

НАРУШЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ЭЯКУЛЯТЕ ПРИ БЕСПЛОДИИ У МУЖЧИН

Семёнов А.В., Сотникова Н.Ю.

ГОУ ВПО «Ивановская государственная медицинская академия Росздрава», кафедра урологии

Резюме. Цель: изучение популяционного состава лимфоцитов эякулята при бесплодии у мужчин. Обследовано 26 мужчин с патологией половых органов (хронический простатит, варикоцеле, атрофии яичек) в возрасте от 20 до 45 лет. В контрольную группу вошли 6 здоровых фертильных добровольцев. Фенотип лимфоцитов эякулята оценивался проточной цитометрией. При патоспермии выявлено увеличение CD25⁺ лимфоцитов на фоне не изменяющейся доли клеток CD95⁺, что выразилось в увеличении соотношения CD25⁺/CD95⁺. При нормозооспермии величина индекса была 0,94±0,18. Увеличение данного показателя более 1,2, как и снижение менее 0,7, было ассоциировано с бесплодием. Мы предположили, что угнетение апоптоза активированных лимфоцитов в эякуляте потенциально опасно для сперматогенеза, так как иммунный ответ и связанные с ним воспалительные реакции могут вызвать неспецифическое поражение окружающих тканей и индукцию патоспермии.

Ключевые слова: активация и апоптоз лимфоцитов, бесплодие у мужчин, сперма.

Semenov A.V., Sotnikova N.Yu.

THE CHANGES IN SEMEN LYMPHOCYTE SUBPOPULATION'S RATIO IN MEN INFERTILITY

Abstract. The aim of present study was to investigate the ratios of semen lymphocyte subpopulations in males with infertility. Twenty-six men (20 to 45 years old) suffering from different genital diseases (chronic prostatitis, idiopathic varicocele, testicular atrophy) were enrolled into the study. Six healthy age-matched normozoospermic male volunteers with normal fertility comprised a control group. Lymphocyte phenotyping was performed by flow cytometric technique. The patients with pathospermia showed increased numbers of CD25⁺ lymphocytes ($p < 0.05$), and unchanged levels of CD95⁺ cells, thus leading to increased CD25⁺/CD95⁺ ratio. In the patients with normozoospermia, the value of this index was 0.94±0.18. Increase of this parameter to > 1.2 , as well as its reduction to < 0.7 was associated with sterility. We suggest that suppressed apoptosis of activated lymphocytes in semen may be potentially dangerous to spermatogenesis, since both immune response and associated inflammatory reactions can cause nonspecific lesions of surrounding tissues, and induction of pathospermia. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 1, pp 91-96)

В семенной жидкости здоровых мужчин, кроме сперматозоидов, всегда содержится некоторое количество клеток неспермального происхождения, главным образом лейкоцитов [10]. Считается, что при отсутствии инфекции, одной из основных функций семенных лейкоцитов,

является удаление сперматозоидов, вставших на путь апоптоза [12]. Несмотря на то, что среди лейкоцитарных субпопуляций в сперме на долю лимфоцитов приходится всего от 2 до 10% [13], интерес ученых к их роли в патологии мужской фертильности весьма велик. С уменьшением доли CD8⁺ лимфоцитов в эякуляте связывают индукцию антиспермальных антител (АСАТ) [1], так как аккумуляция этих клеток в генитальном тракте фертильных мужчин позволяет предположить, что они функционируют как активные ингибиторы аутоиммунного ответа [11]. Вместе с тем, Ricci G. et al. (2002) не выявили корреля-

Адрес для переписки:

153013, г. Иваново, ул. Кукольниковых, д. 154, кв. 164
Семёнову Андрею Владимировичу
Тел.: (4932) 41-56-51, 56-20-53 (раб.);
(4932) 39-66-33
E-mail: semenov@indi.ru; Andrey.Semenov@mail.ru

ции между количеством семенных лейкоцитов и качеством спермы [12]. В этой связи мы считаем, что существует необходимость продолжить изучение других иммунологических факторов, возможно нарушающих фертильные свойства эякулята.

Целью настоящего исследования явилось выявление взаимосвязи между параметрами лимфоидных клеток спермы и фертильными свойствами эякулята при заболеваниях мужских половых органов.

Материалы и методы

Обследовано 32 человека мужского пола в возрасте от 20 до 45 лет. Всем пациентам проведено комплексное обследование, включающее, кроме рутинных методов, выполнение спермограммы по критериям ВОЗ и оценку фенотипа лимфоцитов эякулята методом проточной цитометрии (FACScan, «Becton Dickinson», USA)

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМОГРАММЫ И ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА ЛИМФОЦИТОВ ЭЯКУЛЯТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФЕРТИЛЬНОСТИ ОБСЛЕДОВАННЫХ МУЖЧИН

Показатели спермограммы	Фертильные n = 17	Бесплодные n = 15
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	168,75±12,84	82,27±36,47*
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	60,25±5,73	22,5±10,16**
Патологические формы сперматозоидов, %	57,88±5,75	82,83±5,76**
Степень некрозооспермии, %	10,56±0,03	54,62±0,20**
Индекс качества спермы, млн/мл	48,13±11,72	10,47±4,76*
MAR% IgG	1,40±0,51	2,67±1,20
CD3 ⁺ , %	55,21±4,37	54,08±7,39
CD4 ⁺ , %	33,29±2,99	28,23±4,71
CD8 ⁺ , %	8,87±2,36	15,30±1,05**
Соотношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺	3,62±0,57	1,85±0,32**
CD16 ⁺ , %	7,12±1,21	5,79±2,27
CD20 ⁺ , %	7,21±1,26	6,94±2,28
CD71 ⁺ , %	9,25±2,39	7,97±2,07
CD45RA, %	52,92±4,63	54,98±7,09
CD25 ⁺ , %	5,24±1,19	13,90±5,0*
CD95 ⁺ , %	5,09±0,81	6,13±1,55
CD11b ⁺ , %	9,29±2,96	8,44±2,43
HLA-DR, %	9,37±2,21	10,31±2,52
CD38 ⁺ , %	9,79±2,00	6,70±1,63

Примечания:

* – различия достоверны при $p < 0,05$;

** – различия достоверны при $p < 0,01$.

с помощью моноклональных антител (ЗАО «МедБиоСпектр», Россия). Методом MAR (mixer agglutination reaction) вычисляли долю подвижных сперматозоидов, покрытых антителами IgG (MAR% IgG). Другие исследования выполнялись по показаниям.

Контрольную группу составили 6 здоровых мужчин, в возрасте от 21 до 33 лет, имеющих нормозооспермию и состоящих в фертильных браках. В группу наблюдения вошли больные ($n = 26$) с различными заболеваниями половых органов (хронический простатит, идеопатическое варикоцеле, атрофии яичек и др.). Из них на момент обследования фертильными являлись 11 человек, бесплодными 15.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с вычислением t-критерия Стьюдента и коэффициента корреляции Пирсона.

Результаты и обсуждение

Сравнение показателей местного иммунитета у пациентов контрольной группы и мужчин, страдающих заболеваниями половых органов, но сохранивших при этом свою фертильность, не выявило достоверных различий, их спермограммы соответствовали критериям нормозооспермии, поэтому мы сочли возможным объединить названные подгруппы в единую группу фертильных мужчин (табл. 1). Концентрация сперматозоидов, относительное количество прогрессивно-подвижных сперматозоидов, процент патологических форм сперматозоидов, степень некрозооспермии (относительное количество мертвых сперматозоидов) и интегральный индекс качества спермы (количество морфологически нормальных, прогрессивно подвижных сперматозоидов в 1 мл эякулята) в группах фертильных и бесплодных мужчин отличались с высокой степенью достоверности. Напротив, показатель MAR% IgG находился в нормальных пределах у пациентов обеих групп. Следовательно, мы можем утверждать, что в обследованной популяции мужчин инфертильность была достоверно ассоциирована с патоспермией.

Нами выявлено, что у бесплодных пациентов имеется достоверное ($p < 0,01$) снижение соотношения CD4⁺/CD8⁺ клеток вследствие тенденции к уменьшению содержания CD4⁺ клеток и достоверного увеличения уровня CD8⁺ лимфоцитов ($p < 0,01$). При анализе особенностей активации лимфоцитов в эякулятах фертильных и бесплодных мужчин отмечено достоверное увеличение уровня лимфоцитов с фенотипом CD8⁺HLA-DR⁺ (с 2,86±0,08 до 7,47±1,52%), а также наивных лимфоцитов (CD8⁺CD45RA⁺)

с $2,08 \pm 1,16$ до $7,36 \pm 1,23$ % ($p < 0,05$ в обоих случаях). Кроме того, у бесплодных статистический анализ показал достоверное повышение относительного количества CD25⁺ лимфоцитов ($p < 0,05$) на фоне не изменяющейся доли CD95⁺ лимфоцитов.

Известно, что экспрессия рецептора к IL-2 на поверхности лимфоцитов свидетельствует об активации клеток, а уровень экспрессии Fas антигена — о готовности клеток к апоптозу, который является основным механизмом элиминации активированных клеток [3]. В связи с этим мы сочли целесообразным оценить в семенной жидкости соотношение активированных и готовых вступить в апоптоз лимфоцитов. У фертильных мужчин величина индекса была $0,94 \pm 0,18$, что достоверно отличается от показателей группы бесплодных ($2,35 \pm 0,73$; $p < 0,05$).

Данное соотношение было достоверно повышено при различных вариантах патоспермии: олиго-, терато- и некрозооспермии. Чтобы ответить на вопрос: «На какие параметры спермограммы влияет лимфоцитарный активационный дисбаланс в первую очередь?», мы разделили пациентов с патоспермией на две подгруппы, отличающиеся по концентрации сперматозоидов и сравнили указанный индекс с аналогичным при нормозооспермии (табл. 2). Увеличение отношения CD25⁺/CD95⁺ при тератонекрозооспермии наблюдалось у пациентов с олигоспермией ($p < 0,05$), у которых указанный индекс при тератонекрозооспермии на фоне нормальной концентрации сперматозоидов соответствовал таковому в нормозооспермических эякулятах. Корреляционный анализ также подтвердил достоверную взаимосвязь индекса CD25⁺/CD95⁺ с концентрацией сперматозоидов ($r = -0,47$) и степенью некроспермии ($r = 0,78$).

При ранжировании пациентов по индексу CD25⁺/CD95⁺ и сопоставлении значения индекса с количественными показателями спермограмм, было выявлено, что наибольшее соответствие критериям нормозооспермии имеют спермограммы со «средними» значениями индекса ($0,87 \pm 0,12$). Отклонения, как в сторону уменьшения показателя, так и в сторону его увеличения ассоциируются с патоспермией (табл. 3).

При анализе данных в зависимости от фертильности было выявлено, что в группе пациентов со «средними» значениями индекса CD25⁺/CD95⁺ бесплодный брак отмечался в четырех случаях (29,0%), а с высокими и низкими значениями индекса бесплодными были 11 из 18 мужчин (61,1%, $p < 0,01$). Таким образом, мы

ТАБЛИЦА 2. ЗНАЧЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ С ФЕНОТИПАМИ CD25⁺ И CD95⁺ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ СПЕРМОГРАММЫ

Состояние спермограммы	Отношение CD25 ⁺ /CD95 ⁺ в лимфоцитарном гейте
Нормозооспермия	$0,97 \pm 0,28$
Тератонекрозооспермия, в том числе:	$1,69 \pm 1,54$
тератонекрозооспермия при нормальной концентрации сперматозоидов	$0,65 \pm 0,11$
олиготератонекро-спермия	$2,21 \pm 0,73^*$

Примечание: * – различия с нормозооспермией достоверны при $p < 0,05$.

можем утверждать, что индекс CD25⁺/CD95⁺ («активация/апоптоз») находится в достоверной корреляции не только с патоспермией, но и с фертильностью.

Количественные показатели иммунограмм наблюдаемых пациентов, разделенных на подгруппы по значению индекса CD25⁺/CD95⁺ в лимфоцитарном гейте, приведены в таблице 3. Выявлено, что как при повышении, так и при понижении индекса CD25⁺/CD95⁺ у пациентов уменьшалось количество CD16⁺ ($p < 0,05$) ЕК. При увеличении индекса выше 1,2 снижалось содержание лимфоцитов с фенотипом CD95⁺, при уменьшении индекса CD25⁺/CD95⁺ ниже 0,7 у обследованных мужчин уменьшалось количество лимфоцитов с фенотипами CD4⁺, CD25⁺ и CD38⁺ ($p < 0,05$ во всех случаях).

Выявленные закономерности согласуются с известными клиническими данными. Теоретически при иммунопатологических состояниях оплодотворяющая способность спермы может пострадать в результате прямого цитотоксического действия эффекторных иммунокомпетентных клеток (например, ЦТЛ CD8⁺ или NK) на сперматозоиды и/или сперматогенный эпителий [2], воздействия АСАТ [1], усиления апоптоза сперматозоидов под влиянием провоспалительных цитокинов [6] и активных форм кислорода [4, 11].

Учитывая то, что у наблюдаемых пациентов количество подвижных сперматозоидов, покрытых АСАТ (MAR% IgG), не превышало 3%, следует признать данный фактор несущественным в патогенезе infertility. Напротив, выявленный активационный лимфоцитарный дисбаланс, достоверно коррелирующий с основными дискриминационными параметрами спермограммы, позволяет согласиться с мнением Wang X. et al. (2002) и Fujisawa M, Ishikawa T. (2003), считающим апоптоз ключевым фи-

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПАРАМЕТРЫ СПЕРМОГРАММЫ И ИММУНОГРАММЫ ЭЯКУЛЯТА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЕЛИЧИНЫ СООТНОШЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ С ФЕНОТИПАМИ CD25⁺ И CD95⁺

Параметры спермограммы	Соотношение CD25 ⁺ /CD95 ⁺		
	«среднее» значение	повышено (> 1,2)	понижено (< 0,7)
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	198,00±12,91	120,40±39,71*	135,56±21,02*
Прогрессивно-подвижные сперматозоиды, %	51,80±5,33	26,33±7,03**	38,78±5,73*
Патологические формы сперматозоидов, %	65,00±3,98	80,44±3,83**	71,11±3,80
Индекс качества спермы, млн/мл	37,08±7,16	13,99±4,96**	16,27±4,37*
Степень некрозооспермии, %	13,53±2,87	49,48±11,10**	25,90±4,90*
CD3 ⁺ , %	59,07±3,76	55,66±4,16	57,83±4,41
CD4 ⁺ , %	34,66±2,74	30,47±2,25	24,14±2,50*
CD8 ⁺ , %	12,40±2,02	11,44±1,53	9,76±1,79
Соотношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺	3,26±0,48	3,15±0,53	2,82±1,98
CD16 ⁺ , %	9,96±2,02	4,61±1,25*	3,82±1,42*
CD20 ⁺ , %	8,86±2,10	6,46±1,45	3,89±1,14
CD71 ⁺ , %	8,23±1,69	6,74±1,58	5,23±1,97
CD45RA, %	55,49±3,70	53,80±5,83	53,69±5,61
CD25 ⁺ , %	7,67±0,69	10,61±3,57	2,23±0,63*
CD95 ⁺ , %	8,94±0,70	4,13±0,97*	5,51±1,16
CD11b ⁺ , %	10,17±1,88	5,87±1,74	9,57±6,12
HLA-DR, %	9,42±1,74	7,41±2,08	5,92±1,26
CD38 ⁺ , %	9,56±1,40	6,33±1,41	3,31±2,54*

Примечания:* – различия с показателями при «средних» значениях индекса достоверны при $p < 0,05$;** – различия с показателями при «средних» значениях индекса достоверны при $p < 0,01$.

зиологическим регулятором, лимитирующим размер популяции герминативных клеток в яичке [7, 14].

Известно, что в зависимости от внешних условий процесс активации иммунокомпетентных клеток может иметь, по меньшей мере, два исхода [5]. Если после активации они проходят типичный путь своего развития – это позитивный процесс. Если же активация происходит в измененных условиях (внешние и внутренние факторы микроокружения клеток, дефицит факторов пролиферации и т.п.), то она может привести к противоположному эффекту – гибели иммунокомпетентных клеток в результате феномена апоптоза. Нами предполагается существование нескольких путей нарушения сперматогенеза вследствие нарушения процессов активации и апоптоза иммунокомпетентных клеток.

В большинстве случаев у пациентов с патоспермией оказалась существенно повышенной экспрессия рецепторов к IL-2 (CD25) на фоне снижения уровня лимфоцитов, экспрессирующих молекулу Fas (CD95), что выразилось в увеличении предложенного нами индекса «активация-апоптоз» более единицы. Угнетение апоптоза активированных лимфоцитов спермы,

вне зависимости от причины возникновения, потенциально опасно для сперматогенеза. Иммунный ответ и связанные с ним воспалительные реакции могут вызвать неспецифическое поражение близлежащих тканей [2]. Мы можем предположить, что активированные клетки, не подвергнувшись процессу апоптоза своевременно, могут реализовать свою активность в отношении других клеток-мишеней, например, сперматозоидов. Косвенным подтверждением развития цитотоксического ответа в отношении сперматозоидов может служить отмеченное нами повышение уровня наивных цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺CD45RA⁺) у бесплодных мужчин.

У части больных с патоспермией наблюдалась обратная ситуация: готовность к апоптозу превышала параметры активации лимфоцитов. Тем не менее, у этих пациентов также наблюдалась патоспермия и снижение фертильности. На наш взгляд, в этом нет противоречия. Вероятно, здесь мы имеем дело с так называемыми негативными последствиями активации. Апоптотическая гибель активированных клеток иммунной системы возможна при отсутствии оптимальных рецепторных или медиаторных физиологических воздействий, необходимых

для дальнейшего развития иммунной реакции. Так, M. Weller et al. (1995) выявили, что пролиферативная активность Т-клеток и их повышенный апоптоз наблюдаются в культуре лимфоцитов, лишенных IL-2 [15].

По нашему мнению, активационный иммунный дисбаланс и в этом случае может иметь негативные последствия для сперматогенеза. По литературным данным, массивный апоптоз клеток некоторых тканей сопровождается интенсивным синтезом лизосомальных ферментов в окружающих интактных клетках [8]. Известно также, что апоптозные тела, формирующиеся в тканях и быстро подвергающиеся фагоцитозу, могут избежать фагоцитарного захвата и переваривания, если распределяются в жидкой среде, например, в суспензии клеток или секрете желез [9]. Затем такие свободные «апоптозные» тела подвергаются спонтанной деградации, при которой происходят набухание, разрыв мембраны и другие изменения, характерные для некроза. Этот процесс разрушения апоптозных тел назван вторичным некрозом и может сопровождаться характерными для классического некроза воспалительными изменениями окружающих тканей. Экстраполяция описанной модели применительно к семенной жидкости объясняет возможный патогенез нарушений сперматогенеза при повышении экспрессии CD95 на спермальных лимфоцитах.

Заключение

Полученные данные и анализ научных публикаций позволяют сделать вывод о том, что важным патогенетическим фактором нарушения мужской фертильности является активационный дисбаланс, ведущий к вторичной иммуносупрессии и к индукции патоспермии. Установлено, что соотношение CD25⁺/CD95⁺ в эякуляте является объективным показателем, характеризующим уровень фертильности у больных с бесплодием. Оценка соотношения лимфоцитов с фенотипами CD25⁺/CD95⁺ позволяет наглядно выявить имеющийся активационный дисбаланс. У фертильных мужчин величина индекса колеблется около единицы (0,94±0,18), а увеличение данного показателя более 1,2, как и уменьшение менее 0,7, ассоциировано с бесплодием. Выявленные закономерности позволяют надеяться на успешное использование новых знаний в целях разработки более эффективных терапевтических стратегий коррекции мужского бесплодия.

Список литературы

1. Божедомов В.А., Лоран О.Б., Сухих Г.Т. Этиология и патогенез мужского аутоиммунного

бесплодия. Часть 1 и 2 // Андрология и генитальная хирургия. — 2001. — № 1. — С. 72-87.

2. Фильченков А.А., Степанов Ю.М., Липкин В.М., Кушлинский Н.Е. Участие системы Fas/Fas-лиганд в регуляции гомеостаза и функционировании клеток иммунной системы // Аллергология и иммунология. — 2002. — Т. 3, № 1. — С. 24-35.

3. Ярилин А.А. Основы иммунологии: Учебник. — М.: Медицина, 1999. — 608 с.

4. Agarwal A., Gupta S., Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction // Curr. Opin. Obstet. Gynecol. — 2006. — Vol. 18, N 3. — P. 325-332.

5. Cheredeev A.N., Kovalchuk L.V. Pathogenetic Principle of Immune System Evaluation in Human: Positive and Negative Activation // Russ. J. Immunol. — 1997. — Vol. 2, N 2. — P. 85-90.

6. Fedder J. Nonsperm cells in human semen: with special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility // Arch. Androl. — 1996. — Vol. 36, N 1. — P. 41-65.

7. Fujisawa M., Ishikawa T. Soluble forms of Fas and Fas ligand concentrations in the seminal plasma of infertile men with varicocele. // J. Urol. — 2003. — Vol. 170. — N 6. — P. 2363-2365.

8. Kerr J.F., Searle J. Deletion of cells by apoptosis during castration — induced involution of the rat prostate. // Virchows Arch. B Cell Pathol. — 1973. — Vol. 13, N 2. — P. 87-102.

9. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // Br. J. Cancer. — 1972. — Vol. 26. — P. 239-257.

10. Lackner J, Schatzl G, Horvath S, Kratzik C, Marberger M. Value of counting white blood cells (WBC) in semen samples to predict the presence of bacteria // Eur. Urol. — 2006. — Vol. 49, N 1. — P. 148-152.

11. Omu A.E., Al-Qattan F., Al-Abdul-Hadi P.M., Fatnikun M.T., Fernandes S. Seminal immune response in infertile men with leukocytospermia: effect on antioxidant activity // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. — 1999. — Vol. 86, N 2. — P. 195-202.

12. Ricci G., Perticarari S., Fragonas E., Giolo E., Canova S., Pozzobon C., Guaschino S., Presani G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes // Hum. Reprod. — 2002. — Vol. 17, N 10. — P. 2665-2672.

13. Stanislavov R. Leukocytes in human seminal fluid // Akush. Ginekol. (Sofia). — 1999. — Vol. 38, N 3. — P. 20-21.

14. Wang X., Sharma R.K., Sikka S.C., Thomas A.J. Jr, Falcone T., Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male

factor infertility // Fertil. Steril. – 2003. – Vol. 80, N 3. – P. 531-535.

15. Weller M., Malipiero U., Groscurth P., Fontana A. T cell apoptosis induced by interleukin-2 deprivation or transforming growth factor-beta 2: modulation by the phosphatase inhibitors okadaic acid

and calyculin A // Exp. Cell. Res. – 1995. – Vol. 221, N 2. – P. 395-403.

поступила в редакцию 25.12.2006

отправлена на доработку 07.01.2007

принята к печати 16.01.2007