

## Современный взгляд на иммунологические факторы нарушения мужской репродуктивной функции

М. Н. Тарасова, Г. Н. Чистякова, И. А. Газиева, И. И. Ремизова  
Отделение иммунологии и микробиологии ФГУ «НИИ ОММ Росмедтехнологий», г. Екатеринбург

### Modern view at immunology factors of damage of reproductive function

M. N. Tarasova, G. N. Chistjakova, I. A. Gazieva, I. I. Remisova

#### Резюме

**Цель исследования:** оценить особенности функционального состояния иммунной системы мужчин из супружеских пар с бесплодием в зависимости от степени нарушения процессов сперматогенеза. Проведено клинично-лабораторное обследование 99 инфертильных мужчин: 55 мужчин с показателями спермограммы, соответствующими нормам, рекомендованным ВОЗ, и 44 мужчины с отклонением от нормы одного или несколько показателей спермограммы. Группу сравнения составили 15 здоровых мужчин с нормальной репродуктивной функцией. Состояние структуры хроматина сперматозоидов и содержание дефектных клеток в эякуляте оценивали с использованием метода проточной цитофлуориметрии. Уровень IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  и C-реактивного протеина в спермальной плазме и сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, для преодоления проблемы множественных сравнений использовали поправку Бонферрони (различия считались статистически достоверными, если уровень значимости не превышал 0,01). Установлено повышение синтеза IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10 в спермоплазме и возрастание концентрации IL-1RA и IL-8 в сыворотке крови у мужчин из супружеских пар с бесплодием при нормо- и патоспермии. При нарушении структурной организации сперматозоидов у пациентов с нормоспермией повышается концентрация IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  в сыворотке крови и концентрация CRP и TGF- $\beta$  в спермоплазме. Патоспермия, наряду с данными изменениями, сопровождается усилением локальной продукции IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$  на фоне снижения концентрации IL-6.

Нарушения процесса гаметогенеза сопровождаются активацией иммунной системы, гиперпродукцией первичных и вторичных медиаторов межклеточного взаимодействия на локальном уровне, выходом маркеров воспалительной реакции в системный кровоток. Неспособность протекторных механизмов препятствовать дальнейшему прогрессированию патологического процесса может приводить к нарушению репродуктивной функции и патоспермии.

**Ключевые слова:** сперматогенез, цитокины, семенная плазма, бесплодие, нормоспермия, патоспермия.

#### Summary

**The purpose of research:** to estimate features of a functional condition of immune system of men from married couples with infertility depending on a degree of damage of spermatogenesis processes. The clinic-laboratory inspection of 99 infertility men is carried out: 55 men with parameters of the spermograms, corresponding the norms, recommended by the WHO, and 44 men with a deviation from the recommended norms of one or several parameters of the spermograms. The group of comparison was made by 15 healthy men with normal reproductive function. A condition of sperm chromatin structure and the contents of defective cells in ejaculate estimated with use of a method flow cytometry. Level of IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and C-reactive protein in seminal plasma and serum of blood defined a method of immunoenzym assay. For an estimation of reliability of distinctions between groups is used the Manna-Witne's nonparametric criterion, for overcoming a problem of plural comparisons is used the Bonferroni's amendment (distinctions were considered statistically authentic if the significance value did not exceed 0,01). Increase of synthesis of IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10 in seminal plasma and increase of concentration of IL-1RA and IL-8 in serum of blood at men from married couples with infertility is established at normo- and pathospermia. At damage of the sperm organization structure at patients with normospermia concentration of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in serum of blood and concentration of CRP and TGF- $\beta$  in seminal plasma increase. Pathospermia, alongside with the given changes, it is accompanied by increase of local production of IL-2, IL-4 and IFN- $\gamma$  on a background of decrease of concentration of IL-6.

М. Н. Тарасова — м. н. с. отделения иммунологии и микробиологии;

Г. Н. Чистякова — д. м. н., руководитель отделения иммунологии и микробиологии;

И. А. Газиева — к. б. н., с. н. с. отделения иммунологии и микробиологии;

И. И. Ремизова — к. б. н., н. с. отделения иммунологии и микробиологии.

Damage of process of gametogenesis are accompanied by activation of immune system, hyperproduction primary and secondary intercellular interaction mediators at a local level, an output of markers of inflammatory reaction in a system blood-groove. Inability protector mechanisms interferes with the further progressing of pathological process can lead to damage of reproductive function and pathospermia.

**Keywords:** spermatogenesis, cytokines, seminal plasma, infertility, normospermia, pathospermia.

## Введение

Бесплодный брак остается одной из важнейших социальных и медицинских проблем, как в нашей стране, так и за рубежом. Тенденция к ухудшению качества спермы и, как следствие, увеличению доли мужского фактора в структуре бесплодного брака, диктует необходимость изучения особенностей развития патологических процессов, приводящих к мужской инфертильности.

Традиционным, рекомендованным ВОЗ, критерием оценки состояния мужской репродуктивной функции считается исследование эякулята, включающее в себя определение концентрации, подвижности, морфологии сперматозоидов [1]. Однако общепринятые методы лабораторной оценки сперматогенеза позволяют регистрировать лишь грубые морфологические изменения в половых клетках и не дают возможности определить тонкие структурно-функциональные нарушения в ядерном аппарате сперматозоидов, в результате чего проводится дополнительное, часто дорогостоящее обследование женщин, а нередко и их лечение.

В связи с этим особое значение для диагностики бесплодия у мужчин приобретает внедрение информативных и высокочувствительных лабораторных методов оценки репродуктивного потенциала, к которым относится исследование структурной организации хроматина сперматозоидов.

Несмотря на не ослабевающий в последние годы интерес исследователей к оценке роли иммунной системы в нарушении репродуктивной функции мужчин, остается открытым вопрос, насколько взаимосвязаны механизмы иммунологической регуляции процессов сперматогенеза с нарушением структурной организации хроматина гамет.

Сперматогенез, являющийся одним из наиболее динамичных процессов в человеческом организме, связанных с клеточной регенерацией и дифференцировкой, происходит под контролем совокупности гормонов, цитокинов и факторов роста. Нормальное протекание гаметогенеза обеспечивается взаимодействием большого количества клеток, которое осуществляется не только при непосредственных контактах, но и за счет сложной системы цитокиновых сигналов, играющих ключевую роль в координации всех процессов организма [2, 3, 4, 5]. В свою очередь выработка цитокинов является непосредственным отражением функциональной активности иммунокомпетентных клеток и состояния иммунной системы в целом. Нарушения регуляторных взаимодействий на разных этапах формирования половых клеток приводят к развитию патологического процес-

са в регулируемой системе и в организме в целом.

В последние годы предпринимаются попытки определить диагностическую значимость цитокинов посредством выявления связи между продукцией этих пептидов и показателями спермограммы. Ряд исследователей доказал существование корреляционных зависимостей между содержанием цитокинов и морфо-функциональными, а также количественными показателями эякулята [5, 6, 7]. В то же время практически не изучена степень участия иммунной системы в процессах, приводящих к нарушению организации и передачи генетического материала. Учитывая важную роль иммунной системы как в сперматогенезе, так и в репродукции человека в целом, очень актуальными являются исследования, способствующие появлению новых знаний, позволяющих выявить адекватные иммунологические индикаторы состояния репродуктивного здоровья для повышения эффективности диагностики нарушений фертильности мужчины [8, 9]. Результаты фундаментальных исследований состояния иммунной системы мужчины при нарушении тонких механизмов упаковки и передачи генетической информации позволят задать новые векторы диагностического поиска резервов для снижения количества бесплодных браков.

**Цель:** оценить особенности функционального состояния иммунной системы мужчин в зависимости от степени нарушения процессов сперматогенеза.

## Материал и методы

Проведен анализ результатов клинико-лабораторного обследования 99 пациентов из числа бесплодных супружеских пар и 15 здоровых фертильных мужчин репродуктивного возраста. В ходе исследования на основании морфо-функциональных и количественных характеристик эякулята были сформированы следующие группы: 1-я группа — 55 мужчин из числа бесплодных супружеских пар с показателями спермограммы, соответствующими нормам, рекомендованным ВОЗ, 2-я группа — 44 мужчины из бесплодных супружеских пар с отклонением от норм одного или нескольких показателей спермограммы. Группу сравнения составили 15 здоровых мужчин фертильного возраста с нормальной репродуктивной функцией.

Критерием исключения для пациентов основных групп служили женский фактор бесплодия, а также гормональные нарушения и вирусно-бактериальные инфекции, верифицированные при обследовании супружеской пары.

Аналитический этап исследования включал макро- и микроскопическое исследование эяку-

лята с использованием стандартного протокола, рекомендованного ВОЗ [1]. Состояние структуры хроматина сперматозоидов оценивали с использованием метода проточной цитофлуориметрии на анализаторе «FACSCalibur» фирмы «Becton Dickinson» (США).

Помимо оценки степени компактизации хроматина сперматозоидов данный метод позволял определить уровень неспецифической флуоресценции, отражающий процентное содержание дефектных клеток, присутствующих в исследуемом образце.

Определение уровня медиаторов межклеточного взаимодействия в сыворотке крови и семенной плазме осуществляли методом ИФА в соответствии с рекомендациями фирм-изготовителей. Уровень IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  определяли с использованием наборов фирмы «Biosource» (Бельгия), содержание TNF- $\alpha$  оценивали с помощью тест-систем «Cytimmune» (США). Концентрацию С-реактивного протеина (CRP) определяли с использованием наборов фирмы «Biomerica» (США).

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с использованием программных пакетов Microsoft Excel 7.0 и «Statistica 6.0» (данные представляли в виде арифметического среднего (M) и стандартного отклонения ( $\sigma$ ). Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, для преодоления проблемы множественных сравнений применяли поправку Бонферрони (различия средних считали статистически достоверными, если уровень значимости  $p$  не превышал 0,01).

## Результаты и их обсуждение

Изучение структурной организации сперматозоидов у мужчин из супружеских пар с бесплодием выявило значительные колебания значений параметров в группе пациентов с нормоспермией. Разнородность результатов исследования позволила подразделить данную группу на три подгруппы. Критерием отбора являлись показатели, характеризующие организацию мужских половых клеток — степень компактизации хроматина сперматозоидов D/s (в норме более 48,5 усл.ед., патент №2262107 на изобретение «Способ определения зрелости сперматозоидов») и количество дефектных клеток HDS (в норме менее 15%):

1-я подгруппа — 17 пациентов, в образцах эякулята которых показатели степени компактизации хроматина D/s и количества дефектных клеток HDS находились в пределах установленной нормы (D/s > 48,5 усл.ед., HDS < 15,0%);

2-я подгруппа — 19 пациентов, у которых один из показателей находился в пределах ус-

тановленной нормы, в то время как другой не соответствовал нормативному значению (D/s > 48,5 усл.ед. и HDS > 15,0% или D/s < 48,5 усл.ед. и HDS < 15,0%). Следует отметить, что у большинства пациентов этой подгруппы — 63,1% (12 мужчин) — параметр HDS превышал допустимое значение, в то время как степень компактизации D/s была в норме. У 36,8% (7 мужчин) только параметр D/s не соответствовал нормальному значению.

3-я подгруппа включала 19 пациентов, в эякуляте которых степень компактизации хроматина D/s и количество дефектных клеток HDS не соответствовали установленным нормам (D/s < 48,5 усл.ед.; HDS > 15,0%).

Оценка содержания медиаторов межклеточного взаимодействия показала, что наиболее выраженные отклонения имели место у пациентов из бесплодных супружеских пар с патоспермией. При определении содержания сывороточных провоспалительных цитокинов у этих мужчин выявлено статистически значимое увеличение уровней IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-8, превышающих значения аналогичных показателей здоровых фертильных мужчин в 1,6; 1,7 и 14,6 раза соответственно (табл. 1).

Наблюдаемое у пациентов с патоспермией увеличение уровня одного из основных индукторов воспалительной реакции TNF- $\alpha$ , а также хемокина IL-8, продукция которого ассоциируется с хроническими и острыми воспалительными состояниями, свидетельствует о наличии «латентного» воспалительного процесса.

В отношении содержания иммунорегуляторных цитокинов статистически значимые различия отмечены в содержании IL-1RA, концентрация которого превышала значение аналогичного показателя группы сравнения в 2,4 раза.

С нарастанием степени выраженности нарушений структурной организации сперматозоидов в неоднородной группе пациентов с нормоспермией количество иммунологических параметров, для которых были характерны отклонения от значений в группе сравнения, нарастало.

Так у пациентов 1-й подгруппы, степень компактизации хроматина сперматозоидов и относительное число дефектных клеток которых соответствовали значениям нормы, статистически значимое повышение в продукции провоспалительных цитокинов отмечалось только для IL-8. У пациентов 2-й подгруппы, в эякуляте которых зарегистрировано отклонение от нормы одного из показателей (D/s или HDS), наряду с повышением концентрации IL-8 отмечалось увеличение синтеза IFN- $\gamma$ . Содержание данного цитокина превышало значение

аналогичного показателя здоровых фертильных мужчин в 1,7 раза.

У пациентов с наиболее выраженными отклонениями параметров флуоресцентного анализа эякулята (3-я подгруппа) зарегистрированы статистически значимые различия не только в синтезе провоспалительных цитокинов IL-8 и IFN- $\gamma$ , но и в продукции TNF- $\alpha$ , что было характерно также для пациентов с патоспермией. В сравнении со здоровыми фертильными мужчинами, у этих пациентов концентрация IFN- $\gamma$  в сыворотке крови была в 1,8 раз выше, а для TNF- $\alpha$  данное превышение составляло 2,6 раза. Увеличение выработки проапоптотического маркера TNF- $\alpha$  может свидетельствовать о более интенсивных процессах запрограммированной клеточной гибели у мужчин с нормальными показателями спермограммы, однако, нарушенной структурной организацией хроматина половых клеток.

Таким образом, повышение концентрации IL-8 отмечалось у всех пациентов с нормоспермией, превышая значения здоровых фертильных мужчин в 4,3 раза в 1-й подгруппе, в 2,7 раза во 2-й подгруппе и 3,97 раза в 3-й подгруппе. Поскольку активная продукция IL-8 начинается при встрече антигенпрезентирующих клеток организма с различными видами патогенов, наблюдаемое повышение концентрации IL-8 в сыворотке пациентов всех подгрупп с нормоспермией отражает развитие воспалительных процессов.

Помимо выброса провоспалительных факторов при запуске цитокинового каскада происходит увеличение продукции противовоспалительных медиаторов, включающих иммунорегуляторные цитокины, антагонисты рецепторов и растворимые (плазменные) рецепторы цитокинов. Антагонист рецептора IL-1 (IL-1RA) представляет собой цитокиноподобную молекулу, связывающуюся со специфическим рецептором IL-1, обеспечивая невозможность передачи внутриклеточного сигнала. Синтез иммунорегуляторного IL-1RA был повышен у всех пациентов из числа бесплодных супружеских пар с нормоспермией. Так, в сравнении со здоровыми фертильными мужчинами уровень данного цитокина в 1-й подгруппе был выше в 3,8 раза, для 2-й и 3-й подгрупп превышение составило 2,8 и 2,2 раза соответственно.

В связи с тем, что присутствующий в норме сывороточный IL-1RA выполняет роль своеобразного буфера, блокирующего действие эндогенного IL-1 и защищающего организм от резкого увеличения уровня этого цитокина, полученные данные позволяют заключить, что наиболее выраженная продукция IL-1RA у мужчин из бесплодных супружеских пар с нормоспермией активируется под действием про-

воспалительных агентов, ограничивая воспалительную реакцию и препятствуя реализации их провоспалительного потенциала.

Наряду с повышенным уровнем рецепторного антагониста IL-1, у пациентов 1-й подгруппы с нормативными значениями показателей D/s и HDS выявлено статистически значимое повышение синтеза IL-10, концентрация которого в 4 раза превышала значение аналогичного параметра здоровых фертильных мужчин. Поскольку IL-10 играет роль ключевого регулятора иммунного ответа, можно предположить, что повышенный уровень этого цитокина у пациентов 1-й подгруппы выполняют функцию ограничения развития воспалительных реакций по принципу обратной связи.

Таким образом, анализ результатов исследования уровня медиаторов межклеточного взаимодействия в сыворотке крови показал, что усиление синтеза провоспалительного IL-8 и иммунорегуляторного IL-1RA является общим признаком в цитокиновом статусе пациентов из числа бесплодных супружеских пар как при пато-, так и при нормоспермии, что позволяет дифференцировать их по этому признаку от группы здоровых фертильных мужчин.

Повышение уровней IL-1RA и IL-8 на фоне усиленного синтеза IL-10, отмеченное у мужчин 1-й подгруппы, можно считать ключевым моментом изменения цитокинового баланса, приводящим к бесплодию в супружеской паре.

Нарушение организации хроматина сперматозоидов и повышение относительного количества дефектных клеток сопровождается, наряду с увеличением содержания в сыворотке крови IL-1RA и IL-8, повышением концентрации IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , что свидетельствует о большей вовлеченности цитокиновой сети в регуляцию процессов сперматогенеза у пациентов с отклонениями от нормы показателей D/s и HDS (3-я подгруппа и группа патоспермии).

При исследовании локальной продукции цитокинов в спермоплазме (табл. 2) у пациентов с патоспермией выявлено статистически значимое увеличение концентрации всех провоспалительных цитокинов, за исключением IL-6, уровень которого был достоверно ниже, что может быть связано с прекращением накопления этого раннего индуцибельного цитокина при переходе воспаления из острой фазы в хроническую у пациентов из бесплодных супружеских пар с патоспермией.

Наибольшие концентрации были отмечены для IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$  и CRP, содержание которых по сравнению с аналогичными показателями здоровых фертильных мужчин было

выше в 2,4; 2,5; 3,17 и 2,5 раз соответственно. Не столь выраженное, но достоверно значимое превышение зарегистрировано для IFN- $\gamma$  и IL-2 в спермальной плазме пациентов с патоспермией, разница с группой сравнения составляла 2,0 и 1,9 раз соответственно. Повышение в спермальной плазме пациентов с патоспермией уровня провоспалительных медиаторов, выполняющих функцию индукции апоптоза (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), может приводить к снижению количества подвижных сперматозоидов, поскольку у этих мужчин доля астеноспермии в структуре отклонений показателей спермограммы составляла 91,3%.

Содержание иммунорегуляторных цитокинов у пациентов с отклонением показателей спермограммы от нормативных значений также было достоверно повышенным. Концентрации IL-4, IL-10 и фактора роста TGF- $\beta$  в спермальной плазме были повышены относительно уровня здоровых мужчин в 1,2; 1,4 и 2,0 раза соответственно. Семенная жидкость человека в норме содержит большое количество TGF- $\beta$ , обладающего общим иммуносупрессивным действием и играющего роль негативного регулятора иммунной системы. Повышение в спермоплазме пациентов с патоспермией уровня полифункционального цитокина TGF- $\beta$ , а также IL-4 и IL-10, которые в норме ингибируют продукцию провоспалительных цитокинов и супероксидных радикалов, свидетельствует о выраженной направленности цитокиновой регуляции у этих пациентов на снижение выработки медиаторов воспаления.

Таким образом, проведенные исследования показали, что нарушение процесса сперматогенеза сопровождается увеличением локальной выработки как провоспалительных, так и иммунорегуляторных цитокинов.

При сравнении уровней медиаторов межклеточных взаимодействий в спермальной плазме пациентов 1-й и 2-й подгрупп из бесплодных пар и здоровых фертильных мужчин выявлено статистически значимое повышение концентрации IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8. Увеличение уровня провоспалительных цитокинов в пациентах 1-й подгруппы составило 2,1; 1,1 и 6,6 раз соответственно, 2-й подгруппы — 1,3; 1,2 и 5,7 раз соответственно. При оценке содержания иммунорегуляторных цитокинов у пациентов этих подгрупп зарегистрировано повышение концентрации IL-10 относительно аналогичного показателя в группе здоровых мужчин в 1,2 и 1,3 раза соответственно. Повышение уровня IL-10 на фоне гиперпродукции провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 отражает включение протекторных механизмов в ответ на индукцию локального воспалительного ответа.

У мужчин 3-й подгруппы с отклонениями от нормы показателей D/s и HDS, наряду с выявленными изменениями уровня цитокинов, характерными для пациентов 1-й и 2-й подгрупп, определялось повышение содержания в спермоплазме CRP и фактора роста TGF- $\beta$ , концентрация которых в 1,6 и 1,9 раз превышала таковую у здоровых фертильных мужчин.

Таблица 1. Содержание медиаторов межклеточного взаимодействия в сыворотке крови мужчин из супружеских пар с бесплодием ( $M \pm \sigma$ )

Показатели	Группа сравнения (здоровые фертильные мужчины), (n=15)	Мужчины из супружеских пар с бесплодием, (n=99)			
		1-я группа (нормоспермия), (n=55)			2-я группа (патоспермия), (n=44)
		1-я подгруппа, (n=17)	2-я подгруппа, (n=19)	3-я подгруппа, (n=19)	
<b>Провоспалительные</b>					
IL-1 $\beta$ , пг/мл	14,49 $\pm$ 22,97	17,46 $\pm$ 19,11	9,90 $\pm$ 17,40	9,67 $\pm$ 11,49	10,96 $\pm$ 16,71
IL-2, пг/мл	14,32 $\pm$ 1,57	22,1 $\pm$ 16,89	13,575 $\pm$ 4,519	14,49 $\pm$ 5,31	15,76 $\pm$ 5,23
IL-6, пг/мл	6,23 $\pm$ 4,07	6,37 $\pm$ 1,19	7,268 $\pm$ 2,305	5,97 $\pm$ 3,43	6,83 $\pm$ 1,76
IL-8, пг/мл	9,63 $\pm$ 3,75	41,32 $\pm$ 33,53*	26,26 $\pm$ 18,88*	38,3 $\pm$ 33,77*	140,8 $\pm$ 197,04*
IFN- $\gamma$ , пг/мл	6,77 $\pm$ 2,50	7,53 $\pm$ 4,94	11,344 $\pm$ 4,87*	12,18 $\pm$ 5,67*	10,99 $\pm$ 6,65*
TNF- $\alpha$ , пг/мл	56,07 $\pm$ 30,67	47,65 $\pm$ 22,17	62,35 $\pm$ 41,13	100,43 $\pm$ 53,59*	148,23 $\pm$ 162,93*
CRP, нг/л	4,42 $\pm$ 0,65	5,11 $\pm$ 1,98	5,10 $\pm$ 1,04	6,54 $\pm$ 4,07	8,01 $\pm$ 4,87
<b>Имунорегуляторные</b>					
IL-1RA, пг/мл	43,55 $\pm$ 30,75	163,5 $\pm$ 86,43*	121,16 $\pm$ 38,19*	95,58 $\pm$ 31,64*	105,34 $\pm$ 37,14*
IL-4, пг/мл	2,71 $\pm$ 1,76	1,89 $\pm$ 0,21	2,61 $\pm$ 1,89	2,17 $\pm$ 1,02	2,81 $\pm$ 1,88
IL-10, пг/мл	1,43 $\pm$ 0,60	4,46 $\pm$ 4,92*	1,10 $\pm$ 0,64	1,17 $\pm$ 0,55	1,97 $\pm$ 2,47
TGF- $\beta$ , пг/мл	41360 $\pm$ 3263	35775 $\pm$ 23028	36623 $\pm$ 18425	47767 $\pm$ 9699	45114 $\pm$ 15840

Примечание. \* —  $p < 0,01$  в сравнении с группой здоровых мужчин.

Таблица 2. Содержание медиаторов межклеточного взаимодействия в спермальной плазме мужчин из супружеских пар с бесплодием ( $M \pm \sigma$ )

Показатели	Группа сравнения (здоровые фертильные мужчины), (n=15)	Мужчины из супружеских пар с бесплодием, (n=99)			
		1-я группа (нормоспермия), (n=55)			2-я группа (патоспермия), (n=44)
		1-я подгруппа, (n=17)	2-я подгруппа, (n=19)	3-я подгруппа, (n=19)	
Провоспалительные					
IL-1 $\beta$ , пг/мл	2,14 $\pm$ 0,03	4,7 $\pm$ 2,29*	2,69 $\pm$ 0,89*	3,35 $\pm$ 0,57*	5,03 $\pm$ 5,45*
IL-2, пг/мл	24,16 $\pm$ 0,65	24,20 $\pm$ 1,68^	24,55 $\pm$ 2,3^	28,24 $\pm$ 8,67	46,3 $\pm$ 39,48*
IL-6, пг/мл	8,2 $\pm$ 0,21	11,25 $\pm$ 2,75^	8,4 $\pm$ 3,68^	10,37 $\pm$ 6,06^	6,3 $\pm$ 1,37*
IL-8, пг/мл	40,6 $\pm$ 1,91	269,03 $\pm$ 255,9^*	232,4 $\pm$ 210,9^*	383,3 $\pm$ 290,2^*	101,7 $\pm$ 54,3*
IFN- $\gamma$ , пг/мл	5,58 $\pm$ 0,66	3,71 $\pm$ 4,42^	5,44 $\pm$ 5,07^	3,93 $\pm$ 5,45^	11,01 $\pm$ 6,65*
TNF- $\alpha$ , пг/мл	32,04 $\pm$ 1,93	35,29 $\pm$ 2,21^*	37,54 $\pm$ 7,30^*	36,30 $\pm$ 5,1^*	101,6 $\pm$ 68,9*
CRP, мг/л	0,25 $\pm$ 0,19	0,26 $\pm$ 0,01^	0,33 $\pm$ 0,04^	0,39 $\pm$ 0,03^*	0,62 $\pm$ 0,04*
Иммунорегуляторные					
IL-4, пг/мл	3,14 $\pm$ 0,37	3,27 $\pm$ 0,74	4,05 $\pm$ 1,58	4,12 $\pm$ 2,57	4,14 $\pm$ 1,48*
IL-10, пг/мл	2,21 $\pm$ 0,09	2,6 $\pm$ 0,21^*	2,96 $\pm$ 1,29*	5,94 $\pm$ 2,35^*	3,1 $\pm$ 0,92*
TGF- $\beta$ , пг/мл	12380 $\pm$ 314	11249 $\pm$ 727	12955 $\pm$ 2565	23163 $\pm$ 1000*	24213 $\pm$ 2465*

Примечание. \* —  $p < 0,01$  в сравнении с группой здоровых мужчин;  
^ —  $p < 0,01$  в сравнении с группой патоспермии.

Анализ результатов исследования медиаторов в спермальной плазме пациентов из супружеских пар с бесплодием относительно здоровых фертильных мужчин показал, что отличительными признаками, характерными для пациентов с нарушением репродуктивной функции, является усиление локальной продукции как медиаторов воспаления IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-8 так и иммунорегулятора IL-10, который играет важную роль в реализации противовоспалительных реакций. На фоне выявленных в цитокиновом звене признаков, общих для мужчин с бесплодием, у пациентов 3-й подгруппы с нарушением степени компактизации хроматина и увеличением относительного числа дефектных клеток в эякуляте отмечалась повышенная продукция в спермальной плазме ростового фактора TGF- $\beta$  и увеличение концентрации CRP.

## Заключение

Изучение продукции цитокинов и механизмов иммунологической регуляции процессов сперматогенеза позволяет получить информацию о функциональной активности различных типов иммунокомпетентных клеток в зависимости от выраженности нарушений репродуктивной функции, о тяжести воспалительного процесса, его переходе на системный уровень, о соотношении процессов активации Т-хелперов 1-го и 2-го типов.

У мужчин с нормальными показателями спермограммы, не имеющих нарушений в организации хроматина сперматозоидов, отмечался

ряд изменений в продукции цитокинов на системном и локальном уровнях. В сравнении со здоровыми фертильными мужчинами зарегистрировано не только повышение концентрации IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  и IL-10 в спермоплазме, но и увеличение уровня IL-8 и IL-10 в сыворотке крови, что свидетельствует об индукции иммунного ответа на локальном уровне, несостоятельности механизмов ограничения воспалительного процесса на уровне тканей и выходе медиаторов воспаления и факторов регуляции воспалительной реакции в системное русло.

При снижении степени компактизации хроматина сперматозоидов и/или увеличении относительного числа дефектных клеток (2-я подгруппа) уровень цитокинов (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  и IL-10) в спермоплазме, как и в 1-й подгруппе, оставался достоверно высоким, а в сыворотке крови, наряду с высоким содержанием IL-8, наблюдалось повышение концентрации IFN- $\gamma$ , при этом уровень IL-10 не отличался от аналогичных показателей группы сравнения.

Аналогичные изменения в продукции сывороточных и спермальных цитокинов были отмечены у пациентов 3-й подгруппы с нормоспермией. В то же время выраженные нарушения в организации хроматина сперматозоидов и увеличение содержания дефектных клеток в эякуляте сопровождались появлением новых лабораторных критериев, отражающих прогрессирование патологического процесса — повышением в спермоплазме уровня провоспалительного маркера CRP и ростового

фактора TGF- $\beta$  и увеличением концентрации проапоптотического фактора TNF- $\alpha$ .

У мужчин с патоспермией изменения продукции цитокинов в сыворотке крови были аналогичны выявленным в 3-й подгруппе. Однако на локальном уровне, наряду с повышением уровня провоспалительных (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  и CRP) и иммунорегуляторных (IL-10 и TGF- $\beta$ ) медиаторов отмечалось возрастание концентрации IL-2 и IFN- $\gamma$  при достоверном снижении IL-6.

Результаты проведенных исследований показали, что в иммунологические события, сопровождающие процесс сперматогенеза, вовлечен ряд цитокинов. Ухудшение параметров структурной организации сперматозоидов и в последующем — отклонение от нормы показателей спермограммы, происходит на фоне активации иммунного ответа на локальном и системном уровне.

В результате повышения функциональной активности клеток (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, лимфоцитов, тромбоцитов, эндотелиоцитов), продуцирующих цитокины, происходит запуск каскада воспалительных реакций. При этом концентрация медиаторов воспаления повышается с нарастанием выраженности нарушений образования гамет, способных к полноценной передаче генетической информации. Провоспалительные цитокины являются наиболее агрессивными медиаторами воспаления в отношении наиболее чувствительной к патологическим воздействиям репродуктивной функции человека.

Кроме того, любая воспалительная реакция неразрывно связана с оксидативным стрессом. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов на местном уровне способствует в дальнейшем увеличению синтеза белков острой фазы (CRP), что свидетельствует о выходе процессов иммунологической регуляции сперматогенеза за рамки первичных медиаторов и вовлечении вторичных медиаторов межклеточного взаимодействия, выработке большого количества свободных радикалов, избыточная концентрация которых в эякуляте считается источником появления разрывов в ДНК сперматозоидов и оказывает повреждающее воздействие на все клетки организма, в том числе клетки Сертоли, [10, 11, 12, 13]. Активация иммунной системы на локальном уровне в ответ на патологическое экзо- или эндогенное воздействие может служить пусковым фактором развития нарушений сперматогенеза.

Таким образом, о нарушении механизмов иммунологической регуляции процессов сперматогенеза на локальном уровне свидетель-

ствует превалирование воспалительного компонента над противовоспалительным, что способствует повреждению первичных барьерных структур в зоне воспаления и выходу воспалительных медиаторов в системный кровоток. Утрата защитной функции локального воспалительного ответа, доминирование деструктивных эффектов цитокинов и других медиаторов и нарастание эффектов системной альтерации, тем самым неспособность протекторных механизмов препятствовать дальнейшему прогрессированию патологического процесса приводит к нарушению репродуктивной функции и патоспермии.

Полученные данные позволяют внести вклад в изучение патогенеза нарушения репродуктивной функции мужчин с нормоспермией с позиций процессов иммунологической регуляции, и использовать наиболее информативные маркеры для повышения эффективности диагностики мужского бесплодия.

## Литература

1. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью. 4-е издание. М: Мед Пресс; 2001.
2. Быков В. А. Сперматогенез у мужчин в конце XX века. Проблемы репродукции 2000; 1:6-12.
3. Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. С.-Петербург: ООО «Издательство Фолиант»; 2008.
4. Останин А. А., Черных Е. Р. Сравнительная оценка уровня 17 цитокинов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флуориметрии. Цитокины и воспаление 2005; 4:25-32.
5. Устинов Д. В., Айзикович Б. И. Цитокины семенной плазмы и их роль в этиологии мужского бесплодия. Бюллетень СО РАМН 2008 (приложение); 1:84-87.
6. Атюшев Г. П., Мотавкина Н. С. Лейкоцитарная и эпителиально-десквамативная реакция у больных урогенитальными инфекциями группы ИППП разной этиологии, страдающих бесплодием. Проблемы репродукции 2006; 6:44-46.
7. Koumantakis E., Matalliotakis I., Kyriakou D., Fragouli Y., Relakis K. Increased levels of interleukin-8 in human seminal plasma. Andrologia 1998; 30:339-43.
8. Айзикович Б. И., Айзикович И. В., Верба О. Ю., Козлов В. А. Роль цитокинов в регуляции сперматогенеза: современный взгляд на проблему. Иммунология 2008; 3:191-93.
9. Габбасов З. А., Тер-Аванесов Г. В. Новый метод объективного и быстрого определения основных показателей спермы. Проблемы репродукции 1999; 2:67-70.
10. Черний В. И., Нестеренко А. Н. Нарушения иммунитета при критических состояниях. Внутренняя медицина 2007; 3:16-34.
11. Seli E., Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. Human Reproduction Update 2005; 11 (4):337-49.
12. Tamer M., Aziz N., Sharma R., Lewis-Jones I., Thomas A., Agarwal J. Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patient. Asian J Andrology 2005; 7(2):121-26.
13. Janeway C. A., Medzhitov R. Innate immune recognition. Ann Rev Immunol 2002; 20:197-16.