

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНСУЛИНОПОДОБНОГО ФАКТОРА РОСТА 1 В НОРМАЛЬНОМ СПЕРМАТОГЕНЕЗЕ И ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ БЕСПЛОДИИ

^{1,2}Демяшкин Г.А., ¹Филиппов Е.Е.

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва,
e-mail: 6438@list.ru;

²Научный клинический центр ОАО «РЖД», Москва

Инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР1) является универсальным фактором роста клеток. При этом, в настоящее время, мало изучена роль этого ростового фактора в сперматогенезе у мужчин пожилого возраста и страдающих бесплодием. Цель исследования: получение новых морфофункциональных данных по чувствительности и специфичности ИФР1 в мужских половых клетках в нормальном сперматогенезе и при фокальном сперматогенезе (необструктивная азооспермия). Методы. В ретроспективном исследовании проводили анализ биоптатов яичек, пациентов (n=50) с необструктивной азооспермией. Кроме того, выявляли ИФР1 в половых клетках мужчин 22 – 35 (n=10) и 64 – 75 лет (n=10). Метод – иммуногистохимический. Результаты: Содержание инсулиноподобного фактора роста-1 при необструктивной азооспермии у мужчин 22 – 35 лет снижено на 8.8% (7.0±0.22) по сравнению с таковой возрастной группой в контроле (62.0±0.33%) и на 5,7% у пожилых мужчин (40.0±0.33%). Возможно, речь идёт о нарушении паракринной регуляции синтеза IGF-I. Заключение. Зарегистрированное снижение активности экспрессии инсулиноподобного фактора роста-1 в группе идиопатического бесплодия, представляется закономерным в связи с универсальностью его роли в процессе морфогенеза в целом.

Ключевые слова: инсулиноподобный фактор роста, мужское бесплодие, биопсия яичек, азооспермия

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 IN NORMAL SPERMATOGENESIS AND IN IDIOPATHIC INFERTILITY.

^{1,2}Demyashkin G.A., ¹Philippov E.E.

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, e-mail: 6438@list.ru;

²Scientific Clinical Center of JSC «Russian Railways», Moscow

Insulin-like growth factor (IGF1) is universal cell growth factor. Nevertheless, a role of this signal molecule in spermatogenesis of normal males and in idiopathic infertility remains poorly understood. Objective: obtain new morphofunctional data about sensitivity and specificity of IGF1 in male gametes in normal spermatogenesis and in focal spermatogenesis (non-obstructive azoospermia). Methods: In retrospective research, it was conducted immunohistochemistry analysis of testicular biopsies of patients (n=82) with non-obstructive azoospermia. Also, IGF1 was revealed in male gametes aged 22 – 35 (n=10) and 64 – 75 (n=10). Level of IGF1 in non-obstructive azoospermia in males 22 – 35 years was reduced by 8.8% (7.0±0.22) comparing with that of control group (62.0±0.33%) and by 5.7% in elderly. Probably, this is about disturbance of paracrine regulation of IGF1 synthesis. Conclusion: Registered activity declining of IGF1 expression in patients with idiopathic infertility is seems logical due to its universality in process of morphogenesis in general.

Keywords: insulin-like growth factor-1, male infertility, testicular biopsy, azoospermia

Сперматогенез является динамичным процессом, реализация которого напрямую связана с численностью населения в России и мире. Нормальное течение основных стадий обеспечивается многофакторной регуляцией, как со стороны самих гамет, так и элементами микроокружения и биохимической реанжировки. Семейство инсулиноподобных факторов роста (ИФР, IGF), по структуре и функциям похожих на инсулин, включает в себя несколько представителей [1, 2, 3]. Они являются эндокринными, аутокринными и паракринными регуляторами процессов пролиферации и дифференцировки клеток. ИФР увеличивают транспорт аминокислот и глюкозы в цитоплазму, запускают каскад фосфорилирования белков и ингибируют внутриклеточные протеиназы. ИФР1 (IGF-I) синтезируется в гепа-

тоцитах [3]. Инсулин, андрогены, эстрогены повышают секрецию IGF-I печенью, а глюкокортикоиды её снижают [4]. IGF-I оказывает влияние на развитие организма на протяжении всей жизни, но его уровень в крови не постоянный: наиболее низкий уровень синтеза IGF-I отмечается в детстве и в старости, а самый высокий – во время подросткового периода жизни [4, 5, 6].

IGF-I и его рецепторы обладают широким спектром действия на мужские половые клетки, в первую очередь – стимулируют пролиферацию, стимулируют стероидогенез и этапы половой дифференцировки сперматогоний в первичные сперматоциты [7, 8, 9], его концентрация прямо коррелирует с числом сперматоцитов, находящихся на стадии пахитены [10]. У человека именно эти сперматоциты продуцируют больше всего IGF-I,

который стимулирует синтез ДНК в делящихся митозом гамет. IGF-I также обнаружен в клетках Лейдига. Миоидные клетки вырабатывают производные инсулиноподобного фактора роста, которые, в свою очередь, влияют на клетки Лейдига [11, 12, 13].

Однако в настоящее время мало изучена роль в сперматогенезе универсального ростового фактора – ИФР1 у мужчин пожилого возраста, а также, возможное участие в патогенезе Сертоли-клеточного синдрома и его вариантов и гипосперматогенезе. Количество мужчин, страдающих бесплодием с каждым годом неуклонно возрастает [14, 15]. Поэтому разработка этиопатогенетической терапии является crucialной.

Цель исследования: получение новых морфофункциональных данных по чувствительности и специфичности ИФР1 в мужских половых клетках в нормальном сперматогенезе и при фокальном сперматогенезе (необструктивная азооспермия).

Материалы и методы исследования

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

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

Работа выполнена в двух группах: I – группа с условным контролем физиологического течения сперматогенеза, в семейном анамнезе – одно и более деторождений: А – мужчины 22–35 лет (28.5±6.5, n=10); Б – мужчины 64–75 лет (69.5±5.5, n=10); II – мужчины 22 – 35 лет с идиопатической азооспермией (28.5±6.5, n=50), бесплодие в браке более двух лет. Объект исследования: во всех группах – правые семенники (яички) – биоптаты.

Гормональный анализ мужчин, страдающих бесплодием. Анализ крови забирался строго натощак из локтевой вены. Количественное содержание гормонов проводили по методикам и протоколам после титрования и утверждены для данной биохимической лаборатории. У всех мужчин уровни гормонов ФСГ, ЛГ и тестостерона в сыворотке крови в пределах возрастной физиологической нормы.

Спермограмма. Значения эякулята оценивались согласно протоколу Всемирной организации здравоохранения [14]. После чего, была сформирована груп-

па мужчин, учитывая следующие критерии: азооспермия и ФСГ ≥11.0 мЕд/мл.

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

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

Тестикулярная оценка (биопсия). Биопсия яичка была выполнена с целью выявления причины азооспермии, определения степени поражения сперматогенеза и исключения обструкции выводящих семенных протоков. Биоптаты оценивали с использованием метода, описанного S. Johnsen, с изменениями, внесенными J. Aafjes и соавт. [16].

Морфологическое исследование. Фрагменты яичек (1,0×1,0 см) фиксировали в забуференном HCl 10% формалине (pH=7,2; от 5 до 24 часов); дегидратировали в батарее спиртов восходящей концентрации и заливали в парафин. Срезы аутоптата и биоптата яичек, толщиной 4–6 ×10⁻⁶м, помещали на обычные, а для иммуногистохимического исследования (ИГХ) – на специальные адгезивные предметные стекла SuperFrostPlus (xx), депарафинировали согласно принятой стандартной методике. Впоследствии, срезы (≈5 μm) либо окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для гистологического исследования или использовали для ИГХ.

Иммуногистохимический метод (ИГХ). После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов проводили ИГХ-исследование по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max («Leica», Великобритания) на выявление ИФР1 в структурах яичек. В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела к ИФР1 (табл. 1). Вторичные антитела – компании «Leica Biosystems Newcastle Ltd», Великобритания. Для данного маркера выполнялись контрольные исследования с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Титр антител подбирали с использованием раствора для разведения антител (antibodydiluent). Разведение 1:100; срезов на стекле – по два. Разведения для всех видоспецифичных вторичных антител составили 1: 100. Срез на стекле – по два. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Mayer; промывали под проточной водой; дегидратировали (спирт 96%) 2 раза по 10 минут; срезы подвергали деградации и заключали в гель «Aquatex»® (aqueousmountingagent, «AndwinScience», Франция).

Иммуногистохимическое исследование

Антитело (фирменное название)	Ig класс (фирма)	Специфичность и характеристика
Rabbit polyclonalAntibody Insulin-like Growth Factors-I	IgG1 Santa Cruz Biotechnology	Цитоплазматический антиген; показатель пролиферативной митотической активности клеток; аутокринный/паракринный стимулятор роста.

Интенсивность окрашивания срезов оценивали согласно рекомендациям [17] и с использованием цветовой шкалы детекции: «-» – отсутствие экспрессии, «+» – слабая экспрессия, «++» – умеренная экспрессия, «+++» – выраженная экспрессия (высокоинтенсивная иммунопероксидазная реакция).

Визуализацию биопсийного материала 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.

Статистический анализ. Полученные данные статистически обрабатывали с использованием программного пакета SPSS 7.5 for Windows (IBM Analytics, США). Для сравнения двух выборок использовали t-критерий с уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

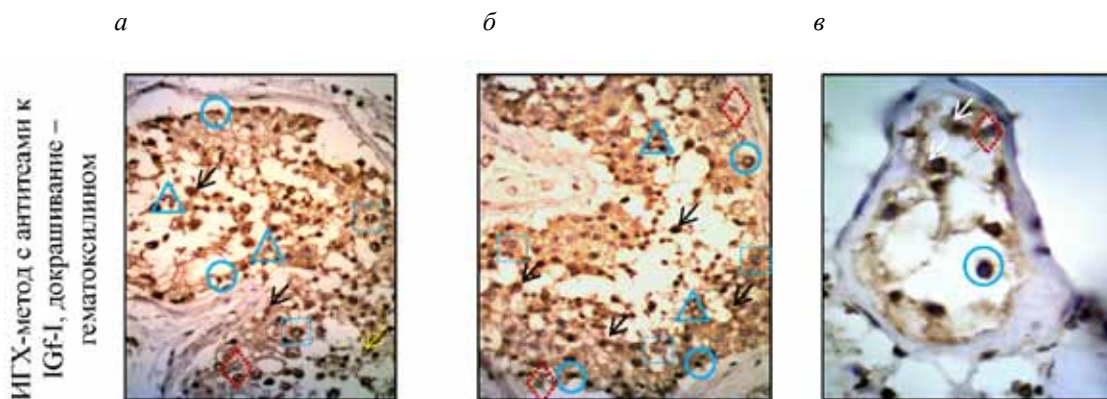
Гистология яичек мужчин I-й группы. В обеих контрольных подгруппах – нормальный сперматогенез (MJS= 10 баллов).

Гистология яичек мужчин II-й группы (n=50). У мужчин в биоптатах визуализируются следующие морфологические картины: субтотальной аплазии мужских половых клеток (n=41); Сертоли-клеточного синдрома (n=9); тубулярная атрофия канальцев (n=6), а также выраженная гиперплазия клеток Лейдига.

Данные иммуногистохимического исследования. Иммунологическая реакция

антител к IGF-I в мужских половых клетках и элементах микроокружения распределась следующим образом (по группам): I – в обеих подгруппах при выявлении IGF-I наиболее ярко маркируются все половые клетки («+++») и соматические клетки интерстициальной ткани («++»), а также эндотелий кровеносных сосудов («+»). Уровень (степень) экспрессии IGF-I снижается в процессе сперматогенеза от сперматогоний («++++») до сперматозоидов («+++»). Отсутствие реакции к IGF-I наблюдается в клетках Сертоли и клетках миоидного слоя стенки семенного канальца у молодых мужчин, но слабое иммуномечение в клетках Сертоли («±») у пожилых. II – слабый уровень положительной экспрессии к IGF-I отмечен в единичных клетках Сертоли («+») и в цитоплазме некоторых сохранившихся сперматогоний («±») (рисунок, в).

Статистическая обработка данных. Содержание инсулиноподобного фактора роста-1 при необструктивной азооспермии у мужчин 22 – 35 лет снижено на 8.8% (7.0 ± 0.22) по сравнению с таковой возрастной группой в контроле ($62.0 \pm 0.33\%$) и на 5,7% у пожилых мужчин ($40.0 \pm 0.33\%$). Возможно, речь идёт о нарушении паракринной регуляции синтеза инсулиноподобного фактора роста I.



Структуры яичка в норме (а, б) и при патологическом сперматогенезе (в):
а – 22–35 лет; б – 64–75 лет; в – мужчины 22–35 лет, фокальный сперматогенез (блок созревания, MJS= 3 балла); О – сперматогонии; □ – сперматоцит I; Δ – сперматоцит II; ◇ – клетки Сертоли; ↑ – IGF-I. Увеличение: а, б $\times 400$; в $\times 1000$

Крайне важной представляется роль инсулиноподобного фактора роста I (IGF-I) в сперматогенезе, селекции мужских половых клеток и элементов микроокружения извитых семенных канальцев, компонентов гемато-тестикулярного барьера [18].

Инсулиноподобные факторы роста обладают широким спектром митогенных и метаболических эффектов [5, 10].

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.

Активное выявление исследованного фактора роста (ИФР1) как в соматических, так и в герминальных элементах гонад подтверждает его функциональную необходимость в региональном механизме ауто- и паракринной регуляции текущих процессов в яичке и семенных канальцах в частности. Отсутствие специфического маркирования стромы свидетельствует о её вспомогательной роли в этих процессах.

Данные проведённых качественных реакций экспрессии ИФР1 в совокупности с результатами количественных анализов 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 компенсаторных механизмов со стороны местных регуляторов с целью подавления патологически идущего сперматогенеза.

Заключение

Зарегистрированное снижение активности экспрессии инсулиноподобного фактора роста-1 в группе идиопатического бесплодия, представляется закономерным в связи с универсальностью его роли в процессе морфогенеза в целом.

Благодарности: пациентам, участвующим в клиническом исследовании (кровь на гормоны и биоптаты); эту статью посвящаем научному руководителю и наставнику – академику РАН, д.м.н., профессору О.В. Волковой, как дань её огромному вкладу в развитие отечественной эмбриологии и репродуктологии.

Список литературы

1. The BioGenex Molecular Pathology Catalog 2014 – 2015, P. 245.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology*, 3rd Edition. 2014. – P. 976.
6. Guo T. // *Cell Communication and Signaling* – 2015. – Vol 13. P. 34 – 41.
7. 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).
8. 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.
9. 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.
10. Gupta G.S. *Proteomics of Spermatogenesis* // Springer Science & Business Media. – 2006 г. – P. 855.
11. 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).
12. Pons-Rejraji H., Brugnon 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.
13. 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.
14. «WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen», 5th edition, Geneva, 2010.
15. Буньков К.В. Савченков А.Л. Сравнение микроморфметрических структур в тканях яичек у плодов антенатального периода и лиц с врожденным крипторхизмом // *Андрология и генитальная хирургия.* – 2015. – Т.16. – №2. – С. 27–36.
16. 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.
17. Dabbs D.J. *Diagnostic immunohistochemistry.* 3rd Edition, 2010.
18. Демьяшкин Г.А., Амиров Н.Ш. Паракринные механизмы регуляции функций семенника (иммуноцитохимический аспект) // *Фундаментальные исследования.* – 2009. – № 2. – С. 88–89.