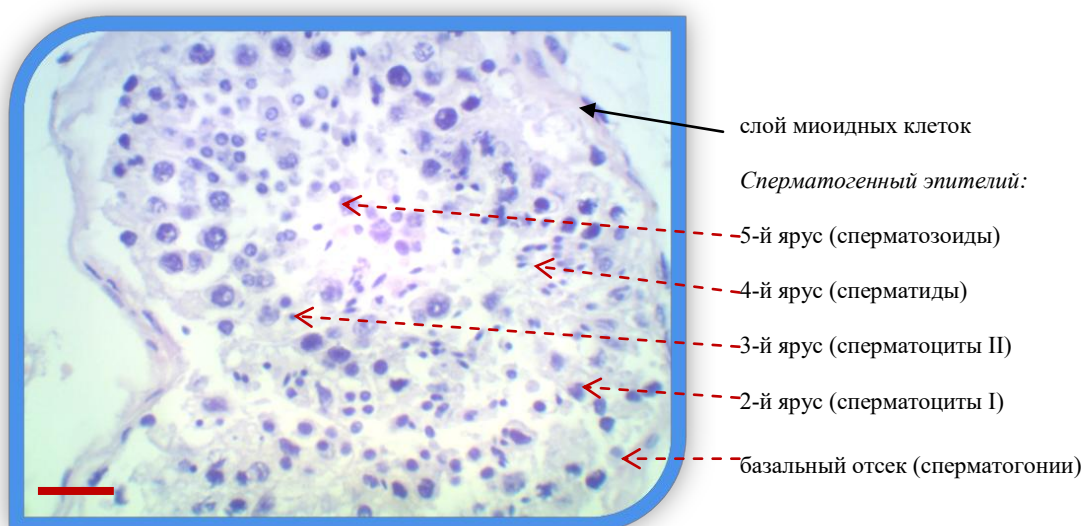


Рис. 28. Яичко, извитой семенной каналец при нормальном сперматогенезе (подгруппа мужчин 61–74 лет), Н&Е, $\times 20$, м.о. – 100 мкм.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ И АПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Ki-67 (белок клеточной пролиферации)

Экспрессия Ki-67 обнаружена в ядрах некоторых сперматогоний («+++»). В популяциях остальных половых клеток различных стадий сперматогенеза, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках экспрессии Ki-67 не обнаружено («—») (табл. 13) и (рис. 29).

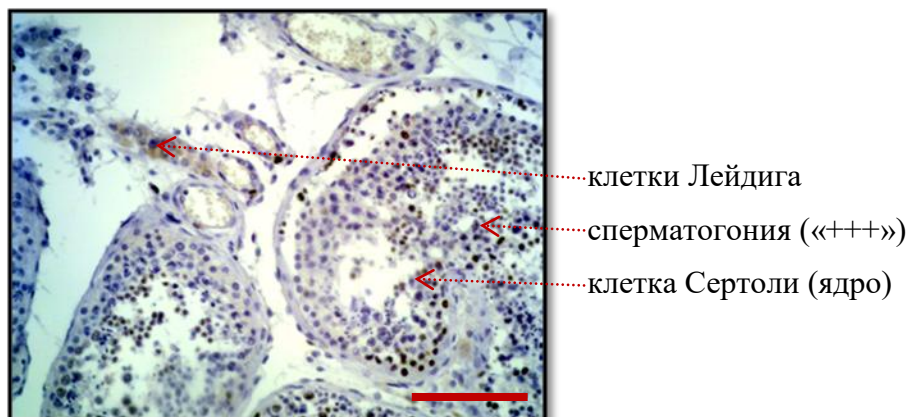


Рис. 29. Яичко (группа I.Б.), положительная интрануклеарная реакция в ядрах некоторых сперматогониев; ИГХ метод с Ki-67, докрашивание гематоксилином, $\times 10$, м.о. – 150 мкм.

p53 (белок проапоптотической активности)

Средняя степень экспрессия белка p53 отмечается в единичных сперматогониях («+++») и в клетках Сертоли («+»). В остальных половых клетках других стадий сперматогенеза, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках экспрессии p53 не обнаружено («—») (табл. 14) и (рис. 30).

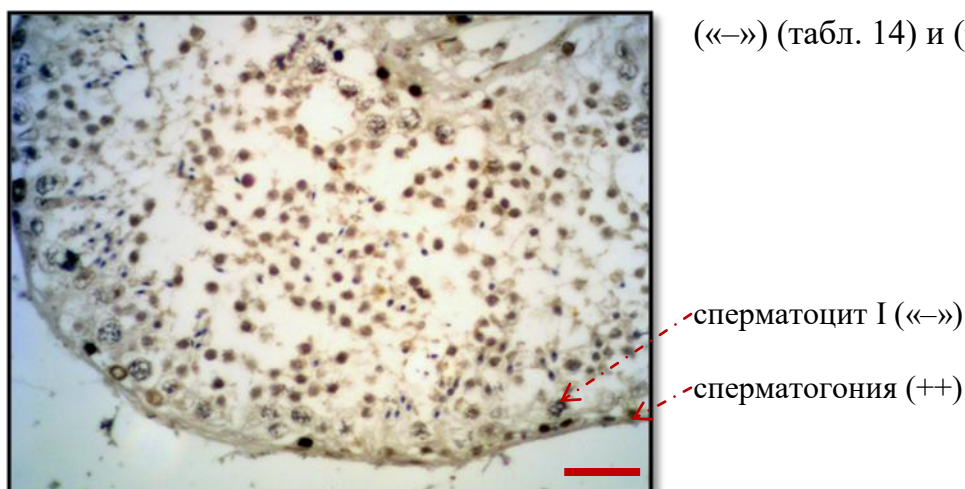


Рис. 30. Яичко (группа I.Б.), положительная интрануклеарная реакция в ядрах некоторых сперматогониев; ИГХ метод с p53, докрашивание гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм.

Vcl-2 (маркёр антиапоптотической активности)

Иммуномечение на Vcl-2 отмечена в единичных сперматогониях: около 10% от общего их количества («±»); во вторичных сперматоцитах («+++») и округлых сперматиды («+»). В популяциях остальных половых клеток различных стадий сперматогенеза, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках окрашивание на Vcl-2 не обнаружено («-») (табл. 15) и (рис. 31).

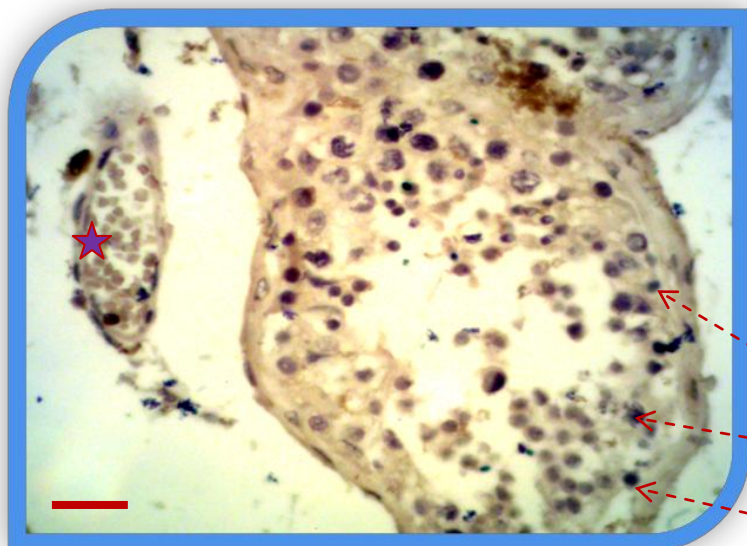
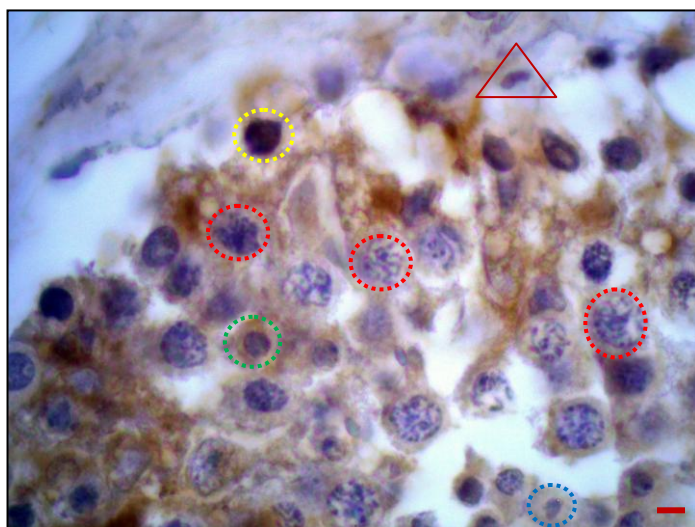


Рис. 31. Яичко (I.Б.); ИГХ метод с антителами к Vcl-2, докрасивание гематоксилином, $\times 40$, м.о. – 50 мкм.

- ★ кровеносный сосуд (вена)
- клетка Сертоли (ядро)
- сперматоцит I
- сперматогония

Caspase-9 (каспаза-9, маркёр апоптотической активности)

В извитых семенных канальцах стабильно положительная ИГХ-реакция на caspasa-9 отмечена в сперматогониях («+++») и в первичных сперматоцитах («+++»). В клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках иммуномечение на caspasa-9 не обнаружено (табл. 16, табл. 16а) и (рис. 32).



- сперматогония («+++») ○
- сперматоцит I ○
- сперматоцит II ○
- сперматиды ○
- клетка Сертоли (ядро) ▲

Рис. 32. Яичко (группа I.Б.), положительная цитоплазматическая реакция у некоторых половых клеток и иммуномечение в ядрах сперматогоний; ИГХ метод с caspasa-9, докрасивание гематоксилином, $\times 100$, м.о. – 10 мкм.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТВОЛОВОЙ АКТИВНОСТИ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

PLAP (Плацентарноподобная щелочная фосфатаза)

Окрашивание на PLAP в половых клетках, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках не обнаружено («-») (рис. 33).

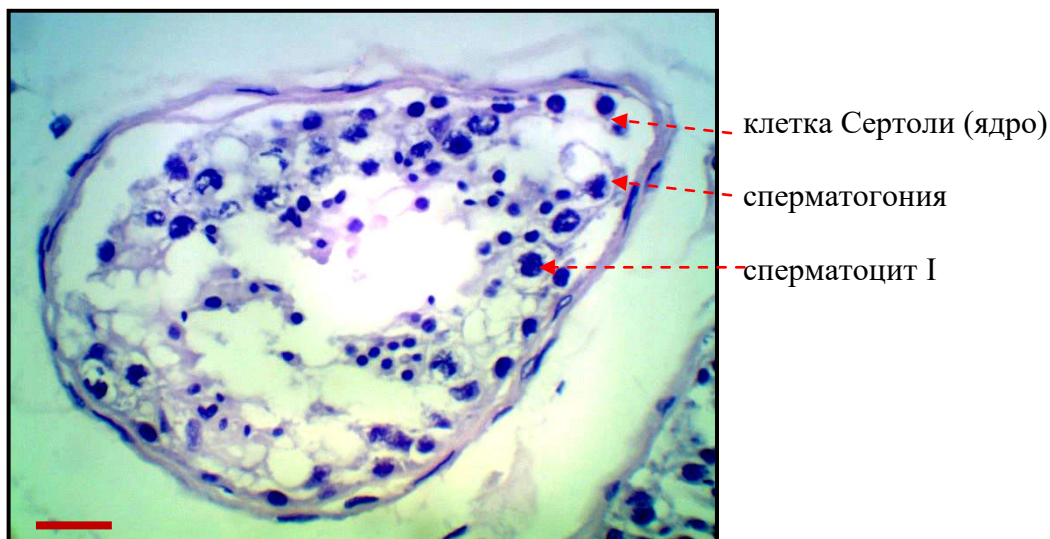


Рис. 33. Яичко (группа I.Б.), иммунонегативная реакция; ИГХ метод с PLAP, докрасивание гематоксилином, $\times 40$, м.о. – 50 мкм.

CD 117

Выраженная положительная реакция на антитела к стволовому маркёру CD 117 обнаружена в перинуклеарных зонах вторичных сперматоцитов («+++»), сперматидях («+++») и сперматозоидах («++»), то есть в клетках, располагающихся в адлюминальном отсеке извитого семенного канальца, ближе к его просвету. Таким образом, отмечена потенция возрастания степени экспрессии в половых клетках последних стадий сперматогенеза после эквационного мейотического деления (созревание и формирование). Кроме того, визуализируется экспрессия маркёра в единичных клетках Лейдига («+++»), располагающихся ближе к канальцу. Маркирование на CD117 в клетках Сертоли («-») и в миоидных клетках («-») не обнаружено (табл. 17) и (рис. 34, 35).

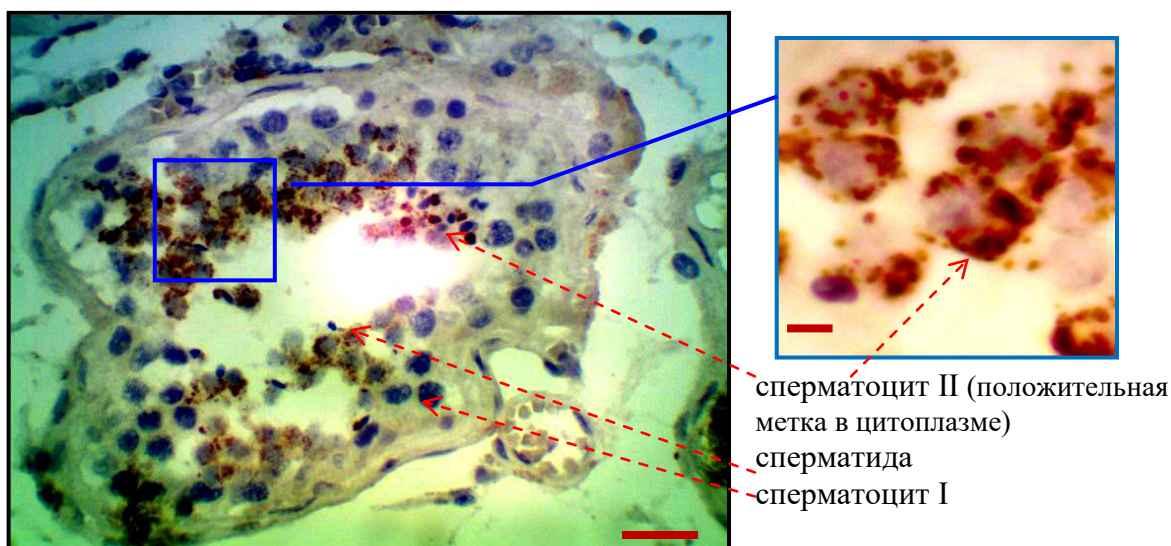


Рис. 34./35. Яичко (группа I.Б.), семенной каналец; ИГХ метод с антителами к CD117, докрасивание гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм; вставка – сперматоциты II, $\times 100$, м.о. – 10 мкм.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФАКТОРА РОСТА

IGF-I (инсулиноподобный фактор роста-1)

Иммуномечение на IGF-I обнаружена в половых клетках на всех этапах сперматогенеза («++») и слабое окрашивание в клетках Сертоли («±») семенных канальцев (табл. 18) и (рис. 36).

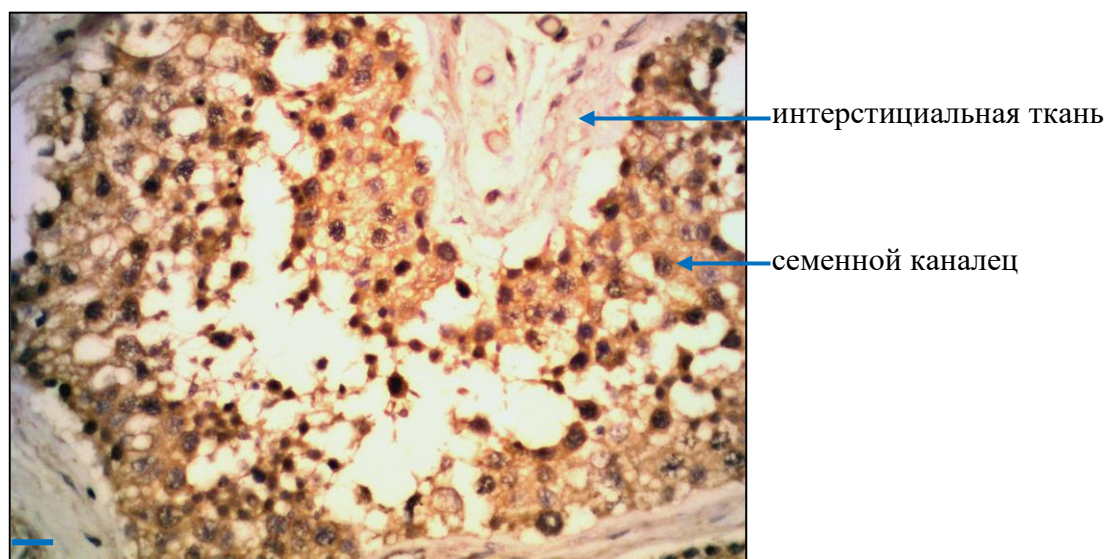


Рис. 36. Яичко (группа I.Б.), извитой семенной каналец, иммунопозитивное окрашивание во всех половых клетках; ИГХ метод с антителами к IGF-I, докрасивание ядер гематоксилином, $\times 40$, м.о. – 50 мкм.

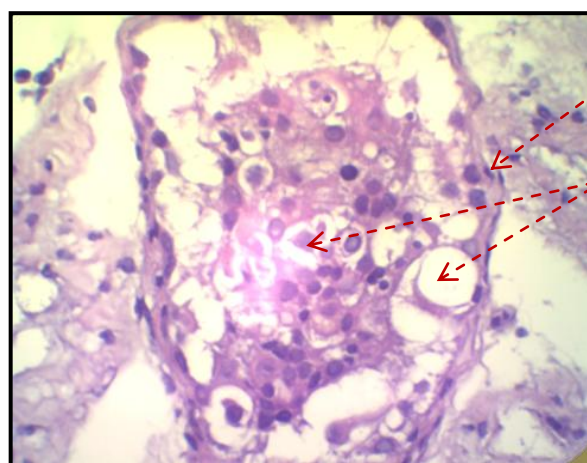
3.3. Морфофункциональная характеристика структур семенника мужчин II-ой группы (при азооспермии)

В биоптатах яичек у разных пациентов наблюдали различную морфологическую картину (нескольких гистологических вариантов): у 3-х – гипосперматогенез (в семенных канальцах располагаются сперматогонии и разрушенные первичные сперматоциты), оценка сперматогенеза по шкале S. Johnson (JS) в модификации De Kretser и Holstein – 4 бала; у 21-го – блок созревания с фокусами субтотальной аплазии гамет (единичные сперматогонии), JS=3 балла; у 5-ти – Сертоли-клеточный синдром (только клетки Сертоли), JS=2 балла; у 1-го – тубулярная атрофия канальцев, JS=1 балл.

Во всех исследуемых препаратах биопсийного материала при бесплодии определяются семенные канальцы с изменениями общего строения: диаметр уменьшен в 1,5 – 2 раза (гипоплазия) (табл. 10, 11) и (рис. 51), местами базальная мембрана с выраженным волокнистым компонентом (гиалиноз, фиброз). Пять вариантов Сертоли-клеточного синдрома идентифицированы по морфологии клеток Сертоли, степени развития семенных канальцев, а также наличие или отсутствие интерстициальных повреждения (табл. 19). Вариант SCO-s оценивали согласно руководству «Bostwick D.G. Urologic surgical pathology» (3rd Edition, 2014), в зависимости от количества популяций клеток Сертоли, преобладающих с одним из признаков: незрелые клетки Сертоли, дизгенетические, зрелые (взрослые), инволютирующие и дедифференцирующиеся [25, 54]. Каждый вариант SCO-sF связан с определёнными тубулярными и интерстициальными изменениями.

В некоторых семенных канальцах обнаружены единичные сперматогонии. Базальные отсеки вакуолизированы, половые клетки отсутствуют (сперматогонии), на месте просветов располагаются деструктивные клетки, которые ещё не лизировались. Признаков интратубулярной неоплазии половых клеток нет. В отдельных канальцах отмечены морфологические

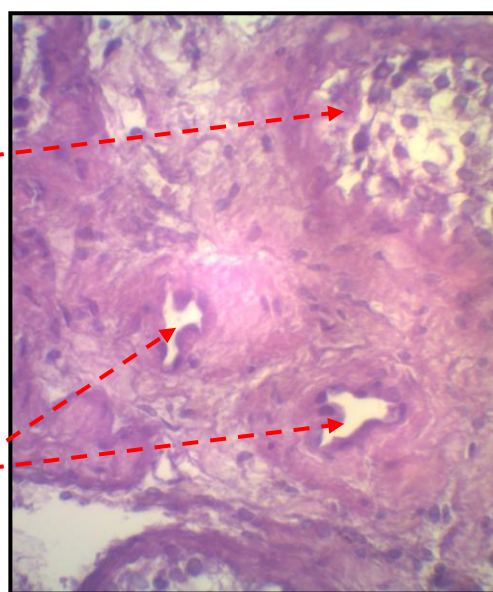
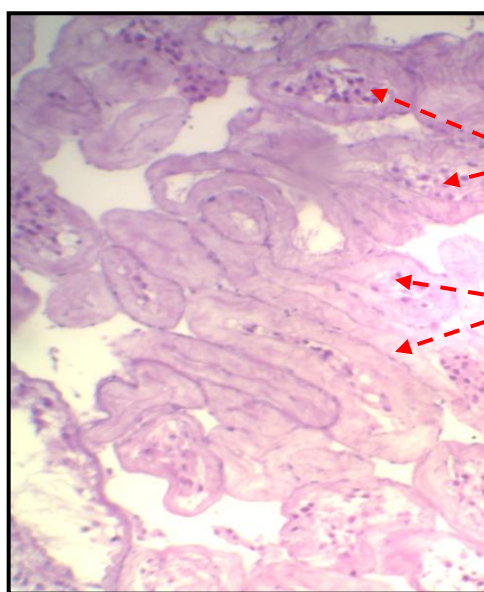
признаки перитубулярного склероза с гиалинозом, прослойки интерстициальной ткани широкие. При серийных срезах в интерстиции выявлены регионы выраженной пролиферации клеток Лейдига (нодулярная гиперплазия) (табл. 20). Таким образом, в большинстве срезах описываемая морфологическая картина соответствует субтотальной или тотальной аплазии мужских половых клеток (GSA), или Сертоли-клеточному синдрому и/или его вариантам и гипосперматогенезу (табл. 21 – 24) и (рис. 37 – 42).



клетки Сертоли (ядро)

деструкция клеток и отёк

Рис. 37. Пациент С., 32 года. Яичко, семенной каналец при азооспермии, Н&Е, ×40.



Слева: **Рис. 38.** Пациент Е., 31 год, Ds: необструктивная азооспермия. Яичко, Н&Е, ×20.
Справа: **Рис. 39.** Пациент Т., 34 года, Ds: необструктивная азооспермия. Яичко, Н&Е, ×40.
Обозначения (Рис. 38 и 39): семенные каналцы: 1 – сохранившиеся, с единичными сперматогониями (SCO-sF), деструктивными клетками и клетками Сертоли, 2 – тубулярная атрофия; 3 – кровеносные сосуды (артерии), средняя оболочка резко утолщена, узкий люминальный просвет, фестоны слабо выражены; вокруг признаки гиперплазии волокнистых компонентов интерстициальной ткани.

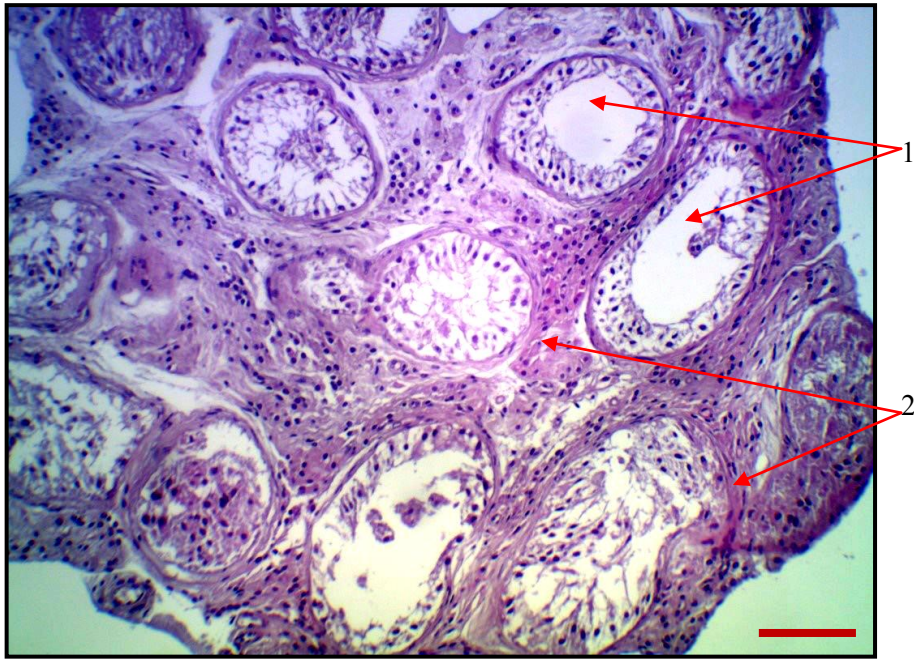


Рис. 40. Пациент А., 28 лет, Ds: необструктивная азооспермия. Яичко, гипосперматогенез и блок созревания, Н&Е, $\times 10$, м.о. – 150 мкм. 1 – семенные каналцы; 2 – интерстициальная ткань.

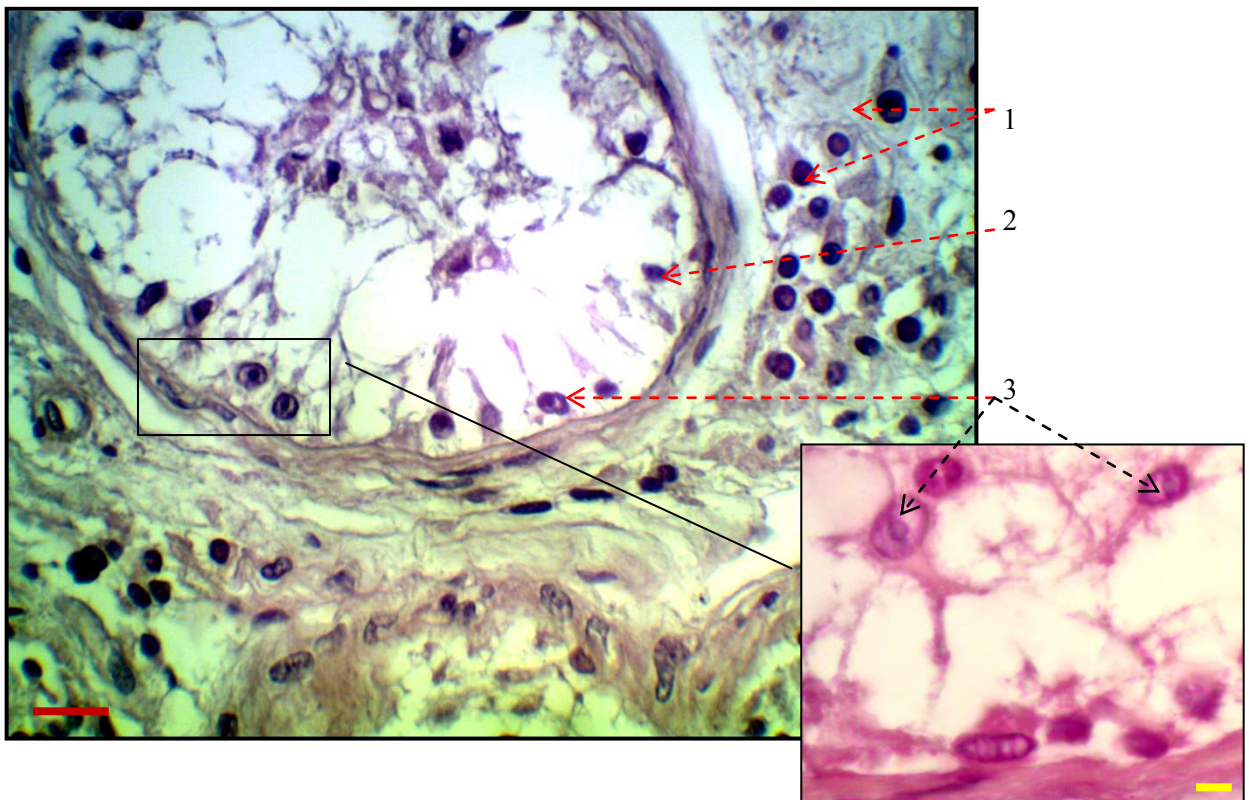


Рис. 41. // 42. Пациент В., 22 года, Ds: необструктивная азооспермия. Яичко, блок созревания (в центре) и SCO-sF (внизу), Н&Е, $\times 40$, м.о. – 50 мкм// $\times 100$, м.о. – 10 мкм. Стенка канальца утолщенная, в базальном отсеке канальца визуализируется множество ядер клеток Сертоли с выраженными ядрышками, местами с оксифильными участками цитоплазмы. В просвете семенного канальца отмечен слабый отёк и признаки клеточной деструкции. 1 – интерстициальная ткань с клетками Лейдига; семенной каналец: 2 – сперматогония (дегенерирующая), 3 – клетка Сертоли (ядро).

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ И АПОПТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Ki-67 (белок клеточной пролиферации)

Положительная реакция на антитела к Ki-67 отмечена в ядрах единичных сперматогоний («+++»). В клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках иммуномечения на Ki-67 не обнаружено («-») (табл. 13) и (рис. 43, 44).

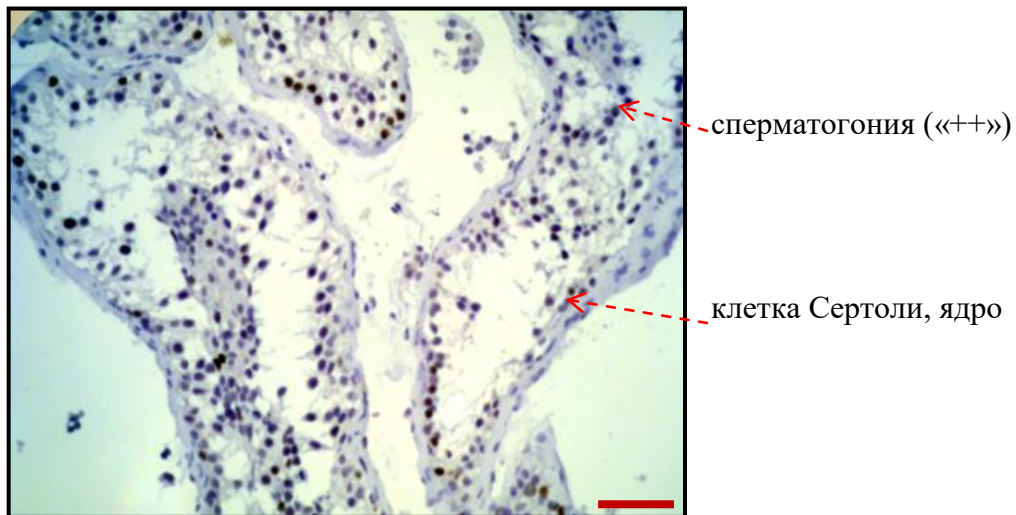


Рис. 43. Яичко (группа II), SCO-sF, умеренная иммуноположительная интрануклеарная реакция с Ki-67 в единичных сперматогониях; ИГХ метод, докрасивание гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм.

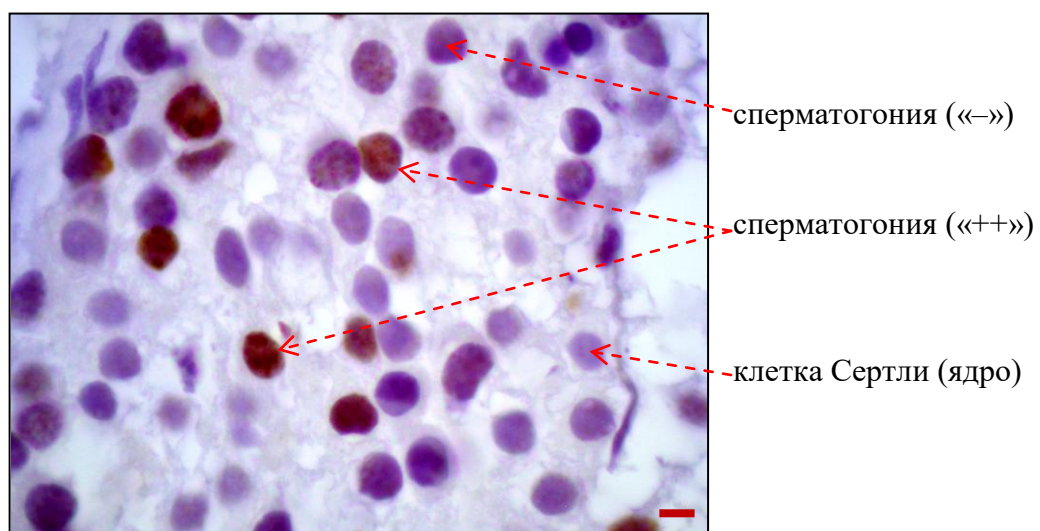


Рис. 44. Яичко (группа II), SCO-sF, умеренная иммуноположительная интрануклеарная реакция с Ki-67 в единичных сперматогониях; ИГХ метод, докрасивание гематоксилином, $\times 100$, м.о. – 10 мкм.

p53 (белок проапоптотической активности)

Уровень экспрессии p53 распределяется в структурах извитого семенного канальца следующим образом: в половине (50%) клеток Сертоли из общего их числа, среди них – среди 25% зрелых и 10% незрелых, а также в сперматогониях («++»). В клетках Лейдига, а также в миоидных клетках экспрессии p53 не обнаружено («-») (табл. 14) и (рис. 45).

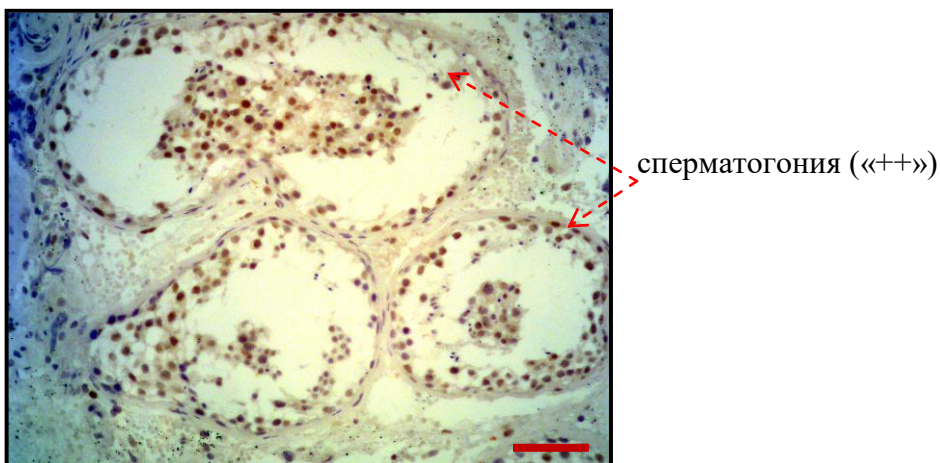


Рис. 45. Яичко (группа II), SCO-sF;
ИГХ метод с антителами к p53, докрасивание гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм.

Bcl-2 (маркёр антиапоптотической активности)

Окрашивание на Bcl-2 в сперматогониях не определяется. В половине от общего числа клеток Сертоли экспрессия белка распределилась следующим образом: среди 25% зрелых («+») и 10% незрелых («+») клетках (табл. 15) и (рис. 46, 58).

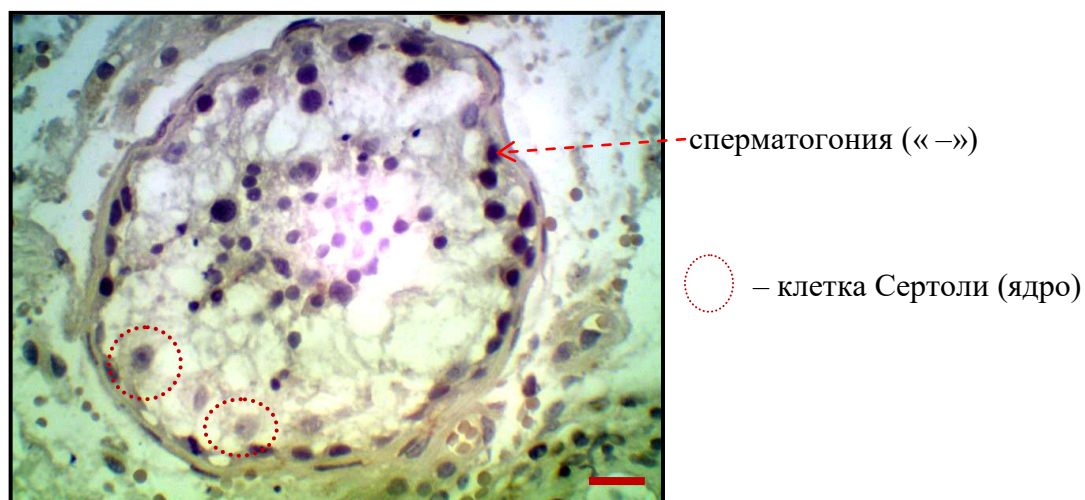
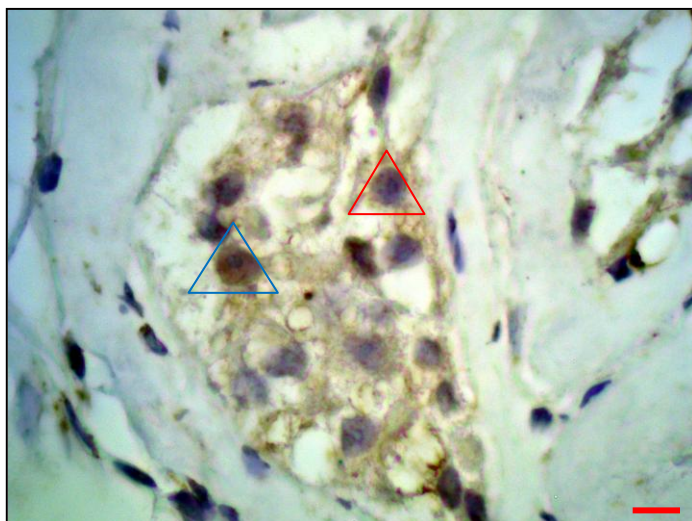


Рис. 46. Яичко (группа II), SCO-sF, семенной каналец;
ИГХ метод с антителами к Bcl-2, докрасивание гематоксилином, $\times 40$, м.о. – 50 мкм.

Caspase-9 (каспаза-9, маркёр апоптотической активности)

В извитых семенных канальцах при блоке созревания отмечена слабая иммунная реакция на caspasa-9 в цитоплазме сперматогоний («+»); при SCO-sF – слабая экспрессия («±») в единичных клетках. В ядрах единичных клеток Сертоли экспрессия caspasa-9 появляется лишь при SCO. В клетках Лейдига и в миоидных клетках экспрессии caspasa-9 не выявлено («-») (табл. 16) и (рис. 47).



клетка Сертоли, ядро («-») ▲

клетка Сертоли, ядро («++») ▲

Рис. 47. Яичко (группа II), семенной каналец, SCO-s; ИГХ метод с антителами к caspasa-9, докрасивание гематоксилином, ×100, м.о. – 10 мкм.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СТВОЛОВОЙ АКТИВНОСТИ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

PLAP (Плацентарноподобная щелочная фосфатаза)

Окрасивание на маркёр PLAP визуализируется в цитолемме до трети от общего числа сперматогоний («+++») семенного канальца (Testicular intraepithelial neoplasia, TIN, carcinoma in situ?). В клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках экспрессии белка не обнаружено («-») (рис. 48).

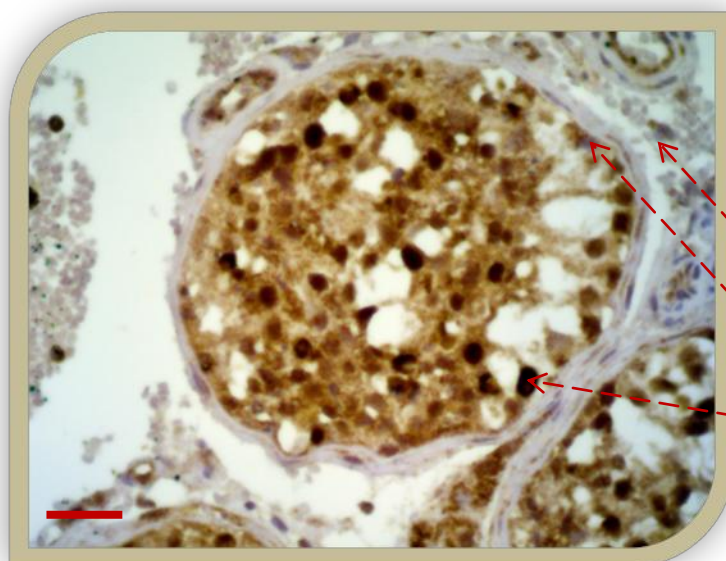


Рис. 48. Яичко (группа II), семенной каналец, SCO-sF; ИГХ метод с антителами к PLAP, докрасивание гематоксилином, ×40, м.о. – 50 мкм; вставка – сперматогоний, ×100, м.о. – 10 мкм.

интерстиций

клетка Сертоли (ядро)

сперматогония
(мечение
цитолеммы
«+++»), TIN?

Экспрессии маркера CD117 в половых клетках, в клетках Сертоли и Лейдига, а также в миоидных клетках не обнаружено («-») (табл. 17) и (рис. 49).

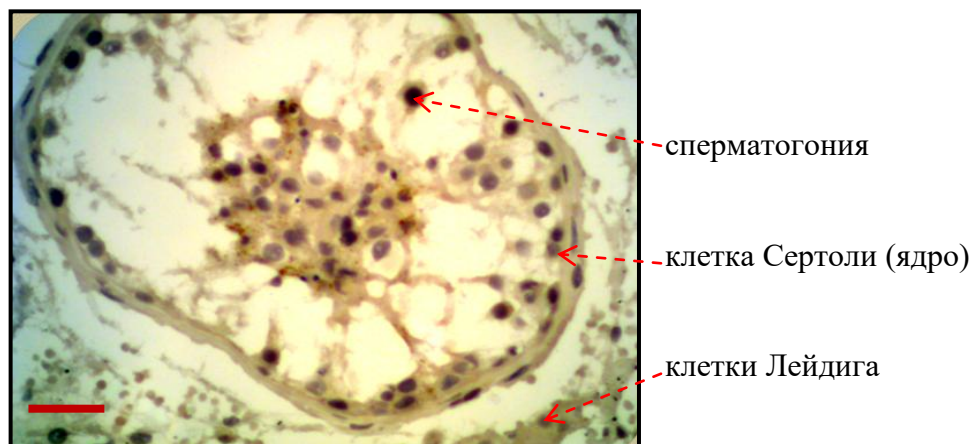


Рис. 49. Яичко (группа II), SCO-sF, иммунонегативная реакция с CD117 в сперматогенном эпителии и структурах интерстициальной ткани; ИГХ метод, докрасивание гематоксилином, $\times 20$, м.о. – 100 мкм.

ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФАКТОРА РОСТА

IGF-I (инсулиноподобный фактор роста-1)

Слабый уровень окрашивания IGF-I отмечен в единичных клетках Сертоли («+») и в цитоплазме некоторых сохранившихся сперматогоний («±») (табл. 18) и (рис. 50).

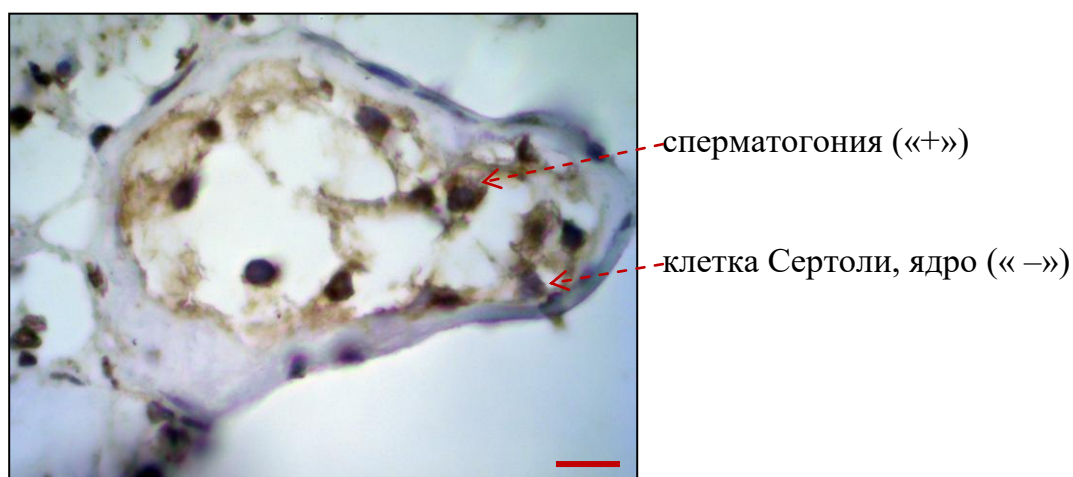


Рис. 50. Яичко (группа II), SCO-sF, извитые семенные канальцы; ИГХ с антителами к IGF-I, докрасивание гематоксилином, $\times 100$, м.о. – 50 мкм.

МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛОВЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЯИЧКА

Удельное содержание клеток в срезе яичка, то есть численность половых и соматических клеток оценивали в предлагаемых стандартных сегментах: для половых клеток – 50 мкм, для клеток Лейдига – 150 мкм (см. Раздел «Материалы и методы исследования») (табл. 10).

Таблица 10

Удельное содержание клеток в одном извитом семенном канальце и микроокружении

клетки	НОРМАЛЬНЫЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗ (количество клеток, сегмент – 50 мкм)		Идиопатическое бесплодие (количество клеток, сегмент – 50 мкм)
	22 – 35 лет	61 – 74 года	
Диаметр извитого семенного канальца (мкм)	150 – 200		50 – 120
Сперматогонии	4 – 5	4	2 – 3
Сперматоцит I	4	4	нет
Сперматоцит II	4 – 5	4 – 5	нет
Сперматиды	6 – 7	6 – 7	нет
Сперматозоиды	13 – 14	10 – 12	нет
клетки Сертоли (ядра)	2	2	зрелые – 4, незрелые – 1
миоидные клетки	1	1	1
клетки Лейдига (в сегменте 150 мкм)	6 – 8	7 – 9	16 – 18

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОРФОМЕТРИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛОВЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ЯИЧКА

Сравнительный статистический анализ мужских половых клеток во всех исследуемых группах на различных стадиях дифференцировки (по Y. Clermont, 1972) проводили между сперматогониями, так как другие клетки сперматогенеза при идиопатическом бесплодии отсутствуют. Анализ результатов измерения площади извитых семенных канальцев выборочной

совокупности указывает на неоднородность по данному признаку (при $p < 0,05$). При гипосперматогенезе отмечается увеличение площади перитубулярной интерстициальной ткани ($46500 \pm 118 \text{ мкм}^2$) и уменьшение в 5,0 раз площади семенных канальцев ($9500 \pm 143 \text{ мкм}^2$) при сниженных показателях площади ареала половых клеток ($2150 \pm 120 \text{ мкм}^2$) по сравнению с мужчинами 22 – 35 лет в контроле ($21000 \pm 112 \text{ мкм}^2$) (табл. 11) и (рис. 51).

Таблица 11

Площадь половых клеток и перитубулярной интерстициальной ткани в нормальном сперматогенезе и при азооспермии

структуры	НОРМАЛЬНЫЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗ (мкм ²)		Идиопатическое бесплодие (мкм ²)
	22 – 35 лет	61 – 74 года	
семенной каналец	59365 ± 275	$49063 \pm 264^*$	$9500 \pm 143^*$
ареал половых клеток	27300 ± 275	$25200 \pm 174^*$	$2150 \pm 120^{**}$
интерстициальная ткань	21000 ± 112	$23000 \pm 109^*$	$46500 \pm 118^{**}$

* – статистически достоверные различия (при $p < 0,05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0,05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.

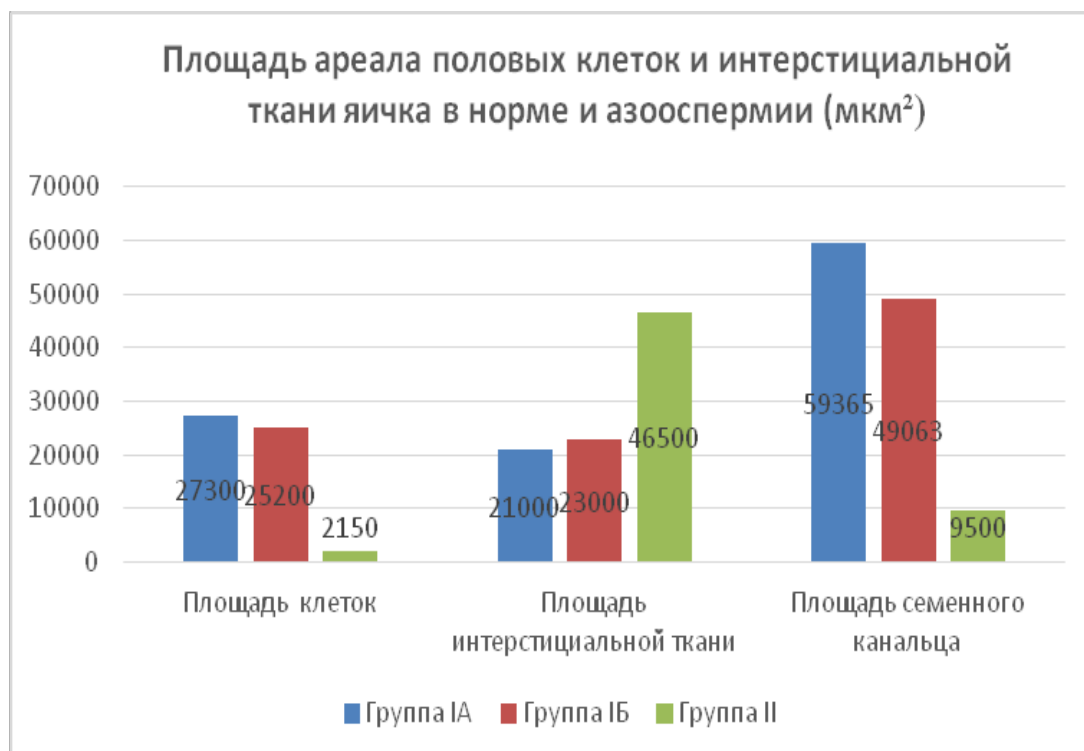


Рисунок 51

МУЖСКИЕ ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Данные статистического анализа (при $p < 0.05$) количества сперматогоний показывают снижение их числа в 1,7 раза при необструктивной азооспермии (19.0 ± 0.1) по сравнению с контрольной группой ($32.8 \pm 0.31 / 31.1 \pm 0.2$) (табл. 12).

Таблица 12

Количество половых клеток в извитом семенном канальце в нормальном сперматогенезе и при азооспермии

клетки	НОРМАЛЬНЫЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗ (количество клеток)		Идиопатическое бесплодие (количество клеток)
	22 – 35 лет	61 – 74 года	
	Сперматогонии	32.8 ± 0.31	
Сперматоциты I	22.8 ± 0.11	$21.1 \pm 0.3^*$	0
Сперматоциты II	42.6 ± 0.2	$38.4 \pm 0.11^*$	0
Сперматиды	98.2 ± 0.13	$91.6 \pm 0.1^*$	0

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.

Высокие значения *индекса пролиферации (Ki-67) половых клеток* указывает на выраженную митотическую активность сперматогоний у мужчин 22 – 35 лет ($42.0 \pm 0.34\%$) в контрольной группе и снижение данного показателя почти в 3,5 раза при гипосперматогенезе и блоке созревания ($15.0 \pm 0.1\%$, $12.0 \pm 0.1\%$) (табл. 13) и (рис. 52).

Таблица 13

Доля сперматогоний, ИГХ-позитивных на Ki-67 в нормальном сперматогенезе и при идиопатическом бесплодии (%)

клетки	НОРМАЛЬНЫЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗ		Идиопатическое бесплодие
	22 – 35 лет	61 – 74 года	
	Сперматогонии	42.0 ± 0.34	

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.

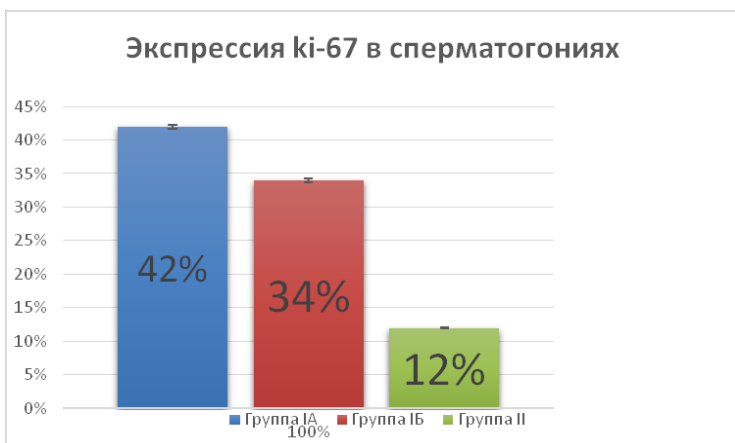


Рисунок 52

Проапоптотический индекс (p53) сперматогоний в контрольной I.A. ($57.2 \pm 0.66\%$; у пожилых – $12.2 \pm 0.3\%$) группе выше чем у сперматоцитов первого порядка в 2,0 раза ($28.5 \pm 0.5\%$) и в 3,9 раза у сперматоцитов второго порядка ($14.5 \pm 0.33\%$). Количество окрашенных на p53 сперматогоний при необструктивной азооспермии в 2,6 раза выше, чем в контроле у мужчин 22 – 35 лет (табл.14) и (рис. 53 и 55).

Таблица 14

Доля ИГХ-позитивных клеток семенных канальцев на p53 в нормальном сперматогенезе и при идиопатическом бесплодии (%)

группа	p53 (%)
I.A. группа (нормальный сперматогенез, 22 – 35 лет), половые клетки	17.2 ± 0.33
I.B. группа (нормальный сперматогенез, 61 – 74 года), половые клетки	$8.1 \pm 0.22^*$
II группа (22 – 35 лет), гипосперматогенез; сперматогонии, сперматоциты I	$40.0 \pm 0.44^{**}$
II группа (22 – 35 лет), блок созревания; сперматогонии	$64.3 \pm 0.39^{**}$
II группа (22 – 35 лет), фокальный вариант СКС; сперматогонии	$72.0 \pm 0.41^{**}$
II группа (22 – 35 лет), классический вариант СКС; клетки Сертоли	$49.2 \pm 0.4^{**}$

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.

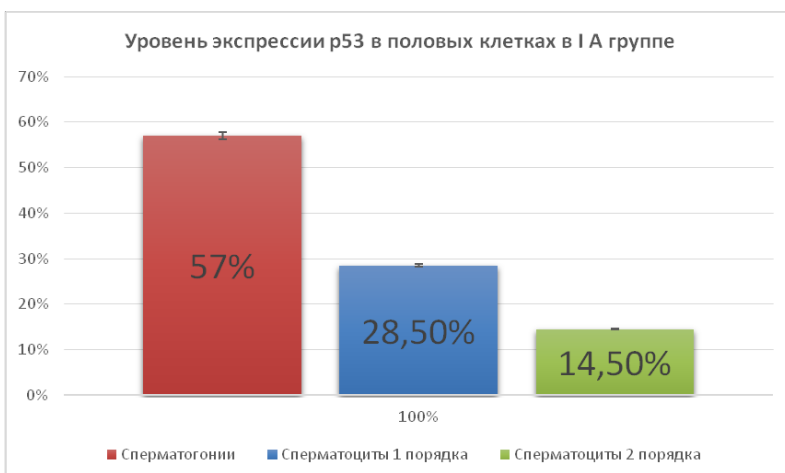


Рисунок 53

Анализ маркирования на Vcl-2 показывает, что *антиапоптотическая активность* превалирует в половых клетках у мужчин 22 – 35 лет ($43.2 \pm 0.44\%$), снижается в пожилом возрасте ($14.1 \pm 0.2\%$) и практически исчезает на всех стадиях нарушенного сперматогенеза ($1.0 \pm 0.1\%$). Доля ИГХ-позитивных половых клеток на Vcl-2 в пожилом возрасте составило: сперматогонии – $11.3 \pm 0.1\%$, сперматоциты I – $53.2 \pm 0.3\%$, сперматоциты II – $27.4 \pm 0.2\%$, сперматиды – $9.1 \pm 0.3\%$. Таким образом, в норме наибольшей антиапоптотической активностью обладают сперматоциты первого порядка (у молодых – $46.0 \pm 0.55\%$) – клетки, вступившие в редукционное деление мейоза (табл. 15) (рис. 54 и 55).

Таблица 15

Доля ИГХ-позитивных клеток семенных канальцев на Vcl-2 в нормальном сперматогенезе и при идиопатическом бесплодии (%)

группа	Vcl-2 (%)
I.A. группа (нормальный сперматогенез, 22 – 35 лет), половые клетки	43.2 ± 0.44
I.B. группа (нормальный сперматогенез, 61 – 74 года), половые клетки	$14.1 \pm 0.2^*$
II группа (22 – 35 лет), гипосперматогенез; сперматогонии, сперматоциты I	$1.0 \pm 0.1^{**}$
II группа (22 – 35 лет), блок созревания; сперматогонии	0
II группа (22 – 35 лет), фокальный вариант СКС; сперматогонии	0
II группа (22 – 35 лет), классический вариант СКС; клетки Сертоли	0

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.



Рисунок 54

Показатель *митохондриального пути запрограммированной гибели* (caspase-9, каспаза-9) в сперматогониях с нормальным сперматогенезом находится примерно на одном уровне (доля окрашенных сперматогоний составляет у молодых мужчин – 39.5 ± 0.33 %, у пожилых – 35.6 ± 0.44 %) и возрастает и при блоке созревания и фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома (64.3 ± 0.39 % и 72.0 ± 0.41 % соответственно) (табл. 16) (рис. 55). Доля иммуномечения других видов половых клеток в нормальном сперматогенезе показана в табл. 16а.

Таблица 16

Доля ИГХ-позитивных клеток семенных канальцев на caspase-9 в нормальном сперматогенезе и при идиопатическом бесплодии (%)

группа	caspase-9 (%)
I.A. группа (нормальный сперматогенез, 22 – 35 лет), сперматогонии	39.5 ± 0.33
I.B. группа (нормальный сперматогенез, 61 – 74 года), сперматогонии	$35.6 \pm 0.44^*$
II группа (22 – 35 лет), гипосперматогенез; сперматогонии, сперматоциты I	$22.0 \pm 0.22^{**}$
II группа (22 – 35 лет), блок созревания; сперматогонии	$64.3 \pm 0.39^{**}$
II группа (22 – 35 лет), фокальный вариант СКС; сперматогонии	$72.0 \pm 0.41^{**}$
II группа (22 – 35 лет), классический вариант СКС; клетки Сертоли	$56.2 \pm 0.2^{**}$

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.

Таблица 16.а.

Доля ИГХ-позитивных половых клеток семенных канальцев на caspase-9 в нормальном сперматогенезе (%)

группа	22 – 35 лет	61 – 74 года
сперматогонии	39.5 ± 0.33	$35.6 \pm 0.44^*$
сперматоциты I	14.0 ± 0.3	$31.0 \pm 0.5^*$
сперматоциты II	12.0 ± 0.3	$31.0 \pm 0.5^*$
сперматиды	13.0 ± 0.3	0

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

Резюмируя анализ распределения белков-регуляторов биологически значимых процессов в половых клетках у мужчин 22 – 35 лет, можно сделать заключение, что сперматогонии относятся к самой обновляющейся клеточной популяции, обеспечивающие баланс между митотической и апоптотической активностями, необходимого для последующих клеток сперматогенеза: индекс пролиферации/индекс апоптоза – 42.0 ± 0.34 %/

25.2±0.44%. Аналогичный баланс отмечается и у пожилых мужчин: индекс пролиферации/ индекс апоптоза – 34.1±0.6%/18.1±0.33%. У лиц, страдающих идиопатической азооспермией, обнаружено снижение пролиферативной активности сперматогоний (12.0±0.1%). Учитывая данные про- и антиапоптотической активности сперматогоний при бесплодии можно констатировать дисбаланс – преобладание процесса апоптоза над пролиферацией.

Показатели *маркера плюрипотентности* мужских гамет (CD117) представлены в табл. 17 и на рис. 55. Указанный фактор в половых клетках при всех морфологических формах идиопатического бесплодия не обнаружен. Следует отметить мизерное иммуномечение на CD117 в сперматогониях и сперматоцитах первого порядка в пожилом возрасте и снижение его экспрессии в сперматоцитах второго порядка (20.1±0.33%) по сравнению с молодыми мужчинами (55.0±0.55%).

Таблица 17

Доля ИГХ-положительных клеток семенных канальцев на CD117 в нормальном сперматогенезе и при идиопатическом бесплодии (%)

группа	Нормальный сперматогенез		Идиопатическое бесплодие
	22 – 35 лет	61 – 74 года	
сперматогонии	10.0±0.33	6.0±0.3	0
сперматоциты I	15.0±0.55	11.0±0.2	0
сперматоциты II	55.0±0.55	20.1±0.33*	0
сперматиды	20.0±0.44	14.1±0.22*	0

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

Количество иммунопозитивных сперматогоний на *инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-I)* при необструктивной азооспермии у мужчин 22 – 35 лет снижено в 8,8 раза (в среднем 4.0±0.22%) по сравнению с таковой возрастной группой в контроле (62.0±0.33%) и в 5,7 раза у пожилых мужчин (40.0±0.33%). Можно предположить, что в этих условиях нарушается паракринная регуляция синтеза IGF-I половыми клетками (табл. 18) (рис. 55).

Доля ИГХ-положительных клеток семенных канальцев на IGF-I
в нормальном сперматогенезе и при идиопатическом бесплодии (%)

группа	IGF-I (%)
I.A. группа (нормальный сперматогенез, 22 – 35 лет), половые клетки	39.5±0.33
I.B. группа (нормальный сперматогенез, 61 – 74 года), половые клетки	35.6±0.44*
II группа (22 – 35 лет), гипосперматогенез; сперматогонии, сперматоциты I	7.0±0.1**
II группа (22 – 35 лет), блок созревания; сперматогонии	5.3±0.6**
II группа (22 – 35 лет), фокальный вариант СКС; сперматогонии	1.0±0.2**
II группа (22 – 35 лет), классический вариант СКС; клетки Сертоли	0

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.

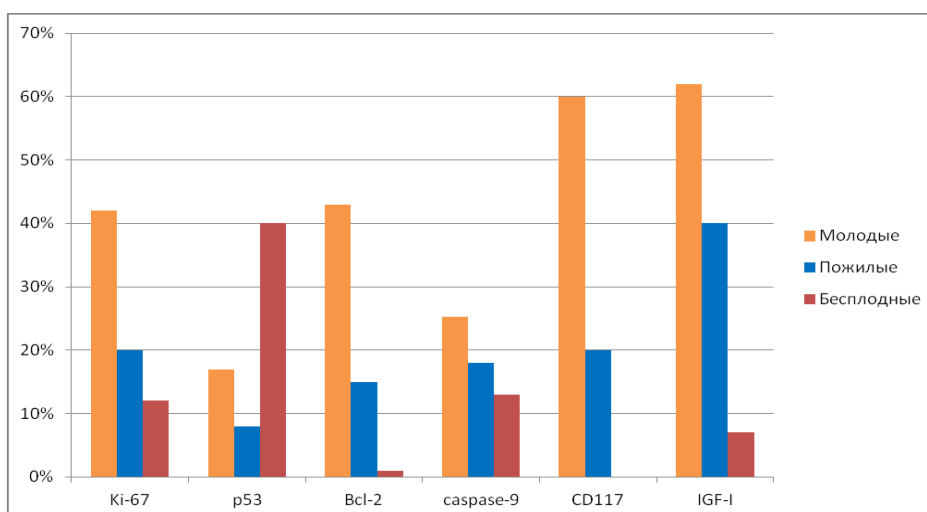


Рисунок 55
Иммуно-гистохимический анализ распределения белков в сперматогониях при нормальном сперматогенезе и идиопатическом бесплодии (%).

КЛЕТКИ СЕРТОЛИ

Количество клеток Сертоли у мужчин с азооспермией существенно превышает значение данного показателя в контрольных подгруппах ($18.6 \pm 0.12\%$). Результаты сравнительного анализа количества клеток Сертоли приведены в табл. 19.

Таблица 19

Количество клеток Сертоли в извитом семенном канальце
в нормальном сперматогенезе и при азооспермии

структуры	НОРМАЛЬНЫЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗ (количество клеток)		Идиопатическое бесплодие (количество клеток)
	22 – 35 лет	61 – 74 года	
клетки Сертоли	9.9±0.08	9.4±0.26*	18.6±0.12**

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.

КЛЕТКИ ЛЕЙДИГА

По данным наших исследований, среди мужчин 22 – 35 лет при нормальном сперматогенезе и при гипосперматогенезе клетки Лейдига преобладают у последних ($21.4 \pm 0.23\%$ против $7.4 \pm 0.07\%$). У лиц пожилого возраста также наблюдается увеличение клеток Лейдига по сравнению с мужчинами 22 – 35 лет ($13.9 \pm 0.2\%$). Результаты сравнительного анализа количества клеток Лейдига приведены в табл. 20.

Таблица 20

Количество клеток Лейдига в интерстициальной ткани яичка при нормальном сперматогенезе и при азооспермии

структуры	НОРМАЛЬНЫЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗ (количество клеток)		Идиопатическое бесплодие (количество клеток)
	22 – 35 лет	61 – 74 года	
клетки Лейдига	7.4 ± 0.07	$13.9 \pm 0.2^*$	$21.4 \pm 0.23^{**}$

* – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I.A. и I.B. контрольными подгруппами.

** – статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I.A. и группой лиц, страдающих бесплодием.

Данные проведённых иммуногистохимических реакций исследуемых белков в совокупности с результатами подсчёта различных клеточных форм и количественного анализа распределения маркеров в них можно трактовать как нарушение аутокринной и паракринной регуляции мужских половых клеток при идиопатической азооспермии, что возможно, является наиболее значимым в патогенезе данной формы бесплодия. Особо следует подчеркнуть о включение в этих условиях компенсаторных механизмов со стороны местных регуляторов с целью подавления патологически измененного сперматогенеза.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПОСРЕДСТВОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

В ходе оценки уровня экспрессии генов, продукты которых ответственны за внутриклеточную регуляцию апоптоза, были выявлены существенные

статистические различия ($p < 0.05$) как между исследуемыми образцами фрагментов биоптатов яичек группы IV (идиопатическое бесплодие) с разными патоморфологическими формами, обнаруженными в ходе гистологического исследования, так и при их сравнении с контролем. Выявлено значительное повышение относительного уровня экспрессии проапоптотических генов внутреннего пути *BAX* и *BAK*, наиболее выраженное в группе пациентов с гипосперматогенезом (рис. 56а). Напротив, экспрессия антиапоптотических генов *BCL2* и *BCLW* оказалась снижена. При этом обнаружено, что значения относительной экспрессии гена *BCLW* значительно ниже контрольного уровня во всех патоморфологических формах идиопатического бесплодия, в то время как уровень экспрессии *BCL2* изменен умеренно (рис. 56б).

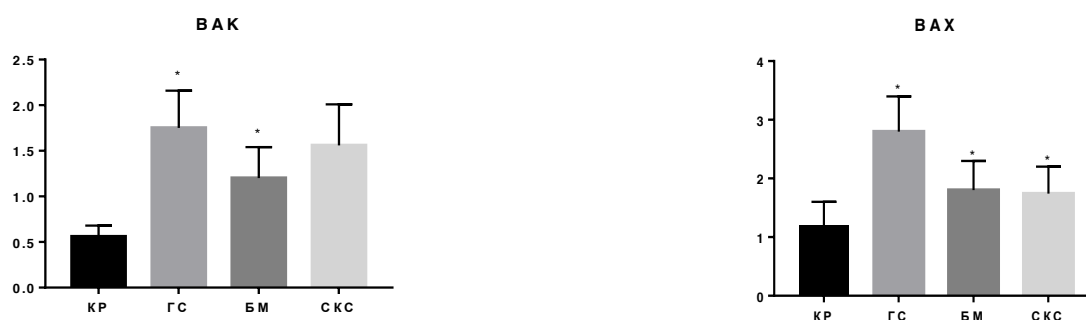


Рисунок 56а. Экспрессия проапоптотических генов *BAK* и *BAX* в яичках пациентов с нормальным сперматогенезом (группа IA) и при идиопатическом бесплодии (группа II). По вертикали: относительный уровень экспрессии, усл. ед.; КР – контроль (I группа, 22 – 35 лет); ГС – гипосперматогенез; БМ – блок мейоза; СКС – Сертоли-клеточный синдром. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.05$.



Рисунок 56б. Экспрессия антиапоптотических генов *BCL2* и *BCLW* в яичках пациентов с нормальным сперматогенезом (группа I) и при идиопатическом бесплодии (группа IV). По вертикали: относительный уровень экспрессии, усл. ед.; КР – контроль (I группа, 22 – 35 лет); ГС – гипосперматогенез; БМ – блок мейоза; СКС – Сертоли-клеточный синдром. * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.05$.

Глава IV

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ (ПРОТЕОМИКА СПЕРМАТОГЕНЕЗА)

Точное время развития мужских половых клеток от сперматогоний (стадия пролиферации) до сперматозоидов (окончание стадии формирования) трудно зафиксировать, что в первую очередь связано со сложностью определения начала роста и их дифференцировки, а также достаточной продолжительностью начальных этапов роста [Каган С.А., 1969; Райцина С.С., 1985; Волкова О.В., Боровая Т.Г., 1999; Быков В.Л., 2000; Gupta S., 2006; Bostwick D.G., 2014].

В работе анализировали время появления, распределение, количественную оценку исследуемых белков при нормальном и патологическом сперматогенезе.

Учитывая вышеизложенное мнение, был произведён количественный анализ экспрессии регуляторных факторов в клетках в зависимости от их типа, дифференцировки или влияния внешних причин.

Морфологическая картина при мужском идиопатическом бесплодии.

✓ Комплексный анализ показал наличие всех необходимых условий – структур (клеток Сертоли и Лейдига, миоидных клеток, кровеносных и лимфатических сосудов, нервов) для нормального функционирования половых клеток [Быков В.Л., 200; Gupta S., 2006; Bostwick D.G., 2014]. Эти данные усилил иммуногистохимический анализ иммуномечения исследуемых белков. Однако, половые клетки, в большинстве наблюдений, с дистрофическими изменениями, что указывает на первичный характер их повреждений.

✓ Нарушения сперматогенеза (тотальная или субтотальная герминальная аплазия) во всех образцах обнаружены на фоне хорошо развитой и даже несколько гиперплазированной интерстициальной ткани, то есть биопсийный материал яичка доказывает первичный характер

поражения половых клеток. Кроме того, биопсия в этих случаях даёт возможность установить наличие той или иной степени нарушений сперматогенеза, а главное – определить направление процесса в сторону прогрессирования или обратного развития [Johnsen S.G., 1970; Брагина Е.Е., и др., 2004; Koh P.O. et al., 2011; Гамидов С. и др., 2013].

✓ Учитывая обнаруженную функциональную активность соматических и эндокринных клеток яичка при необструктивной азооспермии, а именно, наличие отличных друг от друга гистофенотипов в пределах одного изучаемого образца, целесообразно говорить о **фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома (Sertoli cell only-syndrome (SCA), focalis)**.

✓ «Гиперплазия клеток Сертоли» проявляется увеличением общего числа клеток в 2, а в некоторых семенных канальцах в 3 раза на светооптическом уровне – Сертоли-клеточный синдром (SSO) на фоне герминативно-клеточной аплазии (GCA). Клетки Сертоли являются стабильными неделящимися клетками. При нормальном сперматогенезе (при световой микроскопии) они маскируются за большим количеством половых клеток; при бесплодии (SCO-синдроме) же, напротив, половые клетки отсутствуют и поэтому хорошо визуализируются только лишь клетки Сертоли. Поэтому часто употребляемый при микроскопическом описании мужского бесплодия термин «гиперплазия клеток Сертоли» в патологической анатомии и андрологии является не корректным.

✓ Пролиферация сперматогоний в просветах семенных канальцев при тотальной и субтотальной формах аплазии половых клеток (GCA) снижена (Ki-67+), а апоптоз, напротив, повышен (caspase-9+).

✓ Инсулиноподобный фактор роста при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома экспрессирует только в единичных сохранившихся сперматогониях (IGF-I+). Таким образом, сперматогонии в своей цитоплазме, содержат мизерное количество биологически активных веществ, обладающих митогенной активностью. Возможно, нарушена

секреция и дальнейшее поглощение этих пептидов между клетками Сертоли и половыми клетками.

✓ Иммунопозитивная экспрессия PLAP⁺ у сперматогоний говорит о возможной антенатальной причине развития мужского бесплодия. Учитывая, что в норме PLAP является специфическим маркером только половых клеток семенников плода и новорождённого, то экспрессия этого фактора у взрослых, возможно, указывает на задержку или даже на отсутствие сперматогенеза. То есть, речь идёт о дедифференцировке и/или крайней незрелостью половых клеток. По-видимому, мужские половые клетки у лиц, страдающих идиопатическим бесплодием, можно, считать фетальными. Таким образом, можно выдвинуть гипотезу о том, что основной из причин развития мужского идиопатического бесплодия следует считать несостоятельность сперматогенеза уже антенатально. Вопрос, в какой конкретно период эмбриогенеза (оплодотворение, дробление, имплантация, гастрюляция или гисто/органогенез) происходит «поломка», приводящая впоследствии к нарушению сперматогенеза, остаётся открытым. При этом, важно учитывать морфофункциональную характеристику половых клеток отца, так как наследственные аномалии и генетические мутации могли произойти уже в его сперматозоиде, который затем и оплодотворил яйцеклетку матери.

✓ Положительная экспрессия PLAP⁺ можно также расценивать как риск малигнизации (развития семиномы, PLAP⁺/ОСТ⁺) [Albrecht W. et al., 2004; Мацко Д.Е. и др., 2006; Андреева Ю.Ю. и др., 2012]. Для точной верификации подобного поражения необходимо проведение FISH-исследования *i12p* и учитывать данные интратестикулярной ультрасонографии. Необходимо провести амплификацию хромосомных последовательностей ДНК, свойственных хромосоме 12 (*12p*) для выявления возможной связи между идиопатическим бесплодием и развитием семиномы [Loriot A. et al., 2003; Брагина Е.Е. и др., 2004].

Поэтому эта группа мужчин нуждается в постоянном динамическом наблюдении. С другой стороны – обнаруженные камбиальные половые клетки должны послужить объектом дальнейших исследований, с целью определения их возможных пролиферативных и дифференциальных свойств.

✓ Отрицательную ИГХ-реакцию с антителами к CD117, можно расценивать как отсутствие унипотентных свойств у половых клеток принимая во внимание характеристику маркера [Grieco V. et al., 2010; Dabbs D. J., 2014].

✓ Увеличение количества клеток Лейдига в интерстициальной ткани яичка можно рассматривать как компенсаторное явление. Наличие интерстициальных эндокриноцитов в яичке при бесплодии свидетельствует о нормальном функционировании компонентов гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси и продукция тестостерона, что известно из ранее проведённых исследований [Волкова О.В., Боровая Т.Г., 1999; Быков В.Л., 200; Bostwick D.G., 2014; Mao J. Et al., 2015]. Увеличение же клеток Лейдига, вероятно, связано с нарушением обратной связи в регуляции этой оси, так как тестостерон не поступает в половые клетки и включается компенсаторный его синтез.

✓ Обнаруженная диффузная неравномерная гиперплазия и наличие нодулярных пролифератов в интерстициальной ткани могут быть проявлениями предвестников опухолевого процесса, согласно имеющимся данным других авторов [Albers P. et al., 2011]. Поэтому биопсия в подобных случаях является полезной как для раннего распознавания малигнизации яичка, так и для суждения о путях их дальнейшего развития.

Морфологическая картина нормального сперматогенеза.

Проведённые исследования позволяют выделить важные направления, по которым осуществляется анализ экспрессии генома и синтеза специфических белков сперматогенеза, некоторые дополняют ранее полученные результаты

[Pineau C. et al., 2013; Turki Al-Hussain, 2016]. Следует подчеркнуть, что наши исследования важны не только для решения вопросов, связанных с собственно сперматогенезом, в том числе и патологическим, в ряде случаев они имеют более широкое, общебиологическое значение.

Так, процесс дифференцировки половых клеток представляет собой уникальную естественную модель для исследований модификации основных белков хроматина – гистонов и протаминов – в целях выяснения биологического значения этих процессов [Каган С.А., 1969; Райцина С.С., 1985; Астраханцев А.Ф., 1996; Быков В.Л., 2000; Gupta S., 2006; Mendis S.H., 2012; Bostwick D.G., 2014].

С целью определения пролиферативной активности мужских половых [Mateoіu C. et al., 2011] клеток иммуногистохимическим методом выявляли в общей популяции Ki-67 позитивные клетки.

Нами установлено, что количество клеток, вступивших в митоз (сперматогоний) при нормальном течении сперматогенеза (контроль), увеличено по сравнению с нарушенным сперматогенезом (при бесплодии) – $42.0 \pm 0.34\%$; $34.1 \pm 0.6\%$; $12.0 \pm 0.1\%$.

Анализ экспрессии Ki-67 в трёх группах показывает, что низкая эффективность сперматогенеза в группе мужчин с бесплодием зависит не только от постмитотических событий, но и связано со снижением митотической активности сперматогоний.

Локализация продукта реакции с антителами к p53 в ядрах соответствует представлениям о нём как о транскрипционном факторе, эффекты которого реализуются через модификацию активности протеинов митохондриальной ветви апоптоза [Ярилин А.А., 1998; Mateoіu C. et al., 2011]. Антогонистом p53 является супрессор апоптоза Bcl-2. В отличие от мнения об увеличении содержания p53 при всех видах программированной гибели клеток [Чумаков П.В., 2000; Yan W., 2013] результаты работы показывают, что анализ соотношения клеток, окрашенных на p53, и Bcl-2, является более

корректным, а его величина – достаточно информативным показателем состояния популяции половых клеток в различные периоды постнатального морфогенеза и при идиопатическом бесплодии.

Доказательство апоптотической направленности течения сперматогенеза при идиопатическом бесплодии были отмечены уже у сперматогоний при иммунофенотипировании маркера p53. Возможно, имеет место повреждение ДНК, что позволяет осуществить её «ремонт» до репликации генома. Таким образом, p53 предупреждает перенос повреждённой генетической информации от одного поколения клеток к следующему.

Нормальный сперматогенез является удобной моделью для изучения важной роли p53 в дифференцировке клеток в естественных условиях [Mateoіu C. et al., 2011]. Количество клеток, входящих в мейоз – величина постоянная, так как избыток сперматогоний или прелептотенных сперматоцитов устраняется путём апоптоза. p53 экспрессирует во время мейоза – в прелептотене и в начале пахитены. Таким образом, p53 активен в тетраплоидных первичных сперматоцитах, находящихся в мейозе стадии пахитены и этот белок можно считать потенциальным регулятором мейоза. Наиболее высокий уровень p53 определяется в кариолемме. Ядерные поры являются подходящими структурами для быстрого переноса p53 в ядро и связывания его с ДНК для дальнейшего регулирования клеточного цикла. Это подтверждает то, что p53 участвует в мейозе и играет важную роль в процессах рекомбинации и/или формирования синаптонемного комплекса

Как известно, каспазы индуцируют завершающую стадию апоптоза [Almeida. C. et al., 2015]. Эффекторные каспазы, будучи активированными, начинают цепь протеолитических изменений, цель которых – цитолиз. Участие эффекторных каспаз в апоптозе направлено на разрыв связей с окружающими клетками, реорганизацию их цитоскелета, снижение возможностей репарации и репликации ДНК, разрыв ядерной мембраны и

разрушение ДНК, выброс сигналов, маркирующих клетку для апоптоза, расчленение клетки на апоптотические тельца.

Апоптоз – это эволюционно сложившийся механизм регуляции функциональной активности клеток [Jaiswal D. Et al, 2015]. В патологических состояниях повреждающий фактор усиливает пути апоптоза, ускоряя гибель клеток. Особенно чувствительными к различным агентам являются половые клетки.

Для определения количества клеток, вступивших в апоптоз, выявляли специфический маркер инициатора митохондриального пути апоптоза – Caspase-9. Установили, что количество сперматогоний с регистрируемой апоптотической активностью у лиц, страдающих бесплодием, значительно превышает таковые значения в контроле. При этом, следует напомнить, что в семенных канальцах при бесплодии мужских гамет кроме сперматогоний в основной массе не обнаружено. Однако апоптотическая активность частично сохраняется в сперматоцитах первого порядка в контрольной группе.

В органах, характеризующихся интенсивным апоптозом, наблюдаются процессы паракринной регуляции, в основе которой лежит реутилизация продуктов распада. Механизм этого процесса описан при экспериментальном инсульте (Ярыгин К.Н., Холоденко И.В., Скворцова В.И. и др.) [38]. Апоптоз и паракринная регуляция это взаимосвязанные явления в норме и патологии.

Исходя из вышеизложенного, можно заключить, что у мужчин с идиопатическим бесплодием наблюдается угнетение процесса сперматогенеза, что достоверно подтверждается как общепринятыми морфометрическими методами, так и специфическими иммуногистохимическими методами исследования и ПЦР-РВ-анализом.

В то же время, установленное в ходе исследования уменьшение количества клеток с белком Bcl-2– увеличение количества клеток с активным ферментом caspase-9+, свидетельствует о ведущей роли апоптоза в патогенезе выявленных нарушений.

Наличие в семенных канальцах при необструктивной азооспермии сперматогоний можно рассматривать как неполную, или **субтотальную герминальную аплазию (Germ cell aplasia (GCA), subtotal)**, что нехарактерно для проявлений классического Сертоли-клеточного синдрома. Так как сохранившиеся при этом сперматогонии находятся в относительно функциональном состоянии, то они могут быть объектом дальнейшего изучения с использованием новых прогрессивных технологий. Например, их можно «выращивать» (культивировать), создавая определённые физиологические условия, до сперматид для последующего оплодотворения, используя современные репродуктивные технологии (TESE/ЭКО/ИКСИ).

Одной из причин «сбоя» сперматогенеза при идиопатическом бесплодии можно считать нарушение аутокринных механизмов регуляции. Кроме того, учитывая то, что гистофизиология развития и функционирования мужской и женской репродуктивных систем, являются тождественными, то нельзя не исключить факт схожего биохимического состава гамет. Возможно (по аналогии с овогенезом), не выявлен и не изучен белок, инициирующий и/или блокирующий сперматогенез на стадии созревания (редукционного и эквационного деления мейоза) – сперматогониальный мейоз-индуцирующий белок (СМИБ). Также возможно его прямая или опосредованная роль в малигнизации при бесплодии или развитии первичного ракового поражения (герминогенные опухоли).

Процесс оплодотворения включает в себя взаимодействие сперматозоида и яйцеклетки, слияние клеточных мембран и геномов женской и мужской гамет [Primakoff P. et al, 2007]. Успешное завершение развития эмбриона, по крайней мере, частично, зависит от целостности и полноценности ДНК сперматозоида [Ahmadi A. et al, 1999]. Имеется порог повреждений ДНК (к которым относятся фрагментация ДНК, нарушение компактной упаковки ДНК, дефицит протаминов), при котором развитие эмбрионов ухудшается или вовсе прекращается [Ahmadi A. et al, 1999].

Крайне важной представляется роль инсулиноподобных факторов роста (IGF-I) в сперматогенезе, селекции мужских половых клеток и элементов микроокружения семенных извитых канальцев [Nakayama Y. et al., 1999; Guoqiu S. et al., 2014].

Инсулиноподобные факторы роста обладают широким спектром митогенных и метаболических эффектов.

При выявлении маркера IGF-I в контрольной группе наиболее ярко маркируются половые и в меньшей степени соматические клетки семенного извитого канальца, а также его микроокружения. При идиопатическом бесплодии определяется слабая экспрессия IGF[±] в сперматогониях и в клетках Сертоли.

Таким образом, активная экспрессия инсулиноподобного фактора роста как соматическими, так и половыми клетками гонад подтверждает их функциональную необходимость в региональном механизме ауто- и паракринной регуляции процессов в семеннике. Отсутствие специфического маркирования стромы свидетельствует о её вспомогательной роли в этих процессах.

В развитии, функционировании и регуляции любых биологических структур важную роль играют элементы микроокружения. Для мужских половых клеток компонентами микроокружения являются факторы контактного и дистантного взаимодействия. К первым относят клетки Сертоли. Вторая группа факторов представлена гормонами, цитокинами и другими биологически активными веществами. Следует уточнить, что в клетках Сертоли были выявлены все исследуемые факторы в той или иной степени выраженности.

CD117 – маркер, играющий важную роль в сперматогенезе благодаря своим плюрипотентным свойствам [Lu D.X. et al., 2008; Grieco V. et al., 2010]. В группе мужчин зрелого возраста, интенсивность экспрессии CD117 характеризуется равномерной степенью выраженности среди всех классов

половых клеток. В группе мужчин пожилого возраста отмечено отсутствие экспрессии CD117 у сперматогоний и сперматоцитов-I и сохранение экспрессии CD117 в последующих классах половых клеток.

Учитывая, что в базальном отделе извитого семенного канальца осуществляется пролиферация (стадия размножения), а в адлюминальном – мейоз (стадия созревание), правомочен вывод, что в группе мужчин пожилого возраста процессы дифференцировки преобладают над пролиферативными. При этом, очень важно отметить, что у пожилых людей вследствие такого перераспределения возникает высокий риск передачи хронических заболеваний к потомству при деторождении в этом возрасте. Исследуемый маркер в половых клетках при идиопатическом бесплодии отсутствует. Возможно, стволовые сперматогониальные клетки (SSC) в семенных канальцах при идиопатическом бесплодии отсутствуют, то есть, обновляющихся популяций половых клеток нет. Однако, он экспрессирует при иных формах бесплодия, так как сперматогенез при этом не страдает и не наблюдается азооспермия.

Исследования механизмов сперматогенеза, процесса, посредством которого сперматогонии, пройдя стадии размножения, мейоза и формирования становятся сперматозоидами, позволяет выявить ряд генетических детерминант мужского бесплодия. Более обширные знания о генетической регуляции сперматогенеза помогли в создании классификации вариантов идиопатического бесплодия мужчин, так как генетические факторы становятся более ответственными за этот фенотип.

Всё большее и всестороннее изучение морфологии сперматогенеза и патогенеза идиопатического бесплодия, несомненно, приведёт к прогрессу, который позволит исправить или, по крайней мере, смягчить социальные сигмы, связанные с бесплодием.

Глава V

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные в научной работе результаты, следует заключить, что в основе физиологического течения сперматогенеза лежит комплекс морфофункциональных интрагонадных регуляций, важнейшими из которых являются гаметно-соматические и перитубулярные взаимоотношения. Соматические элементы семенных канальцев играют важную роль в регуляции сперматогенеза. Они осуществляют защиту и трофику мужских половых клеток, способствуют реализации мейоза и спермиогенеза, воспринимают внешние и интратестикулярные сигналы нейро-эндокринной и иммунной природы, тем самым локально регулируют состояние гамет и клеток Сертоли.

Основываясь на показателях спермограммы, нельзя дать достоверный прогноз фертильности, учитывающий не только возможность зачатия, но и исход наступившей беременности (Zini A., Libman J., 2006). В последние годы появились сведения о том, что на исход беременности могут влиять факторы, не выявляющиеся при традиционном спермиологическом исследовании.

Таким образом, сперматогенез – сложный, богатый событиями биологический процесс развития мужских половых клеток, важнейшая роль в регуляции которого, наряду с центральными и гуморальными механизмами, принадлежит региональным механизмам (интратестикулярным) (табл. 20).

При мужском идиопатическом бесплодии в регуляции сперматогенеза участвуют также соматические и эндокринные клетки. Очевидно, что стимуляция паракринной регуляции сперматогенеза способствует реализации собственных репаративных механизмов. Кроме того, велико значение не только синтезируемым биологически активным веществам, но и продуктам распада погибающих половых клеток в результате естественного отбора.

Преимущество биопсии яичка состоит в том, что при исследовании нативных половых клеток повышается качество прижизненной диагностики, показывая более «правдивую» морфологическую картину интраорганных молекулярных взаимоотношений, и обеспечивая наибольшую информативность, в отличие от аутопсийного материала.

Проведённое ретроспективное исследование выявило дисбаланс между пролиферацией и апоптозом мужских половых клеток, а также нарушение нейроэндокринной и гуморальной регуляции, что является одним из ключевых звеньев патогенеза идиопатической формы мужского бесплодия (рис. 57).

На основании проведенного исследования разработан алгоритм клинко-морфологического исследования при идиопатическом бесплодии (табл. 21, 22, 23).

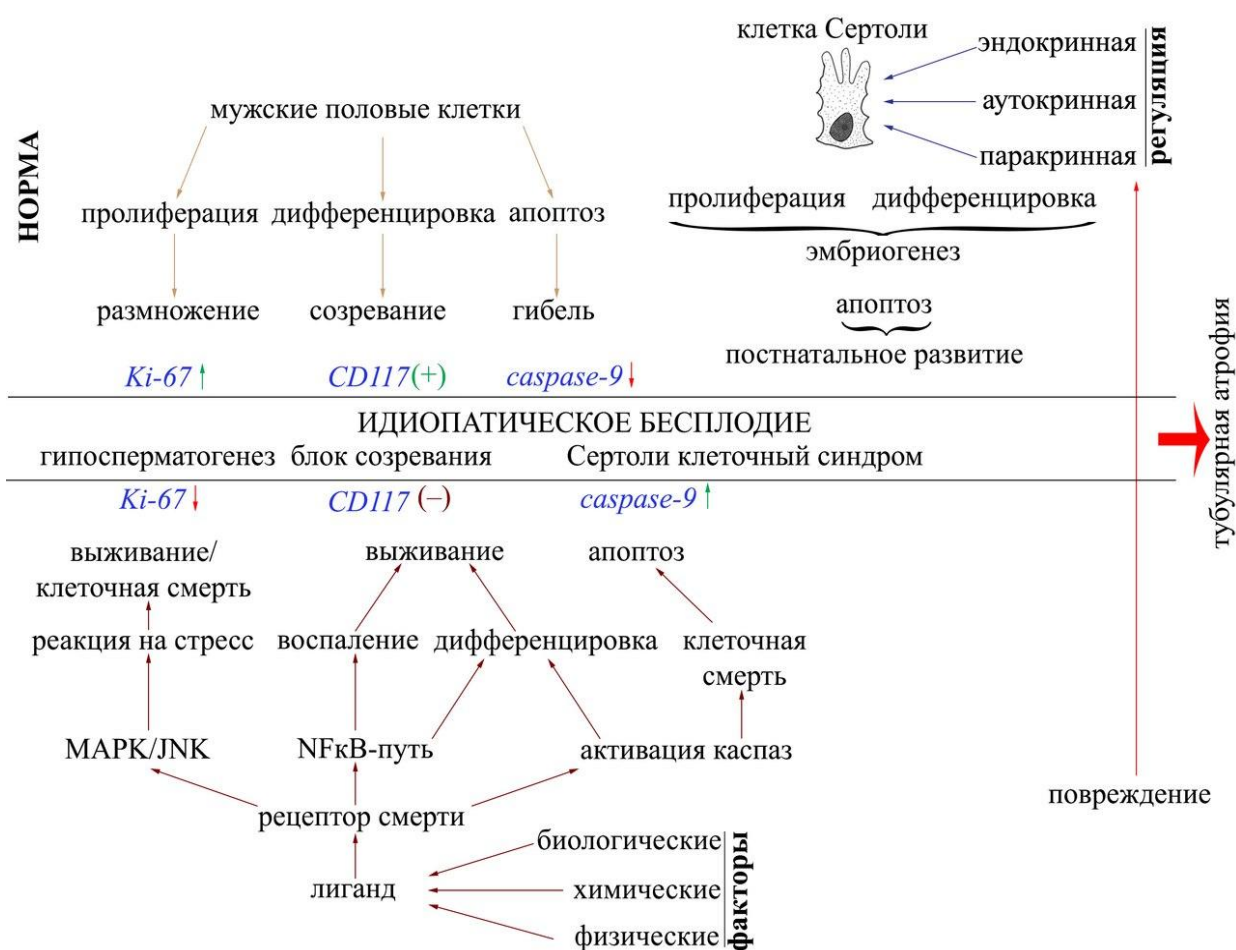
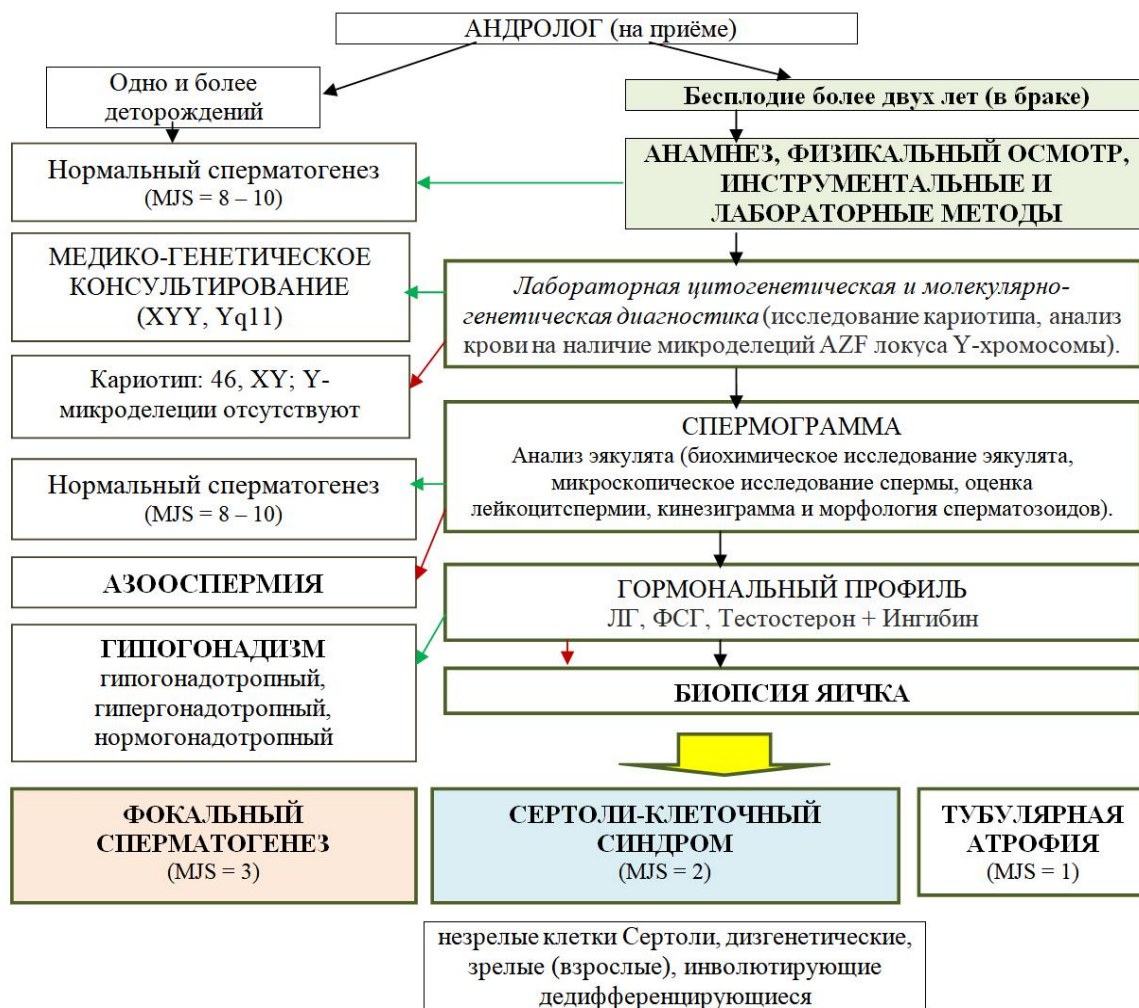


Рисунок 57. Патогенез идиопатической формы мужского бесплодия, схема.

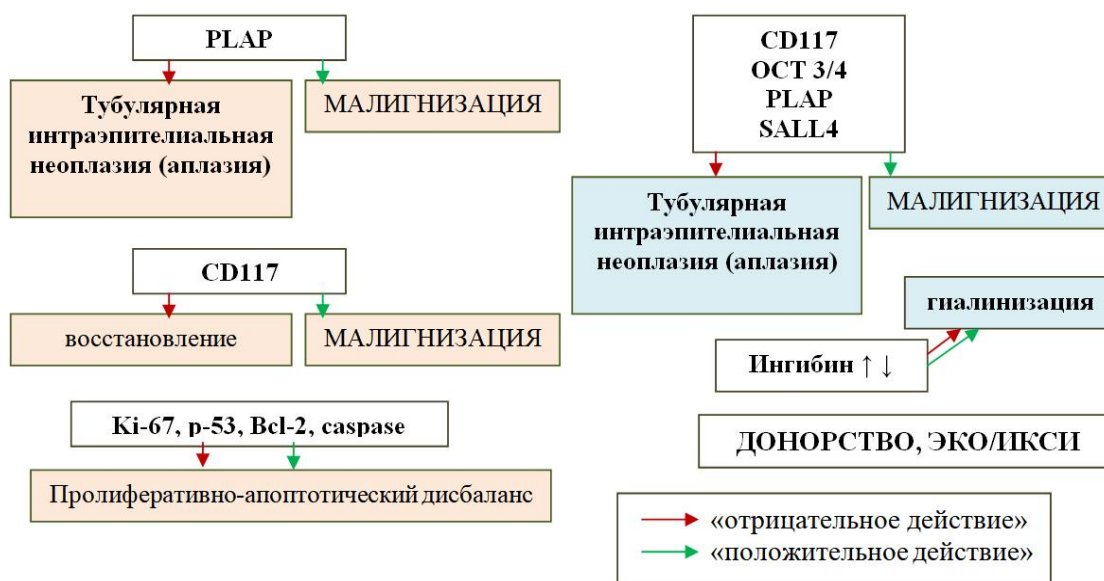
Таблица 21. Степень выраженности белков в элементах семенных канальцев и его окружения в норме и при идиопатическом бесплодии

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»), круглые сперматиды («ve±»)	пролиферация	положительная ИГХ-реакция отмечена в ядрах единичных сперматогоний («ve+2»)	снижение пролиферации при бесплодии и в пожилом возрасте
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»)	антиапоптоз внутренний путь (митохондрия)	сперматогонии («ve-»); зрелые клетки Сертоли («ve+1») и незрелые клетки Сертоли («ve+1»)	снижение антиапоптозной активности при бесплодии и у мужчин пожилого возраста
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 апоптогической активности при идиопатической форме мужского бесплодия и у мужчин пожилого возраста
PLAP	половые	только в раннем эмбриогенезе – в единичных сперматогониях («ve+3»)	дифференцировка	ИГХ-реакция визуализируется в цитолемме сперматогоний («ve+2») до трети от общего 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 плюрипотентных свойств у половых клеток при бесплодии; увеличение стволовых свойств в гаметах поздних стадий сперматогенеза
IGF-I	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-I в клетках Сертоли; слабый уровень экспрессии в единичных клетках Сертоли («ve+1») и в цитоплазме некоторых сохранившихся сперматогоний («ve±»)	снижение уровня контролируется связывающими протеинами – расщепление IGFBP3, что снижает рост клеток при бесплодии

Клинико-морфологический диагностический алгоритм идиопатической формы мужского бесплодия (графологическая структура)



ИММУНОГОСТОХИМИЧЕСКИЙ АСПЕКТ



Диагностический алгоритм верификации, дифференциальной диагностики и интерпретации биоптатов яичка (графологическая структура)

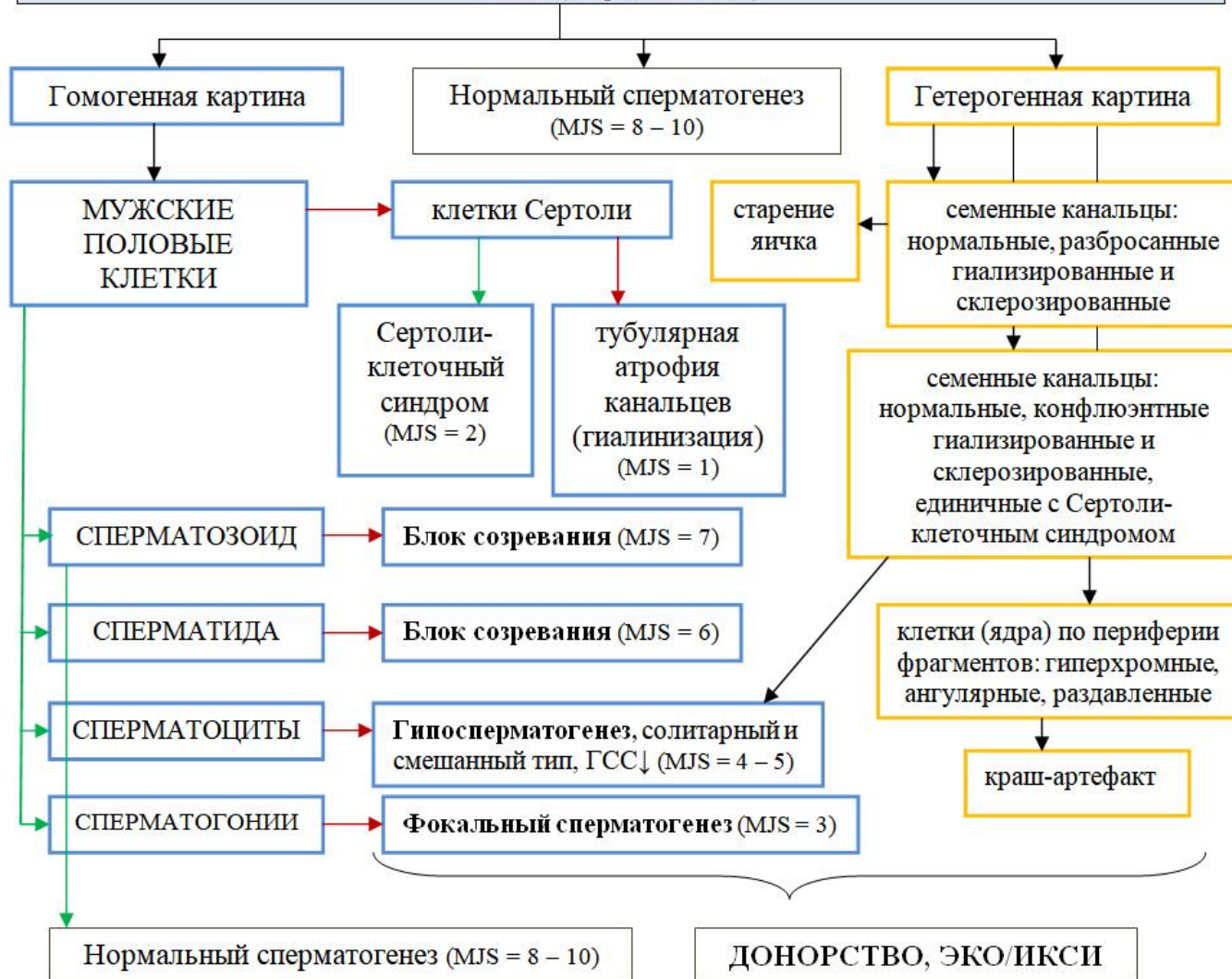
**МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯИЧЕК
(СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦЕВ, ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ТКАНИ и КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ)**

Общая морфологическая оценка (увеличение $\times 40$); окраска биоптата – гематоксилином и эозином

- Полуколичественная оценка структур яичка (> 75 семенных канальцев на поперечных срезах);
 - Общая гетерогенность, наличие половых клеток внутри семенных канальцев, гранулёмы, интерстициальный фиброз, воспаление

Детальная морфологическая оценка (увеличение $\times 200 - 400$)

- Стадии сперматогенеза, количественная и пропорциональная характеристика мужских половых клеток (сперматозоидов).



→ «НЕТ»
→ «ДА»

MJS – Шкала S. Johnsen (баллы),

ГСС – гаметно-сертоли-клеточное соотношение (у молодых мужчин в норме = 13:1)

Морфологический алгоритм тестикулярной дифференциальной диагностики при мужском идиопатическом бесплодии

структуры	характеристика	Баллы (трактовка)
Возраст	22 – 35 лет	–
Объём яичек	одно/оба резко уменьшены, ткань дряблая на ощупь	
спермограмма	удлинённые клетки Сертоли («стоповидные клетки») – гигантские клетки: одно и двухядерные спермиофаги с прозрачной цитоплазмой. В этих клетках – включения в виде головок сперматозоидов (фагоцитоз)	Азооспермия // Астенозооспермия // Олигозооспермия, тяжёлой степени
<p><i>Рисунок (фото):</i></p> <p>1 – сперматогония (дегенерирующая), 2 – клетка Сертоли (ядро), 3 – клетка Лейдига.</p>		

Мужские половые клетки

Диаметр извитого семенного канальца (мкм)	150 – 200	0
	50 – 149 (150)	1
	≤ 50	2
количество клеток (стандарт – 40 мкм)	нет клеток	3
	резидуальные тельца (остатки клеток) сперматогонии	4
	другие половые клетки	2
ИГХ-диагностика	PLAP+	онкориск
	CD117+	нет SSC

клетки Сертоли

количество клеток (стандарт – 40 мкм)	2 – 3	0
	зрелые формы ≥ 4	3
	незрелые формы ≥ 1	4
	дегенерирующие формы ≥ 1	7

клетки микроокружения:

миоидные клетки	количество клеток (стандарт – 40 мкм)	1 – 2	0
клетки Лейдига	количество клеток (стандарт – 100 мкм)	6 – 8	норма
		≥ 15	Гиперплазия
	Морфология: крупные клетки, светлая пенящая цитоплазма (зернистая)		

	<i>Морфология:</i> гипертрофия ядер (тёмные), богаты хроматином, наличие телец полового хроматина (метод Фельгена)	синдром Клайнфельтера
Интерстициальная ткань	гиперплазия соединительнотканых элементов	Нодулярная пролиферация*

**Комментарий* Морфологический анализ показал наличие диффузной неравномерной гиперплазии и нодулярных пролифератов интерстициальной ткани, что может быть проявлением предвестников опухолевого процесса. Поэтому биопсия в подобных случаях может быть полезна как для раннего распознавания предопухолевых процессов в яичке, так и для суждения о путях их дальнейшего развития.

Алгоритм оценки:

баллы	Морфологическое ЗАКЛЮЧЕНИЕ	
	Международная транскрипция (англ.)	Русский эквивалент
0	Norm	Норма
1	Testicular dysgenesis syndrome (TDS)	Синдром тестикулярной дисгенезии
2 – 4	Germ cell aplasia (GCA), subtotal	Аплазия мужских половых клеток, субтотальная
5 – 7	Germ cell aplasia (GCA)	Аплазия мужских половых клеток
8 – 9	Sertoli cell only-syndrome (SCA), focalis	Сертоли-клеточный синдром, фокальный вариант
10	Sertoli cell only-syndrome (SCA)	Сертоли-клеточный синдром
≥10	Tubular atrophy (TA)	Атрофия семенных канальцев

0	Норма (семенные канальцы 150 – 200 мкм; половые клетки обнаружены)
1	Азооспермия на фоне обтурации семявыносящих путей (семенные канальцы 50 – 80 мкм)
2	Гипосперматогенез (сперматогонии, сперматоциты I и II, количество удлинённых сперматид заметно уменьшается) и клетки Сертоли
3 – 4	В большинстве срезах описываемая морфологическая картина соответствует субтотальной аплазии мужских половых клеток (GCA) – кроме сперматогониев других половых клеток не обнаружено
5 – 7	В большинстве срезах описываемая морфологическая картина соответствует тотальной аплазии мужских половых клеток (GCA) – половых клеток не обнаружено
8 – 9	В большинстве срезах описываемая морфологическая картина соответствует фокальному варианту Сертоли-клеточного синдрома.
10	В большинстве срезах описываемая морфологическая картина соответствует Сертоли-клеточному синдрому: гибель сертолиева эпителия, гипоплазия семенных канальцев, герминальная аплазия, перитубулярный склероз
≥10	Семенные канальцы заметно сужены, стенка их лишена клеточных структур – тубулярная атрофия.

В Ы В О Д Ы

1. Идиопатическая форма мужского бесплодия состоит из форм-фаз: гипосперматогенез, блок созревания, фокальный и классический варианты Сертоли-клеточного синдрома (синдром только клеток Сертоли), характеризующие прогрессирующие нарушения сперматогенеза.

2. Стадии гипосперматогенеза и блока созревания при идиопатической форме мужского бесплодия характеризуются снижением пролиферации сперматогоний, нарушением их дифференцировки и наличием эмбриональных PLAP-позитивных клеток.

3. При Сертоли-клеточном синдроме и его фокальном варианте отмечается доминирование апоптоза клеток Сертоли и единичных сперматогоний на фоне полного отсутствия их пролиферации.

4. Снижение уровня пролиферации сперматогоний при идиопатической форме мужского бесплодия является причиной гипосперматогенеза на ранних стадиях заболевания, а отсутствие дифференцировки сперматогоний вызываемое блоком их созревания сочетанием увеличения уровня апоптоза на поздних стадиях.

5. Отличия физиологического сперматогенеза в зрелом (22 – 35 лет) и пожилом (64 – 75 лет) возрастных периодах заключаются в следующем: у молодых мужчин обнаружено доминирование пролиферации над апоптозом, а у лиц пожилого возраста – при сохранном уровне размножения сперматогоний визуализируется относительная активация клеточной гибели, что может рассматриваться как механизм физиологической элиминации aberrantных гамет, риск возникновения которых в период старения возрастает.

6. Механизмы формирования возрастных физиологических изменений отличаются при патогенезе идиопатического бесплодия, что подтверждается сравнительными иммуногистохимическими показателями половых клеток и клеток Сертоли: снижение и последующее отсутствие пролиферации и

дифференцировки сперматогоний при бесплодии, характерное для пожилых мужчин.

7. Низкое содержание инсулиноподобного фактора роста-I в сперматогониях приводит к гипосперматогенезу и нарушению созревания половых клеток в патогенезе мужского бесплодия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Приведенные данные могут послужить основой для развития и совершенствования методов обследования дисфункциональных состояний мужской репродуктивной системы, для разработки новых подходов при диагностике и лечении врожденной тестикулярной формы бесплодия и комбинированной адъювантной терапии опухолей яичка.

Полученные результаты по взаимодействию половых клеток с их микроокружением в норме и при патологии целесообразно более широко использовать в учебном процессе, учебных и методических пособиях при изложении материала, связанного с Мужской репродуктивной системой курса Гистологии, Патологической анатомии, Онкологии, Урологии и Андрологии в Медицинских ВУЗах, на биологических факультетах университетов и педагогических институтов.

Предложен метод подсчёта на гистологических препаратах яичка мужских половых клеток, сустентоцитов (клеток Сертоли) и интерстициальных эндокриноцитов (клеток Лейдига) с использованием условных стандартов.

Приведены морфологические критерии для оценки степени поражения при мужском идиопатическом бесплодии на гистологических препаратах (биоптатах) – алгоритм тестикулярной дифференциальной диагностики.

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- **Bcl** – B-cell lymphoma gene – ген В-клеточной лимфомы.
- **EGF** – англ. Epidermal Growth Factor – Эпидермальный фактор роста.
- **FGF** – англ. Fibroblast Growth Factor – Фактор роста фибробластов.
- **GCA** – англ. Germ cell aplasia – Аплазия мужских половых клеток.
- **GH** – англ. Growth Hormone – Гормон роста, или соматотропный гормон, или СТГ, или соматотропин, или соматропин.
- **H&E** – англ. Hematoxylin and eosin – гематоксилин и эозин.
- **ICSI** – англ. Intracytoplasmic Sperm Injection – Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ).
- **IFN** – англ. Interferon – интерфероны.
- **IGF** – англ. Insulin-like Growth Factor – Инсулиноподобный фактор роста, или соматомедин.
- **LIF** – англ. Leukemia inhibitory factor – Фактор-ингибитор лейкемии.
- **OCT** – англ. Octamer-binding transforming factor – Октамер-связывающий трансформирующий фактор.
- **PCD** – англ. Programmed cell death – запрограммированная клеточная смерть.
- **PCNA** – англ. Proliferating Cell Nuclear Antigen – Ядерный антиген клеточной пролиферации.
- **PLAP** – англ. Placental alkaline phosphatase – Плацентарная щелочная фосфатаза.
- **SCO-s** – англ. Sertoli-cell-only syndrome – Сертоли-клеточный синдром.
- **SCO-sF** – англ. Sertoli-cell-only syndrome focalis – Сертоли-клеточный синдром, фокальный вариант (сперматогенеза).
- **SCF** – англ. Stem cell factor – Фактор стволовых клеток.
- **TESE** – англ. Testicular sperm extraction – Тестикулярная экстракция сперматозоидов (ТЭС).
- **TGF** – англ. Transforming growth factor – Трансформирующий фактор роста.
- **TNF** – англ. Tumor necrosis factor – Фактор некроза опухолей.
- **VEGF** – англ. Vascular Endothelial Growth Factor – Васкулярно-эндотелиальный фактор роста.
- **ВОЗ** – Всемирная организация здравоохранения (WHO).
- **ЛГ** – лютеинизирующий гормон, или лютеотропин, или лютропин.
- **м.о.** – мерный отрезок.
- **ФСГ** – фолликулостимулирующий гормон, или фоллитропин.
- **ЭКО** – экстракорпоральное оплодотворение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Основы патологоанатомической практики. Руководство. М.: РМАПО. – 1998. – 505 стр.
2. Астраханцев А.Ф. Структура мужских половых желез в постнатальном онтогенезе.// Автореф. дис. д.м.н.; Рязань, 1996, 48 с.
3. Алёшкин В.А. Иммунология репродукции: пособие для студентов, врачей, ординаторов и науч. работников / В.А. Алёшкин, А.Н. Ложкина, Э.Д. Загородняя. – Чита, 2004. – 79 с.
4. Андреева Ю.Ю., Франк Г.А. Опухоли мочевыделительной системы и мужских половых органов (под ред.) Издательский дом «Практическая медицина» – 2012. – 218 стр.
5. Боровская Т.Г. Влияние хинина на морфологию семенников мыши [Текст] / Т.Г. Боровская, Е.Л. Гольдберг, Е.В. Абрамова, Т.И. Фомина, С.Г. Ткаченко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2000. – №10. – С. 445–447.
6. Боронихина Т.В. Морфофункциональные изменения бульбоуретральных желез человека в постнатальном онтогенезе.// Дис. д.м.н.; Москва, 2007, 267 с.
7. Бочарова Е.Н. Морфологическая и молекулярно-биологическая характеристика мужских гамет при патоспермии и идиопатическом бесплодии. // Дис. д.м.н.; Москва, 2008, 215 с.
8. Брагина Е.Е., Курило Л.Ф., Абдумаликов Р.А., Бочарова Е.Н., Михайлова Е.М., Гришина Е.М., Шилейко Л.В., Сорокина Т.М. Множественные дефекты ультраструктурной организации жгутика сперматозоида у пациента с абсолютной астенозооспермией // Проблемы репродукции. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 66 – 69.
9. Буньков К.В. Морфометрические сравнительные соотношения канальцево-стромального и эпителиально-стромального индексов яичек плодов. Морфологические ведомости. 2015. №2. С. 35-41.

10. Буньков К.В. Морфогенетические потенции сосудистого (капиллярного) компонента коммуникационных систем в тканях яичек плодов и у лиц с врожденным крипторхизмом: диссертация кандидата медицинских наук: 14.03.02 / Саратовский государственный медицинский университет.- Смоленск, 2015.- 198 с.
11. Быков В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века (обзор литературы) [Текст] / В.Л. Быков // Проблемы репродукции. – 2000. – № 1. – С. 10 – 21.
12. Волкова О.В., Боровая Т.Г. Морфогенетические основы развития и функции яичников. М, 1999. – 252 стр.
13. Галимова Э.Ф. Влияние экстремальных факторов на мужскую репродуктивную систему [Текст] / Галимова Э.Ф., Фархутдинов Р.Р., Галимов Ш.Н., Гизатуллин Т.Р. // Проблемы репродукции. – 2010. – Vol. 4. – P. 60 – 65.
14. Гамидов С. Идиопатическое бесплодие у мужчин: эпидемиология, этиология, патогенез, лечение / Гамидов С., Авакян А. Врач: научно-практический и публицистический журнал. - М.: ИД «Русский врач», №7. – 2013. – С. 2 – 4.
15. Гимадеев М.М. Влияние факторов окружающей среды на репродуктивную функцию женщин и на здоровье новорожденных / М.М. Гимадеев М.М., Бородин Ю.И., Орлов Ю.В. // Казанский мед. журн. 1998. – Т.79, № 2. – С. 126 – 131.
16. Зайратьянц О.В. Медико-демографические показатели. Россия - XX век и начало XXI века / О. В. Зайратьянц, Г. Б. Ковальский, М. Г. Рыбакова и др. // Терапевт: научно-практический ежемесячный журнал. – 2007.– N 6 . – С. 40 – 63.
17. Каган С.А. Патология сперматогенеза. М. «Медицина» – 1969. – 211 стр.

18. Калашникова П.А. Антигены сперматозоидов и антиспермальные антитела ассоциированные с бесплодием (обзор литературы) // Проблемы репродукции. 2004. – № 4. – с. 55 – 60.
19. Кулаков В.И. Руководство по охране репродуктивного здоровья / В.И. Кулаков В.Н. Серов, Л.В. Адамян и др. М.: Триада-Х, 2001. – 568 с.
20. Курило Л.Ф. Развитие эмбриона человека и некоторые морально-этические проблемы методов вспомогательной репродукции. Проблемы репродукции, №3 – 1998. – с. 39 – 49.
21. Лушников Е. Ф., Шапиро Н. А. Аутолиз. М., Медицина, 1974, 199 с.
22. Молдавская А.А., Горбунов А.В., Калаев А.А., Жабина А.В., Серебряков А.А., Болдырев Д.В., Кондратьев А.С. Современные методы исследования эмбриона человека. Вестник Тамбовского университета: Естественные и технические науки. 2014. Т.19. №1. С. 87-89.
23. Мацко Д.Е., Иванцов А.О. Патологическая анатомия герминогенных опухолей // Практическая онкология. – 2006. – Т.7, №1. – С. 6 –15.
24. Мирский В.Е. Детская и подростковая андрология [Текст] / В. Е. Мирский, В.В. Михайличенко, В.В. Заезжалкин. – СПб.:Питер, 2003. – 224 с.
25. Морфологическая характеристика биоптатов яичка при бесплодии [Текст] / Е. А. Дубова [и др.] // Архив патологии. – 2012. – № 6. – С. 8 – 12.
26. Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л. Молекулярная биология, М., МИА, 2003, 544 стр.
27. Руководство ВОЗ по стандартизованному обследованию и диагностике бесплодных супружеских пар / пер. с англ. Р. А. Нерсеяна, 1997.
28. Иммунологические факторы бесплодия и антигены сперматозоидов / Д.А. Охоботов, Е.И. Зарайский, Г.В. Павлова [и др.] // Мед. науки. – 2007. – №4. – С. 31 – 42.
29. Потапов С. Н., Потапов С. Н., Яковцова А. Ф. Иммуногистохимические особенности семенных желез плодов и новорождённых от матери с преэклампсии / «Проблемы эндокринной патологии», № 1. – 2010. – С. 68 –75.

30. Патология. Берестова А.В., Берченко Г.Н., Варшавский В.А., Волощук И.Н., Гавриш А.С., Гуревич Л.Е., Дубова Е.А., Зайратьянц О.В., Иванов А.А., Казанцева И.А., Кактурский Л.В., Коган Е.А., Кондриков Н.И., Кононов А.В., Кудрявцев Ю.В., Литвицкий П.Ф., Мацко Д.Е., Пархоменко Ю.Г., Пирожков С.В., Повзун С.А. и др. Руководство / Москва, 2015. (2-е издание, исправленное и дополненное).
31. Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. Москва, «Наука» – 1985 – 206 стр.
32. Сухарев А.Е., Булах Н.А., Ахушкова Л.М. Плацентарная щелочная фосфатаза – маркер эмбриональных и малигнизированных тканей // Успехи современного естествознания. – 2011.– № 4 – С. 41 – 46.
33. Униговская, М.В. Клинико-анамнестическая характеристика пациенток с бесплодием с разными уровнями антиспермальных антител в крови / М.В. Униговская, Б.И. Медведев, С.Н. Теплова // Вестн. ЮУрГУ. – 2010. – №6. – С. 116 – 118.
34. Филоненко Т.Г., Давыдова А.А., Бабушкин Е.Ю., Нечипоренко Г.В. Морфология сперматогенеза при обструктивной азооспермии. Таврический медико-биологический вестник. 2013, том 16, №1, ч.3 (61). С. 225-228.
35. Чехонацкая М.Л., Колесникова Е.А., Маслякова Г.Н., Спиркина Т.В. Развитие фетальных яичек при неосложнённом течении беременности. Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2014. Т.4. №1. С. 62-64.
36. Шапиро Н.А. Принципы цитологической диагностики злокачественных опухолей: Цветной атлас. – М.: «Репроцентр М», 2008. – 350 с.
37. Шаповалова Е. Ю., Бойко Т. А., Барановский Ю. Г., Каракулькина О. А., Барановский А. Г. Сравнительный анализ пролиферации и гибели клеток органов производных разных зародышевых листков у человека в процессе раннего эмбрионального гистогенеза // Гистогенез и регенерация тканей. – СПб. – С. 212 – 217.

38. Ярыгин К.Н., Холоденко И.В., Кониева А.А., Бурунова В.В., Таирова Р.Т., Губский Л.В., Чеглаков И.Б., Пирогов Ю.А., Ярыгин В.Н., Скворцова В.И. Механизмы положительного влияния трансплантации МСК плаценты человека на восстановление крыс после экспериментального ишемического инсульта // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009, т. 148, № 12, С. 699-702.
39. Ackland J.F., Schwartz N.B., Mayo K.E., Dodson R.E. Non-steroidal signal originating in the gonad/ *Physiol. Rev.* – 1992. – Vol. 72. – P. 731 – 87., 2012.
40. Aafjes J.H., van der Vijver J.C., Schenck P.E. Value of a testicular biopsy rating for prognosis in oligozoospermia. *Br Med J.* 1:289 –290., 1978.
41. Aimaretti G., Attanasio R., Cannavò S., Nicoletti M.C., Castello R., Di Somma C., Garofalo P., Iughetti L., Loche S., Maghnie M., Mazzanti L., Saggese G., Salerno M., Tonini G., Toscano V., Zucchini S., Cappa M., //Growth hormone treatment of adolescents with growth hormone deficiency (GHD) during the transition period: results of a survey among adult and pediatric endocrinologists from Italy. Endorsed by SIEDP/ISPED, AME, SIE, SIMA // *Journal of Endocrinological Investigation*/2015.– Vol. 38. – P. 377 – 382.
42. Albers P., Albrecht W., Algaba F., Bokemeyer C., Cohn-Cedermark G., Fizazi K., Horwich A., Laguna M. "EAU guidelines on testicular cancer: 2011 update". *Eur. Urol.* 60 (2): 304–19.
43. Albrecht W. Testicular tumor markers: Corner-stones in the management of malignant germ cell tumors. *J Lab Med.* 2004. 28 (2): 109–115.
44. Almeida C., Correia S., Rocha E., Alves A., Ferraz L., Joquina F., Mario S., Alberto B. // Caspase signaling pathways in human spermatogenesis. *J Assist Reprod Genet* (2013) 30:487–495.
45. Amo Y., Masuzawa M., Hamada Y., Katsuoka K. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients // *British Journal of Dermatology*, 150 (1), 2004. – P. 160 – 161.

46. Amsterdam A., Sasson R. The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2002. 189(1- 2):1-9.
47. Andersson A.M., Petersen J.H., Jørgensen N., Jensen T.K., Skakkebaek N.E.// Serum inhibin B and follicle-stimulating hormone levels as tools in the evaluation of infertile men: significance of adequate reference values from proven fertile men // *J. Clin Endocrinol Metab.* – 2004, Jun; 89(6). P. 2873 – 9.
48. Anniballo R., Brehm R., Steger K. // Recognising the Sertoli-cell-only (SCO) syndrome: a case study. // *Blackwell. Verlag. GmbH Æ // J. Andrologia/* – 2011. – Vol. 43, P. 78–83.
49. Anthony C.T., Rosselli M., Skinner M.K. Actions of the testicular paracrine factor (P-Mod-S) on Sertoli cell transferrin secretion throughout pubertal development. *Endocrinology.* 2012. 129, 353-360.
50. Bahamondes L., Makuch Y. Infertility care and the introduction of new reproductive technologies in poor resource settings // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 12 – 2014. – p. 87.
51. Bergers G., Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy // *Nat. Rev. Cancer*, 8 (8), 2008. – P. 592 – 603.
52. The BioGenex Molecular Pathology Catalog 2014 – 2015, 245.
53. Bodey B., Bodey B.Jr., Siegel S.E., Kaiser H.E. Immunocytochemical detection of the homeobox B3, B4, and C6 gene products in childhood medulloblastomas/primitive neuroectodermal tumors // *Anticancer Res.* 2003. May-Jun. 20(3A). P. 1769 – 80.
54. Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology*, 3rd Edition. 2014. P. 976.
55. Bishop J.M. // *The molecular genetics of cancer*// *J. Science.* – 1987. – Vol. 235. P. 305–11.
56. Brugnon F., Pons-Rejraji H. // Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity// *J. Anim.Sci.* 2010. Vol. 88 (4). P. 1321-1331.

57. Canadian Neighbor Pharmacy// Sex-Specific Differences in Mouse: result. // J. Treatment of Disease Today. – 2014.
58. Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia.// Asian J. Androl. – 2006; 8 (2). P. 143 – 157.
59. Chang E.S., Mykles D.L. // General and Comparative Endocrinology. – 2011. – Vol. 172, Issue 3/ P. 323 – 330.
60. Claesson-Welsh L. VEGF-B Taken to Our Hearts: Specific Effect of VEGF-B in Myocardial Ischemia // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 28 (9). – 2008. – P. 1575 – 1576.
61. David R. Clemmons. The relative roles of growth hormone and IGF-1 in controlling insulin sensitivity // J. Clin. Invest. 2004. – Jan. 1; 113(1). P. 25–27.
62. Coates P., Hales S., Hall P. // The association between cell proliferation and apoptosis: studies using the cell cycle-associated proteins Ki-67 and DNA polymerase alpha // J. Pathol. – 1996. – Vol. 178: P. 71-77.
63. Culig Z., Bartsch G., Hobisch A. (2002)// Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth //Mol Cell Endocrinol., 197, P. 231 – 238; Coates P., Hales S., Hall P. et al., 2001.
64. Dabbs D.J. Diagnostic immunohistochemistry [Text] / D.J. Dabbs «Diagnostic immunohistochemistry», 3rd Edition, 2010. – 854 p.
65. van Diest P.J., Brugal G., Baak J.P. Proliferation markers in tumors: interpretation and clinical value // J. Clin Pathol. – 51 – 1998. – p. 716 – 24.
66. Droz J.P. [Classification of germ cell tumors of the testis] [French] //Rev. Prat. – 2007, Feb. Vol. 57(4). P. 375 – 8.
67. Ergün S., Kilic N., Wurmbach J.H., Ebrahimnejad A., Fernando M., Sevinc S., Kilic E., Chalajour F., Fiedler W., Lauke H., Lamszus K., Hammerer P., Weil J., Herbst H., Folkman J.// Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes // J. Angiogenesis. – 2001. Vol. 4(3) P. 193 – 206.
68. Fischbach F.T., Dunning M.B. A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests, 8th/ Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008: 1344.

69. Furuchi T., Masuko K., Nishimune Y., Obinata M., Matsui Y. // Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 in spermatogonia // *J. Development* – 2004. – Vol. 122. P. 1703 – 1709.
70. Galcheva-Gargova Z., Konstantinov K.N., Wu I.H., Klier F.G., Barrett T., Davis R.J. Binding of zinc finger protein ZPR1 to the epidermal growth factor receptor // *Science*. – 1996. – Jun; 272 (5269): P. 1797 – 802.
71. Gerber H.P., Malik A.K., Solar G.P., Sherman D., Liang X.H., Meng G., Hong K., Marsters J.C., Ferrara N. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism // *Nature*. – 2002. – 417: P. 954 – 958.
72. Grieco V., Banco B., Giudice C. Immunohistochemical expression of the KIT protein (CD117) in normal and neoplastic canine testes // *J. Comp. Pathol.* – 2010. – Feb. – Apr.; 142 (2 – 3): P. 213 – 7.
73. Guo T. // *Cell Communication and Signaling* – 2015. Vol 13. P. 34 – 41.
74. Guoqiu S., Rongpei Wu, Bo Liu, Dong W., Tu Zh., Yang J. // Upstream and Downstream Mechanisms for the Promoting Effects of IGF-1 on Differentiation of Spermatogonia to Primary Spermatocytes // *J. Life sciences*. – 2014. – Vol. 04/2014/ P. 101(1 –2).
75. Gupta G.S. *Proteomics of Spermatogenesis*// Springer Science & Business Media. – 2006 г. – P. 855.
76. Gupta S., Hastak K., Afaq F. // Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis // *J. Oncogene*. – 2004. – Vol. 23. P. 2507 – 2522.
77. Gure A.O., Chua R, Williamson B., Gonen M., Ferrera C., Gnjatic, S., Ritter G., J.G. Simpson A., Yao-T. Chen, J. Old L., K. Altorki N. Cancer-Testis Genes Are Coordinately Expressed and Are Markers of Poor Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer // *Clinical Cancer Research*. – 2010. – 11 (22): P. 8055 – 8062.

78. Hai Y., Hou J. // «Long-term culture and significant expansion of human Sertoli cells whilst maintaining stable global phenotype and AKT and SMAD1/5 activation». *Cell Commun Signal*. 2015; 13: 20. P. 2-13.
79. Haidl G. // New WHO-reference limits-revolution or storm in a teapot. // *Asian J. Androl.* – 2011. – Vol. 13(2). P. 208–211.
80. Holt R.I., Simpson H.L., Sonksen P.H. The role of growth hormone-insulin-like growth factor axis in glucose homeostasis // *Diabet. Med*. 2003; 20: P. 3 – 15.
81. Honarpour, N., Gilbert, S. L., Lahn, B. T., Wang, X., Herz, J. // Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 98. P. 9683 – 9687.
82. 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.
83. Ihmann T., Liu J., Schwabe W., Häusler P., Behnke D., Bruch H.P.// High-level mRNA quantification of proliferation marker pKi-67 is correlated with favorable prognosis in colorectal carcinoma// *J. Cancer Res Clin. Oncol.* – 2004. – Vol. 130. P. 749 – 56.
84. Jaiswal D., Trivedi S., K. Agrawal N., Singh K. Dysregulation of apoptotic pathway candidate genes and proteins in infertile azoospermia patients. *Fertility and Sterility*. Vol. 104, No. 3, September 2015; 104: P.736–43.
85. Ji-Eun Im, Sun-Hwa Song, Ji Yeon Kim, Koung Li Kim, Sang Hong Baek, Dong Ryul Lee, Wonhee Suh // Vascular differentiation of multipotent spermatogonial stem cells derived from neonatal mouse testis// *Experimental & Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 44. P. 303 – 309.
86. Jin Q., Wang B., Wang J, Liu T, Yu X, Jia C, Fang X, Peng Y, Ma X.// Association between TP53 gene Arg72Pro polymorphism and idiopathic infertility in southeast Chinese Han males // *Syst. Biol. Reprod. Med*. 2013. Vol. 59(6). P. 342-6.

87. 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.
88. Kasai S., Chuma S., Motoyama N., Nakatsuji N. // Haploinsufficiency of Bcl-x leads to male-specific defects in fetal germ cells: differential regulation of germ cell apoptosis between the sexes.// *Dev. Biol.* – 2003. – Vol. 264. P. 202 – 216.
89. Koh P.O., Kim M.O. The role of mast cells in male infertility // *Expert Rev Clin. Immunol.* – 2011. – Sep.;7 (5): P. 627 – 34.
90. Kollmannsberger C., Mayer F., Pressler H. // Absence of c-KIT and members of the epidermal growth factor receptor family in refractory germ cell cancer.// *J. Cancer.* – 2002.– Vol. 95. P. 301 – 308.
91. Larner A.C., Szczepanek K., Lesnefsky E. J. Multi-tasking: Nuclear transcription factors with novel roles in the mitochondria. *Trends Cell Biol.*2012. 22, 429–437.
92. Lau S.K., Weiss L.M., Chu P.G. // Immunohistochemistry in the differential diagnosis of seminoma and embryonal carcinoma: a comparative immunohistochemical study with KIT (CD117) and CD30 // *J. Mod Pathol.* 2007. Vol. 20(3). P. 320 – 5.
93. Law H., Mushtaq I. Williams S., Malone M., Sebire N.J. Risk of germ cell malignancy in children with XY intersex versus isolated cryptorchidism by immunohistochemistry // *Fetal Pediatr. Pathol.* – 2006. – Mar – Apr; 25 (2): P. 95 – 105.
94. Lehmann. Recycle waste for nourishing soils. *J. Nature.* 2013. 504, 33.
95. Leroy X., Augusto D. CD30 and CD117 (c-kit) used in combination are useful for distinguishing embryonal carcinoma from seminoma // *J. Histochem. Cytochem.* – 2002. – Feb.; 50 (2): P. 283 – 5.

96. Liu D.L., Lu Y.P., Shi H.Y., Zhu S.X., Lü J.W., Li W.F. Expression of CD117 in human testicular germ cell tumors and its diagnostic value for seminoma and nonseminoma // *Zhonghua Nan Ke Xue.* – 2008. – Jan.; 14 (1): P 38 – 41.
97. Loveland K.L. // Apoptosis regulator bcl-w is essential for spermatogenesis but appears otherwise redundant // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – Vol. 13. P. 12424 – 31.
98. Lopez-Beltran A., Menendez C.L., Cheng L. // *Tumors and Tumor-like Conditions in Urological Pathology* // 2014. – pp. 437.
99. Lorient A., Boon Th., de Smet Ch. Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia // *Int. J. Cancer.* 2003. 105; P. 371 – 376.
100. Lu N.X., Xia Y.K. // Lack of association between polymorphisms in p53 gene and spermatogenetic failure in a Chinese population// *Andrologia.* 2007. Vol. 39(6). P. 223 – 8.
101. Maekawa M., Kamimura K., Nagano T. // Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function // *Arch. Histol. Cytol.* – 1996. – Vol. 59(1). P. 1 – 13.
102. Mailand N., Gibbs-Seymour I., Bekker-Jensen S. Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability // *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (5): p. 269 – 82.
103. Mao J., Xu H., Wang X., Huang B., Liu Zh., Zhen J., Nie M., Min L., Wu X.// Congenital combined pituitary hormone deficiency patients have better responses to gonadotrophin-induced spermatogenesis than idiopathic hypogonadotropic hypogonadism patients // *Hum. Reprod.* July 3, 2015. P. 32 – 40.
104. Mateoiu C., Pirici A., Bogdan F. // Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, Ki-67 and bcl-2 in different histologic variants of basal cell carcinoma // *Rom J. Morphol Embryol.* – 2011. – Vol. 52. P. 315–9.

105. Meachem S., Schonfeldt V., Schlatt S.// Spermatogonia: stem cells with a great perspective. // J. Reprod. – 2001. – Vol. 121, №6. P. 825 – 834.
106. Mendis S.H. Activins and inhibins in mammalian testis development: new models, new insights // Mol. Cell Endocrinol. – 2012. – Vol.15. P. 66 – 77.
107. de Miguel P.M., Royuela M., Bethencourt F.R., Ruiz A., Fraile B., Paniagua R. // Immunohistochemical comparative analysis of transforming growth factor α , epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in normal, hyperplastic and neoplastic human prostates // Cytokine. – 2009. – Vol. 11. – P. 722 –727.
108. Moldovan G.L., Pfander B., Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork// Cell 129 (4): 2007, May 18;129(4):665-79. P. 665 – 79.
109. Nakayama Y., Yamamoto T., Abé S.I. IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes.// Int. J. Dev. Biol. – 1999.– Jul.; 43 (4). P. 34 – 39.
110. Nalbandian A., Dettin L., Dym M. // Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse // Biol. Reprod.– 2003. – Vol. 69(3). P. 985 – 94.
111. Oka S., Uramoto H., Shimokawa H., Iwanami T., Tanaka F. // The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung // J. Anticancer Res. – 2011. – Vol. 31. P. 4277 – 82.
112. Oldereid N.B., De Angelis P., Wiger R. // Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis //J. Molecular Human reproduction. 2001. Vol. 7(5)/ P. 403 – 408.
113. Omu A.E., Al-Azemi M.K., Kehinde E.O., Anim J.T., Oriowo M.A., Matthew T.C. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. Med Princ Pract. 2008; 17: 108–16.
114. Pineau C., Freour T., Com E., Barriere P., Bouchot O., Jean M., Masson D. // Comparative proteomic analysis coupled with conventional protein assay as a

strategy to identify predictors of successful testicular sperm extraction in patients with non-obstructive azoospermia // *J. Andrology*. American Society of Andrology and European Academy of Andrology. – 2013. – Vol. 1. P. 414 – 420.

115. a Poché R., Saik J., West J., Dickinson M.// The mouse cornea as a transplantation site for live imaging of engineered tissue constructs // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010(4). P. 18.

116. Pons-Rejraji H., Brugnion F., Sion B., Maqdasy S., Gouby G., Pereira B., Marceau G., Gremeau A.S., Drevet J., Grizard G., Janny L., Tauveron I.// Evaluation of atorvastatin efficacy and toxicity on spermatozoa, accessory glands and gonadal hormones of healthy men: a pilot prospective clinical trial // *J. Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2014. Vol. 12. P. 65.

117. Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. Genetics of human male infertility // *Singapore Med. J.* – 2009. – Apr.; 50 (4): P. 336-47.

118. Print C.G., Loveland K.L.// Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis.// *J. Bioessays* – 2000. – Vol. 22. P. 423 – 430.

119. Rump A., Kasper G., Hayes C., Wen G., Starke H., Liehr T., Lehmann R., Lagemann D., Rosenthal A.// "Complex arrangement of genes within a 220-kb region of double-duplicated DNA on human 2q37.1." // *J. Genomics.* – 2001. – Vol. 73 (1). P. 51 – 54.

120. Salehinejad J., Zare-Mahmoodabadi R., Saghafi S., Jafarian A.H., Ghazi N., Rajaei A.R.// Immunohistochemical detection of p53 and PCNA in ameloblastoma and adenomatoidodontogenic tumor // *J Oral. Sci. Morphol Embryol.* – 2011. – Vol. 53. P. 213–7.

121. Satie A-P., Mazaund-Guittot S. // *The Journal of Biological Chemistry*. April. – 2011. P. 23280-23295.

122. Schmoll H.J., Souchon R., Krege S. // "European consensus on diagnosis and treatment of germ cell cancer: a report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group (EGCCCG)"// *J. Annals of Oncology.* – 2004. – Vol. 15 (9). P. 1377 – 99.

123. Sever M., Jones T., Roth L., Abdul Karim F., Zheng W., Michael H., Hattab E., Emerson R., Baldrige A., Cheng L. Expression of CD117 (c-kit) receptor in dysgerminoma of the ovary: diagnostic and therapeutic implications // *Modern Pathology* – 2005. – 18, P. 1411 – 1416.

124. Schon E.A., Di Mauro S., Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nature Reviews. Genetics*, 2012; 13; P. 878–890.

125. Shen G., Wu R., Liu B., Dong W., Tu Z., Yang J., Xu Z., Pan T. // Upstream and downstream mechanisms for the promoting effects of IGF-1 on differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes // *Life Sci.* – 2014. – Vol. 101(1–2). P. 49 – 55.

126. Shin Y. J., Choi J. S. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 mRNA in glial cells following focal cerebral ischemia in rats // *J. Neuroimmunol.* – 2010. – 229 (1 – 2): P. 81– 90.

127. Sjöblom T., Lähdetie J. // Expression of p53 in normal and gamma-irradiated rat testis suggests a role for p53 in meiotic recombination and repair. // *J. Oncogene.* – 1996. – Vol. 12(12). P. 2499 – 505.

128. Steger K., Aleithe I., Behre H., Bergmann M. The proliferation of spermatogonia in normal and pathological human seminiferous epithelium: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen // *Molecular Human Reproduction.* – Vol. 4. №3. – 1998. – P. 227–233.

129. Sturgeon C. Practice guidelines for tumor marker use in the clinic. // *Clin. Chem.* – 2002. – Aug. 48 (8): P. 1151 – 9.

130. Sugiyama N., Obinata M., Matsui Y. // Bcl-2 inhibits apoptosis of spermatogonia and growth of spermatogonial stem cells in a cell-intrinsic manner // *J. Mol. Reprod. Dev.* – 2001. – Vol. 58(1). P. 30 – 8.

131. Tanimoto K., Yoshida, E., Mita S., Nibu Y., Murakami K., Fukamizu A. // Human activin beta-A gene: identification of novel 5-prime exon, functional promoter, and enhancers // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 271. P. 32760 – 32769.

132. Tavalae M., Deemeh M.R., Arbabian M., Nasr-Esfahani M.H. Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012. 29; P. 31–38.
133. Turki Al-Hussain, Jennifer Gordetsky, Rafael Jimenez, Swapnil U. Rane, Sean Williamson. 2016. <http://www.pathologyoutlines.com/testis.html>.
134. Vayena E., Peterson H.B., Adamson D., Nygren K.G. Assisted reproductive technologies in developing countries: are we caring yet? // *Fertil. Steril.* – 2009; 92 (2): P. 413 –416.
135. Vayena E., Rowe P.J., Griffin P.D. Report of a Meeting. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002. Current practices and controversies in assisted reproduction; P. 383 – 385.
136. Viguera-Villaseñor R.M., Cortés-Trujillo L., Chávez-Saldaña M., Vázquez F.G., Carrasco-Daza D., Cuevas-Alpuche O., Rojas-Castañeda J.C.// Analysis of POU5F1, c-Kit, PLAP, AP2 γ and SALL4 in gonocytes of patients with cryptorchidism // *Acta Histochem*. 2015. Vol. 117(8). P. 752 – 61.
137. Wakui S., Muto T., Suzuki Y., Takahash H., Hano H. Sertoli cells proliferate in adult rats with prenatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl.// *Arch Toxicol*. Jan. 2012. P. 159-62.
138. Wandzioch E., Edling C.E., Palmer R.H., Carlsson L., Hallberg B. Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines // *Blood.* – 2004. – Jul.; 104 (1): P. 51 – 7.
139. Wang C. Proliferating Cell Nuclear Antigen. Male Reproductive Function// Springer Science & Business Media. 2007. P. 344.
140. Wang G.G., Guo Y.S., Zhou T., Shi X.D., Yu J., Yang Y., Wu Y.B., Wang J., Liu M.X., Chen X. et al. In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *Journal of Proteomics*, 2013; 79; P. 114–122.

141. Wong P.M.C., Chung S.-W., Dunbar C.E., Bodine D.M., Ruscetti S., Nienhuis A.W. Retrovirus-mediated transfer and expression of the interleukin-3 gene in mouse hematopoietic cells result in a myeloproliferative disorder.// *Mol. and Cel. Biol.* 1989. 9, N 2, P. 789 – 808.
142. Wrobel K.H., Bickel D., Kujat R // Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) // *J. Cell Tissue Res.* – 1996. – Vol. 283(2). P. 191 – 201.
143. Yan W., Huang J., Lax A-S. // Overexpression of Bcl-w in the Testis Disrupts Spermatogenesis: Revelation of a Role of BCL-W in Male Germ Cell Cycle Control // *J. Molecular Endocrinology.* – 2013. –Vol. 17, Iss. 9. P. 45 – 57.
144. Yoon M.J., Berger T., Roser J.F. Localization of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR) in equine testes // *Reprod. Domest. Anim.* – 2011. – Apr.; 46 (2): P. 221 – 8.
145. Zakin M.M., Baron B., Guillou F. Regulation of the tissue-specific expression of transferrin gene. *Hum. Reprod.* (2004) 19 (6): P. 1300-1307.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ*

1. *О.В. Волкова, И.А. Бичерова, Г.Г. Кругликов, Г.А. Демяшкин. Морфо-цитохимические особенности гамет в процессе роста // «Морфология» - Москва. – 2006. - №4. – С.34 – 35.*
2. *Г.А. Демяшкин, Н.Ш. Амиров. Паракринные механизмы регуляции функций семенника (иммуноцитохимический аспект) // «Фундаментальные исследования» – Москва. – 2009. – №2. – С. 88 – 90.*
3. *О.В. Волкова, И.А. Бичерова, В.А. Степаненко, Г.А. Демяшкин. Механизмы, управляющие базисными процессами репродукции // «Морфология» – Москва. 2009. Т. 136. №4. С. 32.*
4. *Г.А. Демяшкин. Морфологическая характеристика сперматогенеза в норме и при идиопатическом бесплодии (иммуногистохимический аспект) // «Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье». – 2015. – №4. – С. 107 – 119.*
5. *Г.А. Демяшкин. Структурно-функциональная характеристика фокального варианта синдрома клеток Сертоли (иммуногистохимический аспект) // «Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье». – 2016. – №1 (21). С. 123 – 130.*
6. *Г.А. Демяшкин. Новые подходы к диагностике мужского бесплодия: анализ биоптатов яичка с нормальным и нарушенным сперматогенезом // «Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье». – 2016. – №2 (22). С. 110 – 128.*
7. *Г.А. Демяшкин. Пролиферация и апоптоз мужских половых клеток в сперматогенном эпителии в норме и при азооспермии // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2016. – Т. 7. № 2. С. 19 – 32.*
8. *Г.А. Демяшкин, Н.Г. Кульченко. Морфологические изменения в ткани яичка при бесплодии // Андрология и генитальная хирургия. – 2016. – №3. С. 45 – 49.*

9. **Г.А. Демяшкин**, Н.Г. Кульченко, А.А. Костин, Ю.В. Самсонов, Д.В. Москвичёв. Прогнозирование резервной функции яичек у пациентов с необструктивной азооспермией // Научно-практический журнал «Исследования и практика в медицине». – 2016. – Т. 3, №3. С. 42 – 48.
10. **Г.А. Демяшкин**, Е.А. Коган, Т.А. Демура. Тканевой ингибин-В – маркёр сперматогенеза. *Патогенез*. 2016; 14(4):43 – 50.
11. **Г.А. Демяшкин**, Е.Е. Филиппов. Морфофункциональная характеристика инсулиноподобного фактора роста 1 в нормальном сперматогенезе и при идиопатическом бесплодии. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017. № 1-2. С. 236-239.
12. **G. Demyashkin**. *Tissue testicular Inhibin-B for Sertoli cell-only syndrome. European Association of Urology (EAU), Section of Andrological Urology (ESAU). Scientific Meeting. May, 2017. 66-67.*

*Курсивом выделены работы, опубликованные в журналах рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации и/или индексируемые в SCOPUS



Фотографии (цветные), таблицы, графики и дополнительная информация по диссертации «Морфологически анализ сперматогенеза – основа диагностики мужского идиопатического бесплодия (иммуногистохимический аспект), а также другие материалы располагаются в облачном хранилище данных (cloud storage).

Выражаю искреннюю благодарность

Диссертационное исследование посвящаю научному руководителю, Академику Российской Академии Наук, заведующей кафедрой гистологии и эмбриологии педиатрического факультета (1969 – 2013 гг.) Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова (РНИМУ), доктору медицинских наук, профессору

Ольге Васильевне Волковой

за развитие отечественной эмбриологии и репродуктологии,

профессорам

кафедры гистологии и эмбриологии педиатрического факультета

РГМУ им. Н.И. Пирогова:

д.б.н., Г.Г. Кругликову,

д.м.н., А.Ю. Цибулевскому,

к.м.н., М.И. Пекарскому

за ценные советы и внимание к работе в ходе её выполнения,

ректору Российского государственного медицинского университета

им. Н.И. Пирогова (1984 – 2007 гг.),

академику РАН, доктору медицинских наук, профессору

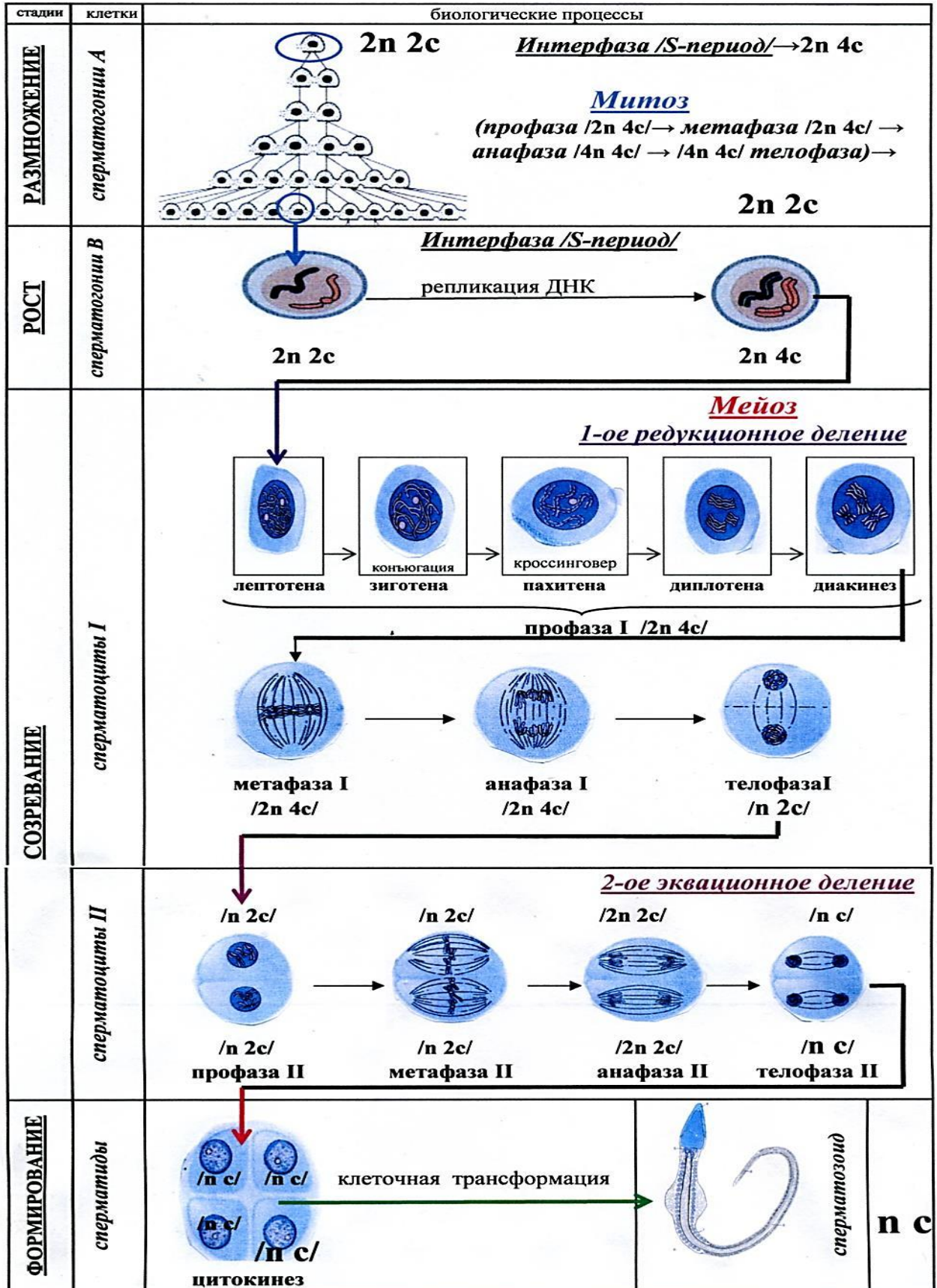
Владимиру Никитичу Ярыгину

Особую признательность и благодарность приношу Пациентам, которые принимали участие в клинико-морфологическом исследовании,

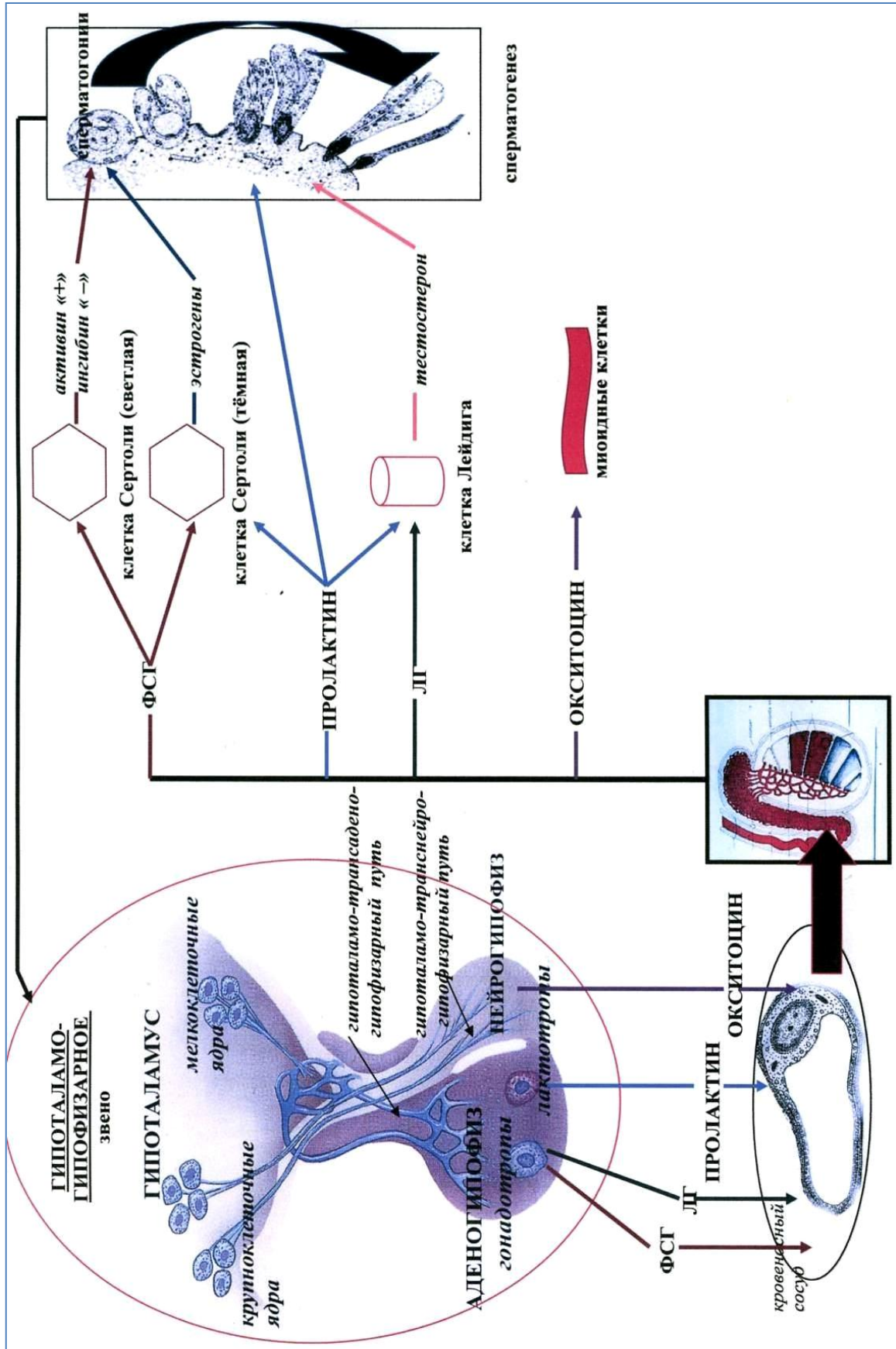
а также

врачу-лаборанту (биологу) патологоанатомического отделения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», канд.хим.наук, Н.М. Файзуллиной; заведующему Отделом патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина», д.м.н., профессору А.И. Карселадзе; заведующему патологоанатомическому отделению ФГБУ «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева», к.м.н., Д.М. Коновалову за помощь при проведении морфологических исследований.

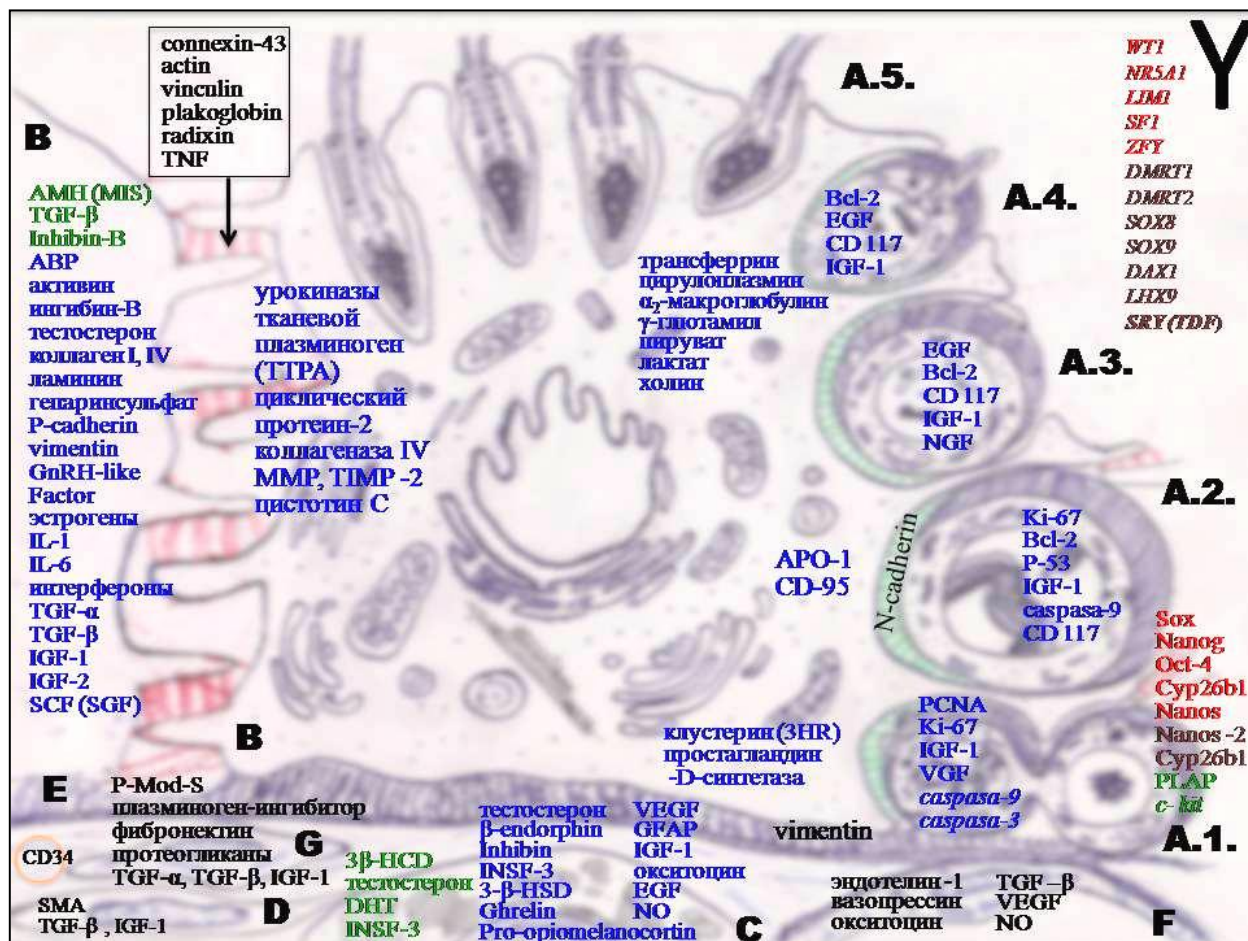
Приложение I. Сперматогенез (схема)



Приложение II. Нейрогуморальная регуляция сперматогенеза, схема



Приложение III. Протеомика антенатального и постнатального сперматогенеза (полусхематично)



Половые клетки (A): 1 – сперматогонии, 2 – сперматоциты I, 3 – сперматоциты II, 4 – сперматиды, 5 – сперматозоиды. Соматические клетки: В – клетки Сертоли, С – клетка Лейдига, D – миоидная клетка, G – фибробласт. E – базальная мембрана извитого семенного канальца. F – гемокапилляр соматического типа.

XXXX – межклеточные коммуникации: плотные сертоли-сертолиевы (TG).
||||| – межклеточные коммуникации: закрывающие сертоли-гаметные.

Гены и белки-регуляторы сперматогенеза и их топономика в онтогенезе:

- – индифферентная стадия развития гонады (до 8 недели эмбриогенеза).
- – стадия дифференциации гонады по мужскому типу (8 – 9 неделя эмбриогенеза).
- – антенатальное развитие (фетогенез).
- – постнатальное развитие.
- – белки соматических клеток.

CD34 – дендритические клетки интерстициальной ткани.

Приложение IV. Гистохимические реакции при идиопатическом бесплодии.

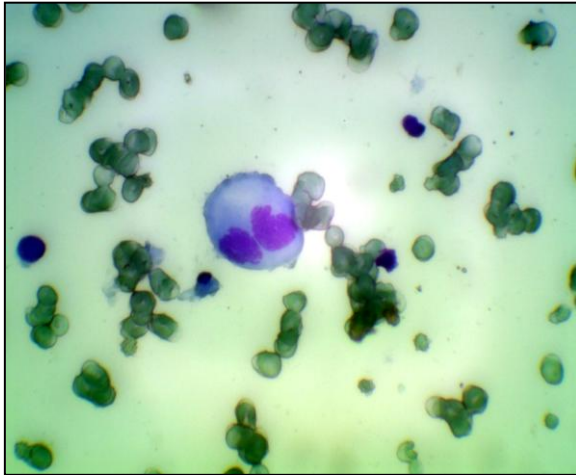


Рис. а. Яичко (в норме).
Отпечаток, окраска по G. Giemsa, ×40.
В центре – сперматоцит I, вокруг – сперматогонии и эритроциты (при резекции яичка).

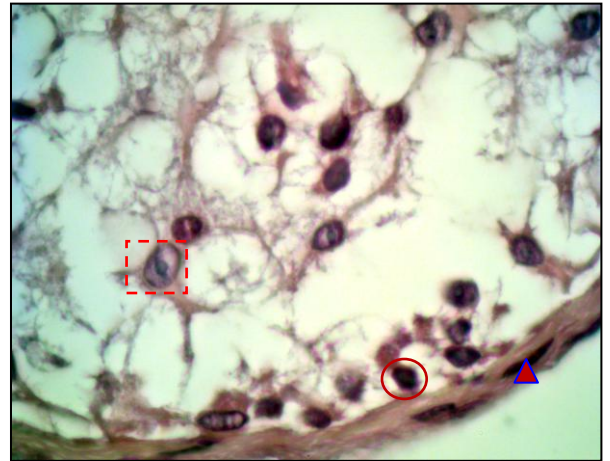


Рис. г. Яичко, SCO-sF.
H&E, ×40. О – половые клетки, □ – клетки Сертоли (ядро и ядрышко), Δ – миоидные клетки.

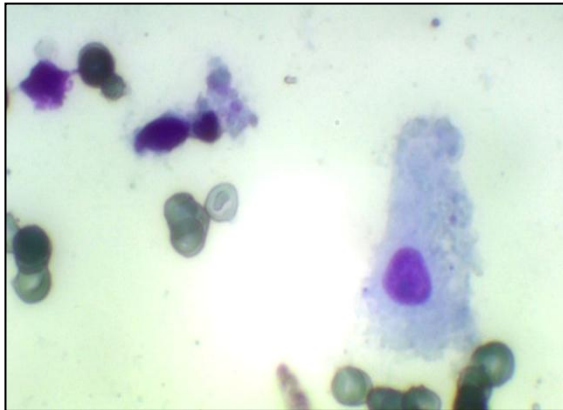


Рис. б. Яичко (в норме).
Отпечаток, окраска по G. Giemsa, ×100.
В центре – клетка Сертоли.

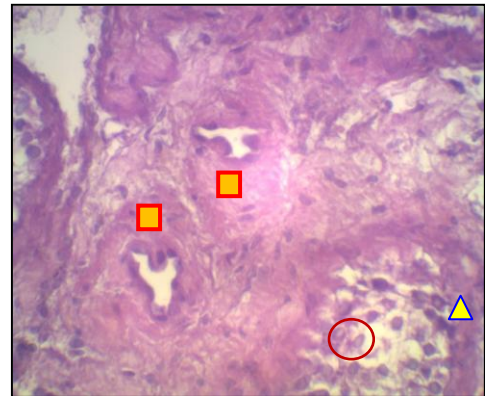


Рис. д. Яичко, SCO-sF.
H&E, ×20. О – половые клетки в просвете семенного канальца, □ – стенка кровеносного сосуда, Δ – стенка семенного канальца.

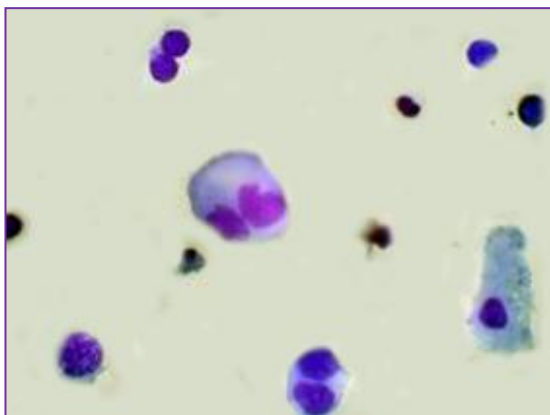


Рис. в. Яичко (в норме).
Отпечаток, окраска по G. Giemsa, ×40.

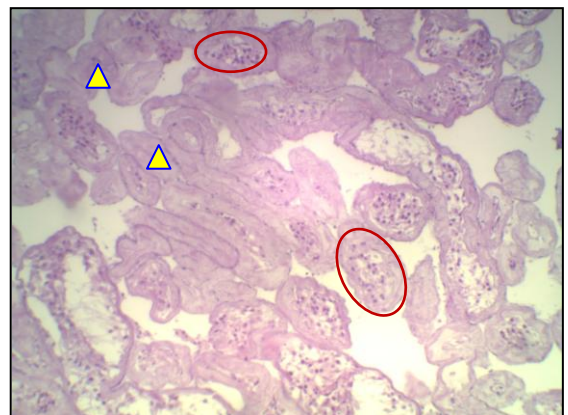


Рис. е. Яичко. H&E, ×10. О – SCO-sF, Δ – тубулярная атрофия семенных канальцев.

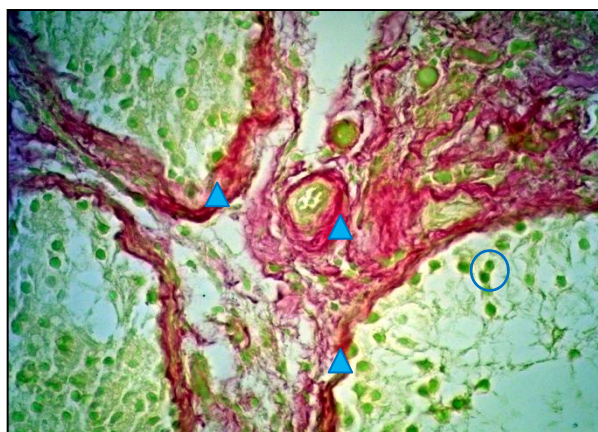


Рис. ж. Яичко, SCO-sF. Окраска по van Gieson, $\times 40$.
 O – половые клетки, Δ – коллагеновые волокна в соединительнотканном слое стенки семенных канальцев и кровеносных сосудов.

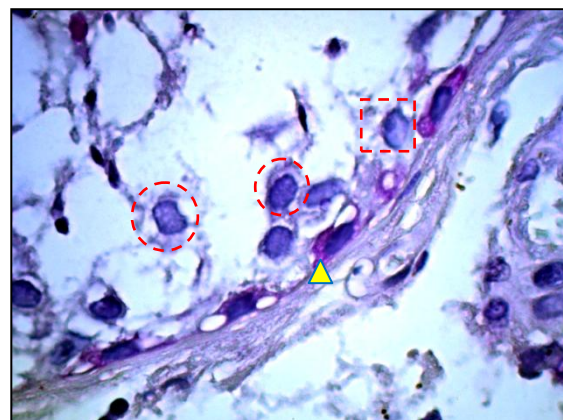


Рис. к. Яичко, SCO-sF. Окраска PAS, $\times 100$.
 O – половые клетки, Δ – включения гликогена в сперматогониях, расположенных ближе к базальной мембране; \square – незрелые клетки Сертоли (ядро).

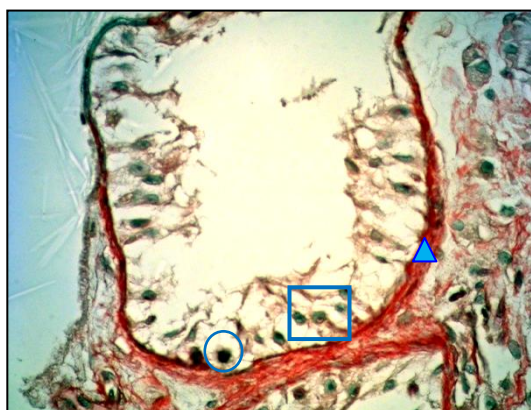


Рис. з. Яичко, SCO-sF. Окраска по Masson, $\times 40$.
 O – половые клетки, \square – клетки Сертоли (ядра), Δ – эластические волокна в соединительнотканном слое извитых семенных канальцев и кровеносных сосудов.



Рис. л. Яичко, SCO-sF.
 Окраска по Weigert, $\times 40$. O – половые клетки, Δ – эластические волокна в соединительнотканном слое семенного канальца.

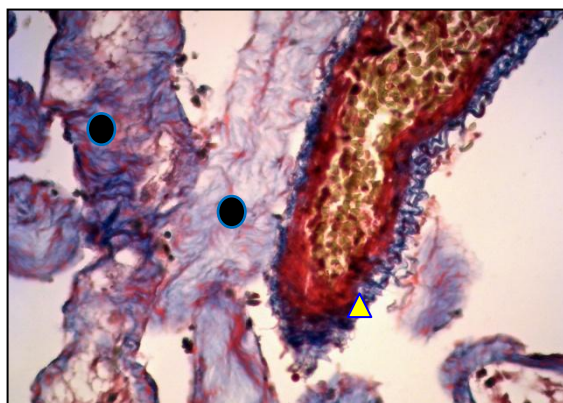


Рис. и. Яичко, гиалиноз семенных канальцев.
 Окраска по Masson, $\times 40$. O – семенные канальцы, Δ – коллагеновые волокна в стенке артерии.

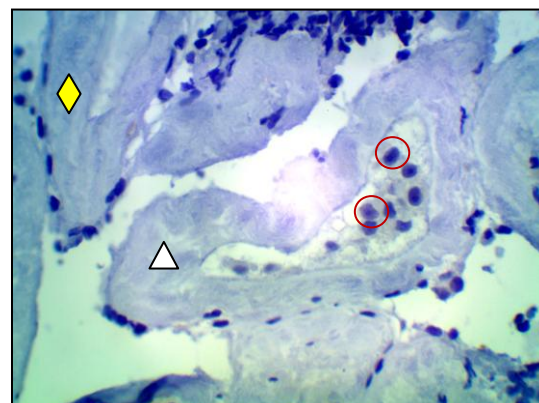


Рис. м. Яичко, SCO-s. Окраска: гематоксилин-эозин, $\times 40$. O – дегенеративные клетки Сертоли (ядра), Δ – гиалиноз стенки семенного канальца, \diamond – тубулярная атрофия

Приложение V. Протоколы исследования (шаблоны)

ПРОТОКОЛ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАБОТЫ

Дата проведения эксперимента: «__» «_____» 20__ год.

Начало: _____ Окончание: _____

Объект исследования: _____

Исследуемый фактор: _____

Разведение первичных антител: _____

время разведение	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :	1 :
количество срезов						
	1.1. Депарафинизация (ксилол) 3 раза x 5 минут					
	1.2. Дегидратация (спирт 96%) 2 раза x 10 минут					
	1.3. Aqua distillate 1 минута					
	1.4. Цитратный буфер (Citrate buffer 1x 0,07 М рН 6)на водяной бане(t= 95°C) 40 минут					
	1.5. Остужение в холодном (t= 20°C) цитратном буфере (Citrate buffer 1x 0,07 М рН 6) 20 минут					
	1.6. Aqua distillate 3 раза x 2 минуты					
	1.7. Ограничить срезы жирным карандашом Liquid blocker super rap pen					
	2.1. Block Peroxidase (t= 20°C) x 5 минут					
	2.2. Отмывание в PBS 10x Solution 0,01M рН 7,4 2 раза x 3 минуты					
	2.3. Serum block x 20 минут					
	2.4. Нанесение первичных антител x 1 час					
	3.1. Отмывание в PBS 10x Solution 0,01M рН 7,4 2 раза x 3 минуты					
	3.2. Нанесение вторичных биотилированных антител x 30 минут					
	3.4. Отмывание в PBS 10x Solution 0,01M рН 7,4 2 раза x 3 минуты					
	3.5. Streptavidin Peroxidase 30 минут					
	3.6. Отмывание в PBS 10x Solution 0,01M рН 7,4 2 раза x 3 минуты					
	3.7. DAB Substrate Chromogen 30 секунд – 20 минут					
	3.8. Aqua distillate 2 минуты, помешивая					
	4.1. Окрашивание гематоксилином					
	4.2. Aqua distillate 2 минуты, помешивая					
	4.3. Промывание проточной водой					
	4.4. Дегидратация (спирт 96%) 2 раза x 10 минут					
	4.5. Заключение в среду.					

Примечание: _____

СВОДНАЯ ТАБЛИЦА ЭКСПЕРЕМЕНТАЛЬНОЙ РАБОТЫ

Исследуемый фактор: _____

№ п/п												
разведение			1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:	1:		
дата												
1. семенной канал	1.1. клетки Сертоли	Я										
		Ц										
	1.2. сперматогенный пул	1.2.1. сперматогонии	Я									
			Ц									
		1.2.2.1. сперматоциты 1	Я									
			Ц									
		1.2.2.2. сперматоциты 2	Я									
			Ц									
		1.2.3. сперматиды	Я									
			Ц									
		1.2.4. сперматозоиды	Я									
			Ц									
		2. строма (интерстиция)	2.1. рыхлая соединительная ткань	2.1.1. клетки фибробластического ряда	Я							
				Ц								
2.1.2.	Я											
2.1.3.	Ц											
2.2. стенка сосуда	2.2.1. эндотелий		Я									
			Ц									
	2.2.2. гладкие миоциты		Я									
			Ц									
	2.2.3. адвентиция		Я									
			Ц									
2.3. клетки Лейдига	Я											
	Ц											

<https://www.morphology.pro/>



Фотографии (цветные), таблицы, графики и дополнительная информация по диссертации «Морфологически анализ сперматогенеза – основа диагностики мужского идиопатического бесплодия (иммуногистохимический аспект), а также другие материалы располагаются в облачном хранилище данных (cloud storage).