

АПОПТОЗ В СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦАХ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ БЕСПЛОДИИ

© Г. А. Демяшкин^{1,2}

¹ Патологоанатомическое отделение с цитологической лабораторией
Научного клинического центра ОАО «РЖД», Москва, и

² Кафедра патологической анатомии им. акад. А. И. Струкова
Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова
(Сеченовский Университет);
электронный адрес: doc.dga76@gmail.com

Цель настоящего исследования заключалась в оценке уровня апоптоза клеток семенных канальцев человека при нормальном и патологическом сперматогенезе путем иммуногистохимического определения доли клеток, содержащих каспазу-9 и -3, а также с помощью сравнительного анализа экспрессии проапоптотических (*BAK* и *BAX*) и антиапоптотических (*BCL2* и *BCLW*) генов. В ретроспективном исследовании участвовали мужчины ($n = 42$), обратившиеся с жалобами на бездетность в браке в течение 2 лет с диагнозом идиопатическое бесплодие, установленным после проведенного физикального, медико-генетического, биохимического (кровь на гормоны) и цитологического (спермограмма) анализа. Исследовали полученные при операции биоптаты яичек, а также аутопсийный материал мужчин 22—35 ($n = 10$), 64—75 ($n = 10$) и 75—90 ($n = 10$) лет. Доля сперматогониев, окрашенных с помощью антител к каспазе-9, при нормальном сперматогенезе составляет у молодых мужчин 39.5 ± 0.33 %, у пожилых — 35.6 ± 0.44 , у мужчин старческого возраста — 32.2 ± 0.28 % и возрастает при блоке созревания и фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома (64.3 ± 0.39 и 72.0 ± 0.41 % соответственно). При использовании антител к каспазе-3 доля иммунопозитивных сперматогониев при нормальном сперматогенезе составляла у молодых мужчин 60.1 ± 0.44 %, у пожилых — 78.2 ± 1.2 , у мужчин старческого возраста — 87.3 ± 0.9 %, а при идиопатическом бесплодии наблюдали резкое повышение доли меченых сперматогониев (в среднем 91.4 ± 1.1 %). При гипосперматогенезе и блоке созревания выявлено значительное повышение относительного уровня экспрессии проапоптотических генов внутреннего пути апоптоза *BAX* и *BAK* на фоне пониженной экспрессии антиапоптотических генов *BCL2* и *BCLW* по сравнению с мужчинами того же возраста, но с нормальным сперматогенезом. На основании полученных нами результатов можно заключить, что в пожилом возрасте в семенниках рецепторно-опосредованный путь апоптоза преобладает над митохондриальным (внутренним). При идиопатической форме мужского бесплодия доминирующим является внутренний путь апоптоза. Повышение активности маркеров апоптоза может быть ассоциировано с нарушениями созревания половых клеток при блоке мейоза и с истощением пула половых клеток при Сертоли-клеточном синдроме.

Ключевые слова: каспаза-9, каспаза-3, мужское идиопатическое бесплодие, биопсия яичек, азооспермия.

Принятые сокращения: ГС — гипосперматогенез, ИБ — идиопатическое бесплодие, НОА — необструктивная азооспермия, СКС — Сертоли-клеточный синдром (Sertoli-cell-only syndrome), САД — каспазоактивируемая ДНКаза (caspase activated DNase), DISC — индуцирующий смерть сигнальный комплекс (death-inducing signaling complex), TNF — фактор некроза опухоли (tumor necrosis factor), TRAIL — апоптозиндуцирующий лиганд семейства TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand), FADD — Fas-ассоциированный белок с доменом смерти (Fas-associated protein with death domain), ve — интенсивность иммуногистохимического мечения.

Биология развития мужских гамет по-прежнему остается предметом повышенного интереса при изучении таких нарушений репродуктивной функции как крипторхизм, варикоцеле, аутоиммунные орхиты, а также азооспермия и др. В отношении азооспермии различают обструктивный и необструктивный варианты. Необструктивная азооспермия (НОА) является преобладающей формой патологии и составляет до 90 % всех случаев азооспермии, представляя наиболее актуальный интерес для

научного поиска, так как часто характеризуется идиопатической (по неустановленной причине) формой мужского бесплодия (Yakirevich et al., 2003; Kim et al., 2007; Matzuk, Lamb, 2008; Bostwick, 2014).

Сперматогенез представляет собой комплекс различных физиологических процессов, таких как пролиферация, дифференцировка и клеточная смерть (Данилов и др., 2000; Chen et al., 2014; Демяшкин, 2016а). Нормальное течение развития как такового обеспечивается равно-

весею между пролиферацией клеток (как соматических, так и половых) и апоптозом. Однако под воздействием определенных факторов этот баланс нарушается, что становится причиной некоторых пролиферативных и апоптотических изменений (Almeida et al., 2013). По данным литературы, при НОА, которая морфологически проявляется как гипосперматогенез (ГС) и (или) Сертоли-клеточный синдром (СКС) (Демяшкин, 2016б), отмечается понижение уровня пролиферации сперматогоний на фоне повышения их гибели (Almeida et al., 2013). Полученные ранее нами данные позволяют усомниться в этом суждении, так как мы показали параллельное снижение показателей и пролиферации, и апоптоза (Демяшкин, 2016а). Для выяснения причин подобного явления необходимо подробно изучить весь каскад взаимодействия инициаторных и эффекторных каспаз и факторов, способных повлиять на них, учитывая гистологические варианты идиопатического бесплодия.

Каспазы (семейство Cys-Asp-протеаз) принадлежат к семейству эволюционно-консервативных протеаз — ферментов, катализирующих ограниченное расщепление клеточных белков, осуществляющих апоптоз (Crawford et al., 2013; Tang et al., 2015). Каспазы, обеспечивающие реализацию программы апоптоза, подразделяют на две группы — инициаторные (каспазы-2, -8, -9 и -10) и эффекторные (каспазы-3, -6 и -7) (Seaman et al., 2016).

В клетках человека экспрессируются каспазы 1—10, 12 и 14 (Saleh et al., 2004). Под действием повреждающих факторов — цитотоксического гранзима В или лигандов TNF- α , FasL или TRAIL (семейство TNF) — запускается биохимический каскад с участием каспазы-2, -3 и 6—10. Каспазы-1, -4 и -5 являются активаторами противовоспалительных цитокинов, а прокаспаза-14 активируется при созревании кератиноцитов эпидермиса (Eckhart et al., 2000; Lippens et al., 2000; Martinon, Tschoop, 2004; Duclos et al., 2017).

О высокой значимости каспазного каскада в физиологии (вероятно, и в патологии) сперматогенеза свидетельствуют данные об обнаружении разного вида каспаз в половых и соматических клетках семенников, в частности прокаспазы-9 и каспазы-8, которые работают как на митохондриальном (внутреннем), так и на рецепторно-опосредованном (наружном) путях инициации апоптоза. Инициаторные каспазы-8 и -9 образуются при димеризации прокаспаза-8 и -9 в результате их протеолиза, способствуя стабилизации димеров (Boatright et al., 2003; Galluzzi et al., 2012). Эти каспазы приводят к запуску эффекторной каспазы-3, которая присутствует в цитоплазме как стабильный, но неактивный димер (прокаспаза-3), препятствующий катализу белков, необходимых для поддержания жизнеспособности клетки. Их ферментативная активация происходит после расщепления межсубъединичного линкера и димерной перестройки в ответ на протеолитические изменения цитозоля. Субстратная специфичность инициаторных каспаз ограничивается инициаторными, эффекторными каспазами, а также проапоптотическим белком Bid (Mac Kenzie et al., 2012). Каспаза-3 является «точкой невозврата апоптоза» и обуславливает расщепление ключевых белков (ICAD \rightarrow ДНКазы CAD, ROCK), приводя к саморазрушению клетки — межнуклеосомальной фрагментации ядерной ДНК, разрушению актиновых микрофиламентов и других элементов цитоскелета (Kim et al., 2007; Mac Kenzie et al., 2012; Almeida et al., 2013; Sessler et al., 2013).

Каспазы-8 и -9 были обнаружены в семенниках в норме — в сперматогониях, первичных и вторичных сперматocyтах и сперматидях, а также в клетках Лейдига (Print, Loveland, 2000; Sati, Huszar, 2015). Кроме того, каспаза-9 определяется в различных соматических клетках — Сертоли и перитубулярных миоидных клетках (Dabbs, 2014; Sati, Huszar, 2015; Seaman et al., 2016). Относительно недавно было показано увеличение уровня эффекторных каспаз в случаях тяжелой олигозооспермии. В частности, при первичной обструкции и гипосперматогенезе наблюдалось значительное увеличение активности каспаз-3 и -9 (Almeida et al., 2013; Bostwick, 2014).

Таким образом, возникает вопрос о том, на каком уровне происходит дисфункция, приводящая к нарушению сперматогенеза в динамике. Поэтому особое значение принадлежит изучению инициации и терминации апоптоза, за которые ответственны каспазы-9 и -3. Наряду с этим отмечено, что важную роль в регуляции клеточного цикла играет активность ряда белковых факторов, кодируемых соответствующими генами, к которым относятся в первую очередь проапоптотические гены *BAK* и *BAX*, а также антиапоптотические гены *BCL2* и *BCLW* (Oldereid et al., 2001).

Цель настоящего исследования заключалась в оценке уровня апоптоза клеток семенных канальцев человека при нормальном и патологическом сперматогенезе, путем определения доли клеток, содержащих каспазы-9 и -3, а также с помощью сравнения экспрессии проапоптотических (*BAK* и *BAX*) и антиапоптотических генов (*BCL2* и *BCLW*).

Материал и методика

Исследования проводили в Научном клиническом центре ОАО «РЖД» и на кафедре патологической анатомии им. акад. А. И. Струкова Сеченовского Университета (май 2016—январь 2017 гг.). Исследование было одобрено локальным этическим комитетом (протокол № 10—16 от 09.11.16), а также соответствовало требованиям Хельсинкской декларации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical principles for Medical research involving Human subjects, 64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October, 2013). От всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Пациенты и материал. Для исследования использовали фрагменты семенников (аутопаты) условно здоровых мужчин из разных возрастных групп и биопсийный материал яичек лиц, страдающих идиопатическим бесплодием (клинически обоснованная азооспермия). Все пациенты были условно разделены на четыре группы, из них три группы с условным контролем физиологического течения сперматогенеза, в семейном анамнезе — одно и более деторождений: I — мужчины 22—35 лет (28.5 ± 6.5 , $n = 10$); II — мужчины 64—75 лет (69.5 ± 5.5 , $n = 10$); III — 75—90 (69.5 ± 5.5 , $n = 10$) и IV — мужчины 22—35 лет с идиопатической азооспермией (28.5 ± 6.5 , $n = 42$), бесплодие в браке более 2 лет. Объект исследования: во всех группах — семенники (яички).

Анализ гормонального фона мужчин, страдающих бесплодием. Кровь брали строго натощак из локтевой вены. Количественное содержание гормонов проводили по методикам и протоколам после тестирования и утверждения для данной биохимической

Используемые праймеры

Ген	5'-праймер	3'-праймер
<i>BAK</i>	CACGGCAGAGAATGCCTATGA	CCCAATTGATGCCACTCTCAA
<i>BAX</i>	GTCCGCTTTTCTACTTTGCCAG	TCCAGCCCAACAGCCGCTCC
<i>BCL2</i>	TCCGATCAGGAAGGCTAGAGTT	TCGGTCTCCTAAAAGCAGGC
<i>BCLW</i>	TCCAGCCCAACAGCCGCTCC	CAGTGGTTCATCTCCTTGTTG
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	GAAGATGGTGTATGGGATTC

лаборатории. У всех мужчин уровни гормонов ФСГ, ЛГ и тестостерона в сыворотке крови в пределах возрастной физиологической нормы.

Спермограмма. Показатели эякулята оценивали согласно протоколу Всемирной организации здравоохранения (WHO, 2010). После этого была сформирована группа мужчин, страдающих бесплодием, с учетом следующих показателей: азооспермия и ФСГ ≥ 11.0 МЕд/мл.

Лабораторная цитогенетическая и молекулярно-генетическая диагностика включала в себя исследование кариотипа, анализ крови на наличие микроделций AZF локуса Y-хромосомы. Кариотип: 46, XY; Y-микроделции отсутствуют.

Физикальные данные. Все пациенты, страдающие бесплодием, являются молодыми людьми в возрасте 22—35 лет; соматически здоровы, без вредных привычек; инфекционные заболевания, влияющие на сперматогенез (в том числе эпидемический паротит), а также врожденные аномалии развития яичек у пациентов отсутствовали.

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 описанных ранее критериев (Johnsen et al., 1970; De Kretser et al., 1976; Aafjes et al., 1980; Демяшкин, 2016б).

Морфологическое исследование. Фрагменты семенников (1.0×1.0 см) фиксировали в забуференном HCl 10%-ном формалине (pH 7.2; от 5 до 24 ч), дегидратировали в батарее спиртов восходящей концентрации и заключали в парафин. Срезы аутопатов и биоптатов яичек толщиной (4—6) · 10⁻⁶ мкм помещали на обычные, а для иммуногистохимического исследования (ИГХ) — на специальные адгезивные предметные стекла Super Frost Plus и депарафинировали согласно принятой стандартной методике. Впоследствии срезы (≈ 5 мкм) либо окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) для гистологического исследования, либо использовали для ИГХ.

Иммуногистохимический метод (ИГХ). После депарафинизации и регидратации парафиновых срезов проводили иммуногистохимическое окрашивание по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Bond-Max (Leica, Германия) для выявления маркеров апоптоза в структурах яичек. В качестве первичных использовали поликлональные кроличьи антитела к каспазе-3 (Abcam, США) и к каспазе-9 (Abcam, США). Вторичные антитела — универсальные (Hi-Def Detection™ HRP Polymer system, Cell Marque, США), позволяющие выявлять мышьиные и кроличьи первичные антитела, конъюгированные с ферментным комплексом на основе пероксидазы хрена. Для данных маркеров вы-

полняли контрольные реакции для исключения псевдопозитивных и псевдонегативных результатов. Антитела использовали в разведении 1 : 100, титр антител подбирали с использованием раствора для разведения антител. Ядра клеток докрашивали гематоксилином Майера, срезы промывали под проточной водой, дегидратировали в 96%-ном этаноле и заключали в гель Aquatex® (Andwin Science, Франция) под покровные стекла.

Учитывая специфику исследуемого объекта (яички), где половые клетки при световой микроскопии «перекрывают» друг друга, а также особенность распределения внутриклеточных белков, проводили подсчет числа иммунопозитивных клеток (в %) и оценивали степень экспрессии (ve+/-) (Carlson, 2014; Демяшкин, 2016а). Визуализацию аутопсийного и биопсийного материалов выполняли на светооптическом микроскопе Carl Zeiss Lab.A1 (Carl Zeiss, Германия), совмещенном с видеокамерой AxioCam ERc5s (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и программным обеспечением ZEN Lite, при увеличениях объективов 20, 40 и 100×.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Фрагменты биоптатов яичек помещали в стабилизирующий раствор RNeasy Lysis Buffer (QIAGEN, Нидерланды) и хранили при -70 °С. Впоследствии образцы подвергали 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 подвергли ПЦР-РВ с использованием готовой смеси реагентов Absolute Blue QPCR Mix (Thermo Scientific, США) с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green I. ПЦР-РВ проводили 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 (Schmittgen, Livak, 2008). Нормирование и внутренний контроль выполнены относительно референсного гена *GAPDH*. Статистический контроль проводили относительно I группы с нормальным сперматогенезом (аналогичного возраста с бесплодными мужчинами). Подбор праймеров был осуществлен на основании общедоступных материалов о последовательностях ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с использованием программы Primer-BLAST (табл. 1).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программного пакета SPSS 7.5 для Windows (IBM Analytics, США). Количественные данные, полученные в ходе ПЦР-РВ, были проанализиро-

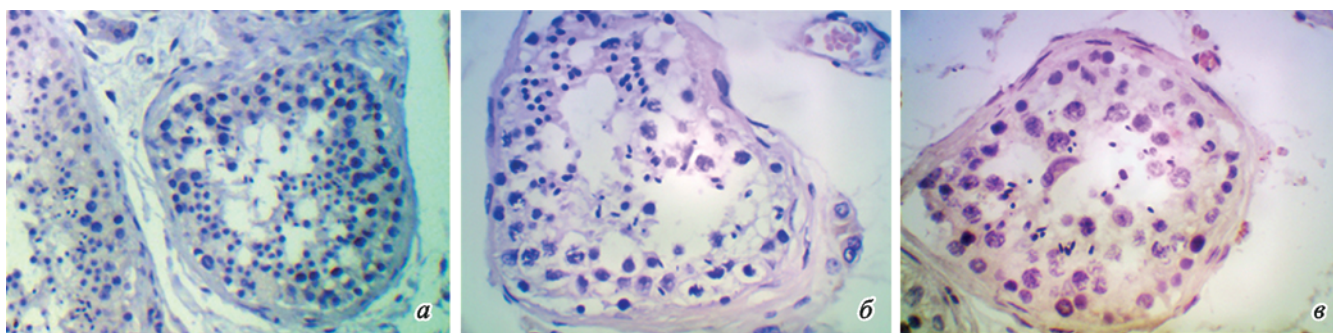


Рис. 1. Внешний вид извитых семенных канальцев при нормальном сперматогенезе.

a — в возрасте 22—35 лет, *б* — 64—75 лет, *в* — 75—90 лет. С возрастом отмечаются разрастание волокнистого компонента межклеточного вещества, местами с признаками склероза, а также гиалиноз стенок артерий среднего и мелкого калибров. Нарушения сосудистой проводимости приводят к дистрофическим изменениям половых клеток и снижению количества клеток Лейдига. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. 20 \times .

ваны с использованием рангового дисперсионного анализа ANOVA. Для сравнения двух выборок использовали *t*-критерий с уровнем значимости $p < 0.05$.

Результаты

Микроскопическое описание семенников мужчин с нормальным сперматогенезом (I—III группы). Стенки извитых семенных канальцев образованы клетками Сертоли и половыми клетками, находящимися на различных стадиях сперматогенеза (рис. 1, *a*—*в*). Во всех исследуемых образцах в каждой группе выявляются морфологические признаки физиологического протекания процесса сперматогенеза (8—10 баллов по шкале S. Johnsen). Сперматогонии лежат на базальной мембране, занимая базальные отсеки семенных канальцев, клетки сперматогенного эпителия на последующих стадиях сперматогенеза локализируются в адлюминальном отсеке, а сперматозоиды — в просветах канальцев. В большинстве семенных канальцев гаметы образуют отдельную функциональную «колонку», в которой все они находятся на одной из шести стадий цикла сперматогенеза. Сперматогонии, которые не вступили в мейоз, несут функцию сперматогониальных стволовых клеток (SSC), пополняющих сперматогониальный пул. В семенниках лиц пожилого возраста визуализируются дистрофические изменения сперматогенного эпителия (рис. 1, *б*), местами отмечается уплотнение волокнистого компонента перитубулярных пространств и стенок кровеносных сосудов. Разрастание волокнистой соединительной ткани с признаками склероза, а также гиалиноз стенок кровеносных сосудов среднего и мелкого калибров особенно заметны в старческом возрасте (рис. 1, *в*). Появление ангиотрофических нарушений вызывает снижение транспорта биологически активных веществ через гематотестикулярный барьер, приводя к выраженным дегенеративным процессам в половых клетках. Кроме того, с возрастом уменьшается количество клеток Лейдига. Некоторые семенные канальца атрофированы.

Микроскопическое описание яичек мужчин с идиопатической формой бесплодия (IV группа). В биоптатах яичек у разных пациентов наблюдали различную морфологическую картину: у 8 — гипосперматогенез (в семенных канальцах располагаются сперматогонии и разрушенные первичные сперматоциты); у 23 — блок созревания с фокусами субтотальной ап-

лазии гамет (единичные сперматогонии); у 9 — Сертоли-клеточный синдром (только клетки Сертоли); у 2 — тубулярная атрофия канальцев. Клетки Сертоли, подверженные апоптотическому процессу, уплощаются, их ядра становятся более базофильными. Также во всех исследуемых случаях выявили гиперплазию клеток Лейдига (рис. 2). Выявленные морфологические различия подтверждают наличие нескольких гистологических вариантов изменения извитых семенных канальцев при идиопатической форме мужского бесплодия.

В результате иммуногистохимического исследования семенников во всех группах обнаружена положительная иммунологическая реакция с антителами к каспазам-9 и -3 в цитоплазме и ядрах половых клеток и клеток Сертоли.

При использовании антител к каспазе-9 в группе мужчин 22—35 лет (I) умеренную ($ve+2$) положительную реакцию получили в цитоплазме сперматогониев, отдельных первичных и вторичных сперматоцитов, а также в сперматиде и клетках Лейдига ($ve+2$) (рис. 3, *a*). У пожилых мужчин (II) умеренно выраженная реакция ($ve+2$) имела место в ядрах сперматогониев и цитоплазме сперматоцитов I и II порядков (рис. 3, *б*). У мужчин старческого возраста (III) иммунопозитивными были цитоплазма и ядра сперматогониев и сперматоцитов I типа (рис. 3, *в*). В клетках Сертоли у мужчин с нормальным сперматогенезом (группы I—III) иммуногистохимического окрашивания не выявляли ($ve-$).

При блоке созревания в извитых семенных канальцах отмечена умеренная иммунная реакция на каспазу-9 в цитоплазме сперматогониев ($ve+2$) (рис. 4, *a*), при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома — слабое окрашивание ($ve-2$) в цитоплазме единичных сперматогониев. При Сертоли-клеточном синдроме иммуномечение при использовании антител к каспазе-9 обнаружено в ядрах немногочисленных клеток Сертоли (рис. 4, *б*). Ни в одном из гистотипов идиопатического бесплодия в клетках Лейдига и в миоидных клетках каспазы-9 не выявлено ($ve-$).

При использовании антител к каспазе-3 у молодых людей (I группа) наблюдали умеренную положительную реакцию ($ve+2$) в цитоплазме сперматогониев и отдельных первичных сперматоцитов, расположенных ближе к базальной мембране извитого семенного канальца, а также в клетках Лейдига (рис. 5, *a*). Также умеренное окрашивание отмечали у пожилых мужчин (II группа): в цитоплазме сперматогониев, сперматоцитов

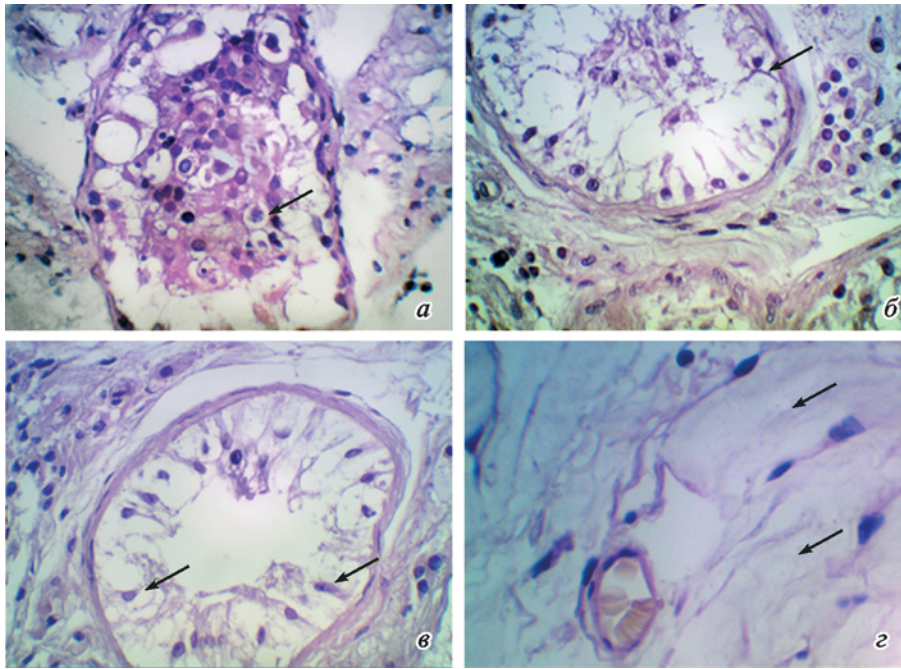


Рис. 2. Различные варианты гистологических изменений извитых семенных канальцев при идиопатическом бесплодии. *а* — гипосперматогенез (*в центре* — разрушенные сперматозоиты); *б* — блок созревания (единичные сперматозоии); *в* — Сертоли-клеточный синдром (клетки Сертоли с дистрофическими изменениями); *г* — тубулярная атрофия (половые клетки, клетки Сертоли и Лейдига отсутствуют; гиалиноз канальцев). *Стрелками* указаны характерные гистологические изменения. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 40×.

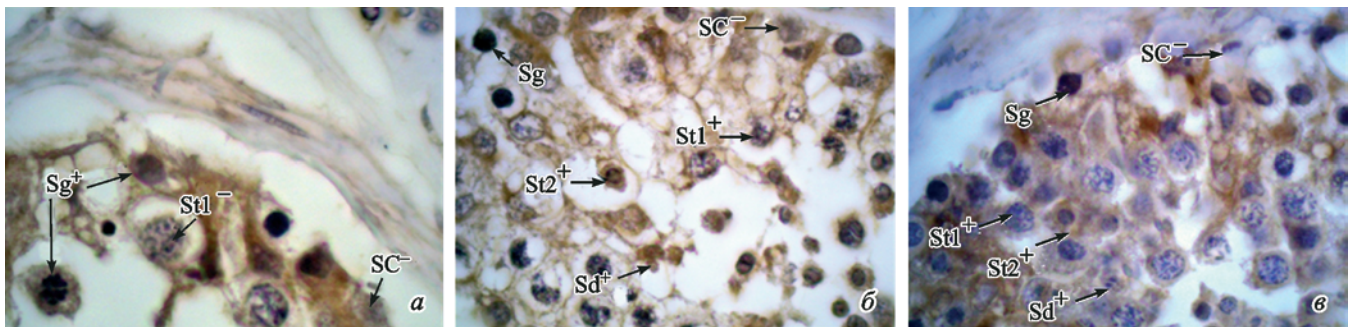


Рис. 3. Иммуногистохимическое выявление каспазы-9 в клетках извитых семенных канальцев при нормальном сперматогенезе. *а* — семенники мужчин в возрасте 22—25 лет, *б* — 64—75 лет, *в* — 75—90 лет. Sg — сперматогонии, St1 — первичные сперматозоиты, St2 — вторичные сперматозоиты, Sd — сперматиды (круглые), SC — клетки Сертоли. Ядра клеток докрасены гематоксилином. Увел.: *а* — 100×, *б*, *в* — 80×.

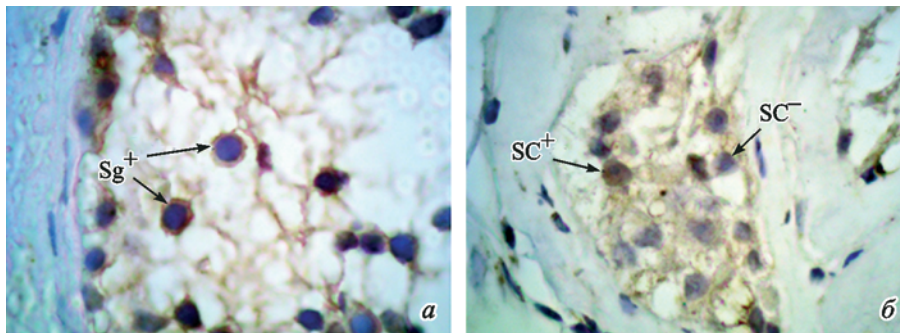


Рис. 4. Иммуногистохимическое выявление каспазы-9 в семенных канальцах при идиопатической форме мужского бесплодия. *а* — блок созревания, *б* — Сертоли-клеточный синдром. Sg — сперматогонии, SC — клетки Сертоли. Ядра клеток докрасены гематоксилином. Увел. 100×.

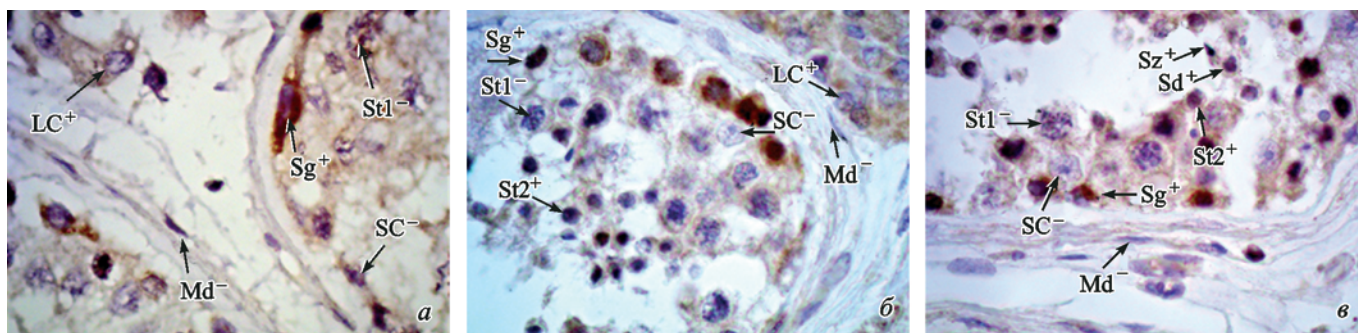


Рис. 5. Иммуногистохимическое выявление каспазы-3 в клетках извитых семенных канальцев при нормальном сперматогенезе. *а* — семенники мужчин в возрасте 22—25 лет, *б* — 64—75 лет, *в* — 75—90 лет. Sg — сперматогонии, St1 — первичные сперматоциты, St2 — вторичные сперматоциты, Sd — сперматиды (круглые), Sz — сперматозоиды, SC — клетки Сертоли, LC — клетки Лейдига, Md — миоидные клетки. Ядра клеток докрашены гематоксилином. Увел. 100×.

I и II типов и в некоторых образцах в ядрах первичных сперматоцитов (рис. 5, *б*). Следует отметить, что у мужчин старческого возраста (III группа) визуализировали иммуномечение во вторичных сперматоцитах и сперматиде (рис. 5, *в*).

В группе мужчин с бесплодием (IV группа) выраженную реакцию (ve+/3) в виде плотного окрашивания в цитоплазме и ядрах наблюдали в сперматогониях при гипосперматогенезе (рис. 6, *а*), блоке созревания (рис. 6, *б*) и при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома (рис. 6, *в*); в виде «мелкодисперсной сеточки» (ve+/2) — в ядрах клеток Сертоли при классическом варианте Сертоли-клеточного синдрома (рис. 6, *г*) с переходом в тубулярную атрофию. В случаях блока созревания интенсивное иммуномечение отмечали в ядрах дегенеративно измененных первичных сперматоцитов. В целом прослеживается прямая зависимость локализации и интенсивности окрашивания от стадии поражения — от легкой (ги-

посперматогенез) к тяжелой (тубулярная атрофия, гиалиноз канальцев) с отрицательной динамикой. Кроме того, диффузное окрашивание обнаружили в клетках Лейдига при блоке мейоза и классическом Сертоли-клеточном синдроме.

Согласно результатам статистической обработки данных, уровень экспрессии каспазы-9, активация которой происходит при реализации митохондриального пути апоптоза, в сперматогониях с нормальным сперматогенезом находится примерно на одном уровне (доля меченых сперматогониев составляет у молодых мужчин — $39.5 \pm 0.33\%$, у пожилых — 35.6 ± 0.44 , у стариков — $32.2 \pm 0.28\%$; табл. 2) и снижен при идиопатической форме мужского бесплодия на стадии гипосперматогенеза ($22.0 \pm 0.22\%$). Однако при дальнейшем развитии патологических изменений этот показатель возрастает и при фокальном варианте Сертоли-клеточного синдрома составляет уже $72.0 \pm 0.41\%$.

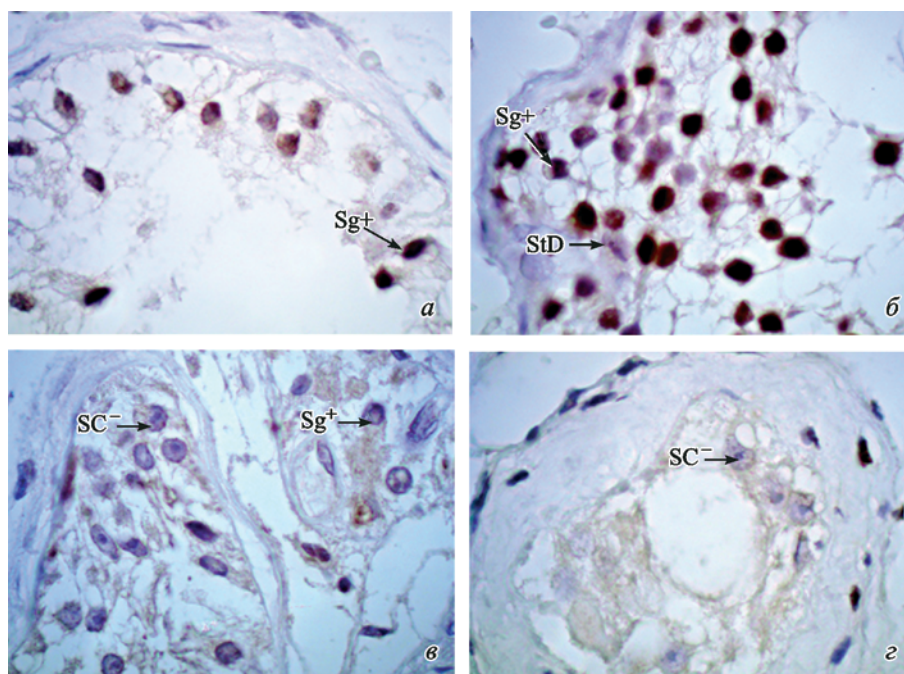


Рис. 6. Иммуногистохимическое выявление каспазы-3 в семенных канальцах при идиопатической форме мужского бесплодия. *а* — гипосперматогенез, *б* — блок созревания, *в* — фокальный вариант Сертоли-клеточного синдрома, *г* — Сертоли-клеточный синдром. Sg — сперматогонии, StD — первичные сперматоциты с дистрофическими изменениями, SC — клетки Сертоли. Ядра клеток докрашены гематоксилином. Увел. 100×.

Таблица 2

**Экспрессия каспаз-9 и -3 в сперматогониях при нормальном и нарушенном сперматогенезе
(идиопатическое бесплодие)**

Группа	Доля сперматогониев, ИГХ-положительных на каспазу-9, %	Доля сперматогониев, ИГХ-положительных на каспазу-3, %
I	39.5 ± 0.33	60.1 ± 0.44
II	35.6 ± 0.44 ^a	78.2 ± 1.2 _a
III	32.2 ± 0.28 ^a	87.3 ± 0.9 ^a
IV (гипосперматогенез)	22.0 ± 0.22 ^б	90.1 ± 1.1 ^б
IV (блок созревания)	64.3 ± 0.39 ^б	91.2 ± 0.9 ^б
IV (фокальный вариант СКС)	72.0 ± 0.41 ^б	93.0 ± 0.88 ^б
IV (классический вариант СКС)	0	0

Примечание. ^a — статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между I, II и III контрольными группами. ^б — статистически достоверные различия (при $p < 0.05$) между контрольной группой I и группой лиц, страдающих бесплодием.

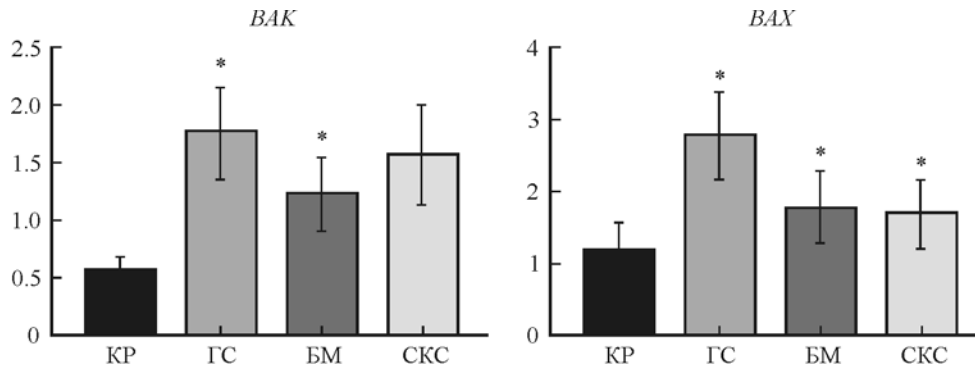


Рис. 7. Экспрессия проапоптотических генов *BAK* и *BAX* в семенниках пациентов с нормальным сперматогенезом (группа I) и при идиопатическом бесплодии (группа IV).

По вертикали — относительный уровень экспрессии, усл. ед. KP — контроль (I группа, 22—35 лет), GC — гипосперматогенез, BM — блок мейоза, СКС — Сертоли-клеточный синдром. Звездочка — статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.05$.

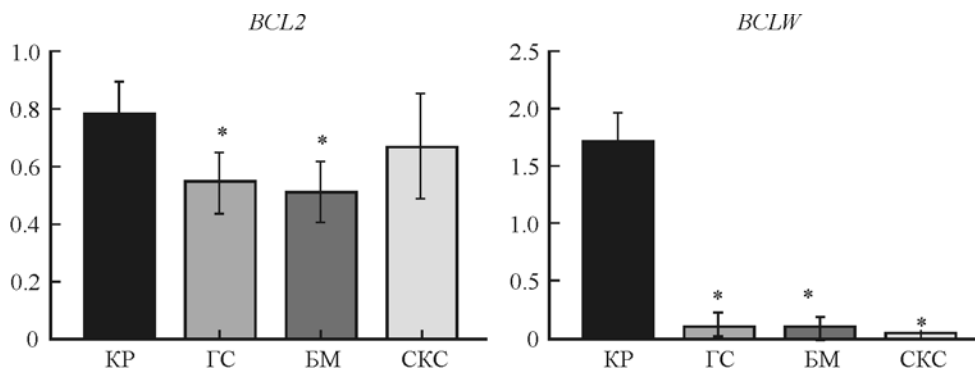


Рис. 8. Экспрессия антиапоптотических генов *BCL2* и *BCLW* в семенниках пациентов с нормальным сперматогенезом (группа I) и при идиопатическом бесплодии (группа IV).

По вертикали — относительный уровень экспрессии, усл. ед. KP — контроль (I группа, 22—35 лет), GC — гипосперматогенез, BM — блок мейоза, СКС — Сертоли-клеточный синдром. Звездочка — статистически значимые отличия от контроля, $p < 0.05$.

Доля сперматогониев, в которых в результате иммуногистохимической реакции выявляли каспазу-3, являющуюся маркером финальных стадий апоптоза, в случае нормального сперматогенеза составляла: I группа — $60.1 \pm 0.44\%$, II — $78.2 \pm 1.2\%$, III — $87.3 \pm 0.9\%$ (табл. 2). Таким образом, апоптотические процессы наиболее характерны для сперматогониев мужчин старческого возраста. При идиопатическом бесплодии наблюдали резкое повышение доли меченых сперматогониев (в среднем $91.4 \pm 1.1\%$).

Анализ экспрессии генов посредством ПЦР-РВ. 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. 7). Напротив, экспрессия антиапоптотических генов *BCL2* и *BCLW* оказалась сниженной. При этом обнаружено, что значения относительной экспрессии гена *BCLW* значительно ниже контрольного уровня во всех исследованных группах пациентов с идиопатическим бесплодием независимо от его патоморфологической формы, в то время как уровень экспрессии *BCL2* изменен умеренно (рис. 8).

Обсуждение

Как указывалось выше, основанием для проведения данного исследования послужили две причины: актуальность проблемы мужского идиопатического бесплодия как таковая и выявленная нами ранее нетипичная для гистогенетических процессов «разбалансировка» соотношения пролиферации—апоптоза — параллельное снижение активности обоих процессов у пациентов с идиопатическим бесплодием (Демяшкин, 2016а). Сравнительное исследование экспрессии ключевых факторов апоптоза клетками семенников при нормальном и нарушенном сперматогенезе для выяснения причины снижения активности апоптотических процессов, сопровождающихся снижением интенсивности клеточной пролиферации, явилось основной задачей настоящего исследования. Для этого было изучено присутствие в половых и соматических клетках яичка при идиопатической форме мужского бесплодия двух типов каспаз — отвечающей за инициацию (каспаза-9) и завершение (каспаза-3) апоптоза. При иммуногистохимических реакциях каспаза-9 и -3 выявляются в цитоплазме анализируемых клеток (Dabbs, 2014). Во всех исследованных группах мужчин (как при бесплодии, так и у мужчин того же возраста с нормальным сперматогенезом) отмечали иммуногистохимическое мечение сперматогониев. Позитивную реакцию с каспазой-9 наблюдали в норме на всех стадиях развития половых клеток, и активность реакции понижалась от стадии сперматогониев к стадии первичных сперматоцитов. Высокие уровни экспрессии каспазы-3 (финального звена апоптотического клеточного каскада) на поздних стадиях сперматогенеза обнаружили в половых клетках у пожилых мужчин (II группа) и

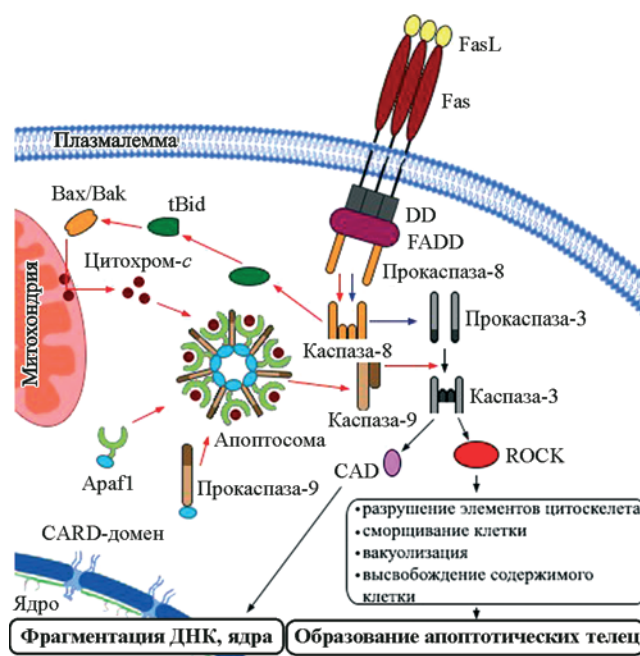


Рис. 9. Схема реализации сигнальных путей апоптоза в мужских половых клетках.

Прикрепление лиганда (FasL) к рецептору смерти (Fas) приводит к активации адаптера (FADD), с которым связана прокаспаза-8. По рецепторно-опосредованному сигнальному пути (синие стрелки) каспаза-8 напрямую активирует эффекторную каспазу-3 — «исполнителя» программы гибели клетки. Если концентрация каспазы-8 слишком низкая для прямой активации эффекторных каспаз, то может быть запущен митохондриальный путь апоптоза (красные стрелки). С участием каспазы-8 происходит расщепление белка Bid с образованием tBid, который перемещается в митохондрии, где активирует Bax и Bak, подвергая их олигомеризации с формированием Bax/Bak-мегаканалов в наружной митохондриальной мембране. Через эти каналы матриксный цитохром c высвобождается в цитозоль, тем самым иницируя внутренний сигнальный путь апоптоза. Параллельно в цитоплазме образуются комплексы активатора каспаз — CARD-домена с Araf-1 и прокаспазами-9. Цитохром c связывается с белком Araf-1, индуцируя его олигомеризацию и взаимодействие с дАТФ и прокаспазой-9, формирующаяся апоптосома активирует каспазу-9, которая может кооперировать с каспазой-8 для запуска эффекторных каспаз-3. Последние через ДНКазы CAD и ROCK приводят к фрагментации ядра и разрушению элементов цитоскелета (прежде всего актиновых миофиламентов). Рецепторно-опосредованный сигнальный путь апоптоза преобладает в мужских половых клетках (в первую очередь в сперматогониях) при физиологическом течении сперматогенеза во всех возрастных группах (при этом его интенсивность увеличивается с возрастом), а митохондриальный путь доминирует у молодых мужчин с идиопатической формой мужского бесплодия (красные стрелки).

мужчин старческого возраста (III группа). На этом основании можно предполагать, что в норме с возрастом в процессе сперматогенеза наружный путь апоптоза начинает «доминировать» над внутренним путем, в процессе которого каспазы-9 и -3 участия не принимают (рис. 9).

При гипосперматогенезе интенсивность иммуногистохимического окрашивания половых клеток на всех стадиях развития не увеличивалась, в то время как при фокальном варианте СКС обнаружили усиление мечения обеих изученных каспаз. У мужчин, страдающих необструктивной азооспермией, особенно в случае блока созревания, увеличение числа сперматогониев, экспрессирующих каспазу-9, т. е. находящихся на терминальной стадии апоптоза, коррелировало с усилением экспрессии эффекторной каспазы-3 в сперматогониях.

Известно, что при чрезмерном увеличении числа половых клеток или при их повреждении клетки Сертоли индуцируют апоптоз части половых клеток путем активации каспаз для обеспечения физиологического баланса, который характерен для нормального течения сперматогенеза, сами клетки Сертоли при этом могут погибать (Gibbs et al., 2011; Almeida et al., 2013; Демяшкин, 2016a). Увеличение количества клеток Сертоли с положительной реакцией на каспазы-9 и -3 у мужчин с СКС подтверждает ключевую роль каспаз в снижении количества сперматозоидов в семенных канальцах и эякуляте при данном нарушении сперматогенеза.

Таким образом, результаты иммуногистохимического выявления каспаз-9 и -3 в клетках семенников различаются в зависимости от степени нарушения процесса сперматогенеза. При слабовыраженном нарушении сперматогенеза происходит окрашивание цитоплазмы сперматогониев, клетки Сертоли при этом не метятся. При классическом варианте СКС часть сперматогониев и клеток Лейдига не окрашивается при выявлении каспаз-3 и -9, но появляется иммуномечение в единичных клетках Сертоли. В тяжелых случаях (тубулярная атрофия) экспрессия маркеров апоптоза отмечается даже в клетках перитубулярного окружения, миоидных клетках.

Выявленная «мозаика» результатов иммуногистохимической реакции на каспазы-9 и -3 в половых и соматических клетках семенников при идиопатической форме мужского бесплодия указывает на перспективность использования этих маркеров для дифференциальной диагностики различных форм бесплодия, а также при анализе клеточного баланса сперматогенного цикла в норме.

С учетом тождественности основных событий женского и мужского гаметогенеза и сходства формирования мужских и женских гонад в эмбриональном периоде (стадия индифферентной гонады) полезно рассмотреть полученные факты с позиции закономерностей гистогенеза (Carlson, 2014). Принципиальное отличие оогенеза от сперматогенеза состоит в том, что самые ранние стадии оогенеза (до первичных ооцитов) проходят внутриутробно. Поддержание числа женских половых клеток в этот период обеспечивается за счет баланса между процессами пролиферации и апоптоза. По всей вероятности, в мужском организме осуществляется аналогичный процесс, но уже в постнатальной стадии сперматогенеза.

Изменение баланса активности генов в сторону увеличения экспрессии проапоптотических генов (*BAK* и *BAX*) и снижения экспрессии антиапоптотических генов (*BCL2* и *BCLW*) способствует индукции апоптоза уже на ранних стадиях мужского бесплодия.

По результатам анализа относительного уровня экспрессии генов, ответственных за регуляцию апоптоза, выявлены существенные отличия яичек пациентов с идиопатическим бесплодием с разными формами патологического сперматогенеза от контрольных образцов, полученных у мужчин с нормальным сперматогенезом.

Несмотря на то что клетки Лейдига оказались каспазопозитивными в биоптатах у мужчин, страдающих бесплодием, при нормальном сперматогенезе в них не было выявлено апоптотических маркеров, что подтверждается предыдущими исследованиями (Hibi et al., 2017), однако смерть клеток Лейдига иногда наблюдалась при блоке мейоза. Гипертрофия клеток Лейдига и «массивный» апоптоз обнаружены при СКС. Данные других

авторов также указывают на связь этих процессов с нарушением экспрессии антиапоптотических факторов (Kim et al., 2007; Hibi et al., 2017). Таким образом, вероятно, что клетки Лейдига подвергаются апоптозу вторично, в ответ на апоптоз мужских гамет в пораженных семенных канальцах. Происходящие при этом патологические процессы в семенных канальцах, а также дистрофические изменения половых клеток в пожилом и особенно в старческом возрасте можно рассматривать как проявления «некроптоза», описанного в эксперименте на самцах мышей (Galluzzi et al., 2011; Ferreira et al., 2017; Li et al., 2017).

Уменьшение числа половых клеток при гипосперматогенезе является следствием снижения численности клеток Сертоли посредством апоптоза и поражением митохондрией половых клеток на стадии первичных сперматозоидов, что также подтверждается результатами других авторов (Almeida et al., 2013; Leung et al., 2017).

Полученные нами данные, а также сопоставление их с результатами других исследований, выполненных с применением иных маркеров, также ответственных за запрограммированную гибель клеток (Sessler et al., 2013; Vanhoutteghem et al., 2014; Lambrot et al., 2015; Wang et al., 2015; Hu et al., 2017; Leung et al., 2017), позволяют полагать, что решающую роль в развитии идиопатической формы мужского бесплодия играют повреждения аутокринного аппарата клеток Сертоли. Основываясь на данных о гистофизиологии сперматогенеза в разных возрастных группах, мы можем отметить, что данный повреждающий фактор действует уже у мальчиков в препубертатном периоде онтогенеза. Полученные нами данные указывают на то, что при нарушении физиологического течения сперматогенеза происходит гибель сперматогоний, тогда как клетки Сертоли остаются толерантными к действию факторов, вызывающих клеточную смерть. Можно выдвинуть гипотезу о том, что причиной идиопатического бесплодия является дисгенетическое нарушение в процессе закладки клеток Сертоли в гонаде в эмбриогенезе.

На основании полученных нами результатов можно заключить, что в пожилом возрасте в семенниках рецепторно-опосредованный путь запрограммированной клеточной гибели преобладает над внутренним (митохондриальным). При идиопатической форме мужского бесплодия доминирующим является внутренний путь апоптоза. Повышение активности маркеров апоптоза может быть ассоциировано с нарушениями созревания половых клеток при блоке мейоза и с истощением пула половых клеток при Сертоли-клеточном синдроме. Эти данные открывают новые перспективы для понимания молекулярных основ патологического сперматогенеза и могут привести к разработке и улучшению новых способов лечения необструктивной формы азооспермии.

Автор выражает благодарность акад. РАН, д. м. н., проф. [О. В. Волковой]; чл.-кор. РАН, д. м. н. проф. Т. Г. Боровой; д. б. н., проф. Г. Г. Кругликову; д. м. н., проф. Е. А. Коган; д. м. н., проф. А. Ю. Цибулевскому, врачу-лаборанту (биологу) патологоанатомического отделения ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова», канд. хим. наук Н. М. Файзуллиной, а также пациентам, участвовавшим в клиническом исследовании.

Список литературы

- Данилов Р. К., Боровая Т. Г., Клочков П. Д. 2000. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей (некоторые итоги XX века и перспективы дальнейших исследований). *Морфология*. 118 (4) : 7—16. (Danilov R. K., Borovaya T. G., Klochkov N. D. 2000. Experimental and histological analysis of histogenesis and tissue regeneration (some results of the 20th century and perspectives on further research). *Morphologia*. 118 (4) : 7—16.)
- Демяшкин Г. А. 2016а. Пролиферация и апоптоз мужских половых клеток в сперматогенном эпителии в норме и при не-обструктивной азооспермии. *Крым. журн. эксперим. клин. мед.* 6(2) : 19—32. (Demyashkin G. A. 2016. Proliferation and apoptosis of male germ cells in the seminiferous epithelium in normal and nonobstructive azoospermia. *Krym. J. Exp. Clin. Med.* 6 (2) : 19—32.)
- Демяшкин Г. А. 2016б. Новые подходы диагностики мужского бесплодия: анализ биоптатов яичка с нормальным и нарушенным сперматогенезом. *Вестн. мед. ин-та «РЕАВИЗ»: реабилитация, врач и здоровье*. 2 : 110—128. (Demyashkin G. A. 2016. New approaches in male infertility diagnosis: examination of biopsy material from testicle with normal and disturbed spermatogenesis. *Bull. Med. Inst. «REAVIZ»: Rehabilitation, Physician and health*. 2 : 110—128.)
- Aafjes J. H., Vels J. M., Schenck E. 1980. Fertility of rats with artificial oligozoospermia. *J. Reprod. Fertil.* 58 : 345—351.
- Almeida C., Correia S., Rocha E., Alves Á. 2013. Caspase signalling pathways in human spermatogenesis. *J. Assist. Reprod. Genet.* 30 : 487—495.
- Boatright K. M., Rensus M., Scott F. L., Sperandio S., Shin H., Pedersen I. M., Ricci J. E., Edris W. A., Sutherland D. P., Green D. R., Salvesen G. S. 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol. Cell*. 11 : 529—541.
- Bostwick D. G., Cheng L. 2014. *Urologic surgical pathology*. 3rd ed. 2014, Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. 976 p.
- Carlson B. 2014. *Human embryology and developmental biology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. 520 p.
- Chen H. H., Welling M., Bloch D. B., Munoz B. J., Mientjes E., Chen X., Tramp C., Wu J., Yabuuchi A., Chou Y.-F., Buecker C., Krainer A., Willemsen R., Heck A. J., Geijsen N. 2014. DAZL limits pluripotency, differentiation, and apoptosis in developing primordial germ cells. *Stem Cell Rep.* 3 : 892—904.
- Crawford E. D., Seaman J. E., Agard N., Hsu G. W., Julien O., Mahrus S., Nguyen H., Shimbo K., Yoshihara H. A. I., Zhuang M., Chalkley R. J., Wells J. A. 2013. The DegraBase: a database of proteolysis in healthy and apoptotic human cells. *Mol. Cell Proteomics*. 12 : 813—824.
- Dabbs D. J. 2014. *Diagnostic immunohistochemistry*. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. 960 p.
- De Krester D. M., Holstein A. F., Hafez E. S. E. 1976. Human semen and fertility regulation in men. In: *Testicular biopsy and abnormal germ cells*. St. Louis: MO, Mosby. 332—343.
- Duclos C., Champagne A., Carrier J., Saucier C., Lavoie C., Denault J.-B. 2017. Caspases play in traffic. *Cell Death Disease*. 8 : e2636.
- Eckhart L., Ban J., Fischer H., Tschachler E. 2000. Caspase-14 : analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277 : 655—659.
- Ferreira M., Boens S., Winkler C., Szeker K., Verbinnen I., van Eynde A., Fardilha M., Bollen M. 2017. The protein phosphatase-1 regulator NIPPI1 is essential for mammalian spermatogenesis. *Scient. Rep.* 7 : 13364.
- Galluzzi L., Kepp O., Trojel-Hansen C., Kroemer G. 2012. Non-apoptotic functions of apoptosis-regulatory proteins. *EMBO Rep.* 13 : 322—330.
- Gibbs G. M., Orta G., Reddy T., Koppers A. J., Martínez-López P., de la Vega-Beltrán J. L., Lo J. C., Veldhuis N., Jamsai D., McIntyre P., Darszon A., O'Bryan M. K. 2011. Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 108 : 7034—7039.
- Hibi H., Yamashita K., Sumitomo M., Asada Y. 2017. Leydig cell tumor of the testis, presenting with azoospermia. *Reprod. Med. Biol.* 16 : 392—395.
- Hu X., Huang X., Shen B., Liao S., Ning Y., Ma L., Chen J., Lin X., Zhang D., Li Z., Zheng C., Feng Y., Huang X., Han C. 2017. Gene knockout of *Zmym3* in mice arrests spermatogenesis at meiotic metaphase with defects in spindle assembly checkpoint. *Cell Death Disease*. 8 : e2910.
- Johnsen S. G. 1970. Testicular biopsy score count — a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1 : 2.
- Kim S. K., Yong-Dal Yoon, Yong-Seog Park, Ju Tae Seo, Jong-Hoon Kim. 2007. Involvement of the Fas-Fas ligand system and active caspase-3 in abnormal apoptosis in human testes with maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Fertil. Steril.* 87 : 547—553.
- Lambrot R., Lafleur C., Kimmins S. 2015. The histone demethylase KDM1A is essential for the maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells and progenitors. *FASEB J.* 29 : 4402—4416.
- Leung J. W., Makharashvili N., Agarwal P., Chiu L. Y., Pourpre R., Cammarata M. B. 2017. ZMYM3 regulates BRCA1 localization at damaged chromatin to promote DNA repair. *Genes Develop.* 31 : 260—274.
- Li D., Meng L., Xu T., Su Y., Liu X., Zhang Z., Wang X. 2017. RIPK1-RIPK3-MLKL-dependent necrosis promotes the aging of mouse male reproductive system. *eLife*. 6 : e27692.
- Lippens S., Kockx M., Knaepen M., Mortier L., Polakowska R., Verheyen A., Garmyn M., Zwijsen A., Formstecher P., Huylebroeck D., Vandenabeele P., Declercq W. 2000. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ.* 7 : 1218—1224.
- Mac Kenzie S. H., Clark A. C. 2012. Death by caspase dimerization. *Adv. Exp. Med. Biol.* 747 : 55—73.
- Matzuk M. M., Lamb D. J. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* 14 : 1197—2213.
- Olderoid N. B., Angelis P. D., Wiger R., Clausen O. P. 2001. Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Mol. Hum. Reprod.* 7 : 403—408.
- Print C., Loveland K. L. 2000. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*. 22 : 423—430.
- Saleh M., Vaillancourt J. P., Graham R. K., Huyek M., Srinivasula S. M., Alnemri E. S., Steinberg M. H., Nolan V., Baldwin C. T., Hotchkiss R. S., Buchman T. G., Zehnbauber B. A., Hayden M. R., Farrer L. A., Roy S., Nicholson D. W. 2004. Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature*. 429 : 75—79.
- Sati L., Huszar G. 2015. Sperm motility and viability: overview of the cellular and physiological aspects that support these functions. *Eur. Med. J.* 1 : 74—80.
- Schmittgen T., Livak K. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3 : 1101—1108.
- Seaman J. E., Julien O., Lee P. S., Rettenmaier T. J., Thomson N. D., Well J. A. 2016. Cacidases: caspases can cleave after aspartate, glutamate and phosphoserine residues. *Cell Death Differ.* 23 : 1717—1726.
- Sessler T., Healy S., Samali A., Szegezdi E. 2013. Structural determinants of DISC function: new insights death receptor-mediated apoptosis signaling. *Pharmacol. Ther.* 140 : 186—199.
- Tang H. L., Tang H. M., Fung M. C., Hardwick J. M. 2015. In vivo Caspase tracker biosensor system for detecting anastasis and non-apoptotic caspase activity. *Sci. Rep.* 5 : 9015.
- Vanhoutteghem A., Messiaen S., Herve F., Delhomme B., Moison D., Petit J. M. 2014. The zinc-finger protein basonuclin 2 is required for proper mitotic arrest, prevention of premature meiotic initiation and meiotic progression in mouse male germ cells. *Development*. 141 : 4298—4310.

Wang S., Wang X., Wu Y., Han C. 2015. IGF-1R signaling is essential for the proliferation of cultured mouse spermatogonial stem cells by promoting the G₂/M progression of the cell cycle. *Stem Cells Develop.* 24 : 471—483.

Yakirevich E., Sabo E., Dirnfeld M., Sova Y., Spagnoli G. C., Resnick M. B. 2003. Morphometrical quantification of spermatog-

nial germ cells with the 57B anti-MAGE-A4 antibody in the evaluation of testicular biopsies for azoospermia. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morph.* 11 : 37—44.

Поступила 7 X 2017

АПОПТОЗИС В СЕМИНІФЕРОУСІ ТУБУЛАХ ЧОЛОВІКА В НОРМАЛІ ТА В ІДІОПАТИЧНІЙ НЕПЛОДНОСТІ

G. A. Demyashkin^{1,2}

¹ Scientific Clinical Center JSC «Russian Railways», Moscow, 123567, and

² I. M. Sechenov Medical University, Moscow, 119048;

e-mail: doc.dga76@gmail.com

The purpose of this study was to assess the level of apoptosis in cells of human seminiferous tubules in normal and pathological spermatogenesis by revealing the proportion of immunostaining cells for caspase-9 and -3 and by comparing the expression of pro-apoptotic (*BAK* and *BAX*) and anti-apoptotic genes (*BCL2* and *BCLW*). A retrospective study involved men ($n = 42$) who complained of childlessness in marriage for 2 years with a diagnosis of idiopathic infertility, established after physical, genetic, biochemical (hormones) and cytological (spermogram) analysis. The biopsies of the testes as well as the autopsy material of men 22—35 ($n = 10$), 64—75 ($n = 10$) and 75—90 ($n = 10$) years were studied using the immunohistochemical method (caspase-9 and -3) and PCR-RT. The marking level for caspase-9 in spermatogonia with normal spermatogenesis is approximately at the same level (the proportion of stained spermatogonia is $39.5 \pm 0.33\%$ in young men, $35.6 \pm 0.44\%$ in the elderly, and $32.2 \pm 0.28\%$ in man of senile age), and increases when the maturation is blocked and in the case of focal variant of Sertoli-cell-only syndrome (64.3 ± 0.39 and $72.0 \pm 0.41\%$, respectively). When using antibodies to caspase-3, the percentage of immunopositive spermatogonia in normal spermatogenesis was $60.1 \pm 0.44\%$ in young men, $78.2 \pm 1.2\%$ in the elderly, and $87.3 \pm 0.9\%$ in men of senile age, and with idiopathic infertility, a sharp increase in the proportion of labeled spermatogonia was observed (an average of $91.4 \pm 1.1\%$). In the case of hypospermatogenesis and the blocking of maturation, a significant increase in the relative level of expression of the proapoptotic genes of the internal pathway of apoptosis of *BAX* and *BAK* was observed against the background of a decrease in the expression of the anti-apoptotic genes *BCL2* and *BCLW*, compared to men of the same age but with normal spermatogenesis. Based on the results, we can conclude that in the elderly's testes the receptor-mediated pathway of apoptosis predominates over the mitochondrial (internal) pathway. In the idiopathic form of male infertility the internal pathway of apoptosis is dominant. An increase in the activity of apoptosis markers can be associated with impaired maturation of the germ cells in the meiosis block and with the depletion of the germ cell pool in Sertoli-cell-only syndrome.

Key words: caspase-9, caspase-3, male idiopathic infertility, testicular biopsy, azoospermia, elderly's testes.