

УДК 616.015.348:616.699-078.73-091.7

С. В. Базалицька

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

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ПРОТЕЇНУ CLAUDIN 11 ТА СТАН ГЕМАТОТЕСТИКУЛЯРНОГО БАР'ЄРУ ПРИ РІЗНИХ ФОРМАХ ЧОЛОВІЧОЇ НЕПЛІДНОСТІ

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

Ключові слова: чоловіча неплідність, протеїн Claudin 11, гематотестикулярний бар'єр.

Робота є фрагментом НДР «Вивчити молекулярно-клітинні механізми порушень сперматогенезу при чоловічій неплідності різної етіології та розробити нові методи діагностики і лікування». № Державної реєстрації 0107U000752.

В чоловічій репродуктивній системі існує гематотестикулярний бар'єр, утворений щільними контактами між клітинами Сертолі (головний компонент) та структурами, які відокремлюють зрілі сперматозоїди від периферійної крові і запобігають їх взаємодії з імунокомпетентними клітинами. Різні фактори, що порушують цей бар'єр, призводять до виникнення імунних реакцій з утворенням в крові антитіл до епітелію сім'яних каналців та розвитку аутоімунної неплідності, оскільки сперматозоїди з'являються під час статевого дозрівання вже після того, як сформувалась імунна толерантність до власних тканин організму. Антиспермальні антитіла - це імуноглобуліни G, A та M, які при взаємодії зі сперматозоїдами здатні їх імобілізувати, аглютинізувати, блокувати процес пенетрації (проникнення) в яйцеклітину, унеможлижуючи процес запліднення, або блокувати процес імплантації ембріона, навіть при використанні допоміжних репродуктивних технологій [2, 3]. Лабораторна діагностика імунної неплідності на сьогоднішній день включає в себе дослідження крові та сім'яної рідини на антиспермальні антитіла - імуноглобуліни G, A та M, хоча ці імуноглобуліни не є специфічними маркерами аутоімунної неплідності [4, 5]. Крім того, гематотестикулярний бар'єр виконує трофічну функцію, а також забезпечує в каналцях специфічне гормональне середовище, необхідне для сперматогенезу. В зв'язку з цим, порушення гематотестикулярного бар'єру – важливий чинник виникнення порушень сперматогенезу (оліго-, терато- і азооспермії). Тому, стан гематотестикулярного бар'єру – важливий діагностичний і прогностичний фактор, який необхідно враховувати в лікуванні чоловічої неплідності.

Молекулярними дослідженнями останніх років встановлено, що трансмембранні білки сімейства claudins складають основу міжклітинних щільних замикальних контактів, які утворюють тканинні бар'єри, в тому числі – гематотестикулярний бар'єр, що існує в чоловічій репродуктивній системі [7, 10, 11, 13]. Нещодавні дослідження показали, що протеїн Claudin 11, який експресує переважно в щільних контактах між клітинами Сертолі відіграє важливу роль в регуляції гематотестикулярного бар'єру та може слугувати як маркер стану гематотестикулярного бар'єру та сперматогенезу при чоловічій неплідності різної етіології [8, 12].

Метою роботи було визначити особливості стану гематотестикулярного бар'єру за імуногістохімічною експресією протеїну Claudin 11 у хворих із екскреторно-обтураційною та секреторною формами чоловічої неплідності.

Матеріал та методи дослідження. Досліджено матеріал 28 хворих із азооспермією, отриманий під час інцизійної біопсії, з наступним гістологічним та імуногістохімічним дослідженням біоптату. Для встановлення клінічного діагнозу форми неплідності користувались загальноприйнятою класифікацією [1]. При визначенні заключного діагнозу враховували дані морфологічного дослідження біоптату яєчка та результати гормональних досліджень. Згідно встановленого діагнозу пацієнтів було розподілено на три групи: 1 група - 11 хворих, у яких було встановлено діагноз екскреторно-обтураційної неплідності. Середній вік хворих - 33,6 років. 2 група - 12 пацієнтів, у яких було встановлено діагноз секреторної неплідності із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид. Середній вік хворих - 29,5 років. 3 група - 5 пацієнтів, у яких було встановлено діагноз секреторної неплідності із синдромом «лише клітини Сертолі». Середній вік хворих - 28,5 років.

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

Імуногістохімічний (ІГХ) аналіз здійснювався з використанням стандартного авідин-біотинного методу. Для ІГХ дослідження біоптати фіксували у 12% забуференому формаліні, заливали в парафін і виготовляли зрізи товщиною до 5 мкм. Зрізи інкубували з первинними антитілами Claudin 11 (DAKO, Glostrup, Данія) в розведенні 1:50. Наприкінці препарати проявляли 1-2 хвилини у 0,05% розчині діамінбензидину (DAB), дофарбовували гематоксиліном та заключали в канадський бальзам. Як позитивний контроль використовували зрізи тканин із відомим заздалегідь високим вмістом Claudin 11. Ті ж зрізи служили як негативний контроль, але без обробки первинними антитілами. В кожному випадку для ІГХ дослідження аналізували 12-16 зрізів. Розповсюдженість та інтенсивність ІГХ реакції оцінювали за напівкількісним методом в балах [9]. Розповсюдженість реакції або кількість забарвлених ядер чи цитоплазми клітин оцінювали від 0 до 3 балів за такими критеріями: 0 – відсутність клітин із видимим забарвленням, 1 – забарвлено менше 10% клітин, 2 – забарвлено більше 10%, але менше 50% клітин, 3 – рівномірно забарвлено більше 50% клітин клітинного шару. Інтенсивність забарвлення ядер або цитоплазми оцінювали за такими критеріями: 0 – відсутність видимого забарвлення, 1 – слабо забарвлені ядра або цитоплазма, 2 – помірно забарвлені ядра або цитоплазма, 3 – інтенсивно забарвлені ядра або цитоплазма. Загальний результат ІГХ реакції визначався за показниками імуногістохімічного коефіцієнту (ІГХК) від 0 до 9 балів, який одержували перемноженням оцінок розповсюдженості та інтенсивності забарвлення. Проводився статистичний аналіз отриманих результатів.

Результати дослідження та їх обговорення. При дослідженні ІГХ експресії протеїну Claudin 11 в групі хворих на екскреторно-обтураційну неплідність із збереженим сперматогенезом (всього 11 пацієнтів), спостерігалось помірне мембранозно-цитоплазматичне зафарбування (4-6 бали) клітин Сертолі в 6-ти спостереженнях (54,5%), в п'яти випадках (45,5%), було виявлено виразну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (7-9 бали) (Рис.1). Середнє значення ІГХК дорівнювало $7,4 \pm 0,45$ бали. Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії, сперматоцити 1 і 2 порядку виявляли слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 1-3 бали в усіх 11 спостереженнях (100%) даної групи. Середнє значення ІГХК становило $2,1 \pm 0,18$. Необхідно зазначити, що сперматиди та зрілі сперматозоїди характеризувались відсутністю ІГХ експресії протеїну Claudin 11 (0 балів) в усіх 11 випадках (100%). В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів виявлялась виразна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (7-9 бали) в п'яти випадках (45,5%), а в шести спостереженнях (54,5%) даної групи спостерігалась помірна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 в 4-6 балів. Середнє значення ІГХК дорівнювало $7,2 \pm 0,45$ бали (Таблиця 1).

Таблиця 1

Показники ІГХ експресії протеїну Claudin 11 в біоптатах яєчка у хворих на різні форми чоловічої неплідності

Структурні елементи біоптата яєчка	Форми неплідності у чоловіків		
	Екскреторно-обтураційна, n = 11	Секреторна, n = 12	Синдром “лише клітини Сертолі”, n = 5
Клітини Сертолі	$7,4 \pm 0,45^*$	$5,3 \pm 0,42^*$	$0,8 \pm 0,6^*$
Ендотелій гемокапілярів	$7,2 \pm 0,45^*$	$5,3 \pm 0,42^*$	$0,8 \pm 0,6^*$
Сперматогонії	$2,1 \pm 0,18$	$1,5 \pm 0,17$	-
Сперматоцити	$2,1 \pm 0,18$	$1,5 \pm 0,17$	-
Сперматиди	0	0	-
Сперматозоїди	0	-	-

* - достовірно між групами; $p \leq 0,001$.

В групі хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид (всього 12 пацієнтів), спостерігалась помірна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (4-6 бали) в клітинах Сертолі у восьми спостереженнях (66,7%) (Рис.2) в чотирьох випадках (33,3%) було виявлено слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (1-3 бали) в суспензіях. Середнє значення ІГХК становило $5,43 \pm 0,42$. Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії та сперматоцити 1 і 2 порядку, що виявлені в цій групі пацієнтів, характеризувались слабкою

мембранозно-цитоплазматичною експресією протеїну Claudin 11 в 1-3 бали в усіх спостереженнях (100%) даної групи. Середнє значення ІГХК для цих клітин сперматогенного епітелію становило $1,5 \pm 0,17$. В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів виявлялась помірна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (4-6 бали) у восьми випадках (66,7%), а в чотирьох випадках (33,7%) даної групи спостерігалась слабка мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 в 1-3 бали. Середнє значення ІГХК дорівнювало $5,3 \pm 0,42$ бали (Таблиця 1). В групі хворих на секреторну неплідність із синдромом “лише клітини Сертолі” (всього 5 пацієнтів), в клітинах Сертолі спостерігалось слабе мембранозно-цитоплазматичне зафарбування протеїну Claudin 11 в 1-3 бали в 2 спостереженнях (40%) (Рис.3), в трьох випадках (60%) мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 в суспендоцитах була відсутня (0 балів). Середнє значення ІГХК становило $0,8 \pm 0,6$ бали. В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів спостерігалась слабка мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 в 1-3 бали у двох спостереженнях (40%) даної групи; в інших 60% випадків експресія протеїну Claudin 11 була відсутня (0 балів). Середнє значення ІГХК також дорівнювало $0,8 \pm 0,6$ бали (Таблиця 1).

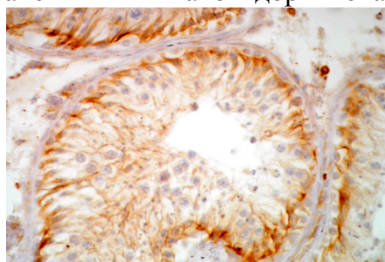


Рис. 1 Екскреторно-обтураційна неплідність. Виразна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (8 балів) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. $\times 200$.

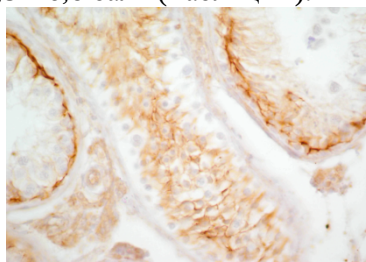


Рис. 2 Секреторна неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматоцитів 1 порядку. Помірна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (4 бали) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. $\times 200$.

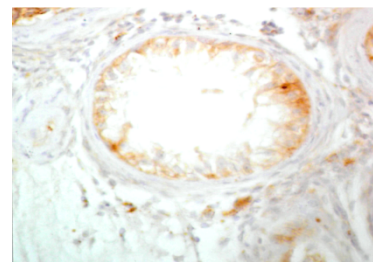


Рис. 3 Секреторна неплідність із синдромом “лише клітини Сертолі”. Слабка мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (2 бали) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. $\times 200$.

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

Сучасними молекулярними дослідженнями встановлено, що протеїни сімейства claudins - це трансмембранні білки, які є найважливішим компонентом міжклітинних щільних замикальних контактів, що виконують бар'єрну функцію, утворюючи тканинні бар'єри в різних органах. Крім них, у складі щільних контактів виявляються трансмембранний протеїн occludin, цитоплазматичні білки zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) та junctional adhesion molecule (JAM), але в значно в меншій кількості. Отже, клаудіни є головним компонентом міжклітинних щільних замикальних контактів, молекула клаудіну має чотири трансмембранних домени, дві позаклітинні та одну внутрішньоклітинну петлі та N- і C- кінці, що розташовуються в цитоплазмі. У людини відомі 24 члени цього сімейства. Але, саме Claudin 11 експресує в щільних контактах між клітинами Сертолі. Це специфічний для гематотестикулярного бар'єру протеїн [6, 7, 10, 11, 13, 14].

Виявлені в нашому дослідженні особливості ІГХ експресії протеїну Claudin 11, які характерні для різних форм чоловічої неплідності, свідчать про значні порушення гематотестикулярного бар'єру в групах хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид та із синдромом “лише клітини Сертолі” порівняно із пацієнтами із екскреторно-обтураційною неплідністю. Враховуючи важливі функції, які виконує Claudin 11 у формуванні цілісності гематотестикулярного бар'єру, стає очевидним, що пошкодження компонентів цього бар'єру лежать в основі розвитку імунного компоненту та поглиблення патологічних змін тканини яєчка при чоловічій неплідності.

Висновки

1. Дослідження протеїну Claudin 11 виявило статистично достовірне зниження показників експресії ІГХК в клітинах Сертолі та ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів в групах хворих на секреторну неплідність із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній,

сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид та із синдромом “лише клітини Сертолі”, порівняно з пацієнтами із екскреторно-обтураційною неплідністю.

2. Зіжнення рівня ІГХ експресії протеїну Claudin 11 при секреторній формі чоловічої неплідності та синдромі “лише клітини Сертолі” свідчить про значні порушення гематотестикулярного бар’єру, які є основою розвитку додаткового імунного компоненту та поглиблення патологічних змін тканини яєчка у хворих при цих формах чоловічої неплідності.

3. При морфологічному дослідженні біоптату яєчка доцільно визначення стану гематотестикулярного бар’єру за ІГХ експресією протеїну Claudin 11, як важливого діагностичного і прогностичного показника стану гематотестикулярного бар’єру, що дозволяє визначати наявність або відсутність імунного компоненту та обирати патогенетично обумовлене лікування чоловічої неплідності і корекцію порушень в кожному конкретному випадку та визначати подальший прогноз щодо відновлення сперматогенезу.

Перспективи подальших розробок у даному напрямку. Висока чутливість та діагностична цінність сучасних біомаркерів обумовлює широкі перспективи досліджень патогенезу найскладніших захворювань на молекулярному рівні з використанням імуногістохімічних (ІГХ) методів дослідження.

Список литературы

1. Junda I.F. Besplodie v supruzhestve / I.F. Junda, L.I. Ivanjuta, L.P. Imshineckaja // – Kiev: Zdorov’e. - 1990. – 464 s.
2. Allegrucci C. Circulating human antisperm antibodies recognize prostasomes / C. Allegrucci, G. Ronquist, B. Ove Nilsson [et al.] // American Journal of Reproductive Immunology. - 2001. – Vol.46, N3. – P. 211-219.
3. Bohring C. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease / C. Bohring, E. Krause, B. Habermann [et al.] // Molecular Human Reproduction. – 2001. – Vol.7, N2. - P. 113-118.
4. Bohring C. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis // C. Bohring, W. Krause // Human Reproduction. – 2003. - Vol.18, N5. - P. 915-924.
5. Chiu W.W. Use of antisperm antibodies in differential display Western blotting to identify sperm proteins important in fertility / W.W. Chiu, L.W. Chamley // Human Reproduction. - 2002. – Vol. 17, N4. - P. 984-989.
6. Chihara M. Molecular dynamics of the blood-testis barrier components during murine spermatogenesis / M. Chihara, S. Otsuka, O. Ichii [et al.] // Molecular Reproduction and Development. - 2010, - Vol. 77, N 7. - P. 630 - 639.
7. Florin A. Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells / A. Florin, M. Maire, A. Bozec [et al.] // Endocrinology. - 2005. – Vol. 146, N3.- P.1532-1540.
8. Fink C. Claudin-11 is over-expressed and dislocated from the blood-testis barrier in Sertoli cells associated with testicular intraepithelial neoplasia in men // C. Fink, R. Weigel, L. Fink // Histochemistry and Cell Biology. – 2009. – Vol. 131, N6. - P. 755 - 764.
9. Malmstrum P.U. Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma / P.U. Malmstrum, C. Busch, B.J. Norben [et al.] // Scandinavian Journal of Urology and Nephrology. - 1998. - Vol. 22.- P. 265-270.
10. Mazaud-Guittot S. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis / S. Mazaud-Guittot, E. Meugnier, S. Pesenti [et al.] // Biology of Reproduction. - 2010. – Vol. 82, N1. - P. 202-213.
11. Mazaud-Guittot S. Phenotyping the claudin 11 deficiency in testis: from histology to immunohistochemistry / S. Mazaud-Guittot, A. Gow, B. Le Magueresse-Battistoni // Methods in Molecular Biology. – 2011. – Vol. 763. - P. 223-236.
12. Nah W.H. Claudin-11 expression increased in spermatogenic defect in human testes / W.H. Nah, J.E. Lee, Y.J. Park [et al.] // Fertility and Sterility. - 2011. – Vol. 95, N 1. - P. 385 - 388.
13. Wu X. Transgene-mediated rescue of spermatogenesis in Cldn11-null / X. Wu, M. Peppi, M.J. Vengalil [et al.] // Biology of Reproduction. - 2012. – Vol. 86, N5.- P. 1-11.
14. Xu J. Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility / J. Xu, F. Anuar, S.M. Ali [et al.] // Molecular Biology of the Cell. – 2009. – Vol. 20, N 20. – P. 4268 - 4277.

Реферати

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ПРОТЕИНА CLAUDIN 11 И СОСТОЯНИЕ ГЕМАТОТЕСТИКУЛЯРНОГО БАРЬЕРА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ

Базалицкая С. В.

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

Ключевые слова: мужское бесплодие, протеин Claudin 11, гематотестикулярный барьер.

FEATURES OF PROTEIN CLAUDIN 11 EXPRESSION AND CONDITION OF BLOOD-TESTIS BARRIER AT VARIOUS FORMS OF MALE INFERTILITY

Bazalytska S. V.

Immunohistochemical (IHC) features of an expression of protein Claudin 11 in testicular tissue of 28 patients with obstructive and secretory forms of male infertility are studied. Authentic depression of level IHC of an expression of protein Claudin 11 at the secretory form of male infertility and a syndrome «only Sertoli cells» is taped in comparison with obstructive form of male infertility. Results testify to appreciable disturbances of blood-testis barrier, which a basis of development additional immune component and excavation of pathological changes in patients at the secretory form of male infertility.

Key words: male infertility, protein Claudin 11, blood-testis barrier.