

ЦИТОКИНОВЫЙ СПЕКТР СЫВОРОТКИ КРОВИ И СПЕРМОПЛАЗМЫ ПРИ ИДИОПАТИЧЕСКОМ БЕСПЛОДИИ

Ш. О. Дбмйнпг, Ю. Х. Дбмйнпгб, Г. О. Рбгмпг

Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия

BLOOD SERUM AND SPERMOPLASMA CYTOKINE SPECTRUM IN IDIOPATHIC STERILITY

Sh. N. Galimov, E. F. Galimova, V. N. Pavlov

Bashkir State University of Medicine, Yfa, Russia

Цель. Оценка роли цитокинов в развитии идиопатического бесплодия у мужчин.

Материалы и методы. Обследованы 60 пациентов с идиопатической патоспермией в возрасте 23–35 лет. Мужчины состояли в бесплодном браке от 1 до 10 лет. У всех обследованных отсутствовала тяжелая соматическая патология. Группу контроля составили 20 фертильных мужчин, отобранных согласно требованиям приказа Министерства здравоохранения № 67, предъявляемым к донорам спермы (2003). В сыворотке крови и спермоплазме мужчин с патозооспермией неясного генеза исследовали уровень 15 цитокинов методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Установлены особенности цитокинового спектра спермоплазмы фертильных лиц, которые заключались в доминировании хемокинов, ростовых факторов (IL-8, SDF-1 α , IL-7, TGF- β), отдельных противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-5) на фоне дефицита провоспалительных медиаторов (IL-1 β , IL-18, ФНО α), что отражает их участие в формировании особого иммунного статуса сперматозоидов. У мужчин с патозооспермией выявлено понижение продукции хемокинов и факторов роста, которые могут рассматриваться в качестве перспективных маркеров оплодотворяющей способности эякулята.

Выводы. Найденные сдвиги цитокинового зеркала спермоплазмы могут представлять собой патогенетическую основу идиопатического бесплодия.

Ключевые слова. Идиопатическое бесплодие, цитокины, сперма, сыворотка крови.

Aim. To assess the role of cytokines in development of male idiopathic sterility.

Materials and methods. Sixty patients aged 23–35 with idiopathic pathospermia were examined. Men had a sterile marriage from 1 to 10 years. All the examined persons had no somatic pathology. The group of control included 20 fertile men chosen according to the requirements of Health Ministry Order № 67 made to sperm donors (2003). Blood serum and spermoplasma level of 15 cytokines was investigated in men with pathozoospermia of unknown genesis using immune-enzyme analysis method.

Results. Peculiarities of cytokine spermoplasma spectrum of fertile subjects including domination of chemokines, growth factors (IL-8, SDF-1 α , IL-7, TGF- β), separate anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-5) against the background of proinflammatory mediator (IL-1 β , IL-18, TNF α) deficit were established that reflects their participation in formation of specific immune status of spermatozooids. Men with pathozoospermia had decrease

© Коллектив авторов, 2012

e-mail: sngalim@mail.ru

тел. 8 (3472) 73 61 71

[Галимов Ш. Н. (* контактное лицо) — доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии; Галимова Э. Ф. — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ЦНИЛ; Павлов В. Н. — доктор медицинских наук, профессор, ректор].

in production of chemokines and growth factors which can be considered as perspective markers of fertilizing ejaculate capacity.

Conclusion. The detected shifts in cytokine spermoplasm mirrors can represent a pathogenetic basis for idiopathic sterility.

Key words. Idiopathic sterility, cytokines, sperm, blood serum.

ВВЕДЕНИЕ

Широкий спектр биологического действия цитокинов включает непосредственное участие в регуляции репродуктивных процессов в целом и гуморальном контроле сперматогенеза в частности. Цитокины различных семейств интегрированы в многоуровневую систему регуляции развития и функционирования экзо- и эндокринного аппарата яичек, клеток Сертоли, тестикулярных макрофагов и др. [5, 10, 14].

Большинство известных цитокинов экспрессируется в зрелом яичке даже в отсутствие воспаления или активации иммунных событий. Противовоспалительные цитокины (IL-4, IL-10 и пептиды семейства трансформирующего фактора роста — TGF, transforming growth factor), наряду с их функциональными антагонистами IL-1, IL-6, TNF α (tumor necrosis factor-alpha) вовлечены в процессы дифференцировки сперматогенных клеток, а также синтеза андрогенов. Поэтому инициирование экспрессии цитокинов различными агентами при патологических состояниях сопровождается изменениями скорости стероидо- и сперматогенеза [5, 7]. Кроме того, в сперме обнаружены высокие концентрации некоторых хемокинов, например фактора стромальных клеток SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1 alpha), которому принадлежит видная роль в инициации сперматогенеза и взаимодействии сперматозоида и яйцеклетки [16].

Несмотря на то, что в обычных условиях эти вещества функционируют как ауто- и паракринные элементы и контролируют множество локальных клеточных процессов, при некоторых патологических состояниях

цитокины выполняют свою сигнальную функцию вдали от места их образования.

Цель исследования — определение уровня основных цитокинов как в циркуляции — в сыворотке крови, так и в спермоплазме при идиопатическом бесплодии для оценки их роли в развитии патологии фертильности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обследованы 60 пациентов с идиопатической патоспермией в возрасте 23—35 лет. Мужчины состояли в бесплодном браке от 1 до 10 лет. У всех обследованных отсутствовала тяжелая соматическая патология. Группу контроля составили 20 фертильных мужчин, отобранных согласно требованиям приказа Министерства здравоохранения № 67, предъявляемым к донорам спермы (2003). Представители контрольной группы имели от 1 до 3 здоровых детей в семье. Анализ эякулята проводился в соответствии с рекомендациями ВОЗ [15].

Концентрацию в сыворотке крови и спермоплазме интерлейкинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-13, IL-17, IL-18), фактора некроза опухоли α (ФНО α) находили с помощью тест-систем фирмы «Bender MedSystems» (Австрия) на иммуноферментном анализаторе «Anthos 2020». Для определения содержания TGF- β и SDF-1 α использованы наборы фирмы «BCM Diagnostics» (США).

Исследуемые образцы хранили при температуре -20°C не более 3 месяцев. Анализ полученных результатов проводился методом вариационной статистики с приме-

нением программного обеспечения Microsoft Excel и заключался в вычислении средних арифметических значений (M), средних квадратичных отклонений (σ), ошибки средних и достоверности различий между двумя средними с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Параметры спермограммы пациентов с идиопатическим бесплодием и контрольной группы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика обследованных групп по параметрам спермограммы, $M \pm m$

Показатель	Группа	
	контроль (n=20)	бесплодие (n=60)
Объем эякулята, мл	3,6±0,2	3,5±0,2
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	71,2±5,4	23,5±2,2 *
Морфологически нормальные формы, %	60,3±5,9	20,9±0,8 *
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	44,7±2,4	41,9±1,8

Примечание. * $p < 0,05$ — по сравнению с контрольной группой.

Обследованные группы достоверно отличались по концентрации и содержанию аномальных сперматозоидов и не имели статистически значимых различий по объему эякулята и содержанию прогрессивно-подвижных клеток.

В таблицах 2—3 приведены данные о содержании цитокинов в сыворотке крови и спермоплазме обследованных мужчин. Все цитокины, проанализированные в этом исследовании, были обнаружены в сыворотке

Таблица 2

Содержание некоторых цитокинов в сыворотке обследованных мужчин, $M \pm m$

Показатель	Группа	
	контроль (n=20)	бесплодие (n=54)
IL-1 β	16,7±2,3	18,6±2,7
IL-2	1,6±0,3	1,5±0,3
IL-4	1,4±0,1	1,6±0,2
IL-5	1,6±0,2	1,7±0,2
IL-6	4,7±0,8	4,3±0,7
IL-7	3,0±0,4	3,3±0,5
IL-8	2,2±0,3	2,1±0,2
IL-10	4,2±0,5	4,6±0,6
IL-11	12,4±1,0	14,8±1,9
IL-13	13,2±1,4	14,3±1,2
IL-17	7,5±1,4	8,2±1,3
IL-18	88,3±9,6	84,1±6,4
ФНО α	16,1±1,7	17,8±1,9
SDF-1 α	2652±134	2847±176
TGF- β	1228±195	1364±201

крови и семенной плазме фертильных мужчин в концентрациях, сопоставимых с указанными в работах других авторов [1, 10].

TGF- β присутствовал в очень высоких концентрациях (более 80 000 пг/мл) во всех образцах спермоплазмы, что, по-видимому, детерминировано его ролью в формировании иммунотолерантности клеток, находящихся за гематотестикулярным барьером, а также участием в повышении рецептивности матки к оплодотворенной яйцеклетке [12]. В большинстве образцов спермы здоровых доноров в высоких концентрациях (более 1000 пг/мл) были найдены также два хемокина и один цитокин: SDF-1 α , IL-8 и IL-7. В низких концентрациях (менее 50 пг/мл) были обнаружены в большинстве исследованных образцов IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, IL-17 и ФНО α , тогда как низкие

Таблица 3

**Содержание некоторых цитокинов
в спермоплазме обследованных мужчин,
M±m**

Показатель	Группа	
	контроль (n=20)	бесплодие (n=54)
IL-1β	3,3±0,5	4,7±0,6
IL-2	4,8±0,6	5,2±0,5
IL-4	12,2±0,9	4,1±0,3 *
IL-5	49,4±7,1	57,3±9,0
IL-6	8,9±1,0	10,5±1,4
IL-7	1929±185	1490±152 *
IL-8	1312±168	1625±297
IL-10	3,5±0,4	3,9±0,5
IL-11	66,3±7,6	72,8±8,8
IL-13	5,2±0,5	4,7±0,5
IL-17	7,1±0,9	8,6±1,1
IL-18	52,6±4,1	47,1±3,0
ФНОα	1,6±0,2	1,8±0,2
SDF-1α	5787±240	2715±182 *
TGF-β	80358±6374	57206±3319 *

Примечание. * p<0,05 — по сравнению с контрольной группой.

концентрации IL-5 и IL-18 были обнаружены в меньшинстве образцов.

Из сравнения с сывороточным уровнем цитокинов следует, что по своему составу спермоплазма представляет собой локальный обособленный компартмент, характеризующийся очень высоким содержанием хемокинов и ростовых факторов (IL-8, SDF-1α, IL-7 и TGF-β), превалированием уровня отдельных противовоспалительных цитокинов (IL-4 и IL-5) и более низким содержанием провоспалительных медиаторов (IL-1β, IL-18 и ФНОα).

Градиент концентраций с преобладанием хемокинов, факторов роста и Th2-цитокинов, очевидно, необходим для создания привилегированного иммунного

положения сперматогенного эпителия, которое ранее связывали исключительно с гематотестикулярным барьером. По современным представлениям, особый иммунный статус яичек обеспечивается не просто физической изоляцией зародышевых клеток, но более сложной мультикомпонентной системой в составе противовоспалительных цитокинов, андрогенов и тестикулярных макрофагов [2, 4].

Наиболее заметной особенностью динамики концентрации различных цитокинов у мужчин с идиопатической патоспермией явилось расхождение изменения их уровней в крови и семенной плазме. Если в сыворотке крови не было обнаружено достоверных колебаний, то в спермоплазме наблюдались выраженные сдвиги цитокинового спектра.

В первую очередь это относится к хемокинам и факторам роста, концентрация которых у пациентов с бесплодием неясного генеза существенно снижалась. Так, уровень SDF-1α статистически значимо уменьшился до 47% от контрольных значений. Истощению спермоплазмы по SDF-1α может принадлежать важная роль в развитии нарушений фертильности, поскольку высокое содержание этого хемокина является необходимым условием пролиферации и выживания примордиальных зародышевых клеток, предшественников сперматозоидов [3].

Дефицит уровня ростовых факторов IL-7 и TGF-β, доминирующих в цитокиновом репертуаре в норме, при идиопатическом бесплодии составил 77 и 72% соответственно. У фертильных доноров IL-7 был найден в 100% образцов семенной плазмы в концентрации 1929±185 пг/мл, что соответствует представлениям о его роли в функционировании CD8+ Т-лимфоцитов в мужском репродуктивном тракте [13]. Аналогичная картина обнаруживалась и в отношении другой регуляторной молекулы этого ряда — TGF-β, которой, наряду с IL-4, отводится

центральная роль в обеспечении выживаемости сперматозоидов в чужеродной среде женских половых путей [5, 8].

По литературным данным, частой находкой при бесплодии, сопряженном с воспалительными явлениями в мужской репродуктивной системе, является превалирование провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, ФНО α), гиперпродукцию которых связывают с повышенным уровнем лейкоцитов [11]. В нашем исследовании пациенты с выраженной лейкоспермией были исключены из группы наблюдения, очевидно, поэтому статистически значимых изменений баланса Th1/Th2-цитокинов в эякуляте выявлено не было.

Полученные данные согласуются с результатами других авторов, также не обнаруживших прироста концентрации Th1 провоспалительных цитокинов при идиопатическом бесплодии [9]. В норме семенная жидкость индуцирует снижение реактивности женской иммунной системы к спермальным аллоантигенам, причем секрет фертильных мужчин отличается более сильным ингибиторным потенциалом, нежели спермоплазма бесплодных мужчин [6]. Поэтому в обычных условиях сперма является одновременно индуктором Th2-ответа и ингибитором Th1-ответа. Жизнеспособность мужских гамет во многом определяется противовоспалительными и иммуносупрессорными свойствами цитокинов спермоплазмы.

Выводы

Таким образом, при идиопатическом бесплодии в спермоплазме формируется количественный дефицит и нарушение соотношения факторов роста и хемокинов, принимающих участие в регуляции пролиферативных процессов и иммунного ответа, а также ответственных за организацию молекулярных и клеточных изменений в эндометрии

при имплантации. Очевидно, выявленные особенности состояния цитокиновой сети, проявляющиеся недостаточностью и дисбалансом ключевых регуляторных факторов, во многом обуславливают снижение оплодотворяющих свойств эякулята при infertility неустановленной этиологии.

Полученные результаты свидетельствуют о диагностической ценности определения уровня цитокинов в семенной плазме. Учитывая собственные и литературные данные, можно предположить, что изучение репертуара цитокинов спермы способно выявить минимальные нарушения оплодотворяющей способности, не обнаруживаемые другими известными методами.

Библиографический список

1. *Останин А. А., Айзикович Б. И., Черных Е. Р.* Цитокиновый профиль семенной плазмы человека. Пробл. репрод. 2006; 6: 65–74.
2. *Cheng C. Yan, Mruk D.* The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.* 2012; 64 (1): 16–64.
3. *Farini D., Scaldaferrri M., Iona S. et al.* Growth factors sustain primordial germ cell survival, proliferation and entering into meiosis in the absence of somatic cells. *Dev. Biol.* 2005; 285 (1): 49–56.
4. *Fijak M., Bhusban S., Meinhardt A.* Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol. Biol.* 2011; 677: 459–470.
5. *Hedger M.* Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J. Androl.* 2011; 32 (6): 625–640.
6. *Huleibel M., Lunenfeld E.* Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J. Androl.* 2004; 6 (3): 259–268.
7. *Juyena N., Stelletta C.* Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J. Androl.* 2012; 33 (4): 536–551.

8. *Ingman W., Jones R.* Cytokine knockouts in reproduction: the use of gene ablation to dissect roles of cytokines in reproductive biology. *Hum. Reprod. Update.* 2008; 14 (2): 179–192.
9. *Moretti E., Cosci I., Spreafico A. et al.* Semen characteristics and inflammatory mediators in infertile men with different clinical diagnoses. *Int. J. Androl.* 2009; 32 (6): 637–646.
10. *Politch J., Tucker L., Bowman F., Anderson D.* Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. *Hum. Reprod.* 2007; 22 (11): 2928–2935.
11. *Sesbadri S., Bates M., Vince G., Jones D.* The role of cytokine expression in different subgroups of subfertile men. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2009; 62 (5): 275–282.
12. *Sharkey D., Macpherson A., Tremellen K. et al.* TGF- β mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. *J. Immunol.* 2012; 189 (2): 1024–1035.
13. *Sheth P., Danesh A., Shahabi K. et al.* HIV-specific CD8+ lymphocytes in semen are not associated with reduced HIV shedding. *J. Immunol.* 2005; 175 (7): 4789–4796.
14. *Ulcova-Gallova Z., Gruberova J., Vrzalova J. et al.* Sperm antibodies, intra-acrosomal sperm proteins, and cytokines in semen in men from infertile couples. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2009; 61 (3): 236–245.
15. WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction. WHO, 4 edition. Cambridge: University Press, 1999.
16. *Zuccarello D., Ferlin A., Garolla A. et al.* How the human spermatozoa sense the oocyte: a new role of SDF1-CXCR4 signalling. *Int. J. Androl.* 2011; 34 (6): 554–565.

Материал поступил в редакцию 05.10.2012