

ВЗАИМОСВЯЗЬ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ С УРОВНЕМ ЦИТОКИНОВ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ У МУЖЧИН, СОСТОЯЩИХ ДЛИТЕЛЬНОЕ ВРЕМЯ В БЕСПЛОДНОМ БРАКЕ

Айзикович Б.И.², Айзикович И.В.², Верба О.Ю.²,
Козлов В.А.¹

¹ ГУ Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

² Медицинский Центр «Авиценна», г. Новосибирск

Резюме. С помощью метода ранговой корреляции по Спирману оценивали направленность и выраженность взаимосвязи между показателями морфологических нарушений сперматозоидов с уровнем цитокинов в семенной плазме мужчин, находящихся в длительном бесплодном браке. Корреляционный анализ показал наличие значимой положительной связи между частотой встречаемости морфологически аномальных сперматозоидов с уровнем IL-1 β , MIP-1 β , G-CSF и отрицательной с содержанием IL-5, IL-10 в семенной плазме. В целом полученные результаты отражают участие цитокинов в регуляции мужской фертильности.

Ключевые слова: сперматогенез, иммунная система, цитокины, патология головки, шейки и хвоста сперматозоидов.

Aisikovich B.I., Aisikovich I.V., Verba O. Yu., Kozlov V.A.

MODES OF INTERACTION BETWEEN SPERMATOZOID ABNORMALITIES AND CYTOKINES IN SEMINAL PLASMA FROM INFERTILE MALES

Abstract. Spearman rank correlation analysis was applied to assess some interrelations between morphological abnormalities of spermatozooids in males with long-term infertility, and cytokine levels in their seminal plasma. Such statistical analysis has revealed a significant positive correlation between prevalence of morphologically abnormal spermatozooids and the levels of IL-1 β , MIP-1 β , G-CSF, along with negative relationship with IL-5 and IL-10 contents in seminal fluid. The data are, generally, demonstrating participation of cytokines in regulation of male fertility. (*Med. Immunol.*, 2008, Vol. 10, N 2-3, pp 203-208)

Введение

Известно, что аномальные сперматозоиды обладают рядом структурно-функциональных

особенностей, понижающих их оплодотворяющую способность [3]. В частности, они имеют низкую скорость прямолинейного движения, способность к пенетрации ооцитов, большую частоту аномалий хроматина и повышение уровня хромосомных aberrаций, что оказывает неблагоприятное влияние на развитие эмбрионов [12]. Влияние повышения доли аномальных сперматозоидов в эякуляте на снижение частоты наступления беременности показано как в условиях естественного зачатия, так и при ис-

Адрес для переписки:

НИИ Клинической Иммунологии СО РАМН,
630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: +7-383-222-26-74.
Факс: +7-383-222-70-28.
E-mail: niiki01@online.nsk.su

пользовании вспомогательных репродуктивных технологий [1].

В настоящее время большое значение в поддержании структурно-функциональной целостности и активности сперматозоидов придается механизмам иммунной регуляции и, в первую очередь, цитокинам [4]. Показано, что $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$ агрессивно влияют на подвижность сперматозоидов и проницаемость яйцеклеток, а $IL-6$ и $IL-8$ тесно коррелирует с количеством лейкоцитов в эякуляте [5, 13]. Обнаружено, что цитокины, воздействуя на клетки Лейдига и Сертоли, способны влиять на уровень тестостерона в организме [10].

Наблюдаемая неоднозначность, а подчас и противоречивость результатов свидетельствуют как о сложности исследуемого вопроса, так и о недостаточной его изученности. В связи с чем представляет большой научно-практический интерес исследование характера взаимосвязи аномальных сперматозоидов с уровнем цитокинов семенной плазмы мужчин, включенных в программу вспомогательных репродуктивных технологий (ЭКО/ИКСИ).

В современных медико-биологических исследованиях для оценки степени, с которой значения двух переменных пропорциональны друг другу или взаимосвязаны, используется корреляционный анализ [2]. Важно, что значение коэффициента корреляции не зависит от масштаба измерения. При этом наиболее часто используемый коэффициент корреляции (r) Пирсона называется линейной корреляцией, т.к. измеряет степень линейных связей между переменными. В отличие от него коэффициент ранговой корреляции Спирмена – это непараметрический метод, который используется с целью статистического изучения связи между явлениями. В этом случае определяется фактическая степень параллелизма между двумя количественными рядами изучаемых признаков и дается оценка тесноты установленной связи с помощью количественно выраженного коэффициента. При использовании коэффициента ранговой корреляции условно оценивают тесноту связи между признаками, считая значения коэффициента, равные 0,3 и менее, показателями слабой тесноты связи; значения более 0,4, но менее 0,7 – показателями умеренной тесноты связи, а значения 0,7 и более – показателями высокой тесноты связи.

Поэтому целью настоящей работы явилось изучение характера корреляционных связей между параметрами морфологических изменений сперматозоидов и содержанием цитокинов в семенной плазме мужчин, состоящих длительное время в бесплодном браке.

Материалы и методы

Материалом исследования служили эякуляты, полученные у 60 мужчин в возрасте от 24 до 46 лет (средний возраст $34,8 \pm 6,01$ лет), проходивших обследование по поводу бесплодного брака на базе отделения ЭКО медицинского центра «Авиценна» (г. Новосибирск).

Спермиологическое исследование проводилось в соответствии с рекомендациями ВОЗ [17]. Оценивали морфологию сперматозоидов (содержание нормальных и дефектных клеток с патологией головки, шейки или хвоста). Для морфологически нормального сперматозоида характерным была овальная форма головки, длиной 5,0-6,0 мкм, шириной 2,5-3,5 мкм, акросомальный участок занимал от 40 до 70% площади головки, при этом отсутствовали аномалии шейки, хвоста и срединного отдела.

Получение семенной плазмы осуществлялось при двухэтапном центрифугировании эякулята (1000-3000 об/мин) в течение 30 мин. Выделенную семенную плазму использовали для определения уровня цитокинов.

Содержание цитокинов ($IL-1\beta$, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $IL-2$, $IL-4$, $IL-5$, $IL-6$, $IL-7$, $IL-8$, $IL-10$, $IL-12$ (p70), $IL-13$, $IL-17$, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β) в семенной плазме оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, «Bio-Rad», США) с использованием коммерческих тест-систем 17-Plex в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Метод основан на специфическом связывании исследуемых цитокинов с твердой фазой, которая представляет собой суспензию полистироловых гранул размером 5,5 мкм. Одновременно в анализе используется 17 типов гранул, каждый из которых различается собственной флюоресцентной меткой и конъюгирован с соответствующими моноклональными антицитокиновыми антителами. После специфического связывания гранул с цитокинами, содержащимися в исследуемых образцах семенной плазмы и в калибровочных пробах с известным их количеством, в реакционную смесь добавляют антицитокиновые антитела, конъюгированные с биотином. Для детекции образовавшейся «сэндвич-структуры» используют взаимодействие биотина со стрептавидином, меченным «репортерной» флюоресцентной меткой (фикоэритрином). Постановка всех реакций происходит в 96-луночном планшетном формате. Оценка результатов проводится на проточном флюориметре, где гранулы автоматически разделяются по типам с использованием их собственных FITC-меток, а количество связавшихся с ними цитокинов оценивается по суммарной интенсивности флюоресценции фикоэритрина.

С помощью стандартных калибровочных разведений концентрация исследуемых цитокинов в тестируемых образцах высчитывается автоматически с использованием программы «Bio-Plex Manager».

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистического анализа программы Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США).

Для оценки характера связи между изучаемыми параметрами использовали метод расчета коэффициента ранговой корреляции Спирмена [2].

Результаты и обсуждение

Выполненные исследования продемонстрировали, что по результатам спермиограмм у 30% обследованных мужчин показатели числа, морфологии и подвижности сперматозоидов соответствовали установленным нормативным значениям, тогда как в 70% случаев обнаруживались различные нарушения сперматогенеза. Например, частота встречаемости сперматозоидов с патологией головки у пациентов с патоспермией составила $63,5 \pm 1,9\%$ случаев, а с аномалиями шейки и хвоста – $13,3 \pm 1,5\%$ и $11,5 \pm 1,0\%$ случаев соответственно.

При оценке результатов корреляционного анализа между различными дегенеративными

формами сперматозоидов в эякуляте пациентов было обнаружено наличие значимой отрицательной корреляции между морфологически нормальными сперматозоидами и сперматозоидами с патологией шейки ($r = -0,68$, $p < 0,05$), между сперматозоидами с патологией головки и шейки ($r = -0,82$, $p < 0,01$), головки и хвоста ($r = -0,92$, $p < 0,01$).

Известно, что при анализе морфологии первоочередное внимание уделяется патологиям головки, затем шейки и в последнюю очередь – хвоста [17]. Однако в практической работе, по мнению О.А. Леонтьевой и О.А. Воробьевой [3], более целесообразно использовать классификацию аномалий, исходя из биологической значимости различных типов патологий. Так как сперматозоиды с аномалиями хвоста неподвижны или же имеют нарушенное движение, что может сказываться на их оплодотворяющей способности, поэтому оценке этой патологии придается первоочередное значение. Аномалии акросомы являются вторым по значению признаком в классификации. Это связано с тем, что мужчины с глобулоспермией бесплодны [16]. В последнюю очередь фиксируются аномалии шейки.

Среди регуляторных механизмов определяющих морфологию и функциональную активность сперматозоидов у мужчин большое значение

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ СЕМЕННОЙ ПЛАЗМЫ У МУЖЧИН С НОРМОСПЕРМИЕЙ И ПАТОСПЕРМИЕЙ (M±m)

Цитокины, пг/мл	Нормоспермия (n = 18)	Патоспермия (n = 42)
Th1-типа		
IL-1 β	8,5±0,9	20,8±4,6*
IFN γ	7,0±1,2	13,1±2,2*
TNF α	8,6±0,9	13,5±1,9*
IL-2	9,6±1,1	13,0±1,1
IL-12	10,0±1,1	12,7±0,4*
Th2-типа		
IL-4	9,0±0,9	11,3±0,5
IL-5	19,5±6,0	23,0±7,6
IL-6	31,0±13,0	49,6±19,5
IL-10	11,2±1,7	16,0±2,3
Хемокины		
IL-8	114,0±50,0	271,0±166
MIP-1 β	73,0±18,0	339,0±122*
MCP-1	271,0±33,0	452,0±80,0
Ростовые факторы		
G-CSF	164,0±16,0	211,0±13,0*
GM-CSF	42,2±2,7	49,0±3,6
IL-7	487,0±55,0	336,0±52,0*

Примечание: * – $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 2. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ УРОВНЕМ ЦИТОКИНОВ Th1-ТИПА И ЧАСТОТОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ЭЯКУЛЯТЕ МУЖЧИН

Показатели	IL-1 β	IFN γ	TNF α	IL-2	IL-12
Норма	-0,25	-0,09	-0,14	-0,35	-0,22
Патология головки	-0,29	0,35	0,19	0,11	0,27
Патология шейки	0,02	-0,46	-0,32	-0,13	-0,31
Патология хвоста	0,55*	-0,07	0,05	0,06	-0,04

Примечание: * – $p < 0,05$.

придается цитокинам семенной плазмы, так как они способны не только участвовать в патогенезе заболеваний органов репродукции, но и влиять на состояние сперматогенеза у мужчин [4]. Полученные собственные результаты подтверждают это (табл. 1). Так, при сравнительном анализе уровней цитокинов у пациентов с нормо- и патоспермией было обнаружено, что снижение качества спермы ассоциируется с статистически достоверным увеличением концентрации Th1- типа цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-12) в семенной плазме. Отмечается также отчетливая тенденция повышения уровня хемокинов (IL-8, MCP-1), которая в отношении MIP-1 β была наиболее выраженной и статистически значимой. Среди ростовых факторов семенной плазмы регистрировалось достоверное снижение концентрации IL-7 на фоне неизмененного уровня GM-CSF и повышенного содержания G-CSF. Все это, по всей вероятности, свидетельствует о том, что цитокиновый профиль семенной плазмы при патоспермии характеризуется повышенным содержанием Th1-типа цитокинов (IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-12) в сочетании с увеличением уровня хемокинов (MIP-1 β) и дефицитом IL-7.

Но более наглядно взаимосвязь морфологических нарушений сперматозоидов с уровнем цитокинов семенной плазмы у мужчин, состоящих длительное время в бесплодном браке, просматривалась при проведении корреляционного анализа. Так, например, между уровнем цитокинов Th1-типа семенной плазмы и частотой морфологических отклонений сперматозоидов в эякуляте мужчин, проходивших обследование по поводу

бесплодного брака (табл. 2), было установлено наличие умеренно выраженной положительной связи IL-1 β с патологией хвостовой части сперматозоида ($p < 0,05$).

Дальнейший сравнительный анализ (табл. 3) показал существование отрицательной корреляционной связи между содержанием IL-5 и изменением срединного тела (шейки) сперматозоида ($p < 0,05$), IL-10 и патологией головки ($p < 0,05$), IL-10 и патологией хвостовой части сперматозоида ($p < 0,01$).

Учитывая тот факт, что регуляция активности Th1 осуществляется цитокинами Th2-типа, например, противовоспалительным цитокином IL-10 [7], становится понятным характер корреляционных связей между частотой аномальных форм сперматозоидов и балансом про- и противовоспалительных цитокинов. Так, известно, что Th2-клетки действуют по принципу обратной связи в ответ на избыток провоспалительных цитокинов путем усиления секреции IL-10, который, в свою очередь, способствует повышению выработки иммуноглобулинов и, таким образом, оказывает влияние на состояние гуморального иммунитета репродуктивного тракта при воспалении [Молочков В.А., Ильин И.И., 1998]. Однако Th2-клетки не всегда способны дифференцировать степень выраженности воспаления, вследствие чего избыточный синтез провоспалительных цитокинов может сопровождаться их диспропорциональным ответом, а это повлечет за собой активацию локальной продукции медиаторов воспаления и изменение морфологической целостности сперматозоидов.

ТАБЛИЦА 3. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ УРОВНЕМ ЦИТОКИНОВ Th2-ТИПА И ЧАСТОТОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ЭЯКУЛЯТЕ МУЖЧИН

Показатели	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10
Норма	-0,46	0,07	0,22	-0,26
Патология головки	0,23	0,46	0,34	-0,62*
Патология шейки	-0,13	-0,57*	-0,45	0,30
Патология хвоста	-0,03	-0,24	-0,22	-0,82**

Примечание: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

ТАБЛИЦА 4. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ УРОВНЕМ ЦИТОКИНОВ/ХЕМОКИНОВ И ЧАСТОТОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ЭЯКУЛЯТЕ МУЖЧИН

Показатели	IL-8	MIP-1 β	MCP-1
Норма	-0,09	-0,25	0,32
Патология головки	0,41	-0,28	0,40
Патология шейки	-0,43	0,02	-0,38
Патология хвоста	-0,21	0,53*	-0,38

Примечание: * – $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 5. КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ МЕЖДУ УРОВНЕМ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ ГЕМОИММУНОПОЭЗА И ЧАСТОТой МОРФОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ В ЭЯКУЛЯТЕ МУЖЧИН

Показатели	G-CSF	GM-CSF	IL-7
Норма	-0,37	-0,25	-0,37
Патология головки	-0,44	0,43	0,01
Патология шейки	0,19	-0,30	0,37
Патология хвоста	0,70*	-0,26	-0,27

Примечание: * – $p < 0,05$.

При анализе зависимостей между дегенеративными формами сперматозоидов и уровнями цитокинов/хемокинов и ростовых факторов (табл. 4, 5) было обнаружено, что частота встречаемости в эякуляте мужчин сперматозоидов с патологией хвоста имеет значимую корреляционную связь с содержанием MIP-1 β ($p < 0,05$) и G-CSF ($p < 0,05$) в семенной плазме.

Таким образом, применение корреляционного анализа позволяет более наглядно представить направленность и выраженность взаимосвязи между характером морфологических аномалий сперматозоидов и уровнем спермальных цитокинов, что, по всей вероятности, может являться, с одной стороны, отражением активности патологического (инфекционного или неинфекционного генеза) процесса в репродуктивном тракте мужчин, с другой – свидетельствовать о степени нарушения сперматогенеза.

Выводы

1. Частота встречаемости при патоспермии различных форм морфологически аномальных сперматозоидов у мужчин, находящихся в бесплодном браке, составляет от 11,5 до 63,5% случаев.

2. Корреляционный анализ показал наличие значимой положительной связи между частотой встречаемости морфологически аномальных сперматозоидов с уровнем IL-1 β , MIP-1 β , G-CSF и отрицательной с содержанием IL-5, IL-10 в семенной плазме.

Список литературы

1. Воробьева О.А., Скрипкина О.А., Корсак В.С. Анализ морфологии сперматозоидов в программе ЭКО // Проблемы репродукции. – 1995. – № 3. – С. 71-76.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
3. Леонтьева О.А., Воробьева О.А. Сравнительный анализ морфологии сперматозоидов человека: нативный эякулят прогрессивно подвижная фракция // Проблемы репродукции. – 1999. – № 3. – С. 29-36.

4. Останин А.А., Айзикович Б.И., Черных Е.Р. Цитокиновый профиль семенной плазмы человека // Проблемы репродукции. – 2006. – № 6. – С. 65-74.

5. Alexander R.B., Ponniah S., Hasday J., Hebel J.R. Elevated levels of proinflammatory cytokines in the semen of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome // Urology. – 1998. – Vol. 52, N 5. – P. 744-749.

6. Angelopoulos T., Moshel Y.A., Lu L., Macanas E., Grifo J.A., Krey L.C. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization // Fertil. Steril. – 1998. – Vol. 69. – P. 740-747.

7. Dinarello C.A. Proinflammatory cytokines // Chest. – 2000. – Vol. 118, N 2. – P. 503-508.

8. Dinarello C.A. Anti-inflammatory cytokines and cytokine antagonists. // Curr. Pharm. Des. – 2000. – Vol. 6, N 6. – P. 633-649.

9. Grow D.R., Oehninger S., Seltman H.J., Toner J.P., Swanson R.J., Kruger T.F., Muasher S.J. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population // Fertil. Steril. – 1994. – Vol. 62. – P. 559-567.

10. Hedger M.P., Meinhardt A. Cytokines and the immune-testicular axis // J. Reprod. Immunol. – 2003. – Vol. 58. – P. 1-26.

11. Francavilla F., Romano R., Santucci R., Poccia G. Effect of sperm morphology and motile sperm count on outcome of intrauterine insemination in oligospermia and asthenozoospermia // Fertil. Steril. – 1990. – Vol. 53. – P. 892-897.

12. Katz D., Morales P., Samuels S., Overstreet J. Mechanisms of filtration of morphologically abnormal human sperm by cervical mucus // Fertil. Steril. – 1990. – Vol. 53. – P. 513-516.

13. Krause W., Bohring C., Gueth A., Horster S., Krisp A., Skrzypek J. Cellular and biochemical markers in semen indicating male accessory gland inflammation // Andrologia. – 2003. – Vol. 35, № 5. – P. 279-282.

14. Lee J.D., Kamiguchi Y., Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes // Hum. Reprod. – 1996. – Vol. 9. – P. 1942-1996.

15. Maegawa M., Kamada M., Irahara M., Yamamoto S., Yoshikawa S., Kasai Y., Ohmoto Y., Gima H., Thaler C.J., Aono T. A repertoire of cytokines in human seminal plasma // J. Reprod. Immunol. – 2002. – Vol. 54. – P. 3-42.

16. Menkveld R., Rhemrev J.P., Franken D.R., Vermeiden J.P., Kruger T.F. Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: rela-

tion with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro // Fertil. Steril. — 1996. — Vol. 3. — P. 637-644.

17. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-

cervical mucus interaction. — 4th ed. — New York: Cambridge University Press, 1999.

поступила в редакцию 23.11.2007

отправлена на доработку 15.12.2007

принята к печати 27.12.2007