

С.В. Базалицька, А.М. Романенко, Ю.В. Персидський

Особливості експресії протеїну клаудин (Claudin 11) при різних формах чоловічої неплідності

ДУ «Інститут урології НАМН України», м. Київ

Ключові слова: чоловіча неплідність, протеїн Claudin 11.

Вивчено імуногістохімічні особливості експресії протеїну Claudin 11 в тканині яєчка 28 хворих при екскреторно-обтураційній та секреторній формах чоловічої неплідності. Виявлено достовірне зниження рівня ІГХ експресії протеїну Claudin 11 при секреторній формі чоловічої неплідності та синдромі «лише клітини Сертолі», порівняно з екскреторно-обтураційною неплідністю. Результати свідчать про значні порушення гематотестикулярного бар'єра, що стали основою розвитку додаткового імунного компонента та поглиблення патологічних змін тканини яєчка у хворих при секреторній формі чоловічої неплідності.

Особенности экспрессии протеина клаудин (Claudin 11) при различных формах мужского бесплодия

С.В. Базалицкая, А.М. Романенко, Ю.В. Персидский

Изучены иммуногистохимические 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 стали основой развития дополнительного иммунного компонента и углубления патологических изменений у больных при секреторной форме мужского бесплодия.

Ключевые слова: мужское бесплодие, протеин Claudin 11.

Патология. – 2012. – №3 (26). – С. 11–14

Features of expression of protein Claudin 11 at various forms of male infertility

S.V. Bazalytska, A.M. Romanenko, Yu.V. Persidsky

Immunohistochemical features of an expression of protein Claudin 11 in testicular tissue of 28 patients with excretory-obstructive and secretory forms of male infertility are studied. Significant decrease of protein Claudin 11 IHC expression level at the secretory form of male infertility and at syndrome «only Sertoli cells» is revealed in comparison with excretory-obstructive form of male infertility. Results testify to considerable disturbances of blood-testis barrier, which have become the basis of the development of additional immune component and intensification of pathological changes in patients with the secretory form of male infertility.

Key words: male infertility, protein Claudin 11.

Pathologia. 2012; №3 (26): 11–14

Молекулярними дослідженнями останніх років встановлено, що трансмембранні білки сімейства claudins складають основу міжклітинних щільних замикальних контактів, що утворюють тканинні бар'єри, в тому числі, гематотестикулярний бар'єр, що існує в чоловічій репродуктивній системі [1–4].

Нещодавні дослідження показали, що протеїн Claudin 11 експресує переважно в щільних контактах між клітинами Сертолі, відіграє важливу роль в регуляції гематотестикулярного бар'єра і може слугувати маркером стану гематотестикулярного бар'єра та сперматогенезу при чоловічій неплідності різної етіології [5,6].

Мета роботи

Визначити особливості імуногістохімічної експресії протеїну Claudin 11 у хворих з екскреторно-обтураційною та секреторною формами чоловічої неплідності.

Матеріали і методи дослідження

Досліджено матеріал 28 хворих з азооспермією, отриманий під час інцизійної біопсії, з наступним гістологічним та імуногістохімічним дослідженням біоптату. Для

встановлення клінічного діагнозу форми неплідності користувались загальноприйнятою класифікацією [7]. При визначенні остаточного діагнозу враховували дані морфологічного дослідження біоптату яєчка та результати гормональних досліджень. Залежно від діагнозу пацієнтів розподілено на 3 групи:

1 – 11 хворих з діагнозом екскреторно-обтураційної неплідності, середній вік – 33,6 років;

2 – 12 пацієнтів з діагнозом секреторної неплідності із блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматочитів 1 і 2 порядку чи сперматид, середній вік – 29,5 років;

3 – 5 пацієнтів з діагнозом секреторної неплідності з синдромом «лише клітини Сертолі», середній вік – 28,5 років.

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

Імуногістохімічний (ІГХ) аналіз виконували з використанням стандартного авідин-біотинового методу. Для ІГХ дослідження біоптату фіксували у 12% забуференому формаліні, заливали в парафін і виготовляли зрізи до

5 мкм завтовшки. Зрізи інкубували з первинними анти-тілами Claudin 11 (ДАКО, Glostrup, Данія) в розведенні 1:50. Наприкінці препарати проявляли 1–2 хвилини у 0,05% розчині діамінбензидину (ДАВ), дофарбовували гематоксилином та заключали в канадський бальзам. Як позитивний контроль використовували зрізи тканин з відомим заздалегідь високим вмістом Claudin 11. Ті ж зрізи використовували 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 у балах [8]. Розповсюдженість реакції або кількість забарвлених ядер чи цитоплазми клітин оцінювали від 0 до 3 балів за такими критеріями: 0 – відсутність клітин з 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 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 визначали за показниками імуногістохімічного коефіцієнта (ІГХК) від 0 до 9 балів, отриманого перемноженням оцінок розповсюдженості та інтенсивності забарвлення. Здійснено статистичний аналіз отриманих результатів.

Результати та їх обговорення

При дослідженні ІГХ експресії протеїну Claudin 11 у групі хворих на екскреторно-обтураційну неплідність зі збереженим сперматогенезом (11 пацієнтів), спостерігали помірне мембранозно-цитоплазматичне зафарбування (4–6 балів) клітин Сертолі в 6 спостереженнях (54,5%), у 5 випадках (45,5%) виявлено виразну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (7–9 балів) (рис. 1). Середнє значення ІГХК дорівнювало 7,4±0,45 балам.

Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії, сперматоцити 1 і 2 порядку виявляли слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну

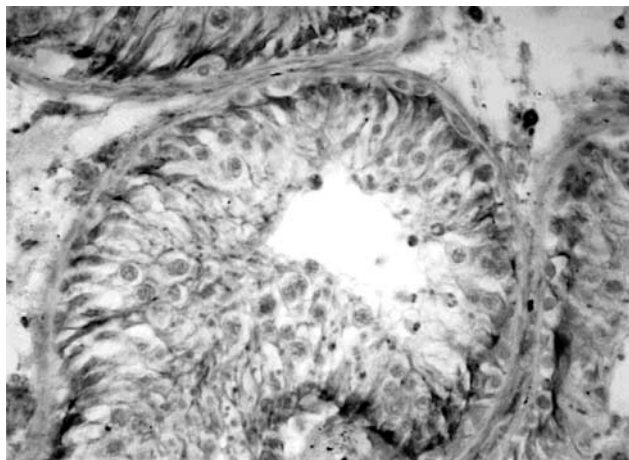


Рис. 1. Екскреторно-обтураційна неплідність. Виразна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (8 балів) у клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. × 200.

Claudin 11 в 1–3 бали у всіх 11 спостереженнях (100%) даної групи. Середнє значення ІГХК становило 2,1±0,18. Необхідно зазначити, що сперматиди та зрілі сперматозоїди характеризувались відсутністю ІГХ експресії протеїну Claudin 11 (0 балів) у всіх 11 випадках (100%).

В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів виявлено виразну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (7–9 балів) у п'яти випадках (45,5%), а в 6 спостереженнях (54,5%) цієї групи спостерігали помірну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 4–6 балів. Середнє значення ІГХК дорівнювало 7,2±0,45 балам (табл. 1).

Таблиця 1

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

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

Примітка: * – достовірно між групами; p≤0,001.

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

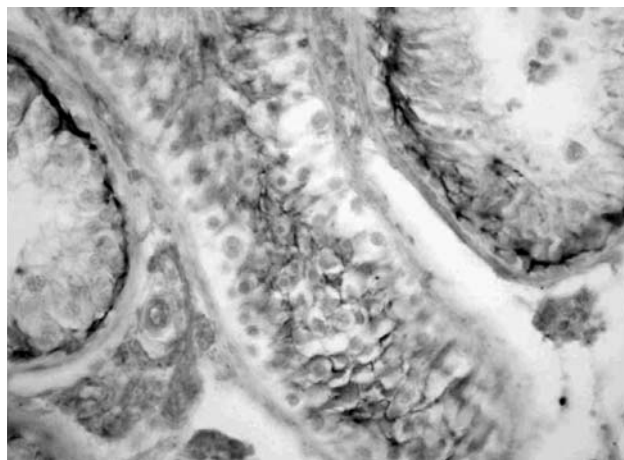


Рис. 2. Секреторна неплідність з блоком сперматогенезу на рівні сперматоцитів 1 порядку. Помірна мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (4 бали) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. × 200.

Клітини сперматогенного епітелію – сперматогонії та сперматоцити 1 і 2 порядку, 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 виявлено помірну мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 (4–6 балів) у 8 випадках (66,7%), а в 4 випадках (33,7%) даної групи спостерігали слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 1–3 бали. Середнє значення ІГХК дорівнювало $5,3 \pm 0,42$ балам (таблиця 1).

У групі хворих на секреторну неплідність з синдромом «лише клітини Сертолі» (5 пацієнтів) у клітинах Сертолі спостерігали слабке мембранозно-цитоплазматичне фарбування протеїну Claudin 11 в 1–3 бали в 2 спостереженнях (40%) (рис. 3), у 3 випадках (60%) мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 в суспензіях відсутня (0 балів). Середнє значення ІГХК становило $0,8 \pm 0,6$ балів.

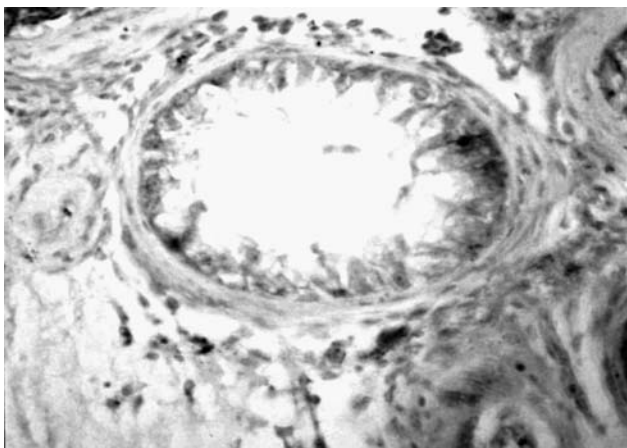


Рис. 3. Секреторна неплідність з синдромом «лише клітини Сертолі». Слабка мембранозно-цитоплазматична експресія протеїну Claudin 11 (2 бали) в клітинах Сертолі. Імунопероксидазний АВС-метод. $\times 200$.

В ендотеліальних клітинах перитубулярних гемокапілярів спостерігали слабку мембранозно-цитоплазматичну експресію протеїну Claudin 11 в 1–3 бали у 2 спостереженнях (40%) даної групи; в 60% випадків експресія протеїну Claudin 11 відсутня (0 балів). Середнє значення ІГХК також дорівнювало $0,8 \pm 0,6$ балам (табл. 1).

Сучасними молекулярними дослідженнями встановлено, що протеїни сімейства claudins – це трансмембранні білки, що 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 мен-

шій кількості. Отже, клаудини є головним компонентом міжклітинних щільних замикальних контактів, молекула клаудину має чотири трансмембранних домени, дві позаклітинні та одну внутрішньоклітинну петлі та N- і C-кінці в цитоплазмі. У людини відомо 24 члени цього сімейства. Але саме Claudin 11 експресує в щільних контактах між клітинами Сертолі. Це специфічний для гематотестикулярного бар'єра протеїн [1–4,9,10].

У чоловічій репродуктивній системі існує гематотестикулярний бар'єр, утворений щільними контактами між клітинами Сертолі (головний компонент) і структурами, що 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 і розвитку аутоімунної неплідності, оскільки сперматозоїди з'являються під час статевого дозрівання вже після того, як сформувалась імунна толерантність до власних тканин організму. Антиспермальні антитіла – імуноглобуліни G, A та M – при взаємодії зі сперматозоїдами здатні їх іммобілізувати, аглютинувати, блокувати процес пенетрації (проникнення) в яйцеклітину, унеможлижуючи процес запліднення, або блокувати процес імплантації ембріона, навіть при використанні допоміжних репродуктивних технологій [11,12]. Лабораторна діагностика імунної неплідності включає дослідження крові та сім'яної рідини на антиспермальні антитіла – імуноглобуліни G, A та M, хоча ці імуноглобуліни не є специфічними маркерами аутоімунної неплідності [13,14]. Крім того, гематотестикулярний бар'єр виконує трофічну функцію, а також забезпечує в каналцях специфічне гормональне середовище, необхідне для сперматогенезу. У зв'язку з цим, порушення гематотестикулярного бар'єра – важливий чинник виникнення порушень сперматогенезу (оліго-, терато- і азооспермії). Тому стан гематотестикулярного бар'єра – важливий діагностичний і прогностичний фактор, який необхідно враховувати в лікуванні чоловічої неплідності.

Виявлені особливості ІГХ експресії протеїну Claudin 11, характерні для різних форм чоловічої неплідності, свідчать про значні порушення гематотестикулярного бар'єра в групах хворих на секреторну неплідність з блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид та з синдромом «лише клітини Сертолі» порівняно з пацієнтами з ексекреторно-обтураційною неплідністю.

Враховуючи важливі функції, які виконує Claudin 11 у формуванні цілісності гематотестикулярного бар'єра, стає очевидним, що пошкодження компонентів цього бар'єра лежать в основі розвитку імунного компонента та поглиблення патологічних змін тканини яєчка при чоловічій неплідності.

Висновки

1. Дослідження протеїну Claudin 11 виявило статистично достовірне зниження показників експресії ІГХК у клітинах Сертолі й ендотеліальних клітинах перитубу-

булярних гемокапілярів у групах хворих на секреторну неплідність з блоком сперматогенезу на рівні сперматогоній, сперматоцитів 1 і 2 порядку чи сперматид і з синдромом «лише клітини Сертолі», порівняно з пацієнтами з екскреторно-обтураційною неплідністю.

2. Зниження рівня ПГХ експресії протеїну Claudin 11 при секреторній формі чоловічої неплідності та синдрому «лише клітини Сертолі» свідчить про значні порушення гематотестикулярного бар'єра, що є основою розвитку додаткового імунного компонента та поглиблення патологічних змін тканини яєчка у хворих при цих формах чоловічої неплідності.

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

Список літератури

1. Wu X. Transgene-mediated rescue of spermatogenesis in Cldn11-null / Wu X., Peppi M., Vengalil M.J., Maheras K.J., Southwood C.M., Bradley M., Gow A. // *Biol. Reprod.* – 2012. – Vol. 86 (5), №139. – P. 1–11.
2. Mazaud-Guittot S. Phenotyping the claudin 11 deficiency in testis: from histology to immunohistochemistry / Mazaud-Guittot S., Gow A., Le Magueresse-Battistoni B. // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – №763. – P. 223–236.
3. Mazaud-Guittot S. Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis / Mazaud-Guittot S., Meugnier E., Pesenti S., Wu X., Vidal H., Gow A., Le Magueresse-Battistoni B. // *Biol. Reprod.* – 2010. – Vol. 82 (1). – P. 202–213.
4. Florin A. Androgens and postmeiotic germ cells regulate claudin-11 expression in rat Sertoli cells / Florin A., Maire M., Bozec A., Hellani A., Chater S., Bars R., Chuzel F., Benahmed M. // *Endocrinology.* – 2005. – Vol. 146 (3). – P. 1532–1540.
5. Nah W.H. Claudin-11 expression increased in spermatogenic defect in human testes / Nah W.H., Lee J.E., Park H.J., Park N.C., Gye M.C. // *Fertil. Steril.* – 2011. – Vol. 95 (1). – P. 385–388.
6. Fink C. Claudin-11 is over-expressed and dislocated from the blood-testis barrier in Sertoli cells associated with testicular intraepithelial neoplasia in men / Fink C., Weigel R., Fink L., Wilhelm J., Kliesch S., Zeiler M., Bergmann M., Brehm R. // *Histochem. Cell. Biol.* – 2009. – Vol. 131 (6). – P. 755–764.
7. Юнда И.Ф. Бесплодие в супружестве / Юнда И.Ф., Иванюта Л.И., Имшинецкая Л.П. – К.: Здоровье, 1990. – 464 с.
8. Malmstrum P.U. Expression of ABH blood group isoantigen as a prognostic factor in transitional cell bladder carcinoma / Malmstrum P.U., Busch C., Norben B.J., Andersson B. // *Scand. J. Urol. Nephrol.* – 1998. – Vol. 22. – P. 265–270.
9. Chihara M. Molecular dynamics of the blood-testis barrier components during murine spermatogenesis / Chihara M., Otsuka S., Ichii O., Hashimoto Y., Kon Y. // *Mol. Reprod. Dev.* – 2010. – Vol. 77 (7). – P. 630–639.
10. Xu J. Zona occludens-2 is critical for blood-testis barrier integrity and male fertility / Xu J., Anuar F., Ali S.M., Ng M.Y., Phua D.C., Hunziker W. // *Mol. Biol. Cell.* – 2009. – Vol. 20 (20). – P. 4268–4277.
11. Allegrucci C. Circulating human antisperm antibodies recognize prostasomes / Allegrucci C., Ronquist G., Ove Nilsson B. et al. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2001. – Vol. 46 (3). – P. 211–219.
12. Bohring C. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease / Bohring C., Krause E., Habermann B., Krause W. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2001. – Vol. 7 (2). – P. 113–118.
13. Bohring C. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis / Bohring C., Krause W. // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18 (5). – P. 915–924.
14. Chiu W.W. Use of antisperm antibodies in differential display Western blotting to identify sperm proteins important in fertility / Chiu W.W., Chamley L.W. // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17(4). – P. 984–989.

Відомості про авторів:

Базалицька С.В., провідний науковий співробітник лабораторії патоморфології ДУ «Інститут урології АМН України».
Романенко А.М., зав. лабораторії патоморфології ДУ «Інститут урології АМН України».
Персидський Ю.В., M.D., Ph.D, USA.

Надійшла в редакцію 02.10.2012 р.