

О. В. Мельник, М. З. Воробець, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець  
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

## ІМУНОФЕНОТИПІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ НЕПЛІДНИХ ЧОЛОВІКІВ ІЗ СУПУТНЬОЮ ПАТОЛОГІЄЮ

**Вступ.** Відомо, що приблизно 15 % подружніх пар страждають від непліддя, причому чоловічий фактор становить майже 50 % випадків. За традиційною методикою оцінки, в 30 % пацієнтів етіологія чоловічого внеску в непліддя залишається нез'ясованою і, таким чином, ідентифікується як ідіопатична. Тому діагностика чоловічого непліддя не може обмежуватися лише звичайним аналізом сперми. Регуляція чоловічої репродуктивної функції є багаторівневою, із залученням не тільки ендокринної системи, але й імунної. Інфертильність чоловіків спостерігають і при інших супутніх патологіях, зокрема ревматоїдному артриті. Для кращого розуміння імунопатогенетичних механізмів непліддя потрібно дослідити роль різних імунних чинників.

**Мета дослідження** – оцінити популяційний склад та активаційні маркери лімфоцитів периферичної крові чоловіків з ідіопатичною формою непліддя й автоімунною патологією суглобів.

**Методи дослідження.** Дослідження проведено на сироватці крові та сім'яній плазмі 45 інфертильних чоловіків віком 22–48 років: з ідіопатичним непліддям ( $n=23$ ) та автоімунною патологією суглобів – ревматоїдним артритом ( $n=22$ ). До контрольної групи ввійшли 27 фертильних здорових чоловіків того ж віку. Для визначення кількісних показників лімфоцитів основних популяцій і субпопуляцій у крові пацієнтів з ідіопатичним непліддям та автоімунною патологією суглобів застосовували метод проточної цитометрії з моноклональними антитілами, міченими флуоресцеїном (BD Biosciences, США). Кількість лімфоцитів визначали на проточному цитометрі BD FACS Calibur (Becton Dickinson, США).

**Результати й обговорення.** Кількість лімфоцитів субпопуляцій у неплідних чоловіків практично не відрізнялася від аналогічних показників контрольної групи за абсолютними значеннями. Проте у крові чоловіків з ідіопатичним непліддям спостерігали вірогідне збільшення  $CD4^+CD25^+$  Т-лімфоцитів – з  $(0,357 \pm 0,185)$  до  $(0,504 \pm 0,220)$  Г/л ( $p < 0,05$ ). При автоімунній патології достовірних змін не виявлено. Неплідні чоловіки з автоімунною патологією відрізнялися від пацієнтів контрольної групи підвищеними показниками  $CD8^+$ -клітин та активованих Т-лімфоцитів. Найбільше відхилення від контролю зареєстровано в осіб з ідіопатичним непліддям: знижена кількість наївних  $CD4^+CD25^-$ -лімфоцитів при одночасному зростанні кількості  $CD4^+CD25^+$ -регуляторних Т-клітин, що вказувало на конверсію наївних Т-лімфоцитів на регуляторні клітини.

**Висновки.** Розвиток непліддя на тлі різної супутньої патології супроводжується змінами показників як системної, так і локальної імунної реактивності. Характер цих змін відрізняється залежно від супутньої патології. З'ясування характерних ознак порушень імунної реактивності в неплідних чоловіків з різною супутньою патологією дозволяє позиціонувати деякі з них як надійні маркери для прогнозування порушень репродуктивної функції.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інфертильність; ідіопатичне непліддя; ревматоїдний артрит; сироватка крові; популяційний склад лімфоцитів.

ВСТУП. Непліддя є серйозною проблемою неможливості завагітніти, незважаючи на регулярні статеві акти понад рік. Вважають, що природне зачаття досягається у 80–85 % пар. Близько 15 % подружніх пар страждають від непліддя, причому чоловічий фактор становить майже 50 % випадків [1, 2]. Парадоксально, але, за традиційною методикою оцінки, в 30 % пацієнтів основна етіологія чоловічого внеску в непліддя залишається нез'ясованою і, таким чи-

© О. В. Мельник, М. З. Воробець, Р. В. Фафула, З. Д. Воробець, 2022.

ном, ідентифікується як ідіопатична [2]. Тому діагностика чоловічого непліддя не може обмежуватися лише звичайним аналізом сперми.

Регуляція чоловічої репродуктивної функції є багаторівневою, із залученням не тільки ендокринної системи, але й імунної [3–7]. Органи репродукції людини перебувають під захистом як системного, так і місцевого імунітету. Імунологічна привілейованість яєчок забезпечується анатомічним бар'єром кров – яєчко та особливим толерантним станом імунної системи щодо антигенів, експресованих на чоловічих гаметах.

Індуцибельний фактор забезпечується багатьма клітинами та розчинними медіаторами. Домінуючу роль у цьому відіграють клітини Сертолі [8]. Вони є важливим елементом сперматогенного гомеостазу, бо через різну взаємодію зі статевими клітинами сприяють їх диференціації.

Сім'яна рідина, яка створює мікросередовище для диференційованих гамет, є багатокомпонентним розчином і містить цілу гаму активних біологічних речовин з імуномодулювальними властивостями. Слизові оболонки є важливим елементом статевої системи у чоловіків, вони мають у своїй структурі компоненти лімфоїдної тканини, які виконують імунні функції [9]. Зменшення продукування інтерферонів, зміна кількості натуральних кілерів, В- і Т-лімфоцитів знижують бар'єрні функції слизових та призводять до розвитку хронічних запальних процесів статевої сфери [10].

На місцевому рівні імуносупресивно впливають прогестерон та інші стероїдні гормони, синтезовані в гонадах.

Інфертильність чоловіків спостерігають і при інших супутніх патологіях, зокрема ревматоїдному артриті (РА). Ревматоїдний артрит – це системне запальне автоімунне захворювання, що характеризується хронічним ерозивним поліартритом, спричиняє біль у суглобах, набряк і скутість. Його поширеність у всьому світі становить 0,5–1,0 % [11–13]. Складна взаємодія між сприятливим генетичним фоном і наявністю специфічної імунної відповіді проти широкого спектра факторів навколишнього середовища, схоже, відіграє роль у визначенні сприйнятливості до РА.

Для кращого розуміння імунопатогенетичних механізмів непліддя потрібно дослідити роль різних імунних чинників. До них належить кількість лімфоцитів різних популяцій і субпопуляцій та їх активаційного статусу. Це дозволить краще розуміти механізми їх впливу на сперматозоїди.

Мета дослідження – оцінити популяційний склад та активаційні маркери лімфоцитів периферичної крові чоловіків з ідіопатичною формою непліддя й автоімунною патологією суглобів.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Забір матеріалу – крові та еякуляту – здійснено, відповідно, у ревматологічному й урологічному відділенні КНП ЛОР “Львівська обласна клінічна лікарня”. Було зібрано детальний анамнез щодо захворювань, а також медикаментозного та хірургічного лікування. Провели ретельне обстеження сечостатевої системи чоловіків, щоб встановити критерії виключення. У дослідження включили осіб з нормально розвиненими сечостатевими

органами, а також хворих зі встановленим діагнозом ревматоїдного артриту без наявності супутніх запальних захворювань сполучної тканини, інших запальних захворювань, онкологічної патології на момент початку дослідження. Тривалість захворювання пацієнтів коливалася від 6 до 360 місяців. У всіх хворих на РА діагностували астенозооспермію і лейкоцитоспермію.

Ідіопатичну форму непліддя, що характеризується невивченим етіопатогенезом, діагностували за відсутністю запліднення впродовж року регулярного статевого життя пари та неможливістю з'ясування причини, що викликала хворобу. Цю форму непліддя мали чоловіки з олігозооспермією, олігоастенозооспермією, астенозооспермією та лейкоспермією.

Усі дослідження проводили з належного дозволу Комісії з питань біоетичної експертизи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького та з письмової згоди пацієнтів.

Було обстежено 45 інфертильних чоловіків віком 22–48 років, яких умовно поділили на 2 групи: 1-ша – 22 чоловіки із системним автоімунним захворюванням (ревматоїдним артритом); 2-га – 23 соматично здорових пацієнти з ідіопатичним непліддям. До контрольної групи ввійшли 27 фертильних здорових чоловіків віком 22–48 років.

Для визначення кількісних показників лімфоцитів основних популяцій і субпопуляцій у крові пацієнтів з ідіопатичним непліддям та автоімунною патологією (ревматоїдним артритом), зокрема кількості Т-лімфоцитів (CD3<sup>+</sup>), В-лімфоцитів (CD19<sup>+</sup>), NK-клітин (CD16/56<sup>+</sup>), субпопуляцій Т-лімфоцитів: Т-лімфоцитів-хелперів (CD4<sup>+</sup>), цитотоксичних Т-лімфоцитів (CD8<sup>+</sup>), регуляторних Т-лімфоцитів (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) і Т-лімфоцитів (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), а також пізніх активаційних маркерів CD3<sup>+</sup>-HLA DR<sup>+</sup> та CD3<sup>-</sup>-HLA DR<sup>+</sup>, застосовували метод проточної цитометрії з моноклональними антитілами, міченими флуоресцеїном (BD Biosciences, США). Кількість лімфоцитів визначали на проточному цитометрі BD FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Усі зразки цільної крові досліджували у день забору крові (протягом 24 год).

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M) і стандартна похибка (m). Результати представлені як середнє арифметичне (M) ± стандартна похибка середнього (m). Кількість дослідів (n) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку (кожного разу використовували

сперматозоїди, отримані від одного пацієнта або практично здорового донора).

Достовірність змін між статистичними характеристиками 2 альтернативних сукупностей параметричних даних встановлювали за t-критерієм Стьюдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях становили 0,95, 0,99 та 0,999.

Рівняння прямої лінії, що найкраще апроксимує еспериментальні дані, розраховували з використанням методу найменших квадратів. Абсолютне значення коефіцієнта кореляції  $r$  становило 0,90–0,98. Достовірність розрахованих параметрів прямої перевіряли за F-критерієм Фішера: достовірною вважали апроксимацію, при якій  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Щоб виявити і вчасно скорегувати порушення імунітету, що можуть мати негативні наслідки для фертильності, необхідно досліджувати показники клітинного імунітету як при первинному, так і при вторинному неплідді. Оцінка різних типів субпопуляцій лімфоцитів у периферичній крові має недостатньо вивчене та часто суперечливе значення в діагностиці непліддя [3]. Порушення пропорцій типів лімфоцитів можуть свідчити про наявність імунологічної проблеми, яку виявляють у пацієнтів. У літературі йдеться про необхідність визначення кількісних показників лімфоцитів певних популяцій і субпопуляцій, зміни яких особливо значимі при автоімунній патології. Це  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  і Treg,  $CD8^+$ ,  $CD28^+$  та  $CD4^+CD25^+$ -клітини [3, 14, 15].

З огляду на отримані результати, кількість лімфоцитів субпопуляцій у неплідних чоловіків практично не відрізнялася від аналогічних показників пацієнтів контрольної групи за абсолютними значеннями (табл. 1).

Проте ми встановили, що у крові чоловіків з ідіопатичним непліддям вірогідно збільшилась кількість  $CD4^+CD25^+$  Т-лімфоцитів – з  $(0,357 \pm 0,185)$  до  $(0,504 \pm 0,220)$  Г/л ( $p < 0,05$ ). При автоімунній патології достовірних змін не виявили.

Щодо  $CD4^+CD25^+$  Т-лімфоцитів, то ці клітини виконують регуляторну функцію, що, на перший погляд, може мати позитивний ефект, оскільки вони запобігають автоімунним реакціям. Водночас  $CD4^+CD25^+$  Т-лімфоцити проявляють супресорну дію як на  $CD4^+$ , так і на  $CD8^+$ -лімфоцити, що призводить до зниження продукування ними інтерферону- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Природні (натуральні)  $CD4^+CD25^+$  Т-клітини, які виконують регуляторну функцію, є основними ефекторами периферичної толерантності, що контролюють функції  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  Т-клітин, моноцитів, дендритних клітин та NK-клітин, гальмуючи їх активацію, проліферацію, диференціацію та ефекторні функції [3, 14].

Відомо, що ревматоїдний артрит пов'язаний із проліферацією синовіальних фібробластів, В- і Т-лімфоцитів, нейтрофілів та моноцитів [11, 16–19]. Наявність імунних клітин у синовіальному компартменті є типовою ознакою РА, що спричиняється різноманітними механізмами, включаючи взаємодію клітина – клітина, секрецію розчинних медіаторів, автоантитіла та шляхи

Таблиця 1 – Кількість лімфоцитів різних субпопуляцій у неплідних чоловіків з різною супутньою патологією ( $M \pm SD$ )

Показник		Контроль (n=27)	Ідіопатичне непліддя (n=23)	Автоімунна патологія (ревматоїдний артрит) (n=22)
$CD3^+$	%	66,95±7,79	68,42±5,39	72,48±7,34
	абс. Г/л	1,452±0,541	1,389±0,287	1,677±0,581
$CD8^+$	%	26,91±6,92	22,87±3,96	29,92±15,53
	абс. Г/л	0,578±0,279	0,459±0,199	0,682±0,245
$CD4^+$	%	38,91±5,52	44,97±6,87	42,14±5,47
	абс. Г/л	0,798±0,259	0,894±0,214	0,961±0,253
$CD16/56^+$	%	20,52±5,65	18,71±4,66	15,87±6,52
	абс. Г/л	0,443±0,150	0,383±0,153	0,362±0,178
$CD19^+$	%	10,33±2,71	10,98±1,85	9,48±2,34
	абс. Г/л	0,227±0,095	0,219±0,069	0,210±0,112
$CD3^+HLA DR^+$	%	5,12±3,32	5,27±3,56	6,69±5,76
	абс. Г/л	0,111±0,083	0,111±0,088	0,155±0,114
$CD3^-HLA DR^+$	%	11,18±1,98	12,89±1,69	11,31±3,57
	абс. Г/л	0,238±0,087	0,258±0,086	0,243±0,114
$CD4^+CD25^+$	%	15,78±5,66	24,86±7,34	18,94±7,69
	абс. Г/л	0,376±0,117	0,498±0,233	0,434±0,178
$CD4^+CD25^-$	%	21,14±5,14	17,78±2,13	20,27±6,81
	абс. Г/л	0,462±0,196	0,361±0,091	0,464±0,236

передачі сигналу як уродженої, так і набутої імунної відповіді на різних стадіях захворювання [11, 20]. Макрофаги, нейтрофіли, опасисті клітини та природні кілери (NK) беруть участь у розвитку запальної відповіді в суглобі в результаті активації уродженої імунної відповіді. Антигенопрезентувальні клітини, такі, як макрофаги й ефекторні клітини, сприяють запаленню та опосередковують руйнування кісток і хрящів, вивільняючи прозапальні цитокіни – фактор некрозу пухлини- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), інтерлейкіни (IL) 1 $\beta$ , 6, 18, 23, а також активні форми кисню та ензими, що деградують матрикс [11, 21, 22]. Зокрема, TNF- $\alpha$  відіграє центральну роль у патогенезі захворювання, підвищуючи концентрацію запальних цитокінів, активуючи макрофаги та лімфоцити.

При автоімунних хворобах Т-лімфоцити з регуляторною функцією обмежують автоантитілоутворення, використовуючи різні механізми: продукування цитокінів з імуносупресивною активністю – IL-10, IL-35, трансформуючого фактора росту- $\beta$ ; зниження експресії коstimуляторних молекул на антигенопрезентувальних клітинах; пригнічення дозрівання дендритних клітин [11]. Неадекватна кількість цих клітин може спровокувати автоімунітет при набутих імунодефіцитах, поліендокринопатії тощо.

Хоча відомо, що ревматоїдний артрит є захворюванням, опосередкованим Т-хелпером (Th) 1, зараз наявні дані, що засвідчують важливість популяції ефекторних клітин Th17 в патогенезі РА [23, 24]. Секреція цитокіна IL-17A клітинами Th17 активує ряд шляхів, зокрема нейтрофіли, макрофаги та В-клітини [11, 24, 25]. Клітини Th17 відіграють важливу роль у патогенезі РА також шляхом синтезу інших цитокінів, включаючи IL-17F, IL-22, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ .

Роль інфекцій у розвитку автоімунних захворювань розглядають уже давно, оскільки інфікування різними збудниками може залучати кілька шляхів імунної системи, потенційно спричиняючи автоімунну відповідь [11]. За останні два десятиліття значна кількість досліджень *in vivo* та *in vitro* переконливо показала наявність патогенетичного зв'язку між імунною відповіддю на мікобактеріальні інфекції та розвитком автоімунних захворювань, включаючи хронічний ревматоїдний артрит [11, 26, 27].

У пацієнтів з ревматичними хворобами тяжкість перебігу автоімунної хвороби залежить від ступеня зниження функцій Т-лімфоцитів із регуляторними властивостями [11, 28]. Тому зміна кількості основних субпопуляцій лімфоцитів та їх функцій у пацієнтів, яких ми обстежили, може спричинити неадекватну імунну відповідь.

Оскільки імунна система діє як єдиний механізм, характеристика окремих її компонентів не дає чіткого уявлення про зміни імунологічної реактивності організму. Для наочності відмінностей імунного статусу в неплідних чоловіків порівняно зі здоровими фертильними чоловіками (контроль) побудовано пелюсткову діаграму, на якій у вигляді “розетки” по радіусах відкладено значення показників імунограми чоловіків з непліддям і пацієнтів контрольної групи. Значення показників імунограми в контрольній групі взято за 100 % (рис.).

Відхилення в неплідних пацієнтів з різною супутньою патологією утворили форму “профілю імунітету”, яка рельєфно відрізнялася від контрольної групи. Неплідні чоловіки з автоімунною патологією відрізнялися від пацієнтів контрольної групи підвищеними показниками CD8<sup>+</sup>-клітин та активованих Т-лімфоцитів. Найбільше відхилень від контролю зареєстровано в осіб з

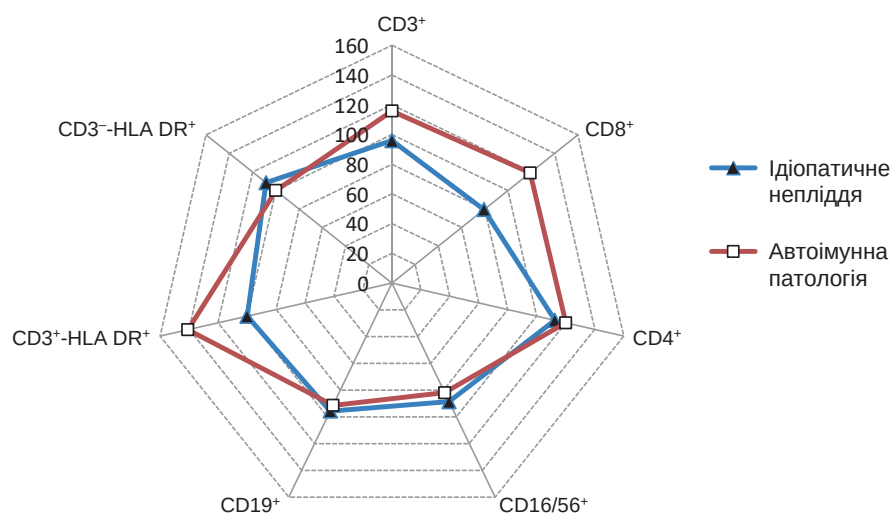


Рис. Діаграма показників клітинної ланки імунітету в чоловіків з ідіопатичним непліддям та чоловіків з автоімунною патологією відносно фертильних чоловіків, значення відповідних показників яких взято за 100 %.

ідіопатичним непліддям: знижена кількість наївних CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>-лімфоцитів при одночасному зростанні кількості CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-регуляторних Т-клітин, що вказувало на конверсію наївних Т-лімфоцитів на регуляторні клітини. Проте перебудова імунної системи за умов розвитку патології може проявлятися змінами не тільки середніх значень окремих показників імунної реактивності, але і їх кореляційних зв'язків. Встановлені нами взаємозв'язки між деякими ознаками свідчать про те, що зміна одного елемента в парі призводить до відповідної перебудови значення іншого показника імунітету. Це може також свідчити про розбалансованість імунної системи.

Кореляційні зв'язки між парами показників імунітету вірогідно різнилися у пацієнтів контрольної групи і хворих на автоімунні захворювання, а також у чоловіків з ідіопатичним непліддям (табл. 2).

Зокрема, в неплідних чоловіків з автоімунною патологією порушення кореляційних зв'язків в імунній системі проявлялися їх зменшенням порівняно зі здоровими особами. У пацієнтів з ідіопатичним непліддям кореляційний зв'язок між показниками імунної реактивності також

послаблювався або набував зворотної пропорційності.

Припускається можливість використовувати кількісний показник циркулюючих CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клітин у чоловіків з автоімунною патологією для прогнозування патологічних змін у спермограмі. З метою перевірки висловленого припущення було проведено ROC-аналіз, який дозволяє об'єктивно визначити діагностичну значимість окремого тесту за значенням AUC (Area Under Curve). AUC – це інтегральний показник прогностичної ефективності маркера, який визначає вірогідність того, що значення ознаки маркера у випадково обраного хворого більше, ніж у випадково обраної здорової людини. Значення AUC  $\geq 0,8$  характеризує високу прогностичну значимість досліджуваної ознаки.

У випадку кількісного показника циркулюючих CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клітин у чоловіків з автоімунними захворюваннями AUC=1,0 це характеризує високу прогностичну значимість даного показника імунної реактивності. Враховуючи виявлену залежність, ми припускаємо, що кількість циркулюючих CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-лімфоцитів може бути предиктором зниження рухливості сперматозоїдів у чоловіків з автоімунними захворюваннями.

Таблиця 2 – Вірогідні кореляційні зв'язки між парами показників імунітету в неплідних чоловіків з різною супутньою патологією

Показник імунограми	Коефіцієнт кореляції			p
	контроль (n=27)	ідіопатичне непліддя (n=23)	автоімунна патологія (ревматоїдний артрит) (n=22)	
CD3 <sup>+</sup> – CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	0,746754	0,108578	–	0,0435
CD8 <sup>+</sup> – CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup>	0,694806	-0,084059	–	0,0154
CD16/56 <sup>+</sup> – CD3 <sup>-</sup> -HLA DR <sup>+</sup>	0,519479	–	-0,144875	0,0491

**ВИСНОВКИ.** На основі дослідження показників імунної реактивності, тобто кількісних показників лімфоцитів різних субпопуляцій та активаційного статусу, аналізу їх взаємозв'язку з порушеннями семіологічних показників у неплідних чоловіків з різною супутньою патологією було встановлено, що розвиток непліддя на тлі різної супутньої патології супроводжується змінами показників як системної, так і локальної імунної реактивності. Характер цих змін відрізняється залежно від супутньої патології. Хоча існують деякі загальні закономірності патологічних відхилень у функціонуванні імунної системи всіх

неплідних чоловіків, яких ми обстежили. Тісний зв'язок між порушеннями семіологічних показників і патологічними змінами показників імунної реактивності у чоловіків з ідіопатичним непліддям переконливо доводить імунний генез цього захворювання. Виявлення характерних ознак порушень імунної реактивності в неплідних чоловіків з різною супутньою патологією дозволяє позиціонувати деякі з них як надійні маркери для прогнозування порушень репродуктивної функції. Так, за автоімунних захворювань при кількості CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-лімфоцитів  $\geq 0,392$  Г/л з великою ймовірністю можна прогнозувати суттєві зміни в спермограмі.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Tahmasbpour E. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART) / E. Tahmasbpour, D. Balasubramanian, A. Agarwal // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2014. – **31**. – P. 1115–1137. DOI: 10.1007/s10815-014-0280-6.
2. Understanding male infertility for promising ART / M. H. Zargar, F. Ahmad, M. Lateef, T. M. Malla // *Infertility and Assisted Reproduction.* – 2021. – **141**. DOI: 10.5772/intechopen.98504.
3. Baczkowski T. Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes on the day of embryo transfer in women undergoing in vitro fertilization / T. Baczkowski, R. Kurfzawa // *Folia Histochemica et Cytobiologica.* – 2007. – **45** (1). – P. 73–77.
4. Immune cell subtypes and their function in the testis / S. Bhushan, M. S. Theas, V. A. Guazzone [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – **11**. – 583304. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583304.
5. T Lymphocytes and testicular immunity: A new insight into immune regulation in testes / J. Gong, Q. Zeng, D. Yu, Y-G. Yong-Gang Duan // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – **22** (1). – P. 57. DOI: 10.3390/ijms22010057.
6. Functional significance of lymphocytes in pregnancy and lymphocyte immunotherapy in infertility: A comprehensive review and update / R. Jafarpour, S. Pashangzadeh, S. Mehdizadeh [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2020. – **87**. – 106776. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106776.
7. The role of lymphocytic cells in infertility and reproductive failures in women with antiphospholipid antibodies / M. Krivonos, J. Kh. Khiozroeva, M. S. Zainulina [et al.] // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* – 2022. – **35** (5). – P. 871–877. DOI: 10.1080/14767058.2020.1732343.
8. Kaur G. Sertoli cells-immunological sentinels of spermatogenesis / G. Kaur, L. A. Thompson, J. M. Dufour // *Semin. Cell. Dev. Biol.* – 2014. – **0**. – P. 36-44. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.02.011.
9. Cheng C. Y. The blood-testis barrier and its implications for male contraception / C. Y. Cheng, D. D. Mruk // *Pharmacol. Rev.* – 2012. – **64** (1). – P. 16–64.
10. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells producing Th1 and Th17 cytokines are involved in the pathogenesis of autoimmune orchitis / P. Jacobo, C. Perez, M. S. Theas [et al.] // *Reproduction.* – 2011. – **141**. – P. 259–268.
11. Role of Infections in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Focus on mycobacteria / M. Bo, S. Jaseemi, G. Uras [et al.] // *Microorganisms.* – 2020. – **8** (10), 1459. – P. 1–19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101459>.
12. Fertility and infertility implications in rheumatoid arthritis; state of the art / A. Fattah, A. Asadi, M. R. H. Shayesteh [et al.] // *Inflamm. Res.* – 2020. – **69** (8). – P. 721–729. DOI: 10.1007/s00011-020-01362-w.
13. Alterations in both the activatory and inhibitory potential of peripheral blood CD4<sup>+</sup> T Cells un rheumatoid arthritis patients correlate with disease progression / A. Kosmaczewska, J. Swierkot, L. Cizak [et al.] // *Pathol. Oncol. Res.* – 2013. – **9**. DOI: 10.1007/s12253-013-9687-0.
14. Ling E. Increased proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T-cells in peripheral blood of children with Bahcet's disease / E. Ling, G. Shubinsky, J. Press // *Autoimmunity Reviews.* – 2007. – **6**. – P. 237–240.
15. Pierucci-Alves F. Transforming factor beta 1 induces tight junction disruption and loss of transepithelial resistance across porcine vas deferens epithelial cells / F. Pierucci-Alves, S. Yi, B.D. Schultz // *Biology of Reproduction.* – 2012. – **86** (2). – P. 1–8.
16. McInnes I. B. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / I. B. McInnes, G. Schett // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – **7**. – P. 429–442. DOI: 10.1038/nri2094.
17. Brennan F. M. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis / F. M. Brennan, I. B. McInnes // *J. Clin. Investig.* – 2008. – **118**. – P. 3537–3545. DOI: 10.1172/JCI36389.
18. Coutant F. Evolving concepts of the pathogenesis of rheumatoid arthritis with focus on the early and late stages / F. Coutant, P. Miossec // *Curr. Opin. Rheumatol.* – 2020. – **32**. – P. 57–63. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000664
19. CLP1 is a prognosis-related biomarker and correlates with immune infiltrates in rheumatoid arthritis / Z. Zhao, S. He, S. Tang [et al.] // *Front Pharmacol.* – 2022. – **13**. – P. 827215. DOI: 10.3389/fphar.2022.827215.
20. Mosaic of Autoimmunity / S. Alivernini, B. Tolusso, L. Petricca [et al.] // Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: Chapter 16 – Rheumatoid arthritis. – 2019.
21. Klareskog L. Rheumatoid arthritis / L. Klareskog, A. I. Catrina, S. Paget // *Lancet.* – 2009. – **373**. – P. 659–672. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60008-8.
22. McInnes I. B. The pathogenesis of rheumatoid arthritis / I. B. McInnes, G. Schett // *N. J. Med.* – 2011. – **365**. – P. 2205–2219. DOI: 10.1056/NEJMra1004965.
23. Rheumatoid arthritis synovial tissue harbours dominant B-cell and plasma-cell clones associated with autoreactivity / M. E. Doorenspleet, P. L. Klarenbeek, M. J. de Hair [et al.] // *Ann. Rheum. Dis.* – 2014. – **73**. – P. 756–762. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202861.
24. The IL-23-IL-17 immune axis: From mechanisms to therapeutic testing / S. L. Gaffen, R. Jain, A. V. Garg, D. J. Cua // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – **14**. – P. 585–600. DOI: 10.1038/nri3707.
25. Lubberts E. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis / E. Lubberts // *Nat. Rev. Rheumatol.* – 2015. – **11**. – P. 415–429. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.53.
26. Hussein H. M. The role of viral infections in the development of autoimmune diseases / H. M. Hussein, T. A. Rahal // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2019. – **45**. – P. 394–412. DOI: 10.1080/1040841X.2019.1614904.
27. Listing J. The risk of infections associated with rheumatoid arthritis, with its comorbidity and treatment / J. Listing, K. Gerhold, A. Zink // *Rheumatology.* – 2012. – **52**. – P. 53–61. DOI: 10.1093/rheumatology/kes305.
28. Venigalla S. S. K. A possible role for autoimmunity through molecular mimicry in alphavirus mediated arthritis / S. S. K. Venigalla, S. Premakumar, V. Janakiraman // *Sci. Rep.* – 2020. – **10**. – P. 938. DOI: 10.1038/s41598-019-55730-6.

## REFERENCES

1. Tahmasbpour, E., Balasubramanian, D, Agarwal, A. (2014). A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J. Assist. Reprod. Genet.*, 31, 1115-1137. DOI 10.1007/s10815-014-0280-6.
2. Zargar, M.H., Ahmad, F., Lateef, M., Malla, T.M. (2021). Understanding male infertility for promising ART. *Infertility and Assisted Reproduction*, 141. DOI: 10.5772/intechopen.98504.
3. Baczkowski, T., & Kurfzawa, R. (2007). Immunophenotypic profiles of peripheral blood lymphocytes on the day of embryo transfer in women undergoing in vitro fertilization. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45 (1), 73-77.
4. Bhushan, S., Theas, M.S., Guazzone, V.A., Jacob, O.P., Wang, M., Fijak, M., et al. (2020). Immune cell subtypes and their function in the testis. *Front Immunol.*, 11, 583304. DOI: 10.3389/fimmu.2020.583304.
5. Gong, J., Zeng, Q., Yu, D., Yong-Gang Duan, Y.-G. (2020). T Lymphocytes and testicular immunity: A new insight into immune regulation in testes. *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (1), 57. DOI: 10.3390/ijms22010057.
6. Jafarpour, R., Pashangzadeh, S., Mehdizadeh, S., Hashem Bayatipoor, H., Shojaei, Z., Motallebnezhad, M. (2020). Functional significance of lymphocytes in pregnancy and lymphocyte immunotherapy in infertility: A comprehensive review and update. *Int Immunopharmacol.*, 87, 106776. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106776.
7. Krivonos, M., Khiozroeva, J.Kh., Zainulina, M.S. et al. (2022). The role of lymphocytic cells in infertility and reproductive failures in women with antiphospholipid antibodies. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.*, 35 (5), 871-877. DOI: 10.1080/14767058.2020.1732343.
8. Kaur, G., Thompson, L.A., Dufour, J.M. (2014). Sertoli cells-immunological sentinels of spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 0, 36-44. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.02.011.
9. Cheng, C.Y., Mruk, D.D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.*, 64 (1), 16-64.
10. Jacobo, P., Perez, C., Theas, M.S. (2011). CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells producing Th1 and Th17 cytokines are involved in the pathogenesis of autoimmune orchitis. *Reproduction*, 141, 259-268.
11. Bo, M., Jasemi, S., Uras, G. (2020). Role of Infections in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Focus on mycobacteria. *Microorganisms*, 8 (10), 1459, 1-19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101459>.
12. Fattah, A., Asadi, A., Shayesteh, M.R.H., Hesari, F.H., Jamalzehi, S., Abbasi, M., et al. (2020). Fertility and infertility implications in rheumatoid arthritis; state of the art. *Inflamm. Res.*, 69 (8), 721-729. DOI: 10.1007/s00011-020-01362-w.
13. Kosmaczewska, A., Swierkot, J., Ciszak, L., et al. (2013). Alterations in both the activatory and inhibitory potential of peripheral blood CD4<sup>+</sup> T Cells in rheumatoid arthritis patients correlate with disease progression. *Pathol. Oncol. Res.*, 9. DOI 10.1007/s12253-013-9687-0.
14. Ling, E., Shubinsky, G., Press, J. (2007). Increased proportion of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T-cells in peripheral blood of children with Bahcet's disease. *Autoimmunity Reviews*, 6, 237-240.
15. Pierucci-Alves, F., Yi, S., Schultz, B.D. (2012). Transforming factor beta 1 induces tight junction disruption and loss of transepithelial resistance across porcine vas deferens epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 86 (2), 1-8.
16. McInnes, I.B., Schett, G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 429-442. DOI: 10.1038/nri2094.
17. Brennan, F.M., McInnes, I.B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, 118, 3537-3545. DOI: 10.1172/JCI36389.
18. Coutant, F., Miossec, P. (2020). Evolving concepts of the pathogenesis of rheumatoid arthritis with focus on the early and late stages. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 32, 57-63. DOI: 10.1097/BOR.0000000000000664.
19. Zhao, Z., He, S., Tang, S. (2022). CLP1 is a prognosis-related biomarker and correlates with immune infiltrates in rheumatoid arthritis. *Front. Pharmacol.*, 13, 827215. DOI: 10.3389/fphar.2022.827215.
20. Alivernini, S., Tulusso, B., Petricca, L., Ferraccioli, G., Gremese, E. (2019). *Mosaic of autoimmunity*. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: Chapter 16. Rheumatoid arthritis.
21. Klareskog, L., Catrina, A.I., Paget, S. (2009). Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 373, 659-672. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60008-8.
22. McInnes, I.B., & Schett, G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Eng J Med.*, 365, 2205-2219. DOI: 10.1056/NEJMra1004965.
23. Doorenspleet, M.E., Klarenbeek, P.L., de Hair, M.J., van Schaik, B.D., Esveldt, R.E., van Kampen, A.H., Gerlag, D.M., Musters, A., Baas, F., Tak, P.P., et al. (2014). Rheumatoid arthritis synovial tissue harbours dominant B-cell and plasma-cell clones associated with auto-reactivity. *Ann. Rheum. Dis.*, 73, 756-762. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-202861.
24. Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A.V., Cua, D.J. (2014). The IL-23-IL-17 immune axis: From mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.*, 14, 585-600. DOI: 10.1038/nri3707.
25. Lubberts, E. (2015). The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 11, 415-429. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.53.
26. Hussein, H.M., & Rahal, E.A. (2019). The role of viral infections in the development of autoimmune diseases. *Crit. Rev. Microbiol.*, 45, 394-412. DOI: 10.1080/1040841X.2019.1614904.
27. Listing, J., Gerhold, K., Zink, A. (2012). The risk of infections associated with rheumatoid arthritis, with its comorbidity and treatment. *Rheumatology*, 52, 53-61. DOI: 10.1093/rheumatology/kes305.
28. Venigalla, S.S.K., Premakumar, S., Janakiraman, V. (2020). A possible role for autoimmunity through molecular mimicry in alphavirus mediated arthritis. *Sci. Rep.*, 10, 938. DOI: 10.1038/s41598-019-55730-6.

## IMMUNO-PHENOTYPIC PROPERTIES OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF INFERTILE MEN WITH COMORBIDITIES

### Summary

**Introduction.** It is known that approximately 15 % of married couples suffer from infertility, with the malefactor accounting for almost 50 % of cases. According to the traditional method of evaluation, in 30 % of patients, the etiology of the male contribution to infertility remains unexplained and, thus, is identified as idiopathic. Therefore, the diagnosis of male infertility cannot be limited only a simple sperm analysis. The regulation of male reproductive function is multi-level, involving not only the endocrine system, but also the immune system. Male infertility is also observed with other accompanying pathologies, in particular, rheumatoid arthritis. For a better understanding of the immunopathogenic mechanisms of infertility, it is necessary to study the role of various immune factors.

**The aim of the study** – to evaluate the population composition and activation markers of peripheral blood lymphocytes of men with idiopathic infertility and autoimmune joint pathology.

**Research Methods.** The research was carried out on blood serum and seminal plasma of 45 infertile men aged 22–48: with idiopathic infertility (n=23) and autoimmune joint pathology – rheumatoid arthritis (n=22). 27 fertile healthy men of the same age were included in the control group. To determine the quantitative parameters of lymphocytes of the main populations and subpopulations in the blood of patients with idiopathic infertility and autoimmune pathology of the joints, the method of flow cytometry with monoclonal antibodies labeled with fluorescein (BD Biosciences, USA) was used. The number of lymphocytes was determined on a flow cytometer BD FACS Calibur (Becton Dickinson, USA).

**Results and Discussion.** It was shown that the number of lymphocytes of subpopulations practically did not differ in infertile men from similar indicators of the control group in terms of absolute values. However, it was found that in men with idiopathic infertility, there is a probable increase in the content of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-lymphocytes in the blood, from (0.357±0.185) to (0.504±0.220) G/l (p<0.05). No significant changes were found in autoimmune pathology. Infertile men with autoimmune pathology are distinguished from controls by increased numbers of CD8<sup>+</sup> cells and activated T-lymphocytes. The most deviations from control were registered in persons with idiopathic infertility: a reduced number of naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> lymphocytes with a simultaneous increase in the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T-cells, which indicates the conversion of naive T-lymphocytes into regulatory cells.

**Conclusions.** It was found that the development of infertility against the background of various accompanying pathologies is accompanied by changes in indicators of both systemic and local immune reactivity. The nature of these changes differs depending on the accompanying pathology. The study of the characteristic signs of immune reactivity disorders in infertile men with comorbidities make it possible to position some of them as reliable markers for predicting reproductive function disorders.

**KEY WORDS:** infertility; idiopathic infertility; rheumatoid arthritis; blood serum; population composition of lymphocytes.

Отримано 22.04.22

**Адреса для листування:** О. В. Мельник, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: viruszet8@gmail.com.