УДК 616.155.32-055.1:616.699

ПРОФІЛЬ ПОПУЛЯЦІЙ ТА СУБПОПУЛЯЦІЙ Т-ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЧОЛОВІКІВ ІЗ ПОРУШЕННЯМИ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ

ГАВРИЛЮК А.М.[1], ЧОПЯК В.В.[1], КРІЛЬ І.Й.[1], КУРПІШ М.[2]

[1]Львівський національний медичнийуніверситет ім. Данила Галицького,
[2]Інституту генетики людини, Познань, Польща

На сьогодні біля 10-15% подружніх пар є неплідними. Неплідда – це нездатність до запліднення після 12 місяців співжиття без запобігання вагітності. Неплідда називається первинним, якщо немає запліднення, і вторинним, якщо вагітність не доношується. Стосовно «чоловічого» фактора подружнього неплідда є різні точки зору – йому виділяють від 40% до 60% від усіх випадків неплідда [35].

У літературі є доволі мало інформації щодо причин первинного неплідда, натомість проблема невиношування доволі добре вивчена. Виділяють такі «жіночі» фактори, асоційовані з викиднями: генетичні, ендокринні, автоімунні, анатомічні, тромбофілічні та інфекційні. Вони підтверджуються тільки у 50-60% випадків. Приблизно половина жінок мають ідіопатичні звичні викидні, які доволі часто відбуваються з «вини» чоловічого фактора [10, 14].

Патогенез чоловічого неплідда ґрунтується на наступних гіпотетичних механізмах:

1. Пошкодження гематогістологічного бар’єру кров-яєчко (пасивного фактора толерантності)

2. Порушення механізмів активної імунологічної толерантності толерантності щодо сперматозоїдів

3. Порушення функціонування природженого імунітету у чоловіка та його вплив на формування імунозалежного неплідда

4. Збій регуляторних механізмів набутого імунітету у чоловіка з наступним розвитком аутоімунного процесу/синдрому/хвороби (напр. аутоімунний орхіт), який характеризується синтезом антиспермальних аутоантитіл.

Активна імунологічна толерантність щодо сперматозоїдів – це особливий вид імунорегуляції за допомогою багатьох медіаторів (імунокомпетентних клітин, антизапальних цитокінів, тощо). Крім імунних клітин, у її забезпеченні беруть участь клітини Сертолі – вони виділяють імуносупресивні фактори, які гальмують проліферацію лімфоцитів. Клітини Сертолі можуть індукувати апоптоз активованих лімфоцитів. Антиспермальний імунітет розвивається за умов відміни імунологічної толерантності до антигенних елементів чоловічої репродуктивної системи. «Нові» для імунної системи антигени активують клітинну ланку набутого імунітету, що може закінчитися утворенням специфічних до них антитіл [2, 9].

Механізми розвитку чоловічого неплідда є складними, поєднують в собі генетичні та фактори навколишнього середовища. Клінічно проявом чоловічого неплідда найчастіше є азооспермія, яка може бути наслідком впливу антиспермальних антитіл [36]. На плідність чоловіка впливають ще і урологічні операції, такі як орхіпексія (хірургічний метод лікування крипторхізму); вазектомія і відновна операція після неї; а також операція на варикоцелє, які спричиняють вплив на сперматогенез [33, 44].

У чоловіків, хворих на онкозахворювання, псоріаз, ревматичні хвороби часто знижується кількість сперматозоїдів та їх якість [22]. Цитотоксичні ліки (циклофосфамід, азатіоприн) можуть впливати на рівні гормонів у чоловіків та сперматогенез. У таких чоловіків низька густина сперми, знижена рухливість клітин та зменшене число нормальних форм сперматозоїдів, що може викликати викидень у дружини. Сульфасалазин індукує олігоспермію, пошкоджений рух сперматозоїдів та підвищення числа сперматозоїдів із патологічною формою. Після відміни препаратів ці показники покращуються [25].

Вчені провели порівняльну оцінку кількості лейкоцитів у периферичній крові та сперматозоїдів у сім'яній рідині і показали, що низька кількість лейкоцитів у крові корелює із зменшенням кількості сперматозоїдів у спермі та зниженням їх рухливості. Пояснюють це так, що загальний стан організму є наслідком функцій багатьох органів і впливає на репродуктивну систему і чоловіка, і жінки, і їх нащадка. Високий ступінь патологічних змін у крові корелює із суттєвим зниженням параметрів сперми [17].

Дослідники вважають, що на першому рівні обстеження неплідних чоловіків центральну роль відіграє збір анамнезу, ультрасонографія яєчок, лабораторний аналіз еякуляту - спермограма [20, 21, 37]. Виявлення антиспермальних антитіл (MAR-тест) вважається рутинним методом обстеження другого рівня чоловіків із неплідних сімей або таких, у дружин яких відбувалися спонтанні викидні [27]. На третьому рівні обстеження виконуються складніші лабораторні обстеження, включно із фенотипуванням лімфоцитів та визначенням цитокінів.

Еякулят чоловіка складається з різних клітин (сперматозоїди, епітеліальні клітини, лейкоцити) та сім'яної рідини. Остання містить білки та небілкові продукти, що синтезуються клітинами Сертолі, епідидимуса, сім'яних канальців, простати та додаткових статевих залоз. Також у сім'яній рідині наявні різні цитокіни (фактор некрозу пухлини α [TNF-α], інтерлейкіни [IL], трансформуючий фактор росту β [TGF-β] та ін.) та їх розчинні рецептори. Цитокіни продукуються багатьма клітинами у чоловічому репродуктивному тракті і діють в основному локально [19, 40]. Складові еякуляту та/або овариальні стероїдні гормони впливають на фенотипи маткових дендритних клітин та їх функції. Вплив є подібним до дії інфекцій, запалення, гормонального гормонального лікування на ці параметри [32, 43].

Нормальна маткова відповідь на вагітність вимагає індукції Т-клітинного імунітету, батьківські антигенспецифічні Т-лімфоцити всередині «суміші» материнських Т-лімфоцитів є доказом «сутички» антигенів при ранній вагітності перед імплантацією ембріона. Т-залежна відповідь активується при запліднені, якщо батьківські антигени, присутні у сім'яній рідині, презентуються материнськими антигенпрезентуючими клітинами CD 4+ та CD 8+ лімфоцитам у парааортальних лімфовузлах, які пронизують матку. При нормальній здоровій вагітності активовані батьківські антигенреактивні Т-лімфоцити не проявляють антифетального імунітету і замість цього вступають у функціональну анергію або проявляють знижену здатність до відповіді. Це приводить до толерантності щодо плода та експресованих на ньому батьківських антигенів. Але толерантність вимагає експансії пулу Т-регуляторних клітин (Treg) фенотипу CD 4+CD25+Foxp3+. Суттєва кількість Т-регуляторних лімфоцитів із специфічністю до батьківських антигенів є необхідною для нормальної імплантації ембріона. Змінений рівень батьківських антигенспецифічних Т-лімфоцитів може інгібувати генерацію материнської толерантності при вагітності і викликати дефекти репродукції [31, 32].

Запалення корелює і з іншими змінами в мукозальній імунній системі, включно із підвищенням рівнів В-лімфоцитів у lamina propria та підвищенням рівня Ig A, зниженням кількості В-лімфоцитів у інших місцях. Додатково до цього підвищується рівень IFN-γ. Це є аргументом, який підтверджує зацікавленість Т-хелперів 1-го порядку, які синтезують прозапальні цитокіни. Ми допускаємо, що такий тип відповіді частіше працює при захворюваннях, у які задіяні слизові тканини [38].

У експериментальній моделі хронічного запалення яєчок у гризунів, яким є експериментальний аутоімунний орхіт (ЕАО), виявили підвищені рівні прозапальних цитокінів (TNF-α, IL-6), хемокінів (в першу чергу MCP-1), що супроводжується лейкоцитарною інфільтрацією (переважно макрофагами, дендритними клітинами, Т-лімфоцитами). Спостерігали підвищення рівня регуляторних CD 4+CD25+Foxp3+ Т-лімфоцитів. На пізніх стадіях хвороби ці інфільтрати формували гранульоми. Фінальна фаза ЕАО полягала у прогресивному апоптозі гермінальних клітин, що приводило до асперматогенезу та стерильності. Знижений рівень тестостерону свідчив про те, що вплив ЕАО не розповсюджується тільки на тестикулярні гермінальні клітини, але і викликає також дисфункцію соматичних клітин, тобто клітин Сертолі та Лейдіга [18, 41]. В тому числі, стероїдні гормони задіяні у ключових змінах імунної відповіді – її посиленні (як естроген) так і її інгібіції (як тестостерон та глюкокортикостероїди) [28].

Показано, що, по-перше, тестостерон ефективно інгібує акумуляцію макрофагів та CD4+ Т-лімфоцитів і одночасно збільшує число імуносупресивних CD4+CD25+Foxp3+ Т-лімфоцитів в тестикулярному інтерстиціумі. По-друге, тестостерон інгібує експресію мРНК, що в результаті знижує присутність прозапальних цитокінів (TNF-α, IL-6), хемокінів (в першу чергу MCP-1) в тканині яєчок. По-третє, виявили, що його вплив здійснюється на локальному (тестикулярному) рівні, а на системному тестостерон знижує секрецію Т-хелперами-1 цитокінів IFN-γ та IL-2. Через зсув співвідношення синтезованих Тх-1/Тх-2 цитокінів Т-залежна аутоімунна відповідь інгібується, що попереджує екстенсивну прозапальну відповідь та пошкодження тканини. Дослідженнями доведено, що тестостерон відіграє важливу роль у підтримці імунологічного балансу у яєчках та відіграє певну, але невідому роль у диференціюванні Т-регуляторних лімфоцитів. Тестостерон може попереджувати акумуляцію макрофагів і чинить так, що макрофаги у яєчках стають неефективними. Композиція імунних клітин імовірно складається так, що число Т-регуляторних підвищується. Здатність тестостерону індукувати цю трансформацію чітко продемонстрована [18].

При ЕАО є важливою пропорція між різними типами Т-лімфоцитів: CD8+ лімфоцити-ефектори підвищені у більшій мірі, ніж CD 4+Foxp3+ Т-регуляторні. Цей дисбаланс приводить до хронічного тестикулярного запалення [23].

У клінічній практиці крипторхізм та варикоцелє відносять до урологічних захворювань, у яких антиспермальний імунітет є частиною патогенезу і однією із причин неплідля. Рівень тестостерону у таких хворих переважно є зниженим. Зараз в літературі активно дискутується питання, чи можна крипторхізм та варикоцелє вважати

аутоімунними органоспецифічними хворобами. Механізми, які викликають дисрегуляцію Т-залежного імунітету, яка передує аутоантитілоутворенню у таких пацієнтів, практично не вивчені і не висвітлені у літературі.

Натомість зміни у регуляції імунної відповіді, які приводять до формування системної аутоімунної патології, вивчені достатньо добре, зокрема, при ревматоїдному артриті (РА). Це – гетерогенне, з точки зору імунопатологічних механізмів, захворювання. Серед різноманітних імунних порушень, які лежать в основі розвитку аутоімунних хвороб, вивчення дефектів В-клітинної регуляції викликає особливий інтерес. Нагадаємо, що однією із перших концепцій імунопатогенезу РА є сприйняття цієї хвороби не як «Т-лімфоцитарної цитокінзалежної» патології, а В-клітинної імунокомплексної хвороби, в розвитку якої основне значення надавали синтезу аутоантитіл. В-лімфоцити можуть приймати активну участь в розвитку аутоімунного процесу при РА за рахунок різноманітних механізмів: презентація антигенів Т-лімфоцитам (особливо на пізній стадії імунної відповіді), синтез аутоантитіл та цитокінів [4]. Є докази, що CD4+ Т-лімфоцити відіграють ведучу роль у патогенезі РА у різних ключових точках цієї хвороби. В-лімфоцити також відіграють важливу роль при РА, вони регулюють активацію CD4+ Т-лімфоцитів, які пронизують тканину, презентуючи їм антигени, їх рух всередину тканини та продукцію ними цитокінів. Інтеракція імунних клітин при РА приводить до уражуючих тканини реакцій. Кількість NK-клітин є підвищеною у периферичній крові хворих РА. NK-клітини можуть бути причетними до патогенезу РА завдяки своїй перфорин- або гранзим-опосередкованій цитотоксичності та продукції цитокінів [30]. На тваринних моделях аутоімунних хвороб було показано, що натуральні кілери (НК) контролюють активацію Т-лімфоцитів. Крім цитотоксичної активності, НК-клітини синтезують різні цитокіни (IL-12, IL-15) та модулюють Т-клітинну відповідь, як in vitro, так і на тваринних моделях аутоімунних хвороб. Найбільш відомими як продуценти цитокінів є НК-клітини фенотипу $CD56^{bright}$ [34].

Останні дані вказують, що порушення імунної регуляції в основному відносяться до надмірно розвинутої запальної реакції, яку супроводжують порушення механізмів контролю над запаленням [15], бо депоновані у тканині Т-лімфоцити CD4+ впливають на макрофаги і фібробласти, стимулюючи їх до продукції прозапальних цитокінів (найбільше IL-1β, IL-6, TNF-α) та активують В-лімфоцити [26]. Т-лімфоцити-хелпери диференціюються у периферичних тканинах у напрямку Т-хелперів типу 1 (Тх1), синтезуючих IL-2, IFN-γ, та Т-хелперів типу 2 (Тх2), синтезуючих IL-4,5,10. Вважається, що під час запалення з аутоімунним компонентом більш важливу роль відіграють Тх1 [11]. Аутореактивні CD4+ Т-хелпери 1-го порядку довший час асоціювалися із розвитком багатьох органоспецифічних аутоімунних хвороб. Диференціація Т-хелперів 1-го порядку ініціюється в присутності IFN-γ, що приводить до активації специфічного для Т-хелперів 1-го порядку транскрипційного фактора T-bet, який, в свою чергу, індукує продукцію IFN-γ і спільну вразливість до дії IL-12 [24].

Найновіші дослідження однак змінили погляд на їх значення в аутоімунних процесах, довели, що ці хвороби можуть розвиватися і без участі Тх1 [11]. Останнє десятиріччя характеризується активним вивченням клітин-регуляторів, володіючих супресорною активністю по відношенню до клітин, експресуючих аутоантигени та антигени інфекційного походження.

Дані досліджень вказують, що індукція та прогресія запальних хвороб з аутоімунним компонентом вимагає присутності інших ефекторних клітин популяції лімфоцитів CD4+. Т-лімфоцити-хелпери можуть (крім клону Тх1) диференціюватися у напрямку формування регуляторних Т-лімфоцитів із фенотипом CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) [29].

Регуляторні лімфоцити CD4+Foxp3+ (Treg) відіграють важливу роль в механізмах імунної регуляції. Ці лімфоцити характеризуються конститутивною експресією в цитоплазмі унікального транскрипційного фактора Foxp3+. Крім цього Т-регуляторні експресують на поверхні молекул CD25, GITR, CD62L, OX-40 та додатково в цитоплазмі та клітинній мембрані – супресорні молекули CTLA-4. Показано, що Т-регуляторні впливають супресивно на проліферацію і функцію ефекторних лімфоцитів (CD4+25-, CD8+, CD4+, NK), знижуючи їх проліферативну активність та рівень секреції IL-2, IFN-γ та інших цитокінів [5, 7]. Цей вплив відбувається через безпосередні міжклітинні контакти або за посередництвом синтезованих імуносупресивних цитокінів (IL-10, TGF-β) [11,26]. Метою їх супресивної дії є також процеси активації аутореактивних Т-лімфоцитів, які «висмикнулися» з-під контролю механізмів утримування імунної толерантності [26]. Також до загального пулу Treg-клітин відносяться антигенспецифічні Т-хелпери 3-го типу, які формуються у відповідь на інфекцію та секретують супресорні цитокіни (IL-10 та TGF-β1), CD8+CD28+ або NKT-клітини природженого імунітету з інваріантним Т-клітинним рецептором (TCR), «некласичні» NK-клітини із варіантним TCR. В процесі нормального постембріонального розвитку Treg-клітини формуються в тимусі і на 4-5 день після народження розселяються в периферичні лімфоїдні тканини. Натуральні Т-регуляторні клітини розвиваються у тимусі з наївних клітин CD4+ Т-лімфоцитів, а в присутності TGF-β і/або

IL-2 можуть бути індуковані із Т CD 4+CD25-, тоді вони називаються індукованими/адаптивними Т-регуляторними клітинами. Величина популяції Т-регуляторних та їх супресорна функція залежить від рівня IL-2, IFN-γ та TGF-β (позитивний вплив) та IL-6 та TNF-α (негативний вплив) [26]. Видалення тимусу в експерименті на 3-й день неонатального розвитку приводить до виникнення різних органоспецифічних аутоімунних хвороб (в т.ч. орхіту). В нормі CD4+CD25+ Т-клітини складають приблизно 5-10% від загальної популяції CD4+ Т-лімфоцитів периферичної крові. При певних патологічних станах активовані CD4+CD25- Т-лімфоцити трансформуються у CD4+CD25+ Treg клітини та набувають супресорної активності.

Активація Treg клітин може бути наслідком багатократної стимуляції [1]. Остання обставина представляє особливий інтерес, так як для аутоімунних хвороб характерна тривала присутність антигену в організмі. Можна передбачити, що в основі розвитку цих хвороб лежить процес формування імунної супресії за участю антигенспецифічних Treg-лімфоцитів [7].

Хронічні запальні реакції у яєчках часом є асимптоматичними. Постановка діагнозу орхіт і підтвердження цієї патології як можливої причини неплідця є дуже важливим. Базові дослідження аутоімунних хвороб чоловічих гонад ґрунтуються на основних знаннях про патогенез аутоімунітету. Аутоагресія (аутоімунітет) проявляється синтезом антиспермальних антитіл (АСА). Аутоімунний компонент у формі АСА часто присутній у хворих на крипторхізм, варикоцелє, гіпоспадію тощо.

Описані хронологічні зміни у кількості CD4+ та CD8+ Т-ефекторних клітин, які інфільтрують яєчка під час прогресування експериментального аутоімунного орхіту. Однак специфічні функції цих субпопуляцій у патогенетичному процесі залишаються невивченими. Доведено лише, що кількість CD4+ Т-ефекторних клітин, продукуючих IFN-γ та TNF-α, драматично підвищується, тоді як кількість CD8+ Т-ефекторних клітин, продукуючих TNF-α, знижується у меншій мірі в порівнянні із CD4+. На протязі хронічної фази ЕАО посилюється значення продукції клітинами CD8+ цитокіну TNF-α [24].

В субпопуляції CD4+ Т-лімфоцитів виділяють три основних субтипи лімфоцитів, які володіють властивостями Treg. Treg-1 інгібують відповідь хелперних Т-лімфоцитів (Тх1 та Тх2) за посередництвом IL-10-залежного механізму, зявляються після хронічної антигенної стимуляції або в присутності спеціалізованих антигенпрезентуючих клітин. Treg-2 (які раніше називали Тх3) секретують трансформуючий фактор росту бета-1 (TGF-β1) і в меншій мірі суп ресорні цитокіни (IL-4 та IL-10). Ці клітини не мають чітких специфічних маркерів і можуть бути виявлені тільки за функціональною активністю. Особливо великий інтерес викликають клітини Treg-3 з фенотипом CD4+CD25+. Вважається, що вони відіграють фундаментальну роль в контролі аутоімунних реакцій [5].

Показано, що регуляторна функція Treg опосередкована прямим контактом із дендритними клітинами. Альтернативний паракринний механізм регуляції залежить від їх локалізації [8, 13]. Механізм, яким CD4+CD25+ Т-лімфоцити пригнічують імунну відповідь, є невивченим. Існують численні гіпотези: ці клітини можуть вбивати аутореактивні клітини різними способами, наприклад інактивувати антигенпредставляючі клітини або Т-лімфоцити через CTLA-4 та вивільнювати або експресувати молекули (такі як перфорин та TGF-β) для супресії аутореактивних клітин [12].

Дослідження in vivo довели, що Treg можуть прямо взаємодіяти з дендритними клітинами у лімфовузлах, тим самим попереджаючи прямий контакт між антигенпрезентуючих клітинах та відповідаючими CD4+. Це дає результат у інгібіції активації Т-лімфоцитів. У тканині, охопленій запальним процесом, взаємодія між Treg CD4+CD25+ та антигенпрезентуючими клітинами здійснюється не тільки за допомогою дендритних клітин, але і моноцитів/макрофагів. Treg CD4+CD25+ можуть прямо інгібувати антигенпрезентуючу функцію моноцитів/макрофагів. По суті Treg пригнічують маннозний рецептор, тобто реалізують інший спосіб взаємодії між клітинами, відмінний від цитокінового. Посилення фагоцитарної здатності та підвищення продукції хемокіну CCL18 тільки частково залежать від IL-10 і не залежать від IL-4/IL-13, що передбачає появу нових доказів щодо індукції Treg-лімфоцитами AAM (альтернативна активація макрофагів). Є дані літератури, що регуляція експресії HLA-DR повністю залежить від рівня IL-10 [42].

Вивчення доступної літератури по проблемі імунозалежного чоловічого неплідця показало, що між різного роду дослідженнями у імунних параметрів існує прогалина – є досить добре вивчені зміни факторів природженого імунітету та остаточні продукти діяльності набутого, тобто антиспермальні антитіла (АСА). Даних же про Т-залежну імунну відповідь, яка веде (можливо, не завжди?) до формування АСА, практично немає.

Метою даної роботи було (1) вивчити фенотипи лімфоцитів у периферичній крові різних груп неплідних чоловіків та порівняти їх із такими у фертильній популяції (2) визначити різні цитокіни у периферичній крові плідних та неплідних чоловіків (3) проаналізувати їх зміни у різних групах.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Пацієнти

Було обстежено 100 чоловіків (27 – здорові фертильні чоловіки; 73 – неплідні чоловіки). Із групи неплідних чоловіків сформували п'ять підгруп для досліджень: пацієнти із системними аутоімунними хворобами, в основному анкілозуючим спондилоартритом – 18; пацієнти із анатомічними вадами (варикоцелє, крипторхізм) – 22; пацієнти із соматичною патологією (псоріаз, патологія щитовидної залози, гепатит А, дерматити, метаболічний синдром, кардіосклероз, онкопатологія) – 10; здорові пацієнти з ідіопатичним непліддям – 13; здорові пацієнти, дружини яких мали в анамнезі 2-3 ранніх спонтанних викидні – 10). Забір крові для фенотипування та виділення сироватки проводилися за стандартною процедурою.

Методи

Вміст цитокінів у сироватці крові

Виділена сироватки крові та сім'яна рідина зберігалися при - 20°С, рівні цитокінів IL-1β, 6, 10, 18; TNF-α, IFN-γ та TGF-β1 визначалися імуноферментним методом (ELISA). Набори для визначення IL-1β, 6, 10, 18, TNF-α та IFN-γ виготовлені в Росії фірмою VECTOR-BEST (Новосибірськ); набір для визначення TGF-β1 виготовлений у Німеччині фірмою DRG Diagnostics. Для проведення імуноферментного аналізу використовували автоматичний аналізатор SUNRISE TECAN (Австрія) з автоматичною приставкою Microwell ELISA (США).

Імунофенотипування

Рівень Т-лімфоцитів (CD3+), В-лімфоцитів (CD19+), NK-клітин (CD 16+/56+), субпопуляцій Т-лімфоцитів: Т-лімфоцитів-хелперів CD4+, Т-лімфоцитів-цитотоксичних CD8+, Т-лімфоцитів регуляторних CD4+/25+ та Т-лімфоцитів CD4+/25-; пізні активізаційні маркери CD 3+ HLA-DR+ та CD 3- HLA-DR+ визначали, використовуючи проточний цитометр BD FacsCalibur Becton Dickinson (США) та реактиви тієї ж фірми.

Статистика

Після проведення досліджень згідно стандартних методик були збудовані калібрувальні криві та вирахувані результати. Для їх порівняння використовували статистичну програму за Стюдентом.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У групі здорових фертильних чоловіків та чоловіків з різними причинами непліддя було визначено відсоток та абсолютне число Т-лімфоцитів (CD3+), В-лімфоцитів (CD19+), NK-клітин (CD16+/56+), субпопуляцій Т-лімфоцитів: Т-лімфоцитів-хелперів CD4+, Т-лімфоцитів-цитотоксичних CD8+, Т-лімфоцитів регуляторних CD4+/25+ та Т-лімфоцитів CD 4+/25- ; пізніі активізаційні маркери CD3+ HLA-DR+ та CD 3-HLA-DR+.

У підгрупі неплідних чоловіків із системними аутоімунними хворобами був підвищений рівень Т-лімфоцитів-цитотоксичних CD8+ (30,6±0,4% в порівнянні з контролем 27±0,4%, $p<0,05$) та Т-лімфоцитів регуляторних CD 4+/25+ (20,2±0,3% в порівнянні з контролем 15,3±0,4, $p<0,05$). У цій же групі в порівнянні з контрольною була підвищена кількість Т-лімфоцитів-хелперів CD 4+ та знижена кількість НК-клітин CD16+/56+, але різниця була статистично недостовірною (таблиця 1).

У підгрупі неплідних чоловіків з анатомічними вадами був знижений рівень Т-лімфоцитів-цитотоксичних CD8+ (24,4±0,3% в порівнянні з контролем 27±0,4%, $p<0,05$) та підвищений рівень Т-лімфоцитів регуляторних CD4+/25+ (18,4±0,2% в порівнянні з контролем 15,3±0,4%, $p<0,05$). В той же час рівень Т-лімфоцитів-регуляторних 4+/25+ у чоловіків з анатомічними вадами був нижчим у порівнянні з групою пацієнтів із системними аутоімунними хворобами (20,2±0,3%). У цій же групі в порівнянні з контрольною була підвищена кількість Т-лімфоцитів-хелперів CD4+ та знижена кількість НК-клітин CD16+/56+, але різниця була статистично недостовірною (таблиця 1).

У підгрупі неплідних чоловіків із соматичною патологією був істотно підвищеним рівень Т-лімфоцитів-цитотоксичних CD8+ (31,5±0,8% в порівнянні з контролем 27±0,4%, $p<0,05$) та підвищений рівень Т-лімфоцитів регуляторних CD 4+/25+ (23,7±2,1% в порівнянні з контролем 15,3±0,4%, $p<0,05$). У цій же групі в порівнянні з контрольною була підвищена кількість Т-лімфоцитів-хелперів CD 4+ та знижена кількість НК-клітин CD16+/56+, але різниця була статистично недостовірною (таблиця 1).

У підгрупі неплідних чоловіків з ідіопатичним непліддям був істотно зниженим рівень Т-лімфоцитів-цитотоксичних CD8+ (23,2±1,2% в порівнянні з контролем 27±0,4%, $p<0,05$); підвищений рівень Т-лімфоцитів-хелперів CD4+ (45,3±2,2% в порівнянні з контролем 39±1,1%, $p<0,05$), суттєво підвищений рівень Т-лімфоцитів-регуляторних CD4+/25+ (24,8±2,4% в порівнянні з контролем 15,3±0,4%, $p<0,01$). У цій же групі в порівнянні з контрольною була підвищена кількість лімфоцитів з експресією активізаційного маркера CD3-HLA-DR+% (12,9±0,5% в порівнянні з контролем 11,3±0,5%, $p<0,05$) та знижена кількість НК-клітин CD16+/56+, але різниця була статистично недостовірною (таблиця 1).

У підгрупі соматично здорових чоловіків, жінки яких перенесли 2-3 ранніх викидні, не було статистично достовірних змін у жодній популяції та субпопуляції лімфоцитів у порівнянні з контролем (таблиця 1).

Таблиця 1

Фенотипічні характеристики лімфоцитів периферичної крові неплідних чоловіків різних груп

№ з/п	Назва показника	Контрольна група	Групи чоловіків				
			з системними автоімунними хворобами	із анатомічними вадами (первинне неплідда)	із соматичною патологією (первинне неплідда)	із ідіопатичним непліддям (первинним)	Здорові чоловіки, жінки яких мали кілька ранніх викиднів
1	Лімф (абс)	2175±141,5	2248,7±209,7	2139±144	2183,8±126,6	2026,9±121,8	2125,8±111,3
2	CD3(%)	67±1,6	73±2,5	67,5±1,5	72,2±2,9	69,3±1,6	72,3±2,8
3	CD3(abs)	1463±110,8	1665,1±178	1450,2±114,3	1573,6±77,6	1398,3±83,9	1536±102,5
4	CD8(%)	27±0,4	30,6±0,4*	24,4±0,3*	31,5±0,8*	23,2±1,2*	31,4±2,5
5	CD8(abs)	584,8±57,5	682,3±93,7	528,5±65,7	651,8±54,3	466,7±43,7	663,5±65,7
6	CD4(%)	39±1,1	41,6±1,8	41,5±1,6	40,7±2,3	45,3±2,2*	41,4±2,5
7	CD4(abs)	826,4±62,2	959,6±120,7	854,8±60,3	883,2±76,9	904±70	874,8±85,5
8	NK 16/56(%)	20,8±1,1	15,8±1,9*	20,2±1,6	15,4±2,2*	18,7±1,7	17±2,8
9	NK 16/56(abs)	455,7±33,5	346,8±50,6	442,6±44,3	356,2±51,1	383,8±44,6	359,4±62,1
10	CD19(%)	10,2±0,6	9,4±1,2	10,5±0,7	9,3±1,4	11,1±0,5	9,8±0,8
11	CD19 (abs)	229,2±21,7	206,2±27,7	219,3±13,9	222,1±39,7	222,3±13,9	208,3±20,3
12	CD3+HLA-DR+%	5±0,7	6,7±1,2	4,1±0,4	5,3±1,4	5,3±1	5±0,5
13	CD3-HLA-DR+%	11,3±0,5	11,6±1,3	11,4±0,7	11,5±1,3	12,9±0,5*	10,6±0,8
14	CD4+25+(%)	15,3±0,4	20,2±0,3*	18,4±0,2*	23,7±2,1**	24,8±2,4**	17,3±2,3
15	CD4+25-(%)	21,7±1,5	19,3±2,5	20,3±1,6	14,3±2,7**	17,8±1,6	21,5±2,3

* – статистично достовірна різниця між контрольною групою та різними групами неплідних пацієнтів ($p<0,05$)
**– статистично достовірна різниця між контрольною групою та різними групами неплідних пацієнтів ($p<0,01$)

Таблиця 2

Цитокіни у периферичній крові неплідних пацієнтів різних груп.

№	Цитокін	Контрольна група	Групи неплідних пацієнтів				
			Системні аутоімунні хвороби Група 1	Анатомічні вади (первинне неплідда) Група 2	Соматична патологія (первинне неплідда) Група 3	Ідіопатичне неплідда (первинне) Група 4	Здорові чоловіки (3-4 ранніх викидні у жінок) Група 5
1	IL-1β пг/мл	3,5±0,3	1,2±0,07*	2,4±0,07	0,5 ±0,1 *	2,7±0,3	2,4±0,1
2	IL-6 пг/мл	2,1 ±0,1	4,8 ±0,1*	2,4±0,1	3,1±0,3	3,4±0,04	2,4±0,3
3	IL-10 пг/мл	0	0	0	0	4,3±0,02 *	0
4	IL-18 пг/мл	160,2±3,13	290 ±11,2*	157,4 ±17,3	171,9±5,7	310,17±20,3 *	162,8±10,3
5	TGF-β1 пг/мл	481,2 ±10,4	570,5 ±20,3 *	500 ±32,3	543,8 ±0,3	600,5±10,9 *	550,2±20,13 *
6	TNF-α пг/мл	4,2 ±0,5	2,3 ±0,04*	3,9 ±0,02	3,5±0,1	2,5±0,02	2,2±0,04
7	IFN-γ пг/мл	10 ±0,05	14,3±0,5	15,9 ±0,3	12,8 ±0,25	25,1 ±0,13 *	16,9 ±0,1

* - статистично достовірна різниця між контрольною групою та різними групами неплідних пацієнтів ($p<0,05$)

Рівень активізаційного маркера CD3+HLA-DR+% (пізнього маркера активації Т-лімфоцитів) статистично достовірно не відрізнявся від контролю у жодній із груп неплідних чоловіків. Кількість неіндукованих Т-лімфоцитів CD4+25- (попередників Т-регуляторних CD4+25+) у чоловіків із груп з аутоімунними хворобами, анатомічними вадами, ідіопатичним непліддям була незначно зниженою в порівнянні з контролем (статистично недостовірно), а у групі пацієнтів із соматичними хворобами та непліддям – суттєво нижчою (14,3±2,7% в порівнянні з контролем 21,7±1,5%, p<0,01) (таблиця 1).

Хоча зміни рівнів далеко не всіх популяцій та субпопуляцій лімфоцитів були статистично достовірними, ми провели порівняння рівнів особливо важливих субпопуляцій Т-лімфоцитів CD8+ та CD4+ , рівнів CD16/56+; рівнів CD4+CD25- та CD4+CD25+ у здорових плідних чоловіків та неплідних чоловіків із різних груп і виразили їх зміни у формі стовпчикових діаграм (рисунок 1,2).

У пацієнтів всіх п’яти груп та у контрольній групі провели визначення цитокінів у сироватці крові. У групі пацієнтів із системними аутоімунними хворобами рівень TGF-β1 був вищим контролю (570,5 ±20,3 пг/мл в порівнянні з контролем 481,2 ±10,4 пг/мл, p<0,05), рівень IL-6 вищий контролю (4,8 ±0,1 пг/мл в порівнянні з контролем 2,1 ±0,1 пг/мл, p<0,05), IL-18 вищий контролю (290 ±11,2 пг/мл в порівнянні з контролем 160,2±3,13 пг/мл, p<0,05) та IFN-γ статистично недостовірно вищими контролю, рівень IL-1β нижчий контрольного (1,2±0,07 пг/мл в порівнянні з контролем 3,5±0,3 пг/мл, p<0,05) та TNF-α нижчий контрольної групи (2,3 ±0,04 пг/мл в порівнянні з контролем 4,2 ±0,5 пг/мл, p<0,05) (таблиця 2).

У групі пацієнтів із анатомічними вадами (крипторхізм, варикоцелє) та первинним непліддям рівні TGF-β1, IL-1β, IL-6, IL-18, TNF-α та IFN-γ статистично недостовірно відрізнялися від контрольної групи (таблиця 2).

У групі пацієнтів із соматичними хворобами та первинним непліддям рівні всіх означуваних цитокінів статистично недостовірно відрізнялися від контрольної групи, тільки рівень IL-1β був суттєво зниженим (0,5 ±0,1 пг/мл в порівнянні з контролем 3,5±0,3 пг/мл, p<0,05) (таблиця 2).

У групі пацієнтів із ідіопатичним первинним непліддям рівень TGF-β1 був вищим контролю (600,5±10,9 пг/мл в порівнянні з контролем 481,2 ±10,4 пг/мл, p<0,05). Рівні IL-1β та IL-6 статистично достовірно не відрізнялися від контролю. IL-18 був статистично достовірно вищий контролю (310,17±20,3 пг/мл в порівнянні з контролем 160,2±3,13 пг/мл, p<0,05) та IFN-γ статистично достовірно вищий контролю (25,1 ±0,13 пг/мл в порівнянні з контролем 10 ±0,05 пг/мл, p<0,05). Рівень TNF-α статистично недостовірно нижчий контрольної групи. Цікаві результат отримані стосовно IL-10. Тільки у групі хворих з ідіопатичним первинним непліддям рівень цього цитокіну виявився статистично достовірно вищим рівня у контрольній групі (4,3±0,02 пг/мл в порівнянні із показником 0 в контролі, p<0,05) (таблиця 2).

У групі соматично здорових пацієнтів, дружини яких мали в анамнезі 2-3 ранніх викидні, майже всі рівні досліджуваних нами цитокінів статистично недостовірно відрізнялися від контрольної групи, тільки рівень TGF-β1 був підвищеним (550,2±20,13 пг/мл в порівнянні з контролем 481,2 ±10,4 пг/мл, p<0,05) (таблиця 2).

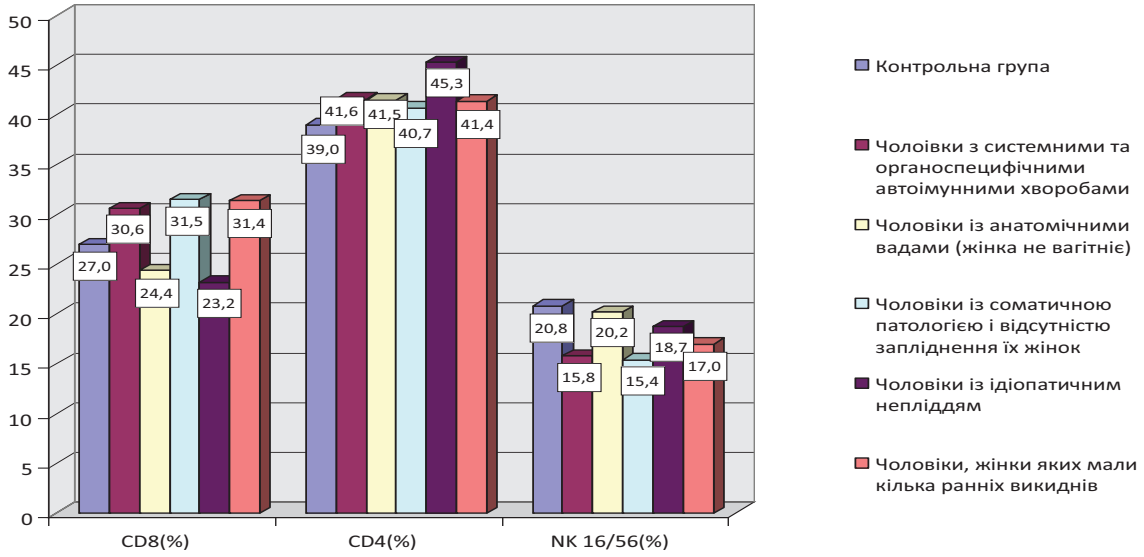

Рисунок 1. Порівняльна характеристика кількості основних субпопуляцій Т-лімфоцитів (CD8+, CD4+) та НК-клітин у периферичній крові здорових чоловіків та неплідних пацієнтів різних груп пацієнтів (у процентах)

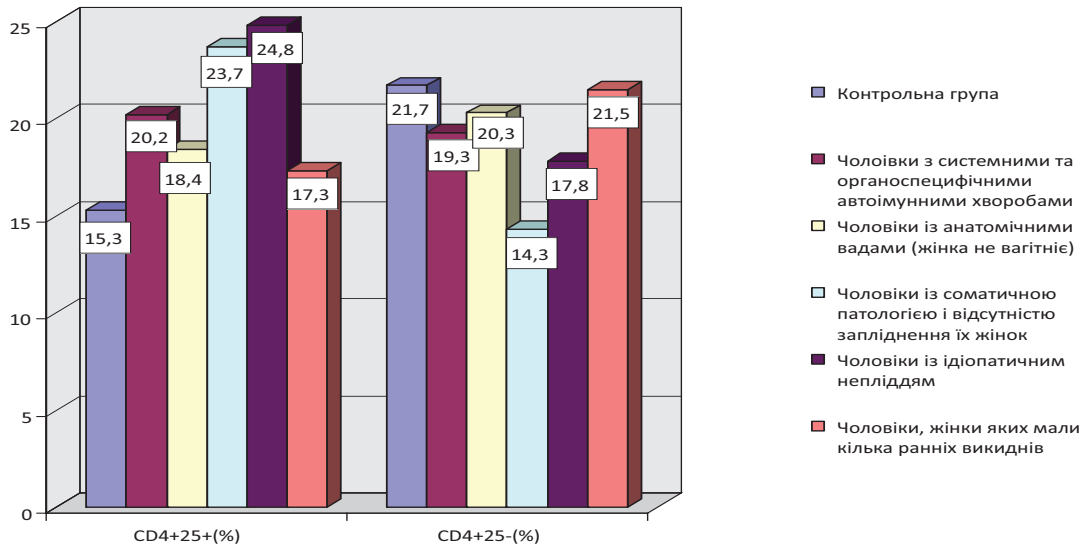

Рисунок 2. Порівняльна характеристика кількості неіндукованих Т-лімфоцитів CD4+CD25- та Т-лімфоцитів-регуляторних CD4+CD25+ у периферичній крові здорових чоловіків та неплідних пацієнтів різних груп пацієнтів (у процентах)

ОБГОВОРЕННЯ

У отриманих нами результатах найбільші відхилення від нормальних рівнів кількостей популяцій та субпопуляцій лімфоцитів та синтезованих ними цитокінів отримані у групах неплідних пацієнтів із системними аутоімунними хворобами та ідіопатичним непліддям.

У групі хворих із системними аутоімунними хворобами нами отримані дані щодо статистично достовірного підвищення рівнів Т-лімфоцитів-цитотоксичних CD 8+ та Т-лімфоцитів регуляторних CD4+/25+. Рівень TGF-β1 (продукт синтезу Treg-клітин) був вищим контролю, рівень IL-10 залишався на нульовій позначці. За даними літератури, у пацієнтів з РА кількість клітин CD4+CD25+ в периферичній крові в порівнянні із здоровими донорами практично одинакове. У хворих РА не відзначали значного зниження кількості CD4+CD25+ Т-лімфоцитів (приблизно 5-10% від загальної популяції CD4+), але спостерігали суттєве зниження їх функцій. Так, субпопуляція Treg-клітин хворих в активній стадії хвороби ефективно подавляла проліферацію нормальних CD4+CD25- Т-клітин, але не продукцію ними прозапальних цитокінів - IL-1, IFN-γ та TNF-α [5]. Вважається, що їх основна функція полягає в обмеженні активації CD4+ та CD8+ Т-лімфоцитів [3]. У порівнянні із здоровими людьми, Treg у периферичній крові при ранніх стадіях РА є у зниженій кількості [13].

Також у групі хворих із системними аутоімунними хворобами нами отримані дані щодо підвищення кількості Т-лімфоцитів-хелперів CD4+ та зниження кількості NK-клітин CD16+/56+, але різниця була статистично недостовірною. Рівень синтезованого IFN-γ виявився вищим контрольного, але також статистично недостовірно.

У даних літератури при РА виявлена підвищена кількість Т-хелперів, що свідчить про активну імунну реакцію. Також є дані про дисбаланс у пропорції периферичних В-лімфоцитів та NK-клітин, що відіграє потенційну роль у патогенезі РА. Було показано, що активовані NK-клітини (HLA-DR+CD56+) можуть функціонувати як клітини, презентуючи суперантиген, які здійснюють неспецифічну стимуляцію Т-лімфоцитів. Проте є дані, що інтенсивна проліферація і В, і Т-лімфоцитів асоційована із низькою пропорцією NK [30]. Чи задіяні NK- клітини у патогенез РА? Існує точка зору, що при РА NK- клітини виконують промуючу хворобу функцію. На місцевому рівні вони продукують більше IFN-γ в порівнянні із NK-клітинами із периферичної крові тих самих пацієнтів. Можливо NK-клітини здатні індукувати диференціацію моноцитів у дендритні клітини. Контакт між NK-клітинами та іншими клітинами, зреалізований через цитокіни та хемокіни, сам по собі є потенційним ризиком аутоімунної хвороби [39]. IL-18 відіграє одну із ключових ролей у реалізації імунної відповіді по Тх1-типу. Цей цитокін стимулює Т-лімфоцитів, FasL-опосередковану цитотоксичність NK-клітин, продукцію Тх1-лімфоцитами IL-12, IFN-γ; знижує продукцію Тх2-лімфоцитами IL-10 [6]. IL-18, який продукують дендритні клітини та моноцити, індукує NK-клітини до продукції IFN-γ, який діє з IL-12 та IL-15, стимулюючи перетворення Т-лімфоцити у Т-хелпери 1-го порядку. Можливо, IL-18 кооперується із IL-2, щоби індукувати Т-хелпери 2-го порядку [16]. Інші автори повідомляють, що при РА активність NK-клітин знижується і зменшується експресія CD 16 [39]. Підвищення рівня IFN-γ в периферичній крові приводить до підвищення абсолютної кількості

В-лімфоцитів в крові. Концентрація IFN-γ достовірно зв'язана із активністю запального процесу [8]. У обстежуваних нами пацієнтів групи хворих із системною аутоімунною патологією виявлене статистично недостовірне зниження кількості В-лімфоцитів, але виявлене нами підвищення рівня IFN-γ в периферичній крові у цих хворих є предиктором наступного зростання кількості В-лімфоцитів.

У пацієнтів із системною аутоімунною патологією нами виявлене підвищення рівнів прозапальних цитокінів IL-6 (продукція моноцитів/макрофагів) та IL-18 (продукція моноцитів/макрофагів, лімфоцитів та дендритних клітин). Але рівень IL-1β та TNF-α у цих хворих був нижчий контрольного. Мабуть, це можна пояснити перспективою індукції у таких хворих власне Т-хелперів 2-го порядку. За даними літератури, при РА імунопатологічний процес проявляється не тільки активацією CD4+ Т-лімфоцитів по типу Тх1, але і активацією макрофагів (синтез макрофагами прозапальних медіаторів). В основі патогенезу РА лежать два тісно взаємозв'язаних процеси: антиген-специфічна активація CD4+ Т-лімфоцитів по типу Тх1, а також формуванням дисбалансу між гіперпродукцією прозапальних та антизапальних цитокінів з переважанням синтезу перших над другими [5, 6, 8]. У пацієнтів із малою активністю процесу була також низька кількість CD4+CD25+ Т-лімфоцитів, але ці результати є статистично недостовірними [12]. Treg CD4+CD25+ проявляють чіткий спосіб супресії при дії стимулу, що проявляється як зниженням регуляції NF-κB і його зв'язування з ДНК, так і базального рівня активності NF-κB. А його активація потрібна для експресії генів прозапальних цитокінів та регуляцію поверхневих маркерів лімфоцитів. Зниження активації NF-κB може приводити до підвищення рівнів IL-10 та IL-13 у культурі Treg-моноцити, бо обидвоє (IL-10 та IL-13) можуть пригнічувати активацію NF-κB. Більше того, блокування NF-κB при класичному способі активації макрофагів дає результат у зниженні продукції ними прозапальних цитокінів, але їхня фагоцитарна здатність залишається незмінною і бактеріальний кіллінг навіть зростає [42]. Виявлені нами знижені рівні IL-1β та TNF-α у хворих із системними аутоімунними хворобами можна пояснити урівноваженням активності процесу, швидше всього, після застосуванням імуносупресивної терапії. Очевидно цим також можна пояснити нульовий рівень IL-10 у хворих цієї групи.

У підгрупі неплідних чоловіків з ідіопатичним непліддям був істотно зниженим рівень Т-лімфоцитів-цитотоксичних CD 8+, підвищений рівень Т-лімфоцитів-хелперів CD4+ та суттєво підвищений рівень Т-лімфоцитів-регуляторних CD 4+/25+. У цій же групі в порівнянні з контрольною була підвищена кількість лімфоцитів з експресією активізаційного маркера CD3-HLA-DR+%. Як відомо з даних літератури, приблизно 50-60% Treg експресують HLA-DR. Можливо, підвищення рівня цього маркера є асоційованим із високим рівнем Т-лімфоцитів-регуляторних CD4+/25+ у дані групі.

У підгрупі неплідних чоловіків з ідіопатичним непліддям була виявлена знижена кількість NK-клітин CD 16+/56+, але різниця з контролем була статистично недостовірною. Але, так як рівень IFN-γ у цій групі хворих виявився статистично достовірно вищий контролю, можна припустити, що NK-клітини у пацієнтів даної групи добре виконують свою функцію.У групі пацієнтів із ідіопатичним первинним непліддям рівень TGF-β1 був вищим контролю, що добре асоціюється із підвищеною кількістю Т-лімфоцитів-регуляторних CD 4+/25+ у цих хворих. Рівні IL-1β та IL-6 у сироватці крові чоловіків із ідіопатичним непліддям статистично достовірно не відрізнялися від контролю, а рівень TNF-α навіть виявився нижчим нормального. IL-18 у цих хворих був статистично достовірно вищий контролю, що може свідчити про активацію презентації антигенів дендритними клітинами на місцевому рівні, що часто передує початку аутоагресії. Тільки у групі хворих з ідіопатичним первинним непліддям рівень IL-10 у сироватці крові виявився статистично достовірно вищим рівня і у контрольній групі, і у інших групах. Це може свідчити як про активацію функції Т-хелперів 2-го порядку, так і активацію Т-лімфоцитів-регуляторних. Загалом зростання синтезу найпотужнішого антизапального цитокіну може свідчити про посилення оборони організму перед аутоагресією.

Загалом імунокомпетентні клітини реагують на перебігаючі в організмі процеси (запалення, коливання гормонального фону, стрес і т.д.) зміною ступеню експресії, появи або зникнення їх поверхневих маркерів або внутрішньоклітинних функціональних молекул. Таким чином клітина пристосовується до умов, прагнучи найбільш ефективно виконувати присущі їй регуляторні чи ефекторні функції. На даний момент вивчення фенотипу лімфоцитів при запальних захворюваннях знаходиться на стадії накопичення даних: для якоїсь патології вже визначені особливості зміни співвідношення субпопуляцій лімфоцитів, для іншої тенденції ще не зрозумілі. Специфічних поверхневих маркерів Treg все ще не описано. Приблизно 50-60% Treg експресують HLA-DR. Інший спосіб виділення Treg при фенотипічному аналізі – це оцінка флуоресценції CD25. У зв'язку із тонкощами цитофлуориметрії як основного методу виявлення типів популяцій та субпопуляцій лімфоцитів, для діагностики варто застосовувати і інші методи, зокрема, вимірювання кількості синтезованих цими клітинами цитокінів.

Аналіз отриманих нами результатів визначення популяційного складу та вмісту цитокінів у периферичній крові чоловіків із порушеннями репродуктивної функції показав, що ці зміни є найбільш показовими у групах чоловіків із системною аутоімунною патологією та соматично здорових чоловіків із ідіопатичним непліддям. У групі чоловіків із системною аутоімунною патологією формування аутоагресії відбувається і за участю Тх1, і Тх2, тоді як у групі соматично здорових чоловіків із ідіопатичним непліддям переважає активація Тх2. Власне активація Тх2 є предиктором запуску у таких хворих аутоантитілоутворення. Наступним кроком нашої роботи буде аналіз профілю синтезованих аутоантитіл у біологічних рідинах пацієнтів.

ВИСНОВКИ

1. Визначення кількості та функціональної активності лімфоцитів периферичної крові є необхідним елементом прогнозування імунозалежного типу неплідля у чоловіків.
2. У найбільшій мірі формування імунозалежного неплідля із залученням факторів набутого імунітету можна підтвердити у групах пацієнтів із системними аутоімунними хворобами та ідіопатичним непліддям.
3. Вивчення кількості та функції лімфоцитів периферичної крові є об'єктивним прогнозом готовності організму пацієнта до синтезу аутоантитіл, в тому числі проти спермальних антигенів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Воробъёв А.А., Быковская С.Н., Пашков Е.П., Быков А.С.* Роль клеток-регуляторов CD4+CD25+ в развитии хронических инфекционных заболеваний. Вестник РАИН.-2006.-№9-10. С.24-29.
2. *Гаврилюк А.М., Чоп'як В.В., Наконечний А.Й., Камєнічна М, Курпіш М.* Імунозалежні причини чоловічого неплідля / Спецвипуск журналу «Профилактика и лечение заболеваний у мужчин», 2010, №1, С.6-14.
3. *Железникова Г.Ф.* Регуляторные Т-лимфоциты в иммунном ответе на инфекцию. Журнал инфектологии.-2011.-Т.3, №1.-С.6-12.
4. *Насонов Е.Л.* Применение ритуксимаба при ревматоидном артрите Вестник РАМН, 2009.-№ 1-2.-С.72-80
5. *Насонов Е.Л., Быковская Г.У.* Т-регуляторные клетки при аутоиммунных ревматических заболеваниях. Вестник РАМН, 2006.-№ 9-10.-С.74-82
6. *Новиков А.А., Александрова Е.Н., Диатроптова М.А., Насонов Е.Л.* Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита. Научно-практическая ревматология.-2010.-№2.-С.71-82.
7. *Олейник Е.К., Олейник В.М., Чуров А.В., Бахлаев И.Е., Ковчур П.И., Мясников А.А., Балашов А.Е.* Экпрессия молекулярных маркеров регуляторных лимфоцитов Foxp3 и TGF-β1 при вирусных инфекциях, аутоиммунных и онкологических заболеваниях. Известия самарского научного центра российской академии наук. Т. 11, №1 (5), 2009, С.1006-1009.
8. *Пачкунова М.В.* Иммунологический профиль больных ревматоидным артритом. Medical sciences (fundamental research). №1, 2011. С.1-9.
9. *Чоп'як В.В., Потьомкіна Г.О., Гаврилюк А.М.* Лекції з клінічної імунології для практичних лікарів (частина 1), Видавництво ЛНМУ ім. Данила Галицького, Львів, 2010, 225 с.
10. *Шакина И.А., Пилипенко М.А., Полторака Е.А., Любавина А.Е.* Синдром потери плода. «Новости медицины и фармации в Украине», № 16 (336), 2010, С.20-21.
11. *Afzali B., Lombardi G., Lechler R.I., Lord G.M.* The role of T-helper 17 (Th17) and regulatory (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. Clin Exp Immunol., 2007;148:32-46.
12. *Al-Shukaili Ah., AlKaabi J., Al-Gafri S., Hassan B., Al-Muneeri Ab.* Quantification of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Peripheral Blood of Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. The Open Autoimmunity Journal, 2009, 1, 5-9.
13. *Behrens F., Himsel A., Rehart S., Stanczyk J., Beutel B., Zimmermann S.Y., Koehl U., Möller B., Gay S., Kaltwasser J.P., Pfeilschifter J.M., Radeke H.H.* Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T-cells in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2007;66:1151-1156.
14. *Courtney W.H., K.L.Bretherick, L.Chi-Chao, M.D.Stephenson, W.P.Robinson* Genetic variation within the hypothalamus-pituitary-ovarian axis in women with recurrent miscarriage. 2010, journals.permissions@oxfordjournals.org, Online.
15. *Duarte J., Agua-Doce A., Oliviera V.G., Fonseca J.E., Graca L.* Modulation of IL-17 and Foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice. PloS One, 2010;5:e10558.
16. *Falgarone G., Jaen O., Boissier M.C.* Role for innate immunity in rheumatoid arthritis. Joint Bone Spine, vol. 72, No1., pp.17-25, 2005.

17. *Fatima P., Debnath B.C., Hossain M.M., Rahman D., Banu J., Begum S.A., Rahman M.W.* Relationship of blood and semen lead level with semen parameter/ Mymensingh Med J., 2010, Vol 19, N 3:4050414.
18. *Fijak M., Schneider E., Klug J., Bhushan S., Hackstein H., Schuler G., Wygrecka M., Gromoll J., Meinhardth A.* Testosterone Replacement Effectively Inhibits the Development of Experomental Autoimmune Orchitis in Rats: Evidence for a Direct Role of Testosterone on RegulatoryT Cell Expansion. The Journal of Immunology, 2011;186:5162-5172.
19. *Fraczek M., Czernikiewicz A., Kurpisz M.* Cytokines and Oxidative Stress in the Germ Line. Chapter 9 in A.Agarwal et.al (eds). Studies on Men’s Health and Fertility, Oxidative Stress in Applied Basic research and Clinical Practice, DOI 10.1007/978-1-61779-776-779, Springer Science+Business Media, LLC 2012, pp.179-205.
20. *Freour T., Delvigne A., Barrire P.* Evaluation of the male of the infertile couple. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2010, Vol 39 (8), Suppl 2, P. 45-52.
21. *Frey K.A.* Male reproductive health and infertility. Prim Care 2010, Vol.37, N 3: 643-652.
22. *French A.E., Koren G.* Effect of methotrexate on male fertility. Canadian Family Physician 2003;49:577-578.
23. *Jacobo P., Guazzone V.A., Jarazo-Dietrich S., Theas M.S., Lustig L.* Differential changes in CD 4+ and CD 8+ effector and regulatory T-lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis. J Reprod Immunol 2009; 81:44-54.
24. *Jacobo P., Pérez C.V., Theas M.S., Guazzone V.A., Lustig L.* CD4+ and CD8+ T-cells producing Th1 and Th17 cytokines are involved in the pathogenesis of autoimmune orchitis. Reprodiction (2011) 141 249-258.
25. *Janssen N.M., Genta M.S.* The Effects of Immunosuppressive and Anti-inflammatory Medications on Fertility, Pregnancy and Lactation. Arch Intern Med 2000.160; n 13:610-618.
26. *Kosmaczewska A., wierkot J., Coszak L., Wiland P.* Rola subpopulacji limfocytów pomocz-niczych Th1, Th17 i Treg w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów z uzwglednieniem przeciwzapalnego dzialania cytokin Th1. Postepy Hig Med Dosw, 2011; 65:397-403.
27. *Leushuis E., van de Steeg J.W., Steures P., Repping S., Schois W., van der Ven F., Moi B.W., Hompes P.G.* Immunoglobulin G antisperms antibodies and prediction of spontaneous pregnancy. Fertil Steril, 2009, Vol 92, N 5: 1659-1665.
28. *Liva S.M., Voskuhl R.R.*Testosterone acts directly on CD 4+ N-lymphocytes to increase IL-10 production. J Immunol 2001; 167:2060-2067.
29. *Mahendra A., Misra R., Aggarwal A.* Th1 and Th17 predominance in the enthesitis-related arthritis form of juvenile idiopathic arthritis. J Rheumatol., 2009;36:1730-1736.
30. *Manda G., Neagu M., Livescu A., Constantin C., Codreanu C.,* Radulescu Imbalance of peripheral B lymphocytes and NK cells in rheumatoid arthritis. J Cell Mol Med. Vol 7., No1, 2003 pp.79-88.
31. *Moldenhauer L.M., Diener K.R., Thring M.P., Brown M.P., Hayball J.D., Robertson S.A.* Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T-cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. J Immunol 2009; 182:8080-8093.
32. *Moldenhauer L.M., Keenihan S.N., Hayball J.D., Robertson S.A.* GM-CSF is an Essential Regulator of T Cell Activation Competence in Uterine Dedritic during Early Pregnancy in Mice. J Immunol 2010; 185:7085-7096.
33. *Pisipati S., Pearcy R.* The role of urological surgery in male infertility.Hum Fertil (Camb), 2010, Vol 13, N 4: 233-241.
34. *Pridgeon C., Lennon G.P., Pazmany L., Thompson R.N., Christmas S.E., Moots R.J.* Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a $CD56^{bright}$, $CD94^{bright}$, $CD158^{negative}$ phenotype. Rheumatology 2003; 42:870-878.
35. *Revonta M., Raitanen J., S. Sihvo, P. Koponen, R. Klemetti, S. Männistő R.* Luoto Health and life style among infertile men and women. Sexual and Reproductive Healthcare 1 (2010): 91-98.
36. *Ruan J. Du* Male infertility and gene defects Yi Chuan, 2010, Vol.32, N 5:411-422.
37. *Schiegel P.N.* Evaluation of male infertility. Minerva Ginecol 2009, Vol 61, N 4: 261-283.
38. *Shaikh R.B., Santee S., Granger S.W., Butrovich K., Cheung T., Kronenberg M., Cheroutre, Ware C.F.* Constitutive Expansion of LIGHT on T cells Leads to Lymphocyte Activation, Inflammation, and Tissue Destruction. J of Immunology, 2001;167:6330-6337.
39. *Shegarfi H., Naddafi F., Mirshafiey A.* Natural Killer Cells and Their Role in Rheumatoid Arthritis: Friend or Foe? The Scientific World Journal, 2012, Article ID 491974, 10 pages, doi:10.1100/2012/491974.
40. *Shiraishi K., Matsuyama H., Takihara H.* Pathophysiology of varicocele in the male infertility in the era of assisted reproductive technology. International Journal of Urology (2112) 19, 538-550.

41. *Theas M.S., Rival C., Jarazo-Dietrich S., Jacobo P., Guazzone V.A., Lustig L.* Tumor necrosis factor-alpha released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. Hum Reprod 2008; 23:1865-1872.
42. *Tiemessen M.M., Jagger A.L., Evans H.G. Herwijnen M.J., John S., Taams L.S.* CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/ macrophages. PNAS (The National Academy of Sciences of the USA), 2007, Vol.104, N 4.
43. *Vujisic S., Zidovec Lepei S., Aksamija A., Jerkovic L., Sokolic B., Kupesic S., Vince A.* B- and T-cells in the Follicular Fluid and Peripheral Blood of Patients Undergoing IVF/ ET Procedure. American J Reprod Immunol vol. 52, 2004, 379-383.
44. *Wiser A., Raviv G., Wiessenberg R., Elizur S.E., Levron J., Machtonger R., Madgar I.* Does age at orchidopexy impact on the results of testicular sperm extraction? Reprod Biomed Online 2009, Vol.19, N 6;778-783.

РЕЗЮМЕ

ПРОФИЛЬ ПОПУЛЯЦИЙ И СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МУЖЧИН С НАРУШЕНИЯМИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ

Гаврилюк А.М.[1], Чопяк В.В.[1], Криль И.И.[1], Курпиш М.[2]

[1] Кафедра клинической иммунологии и аллергологии Львовского национального медицинского университета им. Даниила Галицкого, Львов, Украина
[2] Отдел иммунобиологии репродукциии и стволових клеток Института генетики человека, Познань, Польша

Мужской фактор бесплодия определяется у половины бесплодных семей. Системный воспалительный процесс неинфекционного ґенеза и локальный воспалительный процесс мужской половой системы являются важними этиологическими факторами мужского бесплодия. Среди известных причин нарушения репродуктивной функции мужчины существенное значение имеет изменение иммунных параметров. Существуют предполагаемые доказательства ранее неизученных характеристик популяций лимфоцитов и субпопуляций Т-лимфоцитов, в частности модуляция ими репродуктивной функции. Важными модуляторами иммуного ответа являються также цитокины, которые участвуют во многих физиологических и патологических процесах.

Целью данной работы было (1) определить количественное содержание популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов в периферической крови здоровых мужчин и бесплодных пациентов; (2) определить содержание про- и антивоспалительных цитокинов в периферической крови мужчин из контрольной группы и разных групп бесплодных мужчин; (3) определить тенденции к изменениям цитокинов и лимфоцитов в разных группах неплодных мужчин для прогнозирования бесплодия.

Обследовано 100 мужчин (27 – здоровые плодные мужчины – контрольная группа и 73 – бесплодные). Методы: количество популяций и субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови CD3+, CD4+, CD8+, CD16/56+, CD19+, CD4+CD25-, CD4+CD25+ и активизационные маркеры CD3-HLA-DR+, CD3+HLA-DR+ определяли методом имунофенотипирования; содержание цитокинов IL-1β, 6, 10, 18; TNF-α, IFN-γ ти TGF-β1 в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом.

В результате проведеного исследование мы нашли статистически достоверные различия между показателями лимфоцитов периферической крови и концентрации про- и антивоспалительных цитокинов мужчин из контрольной группы и групп бесплодных пациентов из системными аутоиммунными болезнями и идиопатическим бесплодием. Определили, что у пациентов из этих групп данные изменения ведут к дисрегуляции Т-зависимого звена адаптивного иммунитета и изменений в продукции цитокинов, что позже может привести к продукции аутоантител. В формировании аутоагрессии задействованы несколько вероятных патологических механизмов развития аутоиммунитета, в результате чего розвивается бесплодие. Базируясь на наших результатах, мы установили диагностический алгоритм прогнозирования иммунозависимого бесплодия у мужчин с различными заболеваниями.

Ключевые слова: популяции лимфоцитов крови, субпопуляции Т-лимфоцитов крови, цитокины крови, воспаление, аутоиммунитет, мужское бесплодие.

SUMMARY

THE TYPES OF POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS OF T-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF MEN WITH DISTURBANCES THEIR FERTILITY FUNCTION

Havrylyuk A.[1], Chopyak V.[1], Kril I.[1], Kurpisz M.[2]

[1]Department of Clinical Immunology and Allergology, Medical University named Danylo Galitski, Lviv, Ukraine
[2]Department of Reproductive Biology and Stem Cells, Institute of Human Genetic, Poznan, Poland

Male factor infertility affects almost half of infertile couples. Systemic inflammation of noninfectious origin and local inflammation of the male genital tract are accepted as important etiological factor of infertility in men. Immunological factors are vital factors responsible for reduction in male fertility. Here we provide evidence for a previously uncharacterize role of populations and subpopulations of T-lymphocytes, namely their ability to modulate of reproductive function.

Cytokines are important mediators of the immunological response and are involved in numerous physiological and pathological processes.

The aim of this work was (1) to evaluate the numbers of populations and subpopulations of T-lymphocytes in peripheral blood of control group and unfertile patients; (2) to detect the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood of control group and different groups of infertile men; (3) to detect the tendency of changes various cytokines and lymphocytes in different groups of infertile men for the male infertility prognosis.

Materials and metods. Observations were carried out in 100 men (27 – halthy controls and 73 – with infertility). Methods: the numbers of lymphocyte populations and subpopulations CD3+, CD4+, CD8+, CD16/56+, CD19+, CD4+CD25-, CD4+CD25+ and activating markers CD3-HLA-DR+, CD3+HLA-DR+ in peripheral blood were evaluated with using immunophenotyping. The cytokines IL-1β, 6, 10, 18; TNF-α, IFN-γ and TGF-β1 contents in serum were determined using ELISA method.

We have found statistically significant differences between control group and groups of infertile patients with systemic autoimmune diseases and idiophatic infertility in numbers of lymphocytes and concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines. It has been found that in these groups of patients may lead to dysregulation of T-dependent adaptive immunity and changes in cytokine production, and the latter may consequently lead to autoantibodies production. Some possible pathological mehanisms of the development of autoimmunity are linked either to autoagression formation resulting in infertility. Based on our findings, we postulate the diagnostic algorithm of prognosis of immunology dependent infertility for patients with different pathology.

Key words. Populations of blood lymphocytes. Subpopulations of blood T-lymphocytes. Blood cytokines. Inflammation. Autoimmunity. Male infertility.

УДК 616.61–002.2–078.73

ПРОЗАПАЛЬНІ ЦИТОКІНИ (ІЛ-1β, ФНП-α) ТА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ БАЛАНС КРОВІ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНУ ХВОРОБУ НИРОК V Д СТАДІЇ З РІЗНИМ СТАНОМ КОМОРБІДНОСТІ

ДРІЯНСЬКА В.Є., КОРОЛЬ Л. В., ДУДАР І.О., МИГАЛЬ Л. Я., ГОНЧАР Ю.І., ШІФРІС І.М., МАЛАШЕВСЬКА Н.М.

ДУ “Інститут нефрології НАМН України”, м. Київ

Значною соціально-економічною проблемою в усьому світі є стабільне (до 7 % щорічно) збільшення кількості хворих на хронічну хворобу нирок (ХХН), що лікуються методами замісної ниркової терапії (ЗНТ). Протягом останніх років привертає увагу проблема системного хронічного запалення (СХЗ) у хворих на ХХН V стадії (ст.), що лікуються програмним гемодіалізом (ПГД) – ХХН VД ст. Процес СХЗ формує декілька феноменів: первинна та вторинна системна альтерація, системна запальна реакція, дистрес-реакція нейроендокринної системи, органна дисфункція, аутогенна інтоксикація, а також зміни стану буферних систем антизапальної резистентності та функціональних резервів органних систем [3] .

Вважається, що у пацієнтів на ПГД СХЗ є наслідком складних метаболічних та імунологічних зрушень за рахунок розвитку уремії, декомпенсації багатьох захисних систем організму та факторів, що безпосередньо пов’язані з процедурою діалізу. Процеси хронічного запалення у хворих на гемодіалізі сприяють розвитку прискореного атеросклерозу, нестабільності гемодинаміки, розвитку кардіоваскулярних ускладнень, інфекційній уразливості, розладам з боку судинного доступу, нутриційного статусу, погіршенню якості життя і виживання. Генералізоване збільшення запального процесу у пацієнтів з падінням ниркових функцій може бути пов’язано з наступними механізмами: падінням кліренсу прозапальних цитокінів, перевантаженням об’ємом, ендотоксемією, оксидативним та карбонільним стресом, падінням рівня антиоксидантів, підвищенням числа коморбідних станів [5, 13] .

Відомо, що цитокіни є поліпептидними продуктами активованих клітин імунної системи і функціонують як медіатори міжклітинних комунікацій, а при імунній відповіді на місцевому та загальному рівні вони відповідають за всі послідовні етапи розвитку адекватної відповіді на патогени, запалення, відновлення ушкодженої структури тканин, розвиток атеросклеротичних уражень. В цьому аспекті велику увагу привертають цитокіни, особливо прозапальні, які переважно продукуються моноцитами/макрофагами - ІЛ-1 та ФНП-α.

Показано, що порушення оксидантно/антиоксидантного (О/А) балансу в бік надлишкового утворення цитотоксичних ліпідних пероксидів з розвитком оксидативного стресу корелює з тяжкістю перебігу хронічної ниркової недостатності (ХНН) [5, 8, 15]. Стан ХНН розглядають як прооксидантний стан, при якому продукти перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) перешкоджають реалізації біологічних функцій різних білків, зокрема знижують активність ферментів, прискорюють розвиток атеросклерозу та підвищують ризик розвитку серцево-судинних ускладнень [11, 16]. Окислення як важливий для життєдіяльності організму процес стає могутнім ушкоджуючим фактором для ліпідів та білків тільки за умови надлишкового утворення вільнорадикальних сполук та (або) за умов порушення антиоксидантного захисту (АОЗ). У той же час відомо, що у хворих з уремією АОЗ є зниженим, що обумовлено процедурою ПГД, приєднанням кардіо-васкулярних ускладнень, інших супутніх захворювань тощо [3, 4, 15].

Оцінку прогнозу перебігу хвороби у пацієнтів з ХХН V стадії (ст.), які лікуються ПГД, на сьогодні як