

ВИВЧЕННЯ CD4+CD25+, CD4+HLA-DR4+ ТА CD4+CD95+ ЛІМФОЦИТІВ У СПЕРМІ ЧОЛОВІКІВ З МАЛОСИМПТОМНИМИ ФОРМАМИ ХРОНІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ УРОГЕНІТАЛЬНОГО ТРАКТУ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ФЕРТИЛЬНОСТІ

С.Ю. Ціпоренко

ДЗ "Луганський державний медичний університет"

Вступ

У теперішній час переважають латентні та персистуючі форми перебігу уrogenітальних інфекцій у чоловіків, що дуже ускладнює їх своєчасну діагностику. Водночас статеві бактеріально-вірусні інфекції часто залишаються не розпізнаними, оскільки мають мізерну клінічну симптоматику або взагалі її не мають, й тому уражені чоловіки не звертаються за медичною допомогою, тоді як патологія прогресує і часто ускладнюється розвитком інфертильності [1].

Чоловіча сперма містить не лише сперматозоїди, але й популяції несперматозоїдних клітин, переважно це лейкоцити [14]. Існують суперечки щодо біологічної ролі лейкоцитів у спермі. Деякі дослідники вказують на неадекватний зв'язок між наявністю лейкоцитів та якістю сперми чи інфертильним статусом [6, 9] та роблять припущення щодо позитивної ролі цих клітин у видаленні мертвих клітин чи пошкоджених сперматозоїдів [10]. Однак, більшість авторів стверджують про наявність тісного зв'язку між збільшеною кількістю лейкоцитів у спермі та погіршеними властивостями сперми [4, 12, 13] або запліднюючою здатністю сперми [11], головним чином зниження рухливості сперматозоїдів, або їх потенціалу до пенетрації ооцитів [7, 8]. Здається, що знижена запліднююча можливість сперми є наслідком впливу лейкоцитоспермії асоційованої з інфекцією сечостатевого тракту. Ряд досліджень виявило збільшення кількості CD25+лімфоцитів у спермі на тлі незмінної кількості частки клітин CD95+, що було проявом збільшення пропорції CD25+/CD95+. Як показало дослідження, збільшення цього

індексу, як і зниження його було асоційоване з безпліддям. Це дало змогу припустити, що пригнічення апоптозу активованих лімфоцитів в еякуляті потенційно небезпечно для сперматогенезу, так як імунна відповідь та пов'язані з нею запальні реакції можуть викликати неспецифічне пошкодження оточуючих тканин та індукцію патоспермії [4]. Це пошкодження може бути спричинене хронічним запальним процесом без клінічних проявів [15]. Аналіз маркерів активації субпопуляцій імунокомпетентних клітин багато в чому визначає ефективність імунної відповіді. Оцінка активації лімфоцитів складається у визначенні на їх поверхні активаційних маркерів CD25, HLA-DR4, CD95, їх експресія пов'язана з проходженням певного етапу клітинної диференціації [3]. При захворюваннях, що супроводжуються тривалою антигенною дією і інтоксикацією порушується швидкість утворення і диференціація лімфоцитів, інтенсивність апоптозу, що призводить до порушень в імунній системі, ускладнюючи перебіг інфекційного процесу в організмі [2].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано відповідно до основного плану науково-дослідних робіт ДЗ "Луганський державний медичний університет" і є фрагментом теми "Імунологічні механізми патогенезу хронічних та рецидивуючих інфекцій, імунокорекція та імунореабілітація" (№ держреєстрації 0105U002307) та "Оптимізація лікування хворих з малосимптомними формами уrogenітальної інфекції" (№ держреєстрації 0111U005620).

Метою роботи було дослідження маркерів активації лімфоцитів сперми чоловіків на малосимптомні форми хронічної інфекції уrogenітального тракту в залежності від фертильності.

Матеріали і методи дослідження

Було досліджено сперму 62 хворих чоловіків на малосимптомні форми хронічного запалення уrogenітального тракту (ХЗУТ), з яких I групу склали 34 пацієнта, в яких діагностувалося ускладнення - інфертильність, у II групу ввійшли 28 фертильних пацієнтів.

Усіх пацієнтів обстежували клінічно, включаючи огляд та пальпацію статевого члена, мошонки та передміхурової залози, а також ретельно збирали анамнез. Усі пацієнти здавали сперму для аналізу. Напередодні здачі аналізу не повинно було

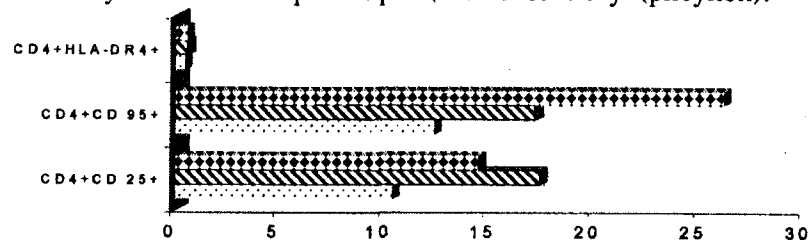
відбуватися еякуляції упродовж 4-5 днів. Аналіз сперми проводився через пів години після еякуляції та згідно інструкції ВООЗ [16]. Враховували концентрацію сперматозоїдів, рН сім'яної рідини, вміст лейкоцитів та їх популяцій (гранулоцити, макрофаги, лімфоцити). Для визначення морфології використовували фарбування за Папаніколау. Критерієм відбору пацієнтів у дослідження була відсутність запальної лейкоцитарної реакції та патологічної мікрофлори в сечовидільному каналі, секреті передміхурової залози, в секреті сім'яників та в спермі. Тривалість безпліддя становила 3-6 років. Вік обстежених 18-40 років. На початок обстеження пройшло більше року після завершення попереднього лікування. В анамнезі всі пацієнти перенесли інфекції, що передаються статевим шляхом (хламідії, уреоплазми, мікоплазми, герпесвірусна інфекція I/II типу) від 1 до 6 років назад, результати клініко-лабораторного видужання були підтверджені бактеріоскопічним, бактеріологічним, культуральним та ПЛР-методами.

Для визначення рівня лімфоцитів, які на своїй поверхні експресують рецептори функціональної активації клітин CD4+CD25+, CD4+CD95+, CD4+HLA-DR4+ (TRAIL-рецептор 1) використовували еритроцитарний діагностикум з моноклональними антитілами виробництва НВЦ "МедБіоСпектр" (РФ - Москва). Для контролю імунологічних показників обстежено 15 практично здорових осіб, їх дані було прийнято за норму. Статистичний аналіз проводили на персональному комп'ютері за допомогою пакета програми "MedStat". При цьому для перевірки показників на нормальний розподіл використовували критерій W Шапіро-Уїлка. Для порівняння показників використовували критерій χ^2 , двостороння критична область. Для порівняння середніх значень ознаки для двох незалежних вибірок використовували метод кутового перетворення Фішера з урахуванням поправки Йейтса. Достовірно вважали різницю при $p < 0,05$. Для аналізу наявності та сили зв'язку розраховували коефіцієнт парної кореляції Кендала - τ .

Отримані результати та їх обговорення

Під час дослідження було виявлено, що перебіг малосимптомних форм ХЗУТ супроводжується зміною ряду показників імунної системи у порівнянні із практично здоровими чоловіками. Як показали дослідження у хворих на ХЗУТ ускладненого безпліддям

спостерігався достовірно підвищений рівень CD4+CD25+ у спермі як у відносних, так і в абсолютних значеннях і склав $17,4 \pm 1,2\%$ ($10,4 \pm 1,2\%$ в контрольній групі), ($P < 0,05$), що свідчить про посилену активність протиінфекційного захисту (рисунок).



Група контролю □ I група (інфертильні чоловіки) ▨ II група (фертильні чоловіки)
Рисунок. Маркери активації лімфоцитів у спермі чоловіків з малосимптомними формами ХЗУТ.

Рівень лімфоцитів у спермі з експресією CD4+CD95+ в I групі був підвищений у порівнянні з контрольною групою, як у відносних, так і в абсолютних значеннях і склав $17,2 \pm 1,4\%$ ($12,4 \pm 1,4\%$ в контрольній групі), ($P < 0,05$). Кратність різниці склала 1,4 рази. Водночас у частини хворих першої групи (14 осіб) рівень CD4+CD95+ у спермі, навпаки, зменшувався відносно контролю, й середнє значення для цієї частини хворих склало $9,4 \pm 1,8\%$, ($P < 0,05$), що було менше у 1,3 рази від прийнятої норми. Понижений рівень імунокомпетентних клітин готових до вступу в процес апоптозу може призводити до дисбалансу в імунній системі. Про активацію протиінфекційного захисту свідчить тенденція збільшення абсолютного рівня клітин з експресією CD4+HLA-DR4+ у цій групі хворих.

В II групі хворих (фертильні чоловіки) рівні CD4+CD25+, CD4+HLA-DR4+ як у відносних, так і в абсолютних значеннях хоч і мали тенденцію до підвищення, але достовірно не відрізнялися від рівнів контрольної групи. Рівень лімфоцитів з експресією CD4+CD95+ маркера був підвищений в порівнянні з контрольною групою і склав $26,1 \pm 1,8\%$ ($12,4 \pm 1,4\%$ в контрольній групі), ($P < 0,01$) і характеризує підвищення кількості лімфоцитів, готових до апоптозу. Кратність різниці склала 2,1 рази.

Проведені нами дослідження ранніх (CD25+) та пізніх (CD95+ і HLA-DR4+) маркерів функціональної активації лімфоцитів у інфертильних та фертильних чоловіків з ХЗУТ, виявили достовірне

збільшення кількості лімфоцитів з рецептором CD25+ у хворих з безпліддям, тоді як у фертильних хворих спостерігалася лише тенденція до їх збільшення. Збільшення числа клітин з рецепторами до інтерлейкіну-2 (CD25+) пов'язане з активацією імунної системи під час відповіді на антиген при інфекції в уrogenітальному тракті. У хворих обох груп спостерігається збільшення в спермі числа лімфоцитів, що несуть на своїй поверхні CD95-антиген, що характеризує активність процесів індукції апоптозу лімфоцитів в умовах вираженої стимуляції імунної системи при ХЗУТ. Але у безплідних чоловіків спостерігається не таке значне збільшення кількості лімфоцитів з експресією CD95+ маркера у порівняння з фертильними чоловіками (кратність різниці 1,4 проти 2,1 відповідно), а у частини хворих навпаки відбувалося достовірне зменшення експресії CD95+, що може вказувати на розвиток патоспермії. З огляду літературних даних [4, 5] ми обчислювали відношення CD25+/CD95+. Дослідження показало, що існує позитивний кореляційний зв'язок між підвищеним значенням пропорції CD25+/CD95+ та наявністю гіперголівчатих сперматозоїдів. Водночас збільшення цього індексу спостерігалось у групі інфертильних чоловіків. Достовірне зменшення пропорції CD25+/CD95+ спостерігалось у групі фертильних чоловіків, спермометрія в яких встановила переважання нормосоматичних форм сперміїв. Отримані дані свідчать, на наш погляд, про токсичну дію активованих лімфоцитів в спермі на тлі пригнічення процесів апоптозу.

Висновки

1. Вивчення маркерів активації лімфоцитів сперми у чоловіків хворих на малосимптомні форми хронічної інфекції уrogenітального тракту вказує на різнопланові збільшення їх кількості в залежності від фертильності.

2. Діагностично важливим є визначення співвідношення CD25+/CD95+ для прогнозування розвитку інфертильності. Збільшення цього індексу вказує на порушення процесів апоптозу патологічних форм генеративних клітин, що веде до їх накопичення у спермі.

3. Імунокорегуюча терапія направлена на клітинну ланку імунної системи з метою нормалізації співвідношення CD25+/CD95+, очевидно, впливатиме на збільшення запліднюючого потенціалу.

Література

1. Быков В.Л. Сперматогенез у мужчин в конце XX века / В.Л. Быков // *Пробл. репрод.* - 2000. - № 1. - С.6-13.
2. Насонов Е.Л. Системный воспалительный ответ при инфекционных процессах / Е.Л.Насонов, А. А.Баранов, Н. П. Шилкина // *Клин. мед.* - 1998. - № 11. - С.4-7.
3. Порядин Г.В. Активационные маркеры лимфоцитов как показатели дисрегуляции иммунной системы при воспалении / Г.В.Порядин, Ж. М.Салмаси, А. Н.Казимирский // *Патология и терапия.* - 2006. - № 2. - С.2-7.
4. Семёнов А.В. Нарушение соотношения субпопуляций лимфоцитов в эякуляте при бесплодии у мужчин / А.В.Семёнов, Н.Ю. Сотникова // *Медицинская Иммунология.* - 2007. - № 1. - С.91-96.
5. Юршин В.В. Экскреторно-воспалительная форма мужского бесплодия (диагностика, лечение, реабилитация) / В.В.Юршин // *Клиническая медицина.* - 2005. - № 12. - С. 68-70.
6. Leucocytes in the ejaculate from fertile and infertile men / M. El-Demiry, H.Young, R.Elton [e.a.] // *Br. J. Urol.* - 1986. - Vol.58. - P.715-720.
7. Kovalski N. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers / N.Kovalski, E.de Lamirande, C. Gagnon // *Fertil. Steril.* - 1992. - Vol. 58. - P. 809-816.
8. Maruyama D.K. Effects of white blood cells on the in vitro penetration of zona-free hamster eggs by human spermatozoa / D.K.Maruyama, R.W.Hale, B.J. Rogers // *J.Androl.* - 1985. - Vol. 6. - P.127-135.
9. Round cells and sperm fertilizing capacity: the presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization / M.J.Tomlinson, C.L.Barratt, A.E.Bolton [e.a.] // *Fertil.Steril.* - 1992. - Vol.58. - P.1257-1259.
10. The removal of morphologically abnormal sperm forms by phagocytes: a positive role for seminal leukocytes / M.J.Tomlinson, A.White, C.L.Barratt [e.a.] // *Hum. Reprod.* - 1992. - Vol.7. - P.517-522.
11. Vogelpoel F.R. Influence of polymorphonuclear granulocytes on the zona-free hamster oocyte assay / F.R.Vogelpoel, R.J. van Kooij, E.R. te Velde, J.Verhoef // *Hum. Reprod.* - 1991. - Vol. 6. - P.1104-1107.
12. Yanushpolsky E.H. Is leukocytospermia clinically relevant? / E.H.Yanushpolsky, J.A.Politch, J.A.Hill, D.J. Anderson // *Fertil. Steril.* - 1996. - Vol. 66. - P. 822-825.

13. Wolff H. *Leukocytospermia is associated with poor semen quality* / H. Wolff, J.A. Politch, A. Martinez [e.a.] // *Fertil. Steril.* - 1990. - Vol. 53. - P. 528-536.

14. Wolff H. *Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen* / H. Wolff, D.J. Anderson // *Fertil. Steril.* - 1988. - Vol. 49. - P. 497-504.

15. Wolff H. *Impact of clinically silent inflammation on male genital tract organs as reflected by biochemical markers in semen* / H. Wolff, G. Bezold, M. Zebhauser, M. Meurer // *J. Androl.* - 1991. - Vol. 12. - P. 331-334.

16. *WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction.* - [4-th edn.]. - WHO: Cambridge universiti press, 1999. - 128 p.

Резюме

Ципоренко С.Ю. *Вивчення CD4+CD25+, CD4+HLA-DR4+ та CD4+CD95+ лімфоцитів у спермі чоловіків з малосимптомними формами хронічного запалення уrogenітального тракту в залежності від фертильності.*

В роботі вивчені маркери активації лімфоцитів в спермі чоловіків з малосимптомними формами хронічної уrogenітальної інфекції в залежності від фертильності. Встановлено, що збільшення співвідношення CD25+/CD95+ призводить до зростання патологічних форм сперматозоїдів та, слідовно, до зниження запліднюючої спроможності чоловіків.

Ключові слова: чоловіче безпліддя, сперма, маркери активації лімфоцитів.

Резюме

Ципоренко С.Ю. *Изучение CD4+CD25+, CD4+HLA-DR4+ и CD4+CD95+ лимфоцитов в сперме мужчин с малосимптомными формами хронической уrogenитальной инфекции в зависимости от фертильности.*

В работе изучены маркеры активации лимфоцитов в сперме мужчин с малосимптомными формами хронической уrogenитальной инфекции в зависимости от фертильности. Установлено, что увеличение соотношения CD25+/CD95+ приводит к нарастанию патологических форм сперматозоидов и, следовательно, к снижению оплодотворяющей способности мужчин.

Ключевые слова: мужское бесплодие, сперма, маркеры активации лимфоцитов.

Summary

Tsiporenko S.YU. *Study of CD4+CD25+, CD4+HLA-DR4+ and CD4+CD95+ lymphocytes in sperm of men, suffering on oligosymptomatic forms of a chronic urogenital infection.*

The markers of activating of lymphocytes in sperm of men with the oligosymptomatic forms of chronic urogenital infection depending on fertility. It is set that the increasing of correlation of CD25 / CD95 brings to growth of pathological forms of spermatozoa and, consequently, to the decline of impregnating ability of men.

Key words: men's infertility, sperm, the markers of activating of lymphocytes.

Рецензент: д.мед.н., проф. В.Р.Піпенін

АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ ЕКОЛОГІЧНОЇ ТА КЛІНІЧНОЇ БІОХІМІЇ