

УДК 616.65-002.2-008.8-078.7

**РІВЕНЬ НЕСПЕЦИФІЧНИХ ГУМОРАЛЬНИХ ФАКТОРІВ ІМУНІТЕТУ
В ЕЯКУЛЯТІ ЗДОРОВИХ ЧОЛОВІКІВ***ДРАННІК Г.М., ПОРОШИНА Т.В., ДОБРОВОЛЬСЬКА Л.І.*

ДУ «Інститут урології АМН України»

Для вирішення проблеми погіршення запліднюючої здатності еякуляту на хлі хронічного запалення передміхурової залози (ПЗ) потрібно враховувати значний перелік факторів, у тому числі секреторну здатність головної та додаткових статевих залоз продукувати неспецифічні гуморальні імунологічні фактори, їх кількісну та якісну характеристику. За даними літератури, в нормі їх продукція в еякулят може забезпечуватися імунокомпетентними клітинами, епітеліальними та стромальними клітинами простати, тестикулярними клітинами Лейдига, Сертолі, перетубулярними та епітеліальними клітинами придатків яєчок, сім'яних пухирців, залоз Купера [1, 11, 12]. Ефекти цих факторів спрямовані, у головному, на забезпечення фертильного потенціалу сперматозоїдів.

В зв'язку з цим, ціллю дослідження було визначення референтних значень цитокінів в еякуляті у здорових чоловіків з метою порівняння їх з показниками стандартні спермограми.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Імунологічні та сперматологічні дослідження еякуляту проведено у 20 практично здорових чоловіків репродуктивного віку (25 – 47 років), які проходили обстеження у відділенні сексопатології ДУ «Інститут урології АМН України» (зав. відділом д. мед. н., професор І. І. Горпинченко).

На теперішній час єдиним стандартним протоколом дослідження еякуляту є інструкція «Руководство ВОЗ по лабораторному дослідженню еякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью», 2001 рік видання. Макро- та мікроскопічне дослідження еякуляту було проведено згідно цього документа [2]. Всі маніпуляції з еякулятом проводили з дотриманням техніки безпеки як з потенційно інфікованим біологічним матеріалом.

Оцінювали показники спермограми, кожен з яких може істотно впливати на фертильні властивості еякуляту: кількість сперматозоїдів в 1 мл та в еякуляті, кількість живих та мертвих сперматозоїдів, рухливість (по 4 критеріях: а – швидкі поступальні рухи; б – повільні, в'ялі поступальні рухи; с – не поступальні рухи (коливальні або маятникоподібні, манежні); д – нерухливі сперматозоїди); патологічні форми та кількість лейкоцитів. Результати сперматологічного аналізу порівнювали з нормативними даними ВООЗ, які прийняті і в Україні.

Імунологічні показники в сім'яній плазмі визначали імуноферментним аналізом на напів-автоматичному аналізаторі STAT-Fax 303 Plus (США) з використанням тест-систем для кількісного визначення інтерлейкінів (IL) –6, IL–8, IL–17, IL–23, простатспецифічного антигену (PSA) виробництва «Укрмедсервіс», «Immundiagnostik» – секреторного імуноглобуліну А (slgA), «Hycult biotechnology» – інгібітора секреторної лейкопротеази (SLPI), «Diacclone» – фактору некрозу пухлин – альфа (TNF- α), «DRG Instruments GmbH» – трансформуючого фактора росту – бета (TGF- β 1), «Invitrogen» – ендотеліального фактора росту (VEGF).

Для отримання сім'яної плазми центрифугували еякулят протягом 10 хвилин при 1000 об/хв., після чого відбирали супернатант та центрифугували його ще 20 хвилин при 3000 об / хв. з метою видалення клітинних елементів та детриту. Середня величина коефіцієнту варіації при проведенні визначення одного зразку у трьох повторях < 10%.

Отримані результати досліджень оброблені за допомогою програмного продукту «MedStat» (Україна) з використанням описових статистик та кореляційного аналізу [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що еякулят є сумішшю секретів ПЗ (30 – 35%), сім'яних пухирців (50 – 60%), бульбоуретральних залоз та придатків яєчок (1 – 5%) [5]. Тому дослідження еякуляту є найбільш важливими для з'ясування функціонального стану статевих залоз і запліднюючої здатності сперми.

Встановлено, що макро- і мікроскопічні показники еякуляту обстежених чоловіків відповідають нормативним вимогам ВООЗ, результати наведені в таблиці 1.

Так, у пацієнтів обстеженої групи час розрідження еякуляту, його в'язкість, рН реакція, відсутність слизу (ознака запалення ПЗ), клітин ПЗ (при простатиті відбувається їх посилене злучування [4], відсутність аглютинації та агрегації сперматозоїдів відповідає нормативним (ВООЗ) показникам практично здорових фертильних чоловіків.

Лецитинові (ліпоїдні) зерна, які складаються з лецитину або близьких до нього фосфоліпідів і є продуктом нормальної фізіологічної секреції залозистого епітелію ПЗ [5, 6], були присутні в еякуляті всіх пацієнтів.

Таблиця 1

Показники еякуляту здорових чоловіків за результатами стандартного сперматологічного дослідження

Показники еякуляту	%
Об'єм, мл	2, 7 + 0, 13
Час розрідження, хв.	24, 0 + 1, 2
В'язкість, см	0, 65 + 0, 04
РН	7, 35 + 0, 03
Лейкоцити, × 10 ⁶ / мл	0, 247 + 0, 023
Кількість сперматозоїдів в 1 мл, млн. / мл	73, 1 + 1, 86
Кількість сперматозоїдів у всьому еякуляті, млн	205, 15 + 6, 37
Кількість живих сперматозоїдів, %	86, 15 + 0, 83
Кількість мертвих сперматозоїдів, %	14, 05 + 0, 87
Кількість активно рухливих сперматозоїдів (а), %	62, 65 + 1, 17
Кількість гіпо-/а дискінетичних сперматозоїдів (b + c), %	21, 0 + 0, 71
Кількість нерухливих сперматозоїдів (d), %	16, 4 + 0, 98
Відсоток сперматозоїдів нормальної будови	48
Лецитинові зерна (ЛЦ)	в 100 %
Клітини ПЗ	-
Слиз	-
Аглютинація сперматозоїдів	-
Агрегація сперматозоїдів	-

Зауважимо, що одним з основних критеріїв відбору пацієнтів була кількість лейкоцитів в еякуляті, яка не перевищувала нормативних показників – 1×10^6 / мл сперми. Пов'язано це, насамперед, з тим, що лейкоцитоспермія є одним з основних показників гострого та латентного інфекційного запалення органів уrogenітальної системи; у більшості інфертильних пацієнтів лейкоцитоспермія серед інших факторів впливу пов'язується з погіршенням та зниженням параметрів спермограми [7]. Даних щодо частоти визначення лейкоцитоспермії у здорових чоловіків з доказаною фертильністю практично не існує.

Відповідно до інструкції ВООЗ, до теперішнього часу нормальним вважається еякулят, в якому живих сперматозоїдів більше 75 %, а їх концентрація не менше 20 мл /мл еякуляту. У пацієнтів обстеженої групи ці показники також були в цих межах. Характерно, що останнім часом спостерігається тенденція до зниження концентрації сперматозоїдів у чоловіків у всьому світі. Так, дослідження сперми фертильних донорів в 60 незалежних центрах показали зниження концентрації сперматозоїдів з 1938 по 1990 рр. від 113 до 66 млн / мл. За даними Паризького банку сперми, в середньому концентрація сперматозоїдів падає на 2.6 % в рік [8].

Морфологія сперматозоїдів – один з ключових факторів в прогнозі фертильності. Поряд з

концентрацією та рухливістю сперматозоїдів, їх морфологічна характеристика являє собою один з основних параметрів, що характеризує репродуктивну здатність сперми.

Згідно з інструкцією ВООЗ по семіологічним дослідженням, в еякуляті фертильних чоловіків повинно бути не менше 30 % морфологічно нормальних сперматозоїдів, а за суворими критеріями Крюгера – не менше 14%. У обстежених чоловіків їх кількість перевищувала нормативний мінімум.

Кількість прогресивно - рухливих сперматозоїдів у пацієнтів контрольної групи була також в межах норми (за даними ВООЗ - не меншою, ніж 50 %).

Таким чином, на підставі отриманих даних можна зробити висновок, що ознаки запалення статевих залоз та порушення запліднюючої здатності еякуляту у пацієнтів обстежені групи не виявлені: показники спермограми, що характеризують функції головної та додаткових статевих залоз, були критерієм відсутності патологій, що впливають на їх фертильний потенціал. Слід підкреслити, що нормативним значенням кожного з показників спермограми вважаються таке, при якому можна надати позитивний прогноз фертильності, при цьому нормативні показники не визначають межі норми фертильності, так як чоловіки з нижчими показниками спермограми також можуть бути фертильними [9].

В табл. 2 представлено аналіз даних дослідження неспецифічних гуморальних імунних факторів в сім'яній плазмі цих же чоловіків. Досліджені параметри представлені у вигляді медіани, нижнього (25%) та верхнього (75%) квартиля. Медіана є характеристикою асиметричного розподілу даних; при значній асиметрії медіана краще середнього значення характеризує біль-

шість даних. Квартилі характеризують $\frac{1}{4}$ частину загальної кількості даних після їх упорядкування від 0 до 100%.

В зв'язку з тим, що за результатами попереднього аналізу концентрація VEGF в еякуляті перевищує максимальні показники стандарту, його визначення проводили в сім'яній плазмі в розведенні 1:200, TGF- β 1, відповідно, 1 : 5.

Таблиця 2

Референтні значення показників цитокінів, SLPI, sIgA та PSA в сім'яній плазмі здорових чоловіків

показник	% позитивних еякулятів	медіана / 25 квартиль : 75 квартиль (пг/мл)
SLPI	100	1315 / 870 : 2150
SigA	100	453 / \pm 57.5
TNF- α	100	11.5 / 5.3 : 26.8
IL-6	100	26.2 / 8.4 : 41.8
IL-8	100	72.0 / 24.5 : 119.4
IL-17	60	11.6 / 0 : 21.8
IL-23	100	8.8 / 4.5 : 15.0
TGF- β 1 (1 : 5)	100	375.5 / 174.5 : 607.0
VEGF (1:200)	100	2850 / 2600 : 2930
PSA	100	6.3 / 2.8 : 8.4

Встановлено, що в сім'яній плазмі практично здорових чоловіків знаходиться значна кількість SLPI, sIgA, цитокінів про- та протизапальної дії, біологічні ефекти яких на локальному рівні забезпечують фертильний потенціал еякуляту.

Проведений аналіз показав, що незв'язаний (вільний) TGF- β 1 визначався у всіх пробах сім'яної плазми практично здорових чоловіків, його концентрація в середньому складала 375.5 пг/мл. TNF- α , біологічні ефекти якого здебільше протилежні TGF- β 1, також присутній в еякуляті практично здорових чоловіків.

В нормі в еякуляті знаходиться значна кількість IL-8, хемоатрактанту для нейтрофілів.

Відсоток зразків сім'яної плазми, де присутній IL-17, складає 60%. Концентрація IL-17 в сім'яній плазмі здорових чоловіків за середніми даними у цих хворих дорівнює 11.6 пг/мл.

Концентрація IL-6 у в еякуляті чоловіків контрольної групи в середньому складала 26.2 пг/мл; IL-6 був присутній в сім'яній плазмі еякуляту в 100% випадків.

За результатами дослідження еякуляту встановлено, що в зразках сім'яної плазми у здорових чоловіків PSA присутній в 100 % випадків.

На сьогодні визнається, що сперматогенез залежить від багато- чисельних імунологічних факторів, що забезпечують інтеграцію та комунікацію різних типів клітин під час гормонального регулювання дозрівання зародкової клітини

в ячку. Механізми впливу цитокінів та інших імунних факторів в спермі на після – гонадному етапі сперматогенезу, у тому числі і на морфофункціональні характеристики сперматозоїдів в еякуляті, не визначені.

В зв'язку з цим, подальший аналіз отриманих даних був проведений корелційний аналіз між показниками локального імунітету і спермограми у практично здорових чоловіків.

Встановлено, що коливання показників SLPI, sIgA, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17, IL-23, TGF- β 1, VEGF, що спостерігається у практично здорових чоловіківне впливають на макро- і мікроскопічні характеристики еякуляту ($p > 0.05$).

Виходячи з отриманих даних, тільки концентрація PSA в еякуляті знаходиться у прямому кореляційному зв'язку ($r_s = 0.09$; $p < 0,05$) з відсотком активно-рухливих сперматозоїдів (категорії а).

Таким чином, встановлено, що в еякуляті практично здорових чоловіків знаходиться значна кількість цитокінів та неспецифічних захисних протеїнів, біологічні ефекти яких на локальному рівні забезпечують фертильний потенціал еякуляту. Індивідуальні коливання показників SLPI, sIgA, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17, IL-23, TGF- β 1, VEGF в еякуляті у практично здорових чоловіків не впливають на макро- і мікроскопічні характеристики сперматозоїдів еякуляту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *MacLennan G.T.* The influence of chronic inflammation in prostatic carcinogenesis: a 5-year followup study / G.T. MacLennan, R. Eisenberg, R.L. Fleshman, J.M. Taylor [et al.] // *J. Urol.* – 2006 (Sep.). – V. 176 (3). – P. 1012 – 1016.
2. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействия сперматозоидов с цервикальной слизью / Пер. с англ.; под ред. Л. Ф. Курило. – М.: Издательство «Мед Пресс», 2001. – 144 с.
3. *Лях Ю.М.* Основы компьютерной биостатистики: анализ информации в биологии, медицине и фармации статистическим пакетом MedStat / Ю.М. Лях, В.Г.Гурьянов, В.Н. Хоменко, О.А. Панченко / Донецк: 2006, 211с.
4. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / [Долгов В.В., Луговская С. А., Фанченко Н. Д. [и др.]; под ред. В. В. Долгова. – М.: Кафедра КЛД, 2005. – 196 с.
5. *Имшенецкая Л. П.* Мужское бесплодие / Л. П. Имшенецкая, В. И. Сажай, А. В. Сажай; под. ред. И. И. Горпинченко. – К.: Аврора плюс, 2005. – 84 с.
6. *Молочков В. А.* Хронический уретрогенный простатит / В. А. Молочков, И. И. Ильин. – М., 2004. – с.
7. *Kraus W.* Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation / W. Kraus, C. Bohring, A. Gueth [et al.] // *Andrologia.* – 2003. – V. 35, № 5. – P. 279 – 282.
8. *Луньова Г. Г.* Дослідження еякуляту в діагностиці чоловічого непліддя / Г. Г. Луньова, Г. М. Ліпкан, О. П. Завадецька [та інш.] – Київ, 2010. – с. 97.
9. *Lackner J.E.* Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflammatory treatment on semen quality // J. E. Lackner, R. Herwig, J. Schmidbauer, G. Schatzl [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2006. – V. 86. – P. 601 – 605.
10. *Steiner G. E.* Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic and malignant prostate / G. E. Steiner, M. E. Newman, D. Paikl [et al.] // *Prostate.* – 2003. – V. 56. – P. 171 – 182.
11. *Steiner G. E.* The Picture of the Prostatic Lymphokine Network Is Becoming Increasingly Complex / G. E. Steiner, B. Djavan, G. Kramer [et al.] // *Rev. Urol.* – 2007. – V. 4 (4). – P. 171–177.

РЕЗЮМЕ

УРОВЕНЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА В ЭЯКУЛЯТЕ ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН

Дранник Г.Н., Порошина Т.В., Добровольская Л.И.
ДУ «Институт урологии АМН Украины»

Ключевые слова: хронический простатит, цитокины, сперматозоид.

Обобщены результаты исследования ELISA – методом на STAT-FAX 303 Plus концентраций sIgA, SLPI, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17, IL-23, PSA TGF- β 1, VEGF в семенной плазме 20 практически здоровых мужчин. На основании корреляционного анализа проанализирована их взаимосвязь с микро- и макроскопическими показателями эякулята. Обнаружена прямая корреляционная связь концентрации PSA в эякуляте и количества активно – подвижных сперматозоидов. Корреляционная связь концентраций SLPI, sIgA, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17, IL-23, TGF- β 1, VEGF в эякуляте с показателями спермограммы у здоровых мужчин отсутствует.