

## ПРОЗАПАЛЬНІ ЦИТОКИНИ В СІМ'ЯНІЙ ПЛАЗМІ ТА КРОВІ НЕПЛІДНИХ ЧОЛОВІКІВ

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

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

**РЕЗЮМЕ.** Приблизно в 50 % випадків непліддя в сімейних парах пов'язано з чоловічим фактором. Непліддя чоловіків без встановленого анамнезу та нормальних аналізів сперми називають «ідіопатичним непліддям». З'являється все більше даних про зв'язок непліддя з автоімунними патологіями, зокрема ревматоїдним артритом. Регуляція чоловічої репродуктивної функції є багаторівневою, із залученням як ендокринної, так і імунної систем. Механізми формування чоловічого непліддя дедалі частіше виявляються імунозалежними. Крім гормонів, не менш важливу роль в регуляції сперматогенезу відіграють цитокіни.

**Мета роботи** – дослідження ролі прозапальних і протизапальних цитокінів у сім'яній плазмі та сироватці крові для з'ясування їх ролі в сперматогенезі.

**Матеріал і методи.** Обстежено 61 інфертильного чоловіка віком 22–48 років, які умовно були поділені на 2 групи: 1 група – 28 чоловіків із системним автоімунним захворюванням – ревматоїдним артритом (РА); 2 група – 33 соматично здорових пацієнти з ідіопатичним непліддям. У контрольну групу увійшли 27 фертильних здорових чоловіків, репрезентативних за віком. Аналіз еякуляту проводили згідно із рекомендаціями ВООЗ (2010). Визначення концентрації цитокінів у сироватці крові та сім'яній рідині проводили імуноферментним методом.

**Результати.** У хворих із автоімунними захворюваннями (ревматоїдний артрит) було виявлено найвищий показник лейкоцитоспермії, що вказує на можливий тривалий запальний процес. При обстеженні хворих із автоімунним ревматоїдним артритом астенозооспермію виявили у 35,72 % пацієнтів, лейкоспермію у 64,28 %. У неплідних чоловіків обох дослідних груп кількісний показник лейкоцитів у спермі вірогідно перевищував показники контрольної групи. У пацієнтів із автоімунною патологією суглобів була зменшена концентрація TGF- $\beta$ 1 щодо контрольної групи, що могло сприяти посиленню запального процесу. Одночасно збільшувався рівень прозапального цитокіну IL-18 – у середньому в 2,52 раза. Зареєстровано також зменшення вмісту IL-1 $\beta$  – у 1,69 раза. Зростання концентрації прозапальних цитокінів IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  в 1,4 – 2,4 раза виявлено і при ідіопатичній неплідності.

**Висновки.** Функціонування імунної і репродуктивної систем чоловічого організму є тісно пов'язаним і взаємозалежним. Розлади імунної реактивності, що супроводжують розвиток автоімунної патології суглобів, асоційовані з порушеннями репродуктивної функції у чоловіків. Тісний зв'язок між порушеннями семіологічних показників і змінами у показниках прозапальних цитокінів у чоловіків з ідіопатичним непліддям переконливо доводить імуний генез цього захворювання.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ідіопатична неплідність чоловіків; ревматоїдний артрит; інтерлейкіни; сім'яна плазма; сироватка крові.

**Вступ.** Чоловіче непліддя є серйозною проблемою здоров'я, яка вражає приблизно 10–15 % пар у всьому світі [1, 2]. Приблизно в 50 % випадків основна проблема полягає в чоловічому факторі. Чоловіче непліддя є мультифакторним синдромом, що охоплює широкий спектр розладів. В основі чоловічого непліддя лежать інфекції статевих шляхів, дисфункція гаметогенезу, молекулярно-генетичні розлади, ендокринні порушення та імунологічні проблеми [2–4]. Крім того, повідомлялося, що такі фактори як спосіб життя, навколишнє середовище і куріння також впливають на гаметогенез [2, 5]. Непліддя чоловіків без встановленого анамнезу та нормальних аналізів сперми називають «ідіопатичним непліддям». Припускають, що такі фактори як окиснювальний стрес, індукований активними формами кисню (АФК), пошкодження ДНК сперматозоїдів і молекулярно-генетичні аномалії відповідальні за симптоми ідіопатичного непліддя [4].

Формування фертильності чоловіків вимагає інтеграції, взаємодії та функціонування різних типів клітин. Регуляція чоловічої репродуктивної

функції є багаторівневою, із залученням як ендокринної, так і імунної систем. Механізми формування чоловічого непліддя дедалі частіше виявляються імунозалежними. Імунологічна привілейованість яєчок забезпечується анатомічним бар'єром кров-яєчко та особливим толерантним станом імунної системи щодо антигенів, експресованих на чоловічих гаметах [6].

Крім гормонів, не менш важливу роль у регуляції сперматогенезу відіграють цитокіни [1, 2, 6]. Антигенпрезентуючі клітини, такі як макрофаги та ефекторні клітини, сприяють запаленню та опосередковують руйнування кісток і хрящів шляхом вивільнення прозапальних факторів, таких як фактор некрозу пухлин альфа (TNF- $\alpha$ ), інтерлейкін-1В (IL-1В), IL-6, IL-18, IL-23, активні форми кисню (АФК) і ферменти, що руйнують матрицю [3, 7–10]. Зокрема, TNF- $\alpha$  відіграє центральну роль у патогенезі захворювання шляхом підвищення рівня запальних цитокінів, активації макрофагів і лімфоцитів. З цих причин TNF- $\alpha$  широко ідентифікували як терапевтичну мішень, що призвело до розробки кількох інгібіторів TNF.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

TNF- $\alpha$  також стимулює продукування активних форм кисню (АФК) і пероксидацію ліпідів сперматозоїдів та апоптичні процеси [2, 7]. Ряд цитокінів, включаючи IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , циклічно продукуються клітинами Сертолі або сперматогенними клітинами під час циклів дозрівання сім'яного епітелію, що має вирішальне значення для контролю функціонування яєчок.

Вплив цитокінів на сперматозоїди у сім'яній рідині є фізіологічним явищем. Рівні IL-6, IL-10 та TNF- $\alpha$  позитивно корелюють із концентрацією, рухливістю та нормальною морфологією сперматозоїдів [11], а IL-6 навіть зі здатністю сперматозоїдів до пенетрації яйцеклітини [5]. Хоча зв'язок між прозапальними цитокінами, зокрема TNF- $\alpha$  і IL-6, та якістю сперми все ще дискутується [1]. У сім'яній рідині здорового чоловіка, крім невеликої кількості лейкоцитів (близько 1 млн/мл), виявлено цитокіни TGF- $\alpha/\beta$  та IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8. Деякі з цих молекул (IL-1 та TGF- $\beta$ ) синтезуються в яєчках, інші, вірогідно, в придатках чи інших чоловічих статевих залозах [8]. Для кращого розуміння імунопатогенетичних механізмів непліддя потрібне дослідження ролі різних імунних чинників.

**Мета** роботи – дослідження ролі прозапальних і протизапальних цитокінів у сім'яній плазмі та сироватці крові для з'ясування їх ролі в сперматогенезі.

**Матеріал і методи дослідження.** Набір матеріалу – крові та еякуляту – здійснювали в урологічному відділенні та клініко-діагностичній лабораторії КНП ЛОР «Львівська обласна клінічна лікарня». Було зібрано детальний анамнез щодо захворювань, а також медикаментозного та хірургічного лікування. Чоловікам було проведено ретельне обстеження сечостатевої системи, щоб встановити критерії виключення. У дослідження були включені особи з нормально розвиненими сечостатевими органами. Ідіопатичну форму непліддя, що характеризується не вивченим етіопатогенезом, діагностували за відсутністю запліднення впродовж року регулярного статевого життя пари та неможливістю з'ясування причини, що спричиняє хворобу. У дослідження також включали осіб зі встановленим діагнозом автоімунного ревматоїдного артриту (РА) 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 пацієнтів із РА діагностували патоспермію, зокрема астенозооспермію або лейкоцитоспермію.

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

Обстежено 61 інфертильного чоловіка віком 22–48 років, які умовно були поділені на 2 групи: 1 група – 28 чоловіків із системним автоімунним захворюванням – ревматоїдним артритом (РА); 2 група – 33 соматично здорових пацієнтів з ідіопатичним непліддям. У контрольну групу увійшли 27 фертильних здорових чоловіків, репрезентованих за віком.

Аналіз еякуляту проводили згідно із рекомендаціями ВООЗ (2010) [12]. Сім'яну плазму отримували шляхом центрифугування зразків еякуляту при 3000 г впродовж 10 хв та осадження сперматозоїдів. Забір крові шляхом венепункциї проводили з ліктьової вени у ранішні години, в умовах фізіологічного спокою, натще, у кількості 20 мл в пробірки, які стабілізували гепарином (кінцеве розведення 1:100).

Визначення концентрації цитокінів у сироватці крові та сім'яній рідині проводили імуноферментним методом. Для визначення цитокінів IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  у сироватці крові і сім'яній рідині використовували набори фірми DIACLONE (Франція), TGF- $\beta$ 1 – набір фірми DRG Diagnostics (ФРН). Дослідження проводили згідно з інструкціями виробників. Для проведення аналізу використовували мікроплейфотометр SUNRISE TECAN (Австрія). Сім'яну рідину та сироватку крові зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  до початку досліджень, найдовше впродовж двох тижнів.

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів *Microsoft Excel*. Визначали такі основні статистичні показники – середнє арифметичне значення ( $M$ ) та стандартну похибку ( $m$ ). Результати представлені як середнє арифметичне ( $M$ )  $\pm$  стандартна похибка середнього ( $m$ ). Кількість дослідів ( $n$ ) відповідає кількості осіб, досліджених у кожному випадку (кожен раз використовували сперматозоїди, отримані від одного пацієнта або практично здорового донора).

Достовірність змін між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей параметричних даних встановлювали за  $t$ -критерієм Стюдента. Критичні рівні достовірності при перевірці статистичних гіпотез у дослідженнях брали рівними 0,95, 0,99 та 0,999.

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

**Результати й обговорення.** На взаємозалежність між фертильністю і станом здоров'я впливає багато супутніх факторів, зокрема, куріння, ожиріння,

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення ріння, медикаментозне лікування тощо [2]. Вони негативно впливають як на параметри еякуляту, так і на стан здоров'я в цілому.

Першою чергою ми оцінювали спермограму. Аналіз еякуляту має принципове значення для діагностики та визначення ступеня тяжкості чоловічого фактора непліддя. Але, хоча воно ґрунтується на зміні кількісних параметрів еякуляту, важливе значення мають функціональні дефекти. Сперматогенез у людини триває майже 3 місяці, а вплив екзогенних чинників може зберігатися протягом 2–3 місяців.

Оцінку еякуляту проводили згідно з рекомендаціями ВООЗ (2010) [12]. У пацієнтів всіх обстеже-

них груп була знижена кількість нормальних сперматозоїдів та їх рухливість (табл. 1). У хворих із аутоімунними захворюваннями (ревматоїдний артрит) було виявлено найвищий показник лейкоцитоспермії, що вказує на можливий тривалий запальний процес. При обстеженні хворих із аутоімунним ревматоїдним артритом астенозооспермію виявили у 10 (35,72 %) пацієнтів, лейкоспермію – в 18 (64,28 %). Незначні кількісні і якісні зміни сперматозоїдів були виявлені також у групі чоловіків з ідіопатичним непліддям – у 15-ти пацієнтів (53,6 %). У неплідних чоловіків обох дослідних груп кількісний показник лейкоцитів у спермі вірогідно перевищував показники контрольної групи.

Таблиця 1. Оцінка спермограми інфертильних чоловіків з ідіопатичним непліддям та ревматоїдним артритом (M±m)

Показники	Ідіопатичне непліддя (n=33)	Ревматоїдний артрит (n=28)	Контроль (n=27)
Кількість сперматозоїдів в 1 мл, млн	38,42±4,73	49,37±6,82	58,27±7,51
Кількість сперматозоїдів в еякуляті, млн	107,9±12,64*	121,87±13,56	195,69±24,32
Рухливість, %	31,36±4,20*	42,16±5,42*	56,71±7,51
Кількість морфологічно нормальних сперматозоїдів, %	38,11±5,23*	39,17±5,36*	68,83±8,95
Лейкоцити, 10 <sup>6</sup> /мл	0,46±0,08	0,34±0,07	0,28±0,06

Примітка. \* – p<0,05 – вірогідність різниці порівняно з контролем.

Взаємодія клітин імунної системи між собою залежить від продукування ними багатьох біологічно активних речовин, зокрема й цитокінів, які можуть мати як прозапальну, так і протизапальну дію. Зміна цитокінового профілю є одним з імунопатогенетичних механізмів багатьох захворювань, зокрема репродуктивної системи [1, 13].

Системне порушення цитокінового балансу тісно пов'язане зі зрушеннями локальної цитокінової рівноваги в окремих біологічних системах, зокрема й у репродуктивному тракті. Для аналізу цитокінового профілю у сім'яній рідині та сир-

ватці крові визначали рівні таких цитокінів: прозапальні – інтерлейкін 1β (IL-1β), інтерлейкін 18 (IL-18), інтерлейкін 6 (IL-6), фактор некрозу пухлин α (TNF-α), інтерферон γ (IFN-γ) та, для порівняння, протизапальні – інтерлейкін 10 (IL-10), трансформуючий фактор росту β1 (TGF-β1).

На першому етапі досліджень ми аналізували цитокіновий профіль сім'яної рідини (табл. 2). Сім'яна рідина містить у своєму складі широкий спектр цитокінів, від рівня і властивостей яких залежать кінцеві етапи постестидулярного дозрівання сперматозоїдів і ефективність запліднення у фізіологічних умовах.

Таблиця 2. Концентрація основних цитокінів у сім'яній рідині неплідних чоловіків із різною патологією (M±m)

Показники, пг/мл	Ідіопатичне непліддя	Ревматоїдний артрит	Контроль
IL-1β	28,99±26,48*	44,34±39,79*	75,13±18,11
IL-6	41,33±31,08	57,22±40,82	27,49±19,76
IL-18	23,54±19,07	24,25±16,94*	9,62±5,61
TNF-α	20,02±14,42	16,22±18,27	12,39±4,40
IFN-γ	79,40±17,48*	68,63±16,58	59,76±18,01
TGF-β1	151,18±93,58	95,70±45,47*	116,28±47,97
IL-10	16,21±12,50	13,29±12,71	11,78±3,69

Примітка. \* – p<0,05 – вірогідність різниці порівняно з контролем.

Із даних, наведених у таблиці 2, можна бачити, що у хворих із аутоімунною патологією суглобів була зменшена концентрація TGF-β1 щодо контрольної групи, що могло сприяти посиленню

запального процесу. Одночасно зростав рівень такого прозапального цитокіну як IL-18 – у середньому в 2,52 раза. Зареєстровано також зменшення вмісту IL-1β – у 1,69 раза.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

Зростання концентрації прозапальних цитокінів IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  в 1,4 – 2,4 раза виявлено і при ідіопатичній неплідності. Також, що цікаво, зростала концентрація і протизапальних цитокінів IL-10 і TGF- $\beta$ 1.

Ростові фактори із сім'яної рідини відіграють позитивну роль в преімплантаційному розвитку та імплантації ембріона. При запальному процесі уrogenітального тракту провідна роль належить цитокінам. Також вони потенціюють реалізацію прозапальних ефектів інших медіаторів запалення. IL-1 $\beta$  за умов норми сприяє дозріванню сперматозоїдів, за умов патології полегшує розвиток запальної реакції, не тільки діючи хемотаксично на нейтрофіли та моноцити, а й сприяючи виділенню гістаміну, що пришвидшує формування всього каскаду запалення [14]. IL-6 синтезується моноцитами і макрофагами під впливом IL-1, проявляє прозапальні властивості. У сім'яній рідині та мембранах сперматозоїдів підвищений рівень IL-6 позитивно корелює з рівнем пероксидного окиснення ліпідів і негативно – з рухливістю сперматозоїдів та їх кількістю, оскільки пригнічує синтез ДНК при мейозі сперматогенних клітин [15].

Протизапальний цитокін IL-10 у сім'яній рідині здорових чоловіків міститься у підвищених концентраціях, бо підтримує імунологічний баланс на місцевому рівні та захищає сперматозоїди від пошкодження. Рівень TNF- $\alpha$  у сім'яній рідині вірогідно корелює із кількістю лейкоцитів та їх субпопуляцій в еякуляті, тому може служити індикатором наявності інфекції чи запалення. Підвищений його рівень не впливає на здатність до запліднення, але негативно діє на рухливість та ступінь пошкодження ДНК у сперматозоїдах та на весь сперматогенез, оскільки пригнічує синтез тестостерону клітинами Лейдіга [1, 2, 16, 17].

Цитокін TGF- $\beta$ 1 у сім'яній рідині здійснює імунорегуляторний вплив на клітинні елементи жіночого статевого тракту задля забезпечення

сперматозоїдам умов для виживання та збереження запліднювальної здатності [18]. Цитокін IFN- $\gamma$  є прозапальним цитокіном, підвищений рівень якого у сім'яній рідині відображає наявність інфекції або автоімунного захворювання. При автоімунному орхіті IFN- $\gamma$  функціонує у синергизмі із IL-12 [19], який, своєю чергою, взаємодіє із IL-18 у реалізації багатьох своїх функцій. IL-18 належить до родини IL-1 і також продукується активованими макрофагами. Важливою функцією IL-18 є регуляція функціонально відмінних субпопуляцій Т-хелперів, необхідних для клітинно-опосередкованої імунної відповіді. Він посилює синтез FasL, який опосередковує цитотоксичну дію НК-клітин, та разом з IL-12 впливає на функції НК-клітин (індукція синтезу IFN- $\gamma$ , посилення цитотоксичності і проліферації) [20].

Підвищений рівень IL-18 у сім'яній рідині корелює із зниженням рухливості сперматозоїдів [21]. IL-18 пригнічує шкідливі впливи інфекції/запалення на сперматогенез, посилюючи проліферацію гермінативних клітин, тому його можна назвати паракринним захисним фактором у чоловічих гонадах [21].

У наших дослідженнях виявлений взаємозв'язок між рівнем цитокінів і патологічними змінами сперматозоїдів. Порушення у кількості і рухливості сперматозоїдів було діагностовано на тлі зниження концентрації IL-1 $\beta$  – (44,34 $\pm$ 39,79) пг/мл проти (75,13 $\pm$ 18,11) пг/мл в контролі ( $p < 0,05$ ), збільшення IL-6 – (57,22 $\pm$ 70,82) пг/мл проти (27,49 $\pm$ 19,76) пг/мл ( $p < 0,05$ ), підвищення TNF- $\alpha$  – (16,22 $\pm$ 18,27) пг/мл проти (12,39 $\pm$ 4,40) пг/мл ( $p > 0,05$ ). Таким чином, знижена рухливість сперматозоїдів і їх низька кількість виявлялися при переважанні прозапальних цитокінів у сім'яній рідині.

Наступним завданням було визначити концентрацію основних цитокінів у крові чоловіків із непліддям (табл. 3). Так, виявлено, що при автоімунному ревматоїдному артриті концентрація IL-18 у

Таблиця 3. Концентрація основних цитокінів у сироватці крові неплідних чоловіків (M $\pm$ m)

Показники, пг/мл	Ідіопатичне непліддя (n=33)	Ревматоїдний артрит (n=28)	Контроль (n=27)
TNF- $\alpha$	2,99 $\pm$ 2,17	7,46 $\pm$ 25,64	3,36 $\pm$ 3,05
IFN- $\gamma$	24,32 $\pm$ 12,46*	27,77 $\pm$ 46,29*	9,17 $\pm$ 6,21
IL-1 $\beta$	2,72 $\pm$ 2,23	9,87 $\pm$ 28,68	3,61 $\pm$ 2,45
IL-6	6,76 $\pm$ 9,73*	14,29 $\pm$ 24,52*	2,37 $\pm$ 1,67
IL-10	3,71 $\pm$ 3,49*	11,66 $\pm$ 46,47	1,24 $\pm$ 1,75
IL-18	287,69 $\pm$ 143,15*	268,22 $\pm$ 119,34*	196,79 $\pm$ 131,71
TNF- $\alpha$	2,99 $\pm$ 2,17	7,46 $\pm$ 25,64	3,36 $\pm$ 3,05
IFN- $\gamma$	24,32 $\pm$ 12,46*	27,77 $\pm$ 46,29*	9,17 $\pm$ 6,21
IL-10	3,71 $\pm$ 3,49*	11,66 $\pm$ 46,47	1,24 $\pm$ 1,75
TGF- $\beta$ 1	548,23 $\pm$ 58,17*	539,72 $\pm$ 77,51	479,23 $\pm$ 78,75

Примітка. \* –  $p < 0,05$  щодо контрольних значень.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення сироватці крові неплідних чоловіків перевищувала, в середньому в 1,38 раза, показники фертильних чоловіків, рівень IL-6 був вищим в 7,04 раза, а показник концентрації IFN- $\gamma$  перевищував норму більше, ніж утричі. Підвищені сироваткові рівні прозапальних цитокінів є характерною ознакою порушення імунної реактивності при аутоімунній патології [22]. Суттєві зміни цитокінового профілю сироватки крові були зафіксовані у чоловіків із діагностованим ідіопатичним непліддям. Статистично вірогідно зростав рівень прозапальних цитокінів: IL-18 – у 3,02 раза, IL-6 – у 3,16 раза, IFN- $\gamma$  – у 2,73 раза. Паралельно збільшувалася концентрація протизапальних цитокінів: IL-10 – у 3,09 раза, TGF- $\beta$ 1 – у 1,14 раза.

Отже, загальною відмінною особливістю зміни цитокінового профілю неплідних чоловіків обох дослідних груп було збільшення концентрації прозапальних цитокінів, особливо IFN- $\gamma$ . Підвищення сироваткового рівня цього цитокіну є свідченням системної прозапальної активації імунної системи. Крім того, IFN- $\gamma$  залучений у процес переключення антитілогенезу до синтезу IgG. Ключова роль у формуванні цитокінового профілю сироватки крові належить Т-хелперам. Популяція Т-хелперів включає в себе кілька субпопуляцій, з яких найбільш важливими є Т-хелпери 1 і 2 типів

(Тх1 і Тх2). Цитокіни, продуковані Тх1, гальмують продукцію цитокінів Тх2-профілю і пригнічують диференціювання наївних Т-лімфоцитів за цим профілем. І навпаки, цитокіни Тх1-профілю є антагоністами імунної реакції за Тх2-профілем [23].

Т-хелпери відіграють важливу роль у розвитку запалення, так як є індукторами адаптивної імунної відповіді. Дисбаланс Т-хелперів 1-го і 2-го профілів і продукованих ними цитокінів є основою для розвитку хронічних запальних захворювань. Крім того, баланс цих клітин у період активації імунної відповіді визначає її подальшу форму: чи буде вона переважно клітинною, чи гуморальною. Однак співвідношення між цитокінами не абсолютно відображає їх продукцію Т-хелперами 1-го чи 2-го профілів, оскільки за умов запалення TNF- $\alpha$ , наприклад, продукується не тільки Тх1-лімфоцитами, але і моноцитами/макрофагами, а IL-10 – крім Тх2-лімфоцитів, продукується ще і Тх3-лімфоцитами та деякими іншими клітинами. При цьому співвідношення між загальною синтезованою кількістю IL-10 та TNF- $\alpha$  у сироватці крові і, особливо, у сім'яній рідині використовується для оцінки фертильної здатності [15]. З огляду на це ми провели аналіз співвідношення кількісних показників сироваткових рівнів цитокінів із протизапальною спрямованістю (табл. 4).

Таблиця 4. Показники співвідношення IL-10/IFN- $\gamma$ , IL-10/TNF- $\alpha$  у крові обстежених чоловіків (M  $\pm$  m)

Обстежені групи	IL-10/TNF- $\alpha$	IL-10/IFN- $\gamma$
Контроль (n=27)	0,28 $\pm$ 0,59	0,24 $\pm$ 0,18
Чоловіки з ідіопатичним непліддям (n=33)	1,94 $\pm$ 1,02*	0,18 $\pm$ 0,16
Чоловіки, хворі на ревматоїдний артрит (n=28)	2,98 $\pm$ 1,93	0,42 $\pm$ 1,12

Примітка. \* –  $p < 0,05$  щодо контрольних значень.

У цьому аналізі ми оцінювали співвідношення цитокінів, які є антагоністами: IL-10/IFN- $\gamma$ , IL-10/NGF- $\alpha$ . Проаналізовані показники характеризувалися значною індивідуальною варіабельністю. Однак, виявлено тенденцію до зниження показника співвідношення IL-10/IFN- $\gamma$  практично у всіх неплідних чоловіків, що свідчить про прозапальну активацію імунної системи. Імунна система діє як єдиний цілісний механізм, і у фізіологічних умовах синтез цитокінів з різноспрямованою дією, як правило, є взаємозалежним. Тому важливими є кореляційні зв'язки, у першу чергу, між про- і протизапальними цитокінами. У деяких випадках цитокіни з антагоністичною дією гальмують синтез один одного. В іншому випадку надсинтез цитокінів однієї спрямованості викликає гомеостатичне посилення синтезу групи цитокінів протилежної спрямованості [24]. Як правило, різні патологічні стани супроводжуються змінами кількості і характеру кореляційних взаємозв'язків між різними показниками імунної реактивності, у тому числі й сироватковими

рівнями цитокінів різної спрямованості, у порівнянні з кореляційним портретом здорових осіб.

У нашому випадку у здорових фертильних чоловіків виявлено три статистично вірогідних позитивних кореляційних взаємозв'язки: TGF- $\beta$ 1 – IFN- $\gamma$ , IL-10 – IL-18 та IL-10 – TNF- $\alpha$ . У чоловіків з контрольної групи синтез IL-18 і TNF- $\alpha$  врівноважувався продукцією IL-10, а IFN- $\gamma$  – TGF- $\beta$ 1 (табл. 5).

Водночас, у хворих із аутоімунною патологією суглобів кореляційної залежності між цитокінами різної спрямованості взагалі не простежувалося, що може свідчити про розбалансованість у формуванні адекватної імунної відповіді. В цих групах пацієнтів простежувалися і негативні кореляційні зв'язки, особливо при хронічних запальних хворобах. У чоловіків з ідіопатичним непліддям виявилось три вірогідні кореляційні зв'язки, відмінні від тих, які було виявлено у здорових фертильних чоловіків. Важливо відзначити, чи зміни цитокінів у сироватці крові корелювали з відповідними показниками у сім'яній рідині.

Таблиця 5. Кореляційні зв'язки (рангові кореляції Spearman) між цитокінами у сироватці крові неплідних чоловіків

Групи цитокінів	Ідіопатичне непліддя	Ревматоїдний артрит	Контроль
IL-10 – IL-1 $\beta$	0,272408	0,432838	0,206628
IL-10 – IL-6	0,259813	0,180408	0,170343
IL-10 – IL-18	0,508948	0,270664	0,407734*
IL-10 – TNF- $\alpha$	0,222228	0,004119	0,533632*
IL-10 – IFN- $\gamma$	0,383951	0,370274	0,149463
TGF- $\beta$ 1 – IL-1 $\beta$	0,637889*	0,172547	0,179902
TGF- $\beta$ 1 – IL-6	-0,586876*	-0,029026	0,207968
TGF- $\beta$ 1 – IL-18	-0,125248	0,104100	0,141260
TGF- $\beta$ 1 – TNF- $\alpha$	0,695551*	0,220608	0,265217
TGF- $\beta$ 1 – IFN- $\gamma$	0,184943	0,208828	0,450431*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  щодо контрольних значень.

При ідіопатичному неплідді також низький рівень IL-1 $\beta$  у сім'яній рідині був при низькій концентрації цього цитокіну у сироватці крові ( $p < 0,05$ ). Такий результат може пояснити знижену кількість сперматозоїдів у чоловіків цієї групи, адже IL-1 $\beta$  у фізіологічних концентраціях сприяє дозріванню сперматозоїдів.

Щодо TGF- $\beta$ 1, то цей цитокін у високій концентрації фізіологічно присутній у епідидимальному епітелії та інших компартментах чоловічої статеві системи, а зниження його рівня може відобразитися на епітеліальній бар'єрній функції та цілісності бар'єру кров-яєчко. Це посприяє транспорту лейкоцитів, що, своєю чергою, матиме наслідок – локальний запальний процес [6, 25–28].

**Висновки.** Функціонування імунної і репродуктивної систем чоловічого організму є тісно пов'язаним і взаємозалежним. Розлади імунної реактивності, що супроводжують розвиток аутоімунної патології суглобів, асоційовані з порушеннями репродуктивної функції у чоловіків.

На основі дослідження показників концентрації цитокінів у сироватці крові та сім'яній рідині та аналізу їх взаємозв'язку з порушеннями семіологічних показників у неплідних чоловіків з ідіопатичним непліддям та аутоімунним ревматоїдним артритом було виявлено, що характер цих змін відрізняється залежно від наявної патології. Хоча існують деякі загальні закономірності патологічних відхилень у функціонуванні імунної системи усіх обстежених нами неплідних чоловіків: прозапальний цитокінетичний профіль сироватки крові і зниження концентрації IL-1 $\beta$  одночасно з підвищенням концентрації IFN- $\gamma$  у сім'яній рідині. Найбільша кількість відхилень від норми показників імунної реактивності виявлена у неплідних чоловіків із аутоімунним ревматоїдним артритом.

Тісний зв'язок між порушеннями семіологічних показників і змінами у показниках прозапальних цитокінів у чоловіків з ідіопатичним непліддям переконливо доводить імунний генез цього захворювання.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Pro-inflammatory cytokines and microRNAs in male infertility / H. Attia, F. Finocchi, M. Orciani [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2021. – Vol. 48 (8). – P. 5935–5942.
2. Tahmasbpour E. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutation, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART) / E. Tahmasbpour, D. Balasubramanian, A. Agarwal // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2014. – Vol. 31. – P. 1115–1137.
3. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases / M. Akdis, A. Aab, C. Altunbulakli [et al.] // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2016. – Vol. 138 (4). – P. 984–1010.
4. Reactive oxygen species secreted by leukocytes in semen induce self-expression of interleukin-6 and affect sperm quality / X. Li, M. Ni, S. Xing, Y. Yu // *Am. J.*

*Mens Health.* – 2020. – Vol. 14 (5). DOI: 10.1177/15579883220970053.

5. Effects of *Ureaplasma urealyticum* infection on the male reproductive system in experimental rats / Y. Wang, Z.-W. Wu, L.-F. Zhang [et al.] // *Andrologia.* – 2010. – Vol. 42. – P. 297–301.

6. Cheng C. Y. The blood-testis barrier and its implications for male contraception / C. Y. Cheng, D. D. Mruk // *Pharmacol. Rev.* – 2012. – Vol. 64 (1). – P. 16–64.

7. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on human sperm motility and apoptosis / A. Perdichizzi, F. Nicoletti, S. La Vignera [et al.] // *J. Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 27 (2). – P. 152–162.

8. Cytokines in the blood and semen of infertile patients / A. Havrylyuk, V. Chopyak, Y. Boyko, I. Kril, M. Kurpysz // *Cent. Eur. J. Immunol.* – 2015. – Vol. 40 (3). – P. 337–344.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

9. Role for tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1-beta (IL-1beta) determination in seminal plasma during infertility investigation / W. Eggert-Kruse, I. Kiefer, C. Beck, T. Demirakca, T. Strowitzki // *Fertil. Steril.* – 2007. – Vol. 87 (4). – P. 810–823.
10. Zhang C. Inhibition of the interleukin-6 signaling pathway: a strategy to induce immune tolerance / C. Zhang, X. Zhang, X. H. Chen // *Clin. Rev. Allergy Immunol.* – 2014. – Vol. 47. – P.163–173.
11. Inflammatory cytokine profiles of semen influence cytokine responses of cervicovaginal epithelial cells / C. L. Rametse, A. O. Adefuye, A. J. Olivier [et al.] // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 2721. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02721.
12. World Health Organization reference values for human semen characteristics / T. G. Cooper, E. Noonan, S. von Eckardstein [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – Vol. 16 (3). – P. 231–245.
13. Cytokine expression in the seminal plasma and its effects on fertilisation rates in an IVF cycle / S. Seshadri, M. Bates, G. Vince, D. Jones // *Andrologia.* – 2011. – Vol. 43 (6). – P. 378–386. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2010.01042.x.
14. Sliwa L. Effect of transforming growth factors (TGF alpha and TGF beta) on human sperm chemotactic migration in vitro / L. Sliwa // *Arch. Androl.* – 2003. – Vol. 49 (2). – P. 155–159.
15. Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates / O. Vera, M. Vasquez, M. G. Munos // *Theriogenology.* – 2003. – Vol. 60. – P. 553–558.
16. Association of TNF $\alpha$ , TNFR1, and TNFR2 Polymorphism With Sperm Concentration and Motility / L. A. Lazaros, N. V. Xita, A. L. Chatzikyria-kidou // *Journal of Andrology.* – 2012. – Vol. 33. – P. 74–80.
17. Dual role of immune cells in the testis: protective or pathogenic for germ cells? / C. V. Perez, M. S. Theas, P. V. Jacobo [et al.] // *Spermatogenesis.* – 2013. – Vol. 3, No. 1. – P. e23870. Pages 12.
18. 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. – Vol. 86, No. 2. – P. 1–8.
19. Testicular autoimmunity / P. Jacobo, V.A. Guazzone, M.S. Theas [et al.] // *Autoimmun. Rev.* – 2011. – Vol. 10. – P. 201–204.
20. Khadka A. Interleukins in therapeutics / A. Khadka // *PharmaTutor.* – 2014. – Vol. 2 (4). – P. 67–72
21. Presence of IL-18 in testicular tissue of fertile and infertile men / A. Komsy, M. Huleihel, M. Ganaïem [et al.] // *Andrologia.* – 2012. – Vol. 44. – P. 1–8.
22. Intratesticular expression of mRNA of both Interferon  $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  is significantly increased in experimental autoimmune orchitis in mice / H. Terayama, M. Naito, N. Qu [et al.] // *Journal of Reproduction and Development.* – 2011. – Vol. 57, No. 2. – P. 296–302.
23. The role of IFN- $\gamma$  in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity / A. N. Theofilopoulos, S. Koundouris, D. H. Kono [et al.] // *Arthritis Res.* – 2001. – Vol. 3. – P. 136–141.
24. Pripp A. H. The correlation between pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic subdural hematoma patients assessed with factor analysis / A. H. Pripp, M. Stanišić // *PLOS One.* – 2014. – Vol. 9 (2). – P. e90149. DOI: 10.1371/journal.pone.0090149.
25. Cheng C. Y. The blood-testis barrier and its implications for male contraception / C. Y. Cheng, D. D. Mruk // *Pharmacol. Rev.* – 2012. – Vol. 64, No 1. – P. 16–64.
26. Expression of the TGF-beta1 system in human testicular pathologies / C. R. Gonzalez, M. E. Matzkin, M. B. Frungieri [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2010. – Vol. 8. – P. 148. Pages 11. DOI: 10.1186/1477-7827-8-148.
27. Kutteh W. H. Immunology and Reproduction. Chapter 1 / W. H. Kutteh, A. K. Stanic, D. J. Schust // *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition).* – 2019. – P. 301–321.
28. Role of infection in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: focus on mycobacteria / M. Bo, S. Jasemi, G. Uras [et al.] // *Microorganisms.* – 2020. – Vol. 8. – P. 1459. DOI: 10.3390/microorganisms8101459.

## REFERENCES

1. Attia, H., Finocchi, F., Orciani, M., Mehdi, M., Zidi Jrah, I., & Lazzarini, R. (2021). Pro-inflammatory cytokines and microRNAs in male infertility. *Mol. Biol. Rep.*, 48(8), 5935-5942.
2. Tahmasbpour, E., Balasubramanian, D., & Agarwal, A. (2014). A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutation, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J. Assist. Reprod. Genet.*, 31, 1115-1137.
3. Akdis, M., Aab, A., Altunbulakli, C., Azkur, K., Costa, R.A., & Cramer, R. (2016). Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 138(4), 984-1010.
4. Li, X., Ni, M., Xing, S., & Yu, Y. (2020). Reactive oxygen species secreted by leukocytes in semen induce self-expression of interleukin-6 and affect sperm quality. *Am. J. Mens Health.*, 14(5), 15579883230970053. DOI: 10.1177/15579883220970053.
5. Wang, Y., Wu, Z.-W., & Zhang L.-F. (2010). Effects of Ureaplasma urealyticum infection on the male reproductive system in experimental rats. *Andrologia*, 42, 297-301.
6. Cheng, C.Y., & Mruk, D.D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.*, 64(1), 16-64.
7. Perdichizzi, A., Nicoletti, F., La Vignera, S., Barone, N., D'Agata, R., & Vicari, E. (2007). Effects of tumor necrosis factor-alpha on human sperm motility and apoptosis. *J. Clin. Immunol.*, 27(2), 152-62.
8. Havrylyuk, A., Chopyak, V., Boyko, Y., Kril, I., & Kurpiz, M. (2015). Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 40(3), 337-344.
9. Eggert-Kruse, W., Kiefer, I., Beck, C., Demirakca, T., & Strowitzki, T. (2007). Role for tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1-beta (IL-1beta) determination in seminal plasma during infertility investigation. *Fertil. Steril.*, 87(4), 810-823.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення

10. Zhang, C., Zhang, X., & Chen X.H. (2014). Inhibition of the interleukin-6 signaling pathway: a strategy to induce immune tolerance. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 47, 163-173.
11. Rametse, C.L., Adefuye, A.O., & Olivier, A.J. (2018). Inflammatory cytokine profiles of semen influence cytokine responses of cervicovaginal epithelial cells. *Front. Immunol.*, 9, 2721. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02721.
12. Cooper, T.G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H.W., & Behre, H.M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum. Reprod. Update*, 16(3), 231-245.
13. Seshadri, S., Bates, M., Vince, G., & Jones, D. (2011). Cytokine expression in the seminal plasma and its effects on fertilisation rates in an IVF cycle. *Andrologia*, 43(6), 378-386. DOI: 10.1111/j.1439-0272.2010.01042.x.
14. Sliwa, L. (2014). Effect of transforming growth factors (TGF alpha and TGF beta) on human sperm chemotactic migration in vitro. *Arch. Androl.*, 49(2), 155-159.
15. Vera, O., Vasquez, M., & Munos, M.G. (2003). Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates. *Theriogenology*, 60, 553-558.
16. Lazaros, L.A., Xita, N.V., & Chatzikyria-Kidou, A.L. (2012). Association of TNF $\alpha$ , TNFR1, and TNFR2 polymorphism with sperm concentration and motility. *Journal of Andrology*, 33, 74-80.
17. Perez, C.V., Theas, M.S., & Jacobo, P.V. (2013). Dual role of immune cells in the testis: protective or pathogenic for germ cells? *Spermatogenesis*, 3(1), e23870. Pages 12.
18. 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.
19. Jacobo, P., Guazzone, V.A., & Theas, M.S. (2011). Testicular autoimmunity. *Autoimmun. Rev.*, 10, 201-204.
20. Khadka, A. (2014). Interleukins in therapeutics. *PharmaTutor.*, 2(4), 67-72.
21. Komsky, A., Huleihel, M., & Ganaiem, M. (2012). Presence of IL-18 in testicular tissue of fertile and infertile men. *Andrologia*, 44, 1-8.
22. Terayama, H., Naito M., & Qu, N. (2011). Intratesticular expression of mRNA of both Interferon  $\gamma$  and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  is significantly increased in experimental autoimmune orchitis in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 57(2), 296-302.
23. Theofilopoulos, A.N., Koundouris, S., & Kono, D.H. (2001). The role of IFN- $\gamma$  in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis. Res.*, 3, 136-141.
24. Pripp, A.H., & Stanišić, M. (2014). The correlation between pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic subdural hematoma patients assessed with factor analysis. *PLOS One*, 9(2), e90149. DOI: 10.1371/journal.pone.0090149.
25. Cheng, C.Y., & Mruk, D.D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.*, 64(1), 16-64.
26. Gonzalez, C.R., Matzkin, M.E., & Frungieri, M.B. (2010). Expression of the TGF-beta1 system in human testicular pathologies. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 8, 148. DOI: 10.1186/1477-7827-8-148.
27. Kutteh, W.H., Stanic, A.K., & Schust, D.J. (2019). Immunology and Reproduction. Chapter 13. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*, 301-321.
28. Bo, M., Jasemi, S., & Uras, G. (2020). Role of infection in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: focus on mycobacteria. *Microorganisms*, 8, 1459. DOI: 10.3390/microorganisms8101459.

## PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES IN SEMINAL PLASMA AND BLOOD OF MEN WITH INFERTILITY

©O. V. Melnyk, M. Z. Vorobets, R. V. Fafula, O. K. Onufrovych, Z. D. Vorobets

*Danylo Halytsky Lviv National Medical University*

**SUMMARY.** In approximately 50 % of cases, infertility of married couples is associated with the male factor. Male infertility without an established history and normal sperm analysis is called «idiopathic infertility». There is more and more data on the connection between infertility and autoimmune pathologies, in particular, rheumatoid arthritis. Regulation of male reproductive function is multilevel, involving both the endocrine and immune systems. The mechanisms of formation of male infertility are more and more often found to be immune-dependent. In addition to hormones, cytokines play an equally important role in the regulation of spermatogenesis.

**The aim** – to study the role of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in seminal plasma and blood serum, to clarify their role in spermatogenesis.

**Material and Methods.** 61 infertile men aged 22–48 were examined, who were conditionally divided into 2 groups: 1 group – 28 men with a systemic autoimmune disease – rheumatoid arthritis (RA); 2 group – 33 somatically healthy patients with idiopathic infertility. The control group included 27 fertile healthy men representative by their age. Ejaculate analysis was performed in accordance with WHO recommendations (2010). Determinations of the concentration of cytokines in blood serum and seminal fluid were carried out by the immunoenzymatic method.

**Results.** In patients with autoimmune diseases (rheumatoid arthritis) the highest rate of leukocytospermia was observed, indicating a possible long-term inflammatory process. When examining patients with autoimmune rheumatoid arthritis, asthenozoospermia was found in 35.72 % of patients, leucospermia in 64.28 %.

In of both research groups of infertile men, the quantitative indicator of leukocytes in the sperm probably exceeded the indicators of the control group. In patients with autoimmune joint pathology, the concentration of TGF- $\beta$ 1 was reduced compared to the control group, which could contribute to the increase of the inflammatory process. Simultane-



Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему, випадок з практики, короткі повідомлення  
ously, the level of the pro-inflammatory cytokine IL-18 increased by an average of 2.52 times. A 1.69 – fold decrease in IL-1 $\beta$  content was also recorded. An increase of the concentration of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  in 1.4–2.4 times was also found at idiopathic infertility.

**Conclusions.** The functioning of the immune and reproductive systems of the male body is closely related and interdependent. Immune response disorders accompanying the development of autoimmune joint pathology are associated with male reproductive function disorders. The close connection between violations of semiological indicators and changes of pro-inflammatory cytokines in organisms of men with idiopathic infertility convincingly proves the immune genesis of this disease.

**KEY WORDS:** idiopathic male infertility; rheumatoid arthritis; interleukins; seminal plasma; blood serum.

Отримано 22.10.2022

Електронна адреса для листування: viruszet8@gmail.com