

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Гаврилюк
Анна Мирославівна

УДК 616.697-02:616-092.19

**МЕХАНІЗМИ ФОРМУВАННЯ ІМУНОЗАЛЕЖНОГО НЕПЛІДДА В ОСІБ
ЧОЛОВІЧОЇ СТАТІ З ОРГАНСПЕЦИФІЧНИМИ ТА СИСТЕМНИМИ
АУТОІМУННИМИ ХВОРОБАМИ**

03.00.09 – імунологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2017

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України

Науковий

консультант: доктор медичних наук, професор
Чоп'як Валентина Володимирівна,
Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького МОЗ України,
завідувач кафедри клінічної імунології та алергології

Офіційні

опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Сківка Лариса Михайлівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, професор кафедри мікробіології та
імунології ННЦ «Інститут біології та медицини»;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Лазаренко Людмила Миколаївна,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України, провідний науковий співробітник відділу
проблем інтерферону та імуномодуляторів;

доктор медичних наук, професор
Чернишов Віктор Павлович,
ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН
України», завідувач лабораторії імунології

Захист відбудеться 29 травня 2017 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини». ауд. 434

Поштова адреса: 01061, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитися у Науковій бібліотеці ім. М.Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58

Автореферат розісланий 29 квітня 2017 року
Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Н.Г.Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми дослідження. Непліддя є одним із важливих показників стану здоров'я: при його частоті 10-20% можна стверджувати про прямі репродуктивні втрати в людській популяції. У світі частота жіночого непліддя складає 30%, чоловічого – 30%, поєданого – 30-40% [Sohrabvand F., 2015; Ventimiglia E., 2015]. Згідно з оцінкою ВООЗ, відсоток чоловічого непліддя на світовому рівні становить 40-60% [Ruan J., 2010; Akhter S., 2011; Веропотвелян Н.П., 2012; Поворознюк М.В., 2015]. В Європі «чоловічий» фактор непліддя встановлюється у 45-50% неплідних пар [Jungwirth A., 2012].

Демографічна ситуація в Україні останніми роками вкрай ускладнилася [Зборовська Н.В., 2014], на непліддя страждає близько 1 млн подружніх пар, тобто 15-17% [Поворознюк М.В., 2012]. При цьому структура непліддя дещо інша – у 79,4% неплідних пар причинним вважається «жіночий» фактор, а у 20,6% – «чоловічий». З 2006 року до теперішнього часу встановлено зростання частоти «чоловічого» фактора непліддя майже у три рази. Діагностика чоловічого непліддя в Україні утруднена і недосконала, реєстрація таких пацієнтів - неповна, а профілактичні заходи щодо його попередження не впроваджуються зовсім.

Основними причинами чоловічого непліддя є: генетичні [Oates R.D., 2011]; імуногенетичні [Varla-Leftherioti M., 2011; Jarazo-Dietrich S., 2012; O'Flaherty C., 2015; Kurtz M.P., 2015]; вади розвитку статевих органів: крипторхізм, варикоцеле і т.п. [Chen Sh.-Sh., 2012]; гормональні розлади [Bohring C., 2003]; інфекції, що передаються статевим шляхом [Горпинченко И.И., 2010; Freour T., 2010; Sarkar O., 2011]; імунні порушення [Zorn B., 2010], алергопатологія [Revonta M., 2010]. Дедалі частіше виявляється, що імунозалежні причини формування чоловічого непліддя пов'язані із змінами вродженого та набутого імунітету [Чернишов В.П., 1990; Bhushan S., 2016; Hedger M.P., 2016], але досі їх вивчали тільки в контексті наявності антиспермальних антитіл (АСАТ) [Mainhardt A., 2011; Agarwal A., 2015]. Найважливішими патогномонічними факторами в розвитку чоловічого непліддя є антигени сперматозоїдів [Bhushan S., 2009; Kurpisz M., 2010], бо їх комплекси з антитілами активують метаболічні процеси в сперматозоїдах, стимулюючи продукцію вільних кисневих радикалів, порушують акросомальну реакцію, навіть впливають на розвиток зародка [Nikolaeva M.A., 2001]. На сьогоднішній день не підлягає сумніву, що власне запальні процеси в яєчках [Sakai Y., 2010], оксидативний та нітрозативний стрес є найбільш небезпечними чинниками для сперматогенезу [Jiwakanon J., 2010; Abu Elheija M., 2011; Kampfner C., 2012; Lee N.P.Y., 2008]. Запальний процес є асоційований із важливими регуляторними молекулами – цитокінами, які теж впливають на продукцію АСАТ [Галимов Ш.Н., 2011; Lazaros L.A., 2012; Tremellen K., 2008]. Недослідженим залишається характер антиспермального антитілогенезу (локальний чи системний), ізотипу АСАТ, сайту їх прикріплення та здатності активувати антитілозалежні клітинні імунні реакції, які уражують тканину яєчок [Carp J.A., 2012]. Не менш актуальною проблемою є вивчення порушень

репродуктивної функції жінки, які відображають вторинне неплоддя партнера [Saxena P., 2008; Dekker G., 2011].

Рівень загальної захворюваності, в тому числі і на системні захворювання сполучної тканини, зростає, як і ризик впливу загального стану організму на репродуктивну систему чоловіка [Kovacs M., 2012]. Розлади репродуктивної функції з розвитком вторинного аутоімунного орхіту і погіршенням якості еякуляту виявлено у хворих на системні аутоімунні захворювання (системний васкуліт, ревматоїдний артрит, склеродермія тощо) та у хворих на органоспецифічні аутоімунні захворювання – діабет 1-го типу та базедову хворобу [Revonta M., 2010; Fatima P., 2010]. Раннє формування системної аутоімунної хвороби у хлопчиків загрожує ускладненнями розвитку їх статевої системи [Ravelli A., 2007]. Невідомо, чи залишається схильність до продукції аутоантитіл, в тому числі й антиспермальних, у дорослих чоловіків за умов наявності імунозалежної патології в дитинстві [Boyko Y., 2009].

Особливо актуальним є вивчення таких гіпотетичних імунопатогенетичних механізмів формування чоловічого неплоддя: 1) відміна толерантності до антигенів сперматозоїдів після пошкодження бар'єру кров-яєчко; 2) зміна структури спермальних антигенів та антитіл до них під впливом гострого, хронічного та латентного перебігу запального процесу з участю оксидативного стресу; 3) «антигенна мімікрія» як причина продукції АСАТ; 4) порушення механізмів апоптозу статевих клітин (незрілих чи дефективних), утворення неоаутоантигенів і синтез АСАТ до них [Kamieniczna M., 2010]. Доступні у практичній медицині методи діагностики імунозалежного чоловічого неплоддя є рутинними і не виявляють причин погіршення функцій сперматозоїдів. Пошук і розробка нових лабораторних методів надалі є актуальною проблемою [Wiser A., 2009; Rosen M.P., 2010; Brandes M., 2011], бо це дозволить встановити провідний механізм руйнування гермінативних клітин, особливо в контексті наявності у пацієнтів імунозалежних хвороб.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках науково-дослідної теми „Оцінка взаємозв'язку імунологічних, генетичних, гормональних механізмів розвитку вторинних системних васкулітів та поліімунопатології за умов системних захворювань сполучної тканини та оцінка ефективності та безпеки застосування терапії супроводу біофлавоноїдів та бігуаноїдів” (№ д/р 0112U000166) кафедри клінічної імунології та алергології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Мета і задачі дослідження. Метою було дослідити імунозалежні механізми неплоддя в експерименті та клініці у самців-щурів та пацієнтів чоловічої статі з аутоімунними захворюваннями та іншою супутньою патологією, розробити алгоритм його діагностики у досліджуваних групах.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Оцінити в експерименті на тваринах з індукованим системним аутоімунним захворюванням гістологічні характеристики органів репродуктивного тракту та показники локальної і системної імунної реактивності.

2. Дослідити імуногенетичні показники (HLA-антигени, KIR-рецептори) як можливі фактори ризику порушень репродуктивної функції у хлопчиків з крипторхізмом.
3. Дослідити характеристики антиспермальних антитіл у сироватці крові хлопчиків з крипторхізмом та ЮІА та у неплідних чоловіків з аутоімунною та іншою супутньою патологією.
4. Визначити вміст маркерних для системної аутоімунної патології аутоантитіл у неплідних чоловіків з аутоімунною та іншою супутньою патологією.
5. Провести визначення кількісних показників лімфоцитів основних популяцій та субпопуляцій, а також їх активаційних маркерів у крові неплідних чоловіків з аутоімунною та іншою супутньою патологією.
6. Визначити рівні цитокінів у неплідних чоловіків з аутоімунною та іншою супутньою патологією та оцінити взаємозв'язок між ними.
7. Розробити алгоритм лабораторних обстежень чоловіків з непліддям імунозалежного генезу.

Об'єкт дослідження – імунні, імуногенетичні та біохімічні процеси формування непліддя у осіб чоловічої статі в експерименті та клініці.

Предмет дослідження – особливості оксидаційної та антиоксидаційної систем та апоптозу гермінативних клітин тварин з індукованим системним аутоімунним захворюванням, стану місцевого та системного імунітету у пацієнтів чоловічої статі з аутоімунною та іншою супутньою патологією.

Методи дослідження. У роботі використано біохімічні (визначення вмісту продуктів оксидаційних реакцій, встановлення рівня активності індикаторних ензимів та продуктів їх реакції в сироватці крові), цитологічні (проточна цитофлуориметрія), фізико-хімічні (електрофорез), нефелометричний (імунохімічний аналіз), імуноферментні, морфологічні (гістологічне дослідження зрізів тканин), імуногістохімічні, статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Розширено існуючі уявлення про провідні імунозалежні механізми формування непліддя в осіб чоловічої статі із аутоімунними хворобами та іншою супутньою патологією. У експерименті на тваринах з індукованим системним захворюванням (колагеновий артрит) уперше виявлено, що механізми імунозалежного пошкодження плідної функції ґрунтуються на посиленні синтезу клітинами імунної системи реактивних форм кисню та азоту, наслідком дії яких є підвищення активності апоптозу сперматогенних клітин. Отримано нові дані про взаємозв'язок імунозалежного чоловічого непліддя з наявністю антиспермальних антитіл, змінами рівнів прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-18, ІФН- γ), кількісних показників лімфоцитів окремих субпопуляцій (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/25⁺), збільшенням відносного числа лейкоцитів з експресією активаційного маркера (HLA-DR⁺), порушенням показників оксидаційного та нітрозацийного стресу і, як наслідок, посиленням апоптозу гермінативних клітин. Вперше виявлено зв'язки між рівнями цитокінів ІЛ-6, 10, 18, ІФН- γ , ФНП- α та числом імунокомпетентних клітин CD8⁺, CD16/56⁺, CD4⁺25⁺ в крові; кількістю сперматозоїдів, їх рухливістю, відсотком дегенеративних форм,

лейкоспермією та рівнем антиспермальних антитіл. У хворих на крипторхізм уперше виявлені імуногенетичні маркери синтезу органоспецифічних антиспермальних антитіл: наявність HLA-DRB1*07,08, та активаторних KIR-рецепторів (KIR-2DS5) на НК-клітинах, що дає підстави вважати цю хворобу за патогенезом органоспецифічним аутоімунним захворюванням.

На підставі вивчення семіологічних та імунологічних показників підтверджено наявність імунопатологічних змін у неплідних пацієнтів з системними захворюваннями сполучної тканини, варікоцеле та соматично здорових чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, а також уперше виявлено наявність імунопатологічних змін у пацієнтів з ідіопатичним непліддям. Отримано нові дані про наявність АСАТ у хлопчиків з імунозалежними захворюваннями (крипторхізм, ЮІА). Уперше виявлено та охарактеризовано ізотиповий склад АСАТ та сайти їх зв'язування за умов розвитку системної аутоімунної патології (ЮІА) у дитячому віці, які можуть складати ризик формування непліддя у дорослому віці.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами дисертаційної роботи розроблено алгоритм комплексного лабораторного дослідження показників імунної системи для диференційної діагностики імунозалежного непліддя у осіб чоловічої статі на тлі аутоімунної та іншої супутньої патології. На основі розробленого алгоритму сформульовані практичні рекомендації. Результати роботи впроваджено в навчальний процес на кафедрах клінічної імунології та алергології, дитячої хірургії, урології, патологічної анатомії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, використовуються у діагностично-лікувальному процесі медичних закладів міст Львова, Івано-Франківська, Чернівців.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Автором було складено план проведення досліджень і підібрано оптимальні методи для реалізації поставлених завдань. Аналіз та інтерпретація одержаних результатів, викладення висновків дисертаційної роботи обговорювалися з науковим консультантом, д.мед.н., проф. Чопяк В.В. Дисертантом не була використано ідей співавторів публікацій. Експериментальну частину дисертаційної роботи виконано самостійно у віварії ЛНМУ імені Данила Галицького і у співпраці із завідувачем лабораторії молекулярних механізмів міжклітинної взаємодії Відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України д.б.н. Ю. Я. Котом (м. Львів, Україна). Дослідження активних форм кисню та азоту виконувалося в Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (м. Київ, Україна). Визначення антиспермальних антитіл у сироватці крові та сім'яній рідині виконано у дорослих чоловіків самостійно в імунологічній лабораторії Регіонального центру клінічної імунології та алергології (м. Львів, Україна) та спільно із науковим співробітником відділу імунобіології репродукції Інституту генетики людини м. Познань (Польща) доктором Маженою Каменічною. Типування HLA-антигенів II-го класу у хлопчиків з крипторхізмом виконано самостійно (ізоляція ДНК) та спільно з науковим співробітником лабораторії тканинного типування Інституту експериментальної імунології та терапії м.

Вроцлав (Польща) доктором Беатою Новаковською. Типування KIR-рецепторів та їх епітопів виконано самостійно (ізоляція ДНК) та спільно з науковим співробітником цієї ж лабораторії Інституту експериментальної імунології та терапії (м. Вроцлав, Польща) доктором Вандою Непекло-Міневською. Морфологічне дослідження та опис гістологічних зрізів експериментальних тварин виконано спільно із доцентом кафедри патологічної анатомії ЛНМУ ім. Данила Галицького В. І. Вовком. Імуногістохімічне дослідження зрізів тканин експериментальних тварин та їх опис виконані спільно із завідувачем патоморфологічної лабораторії діагностично-консультативного центру „CSD Health care” к.мед.н О. О. Селезньовим (м. Київ, Україна). Спільно із доцентом кафедри організації охорони здоров'я ЛНМУ ім. Данила Галицького Т. Г. Гутором проведено статистичну обробку результатів дослідження. Самостійно проаналізовано і узагальнено отримані результати, написано усі розділи дисертації. Результати роботи автор опублікувала у статтях, доповідала на національних і міжнародних форумах. Усі матеріали в опублікованих роботах значною мірою належать автору.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації були представлені на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Імунологія репродукції» (Львів, Україна, 2006); 9-ій конференції «Молекулярна біологія в діагностиці інфекційних хвороб та біотехнології» (Варшава, Польща, 2006); науково-практичному семінарі з міжнародною участю «Діагностика та імуноterapia імунозалежного непліддя чоловіків та жінок» (Черкаси, Україна, 2008); 13-му з'їзді Польського Товариства клінічної та експериментальної імунології (Краків, Польща, 2008); міжнародній науково-практичній конференції «Імуноterapia, імунопрофілактика в клінічній практиці: реалії та перспективи» (Львів, Україна, 2009); курсі лекцій в Університетській клініці Одеського національного медичного університету «Імунологічні аспекти інфертильності» (Одеса, Україна, 2010 року); міжнародній науково-практичній конференції «Імуноterapia, імунопрофілактика: реалії та перспективи» (Львів, Україна, 2010); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Імуногенетика та репродуктивні втрати» Львів, Україна, 2010); симпозіумі фахівців України з репродуктивної медицини (Харків, Україна, 2011); 9-му європейському конгресі з імунології репродукції (Копенгаген, Данія, 2011); 14-му з'їзді Польського Товариства клінічної та експериментальної імунології (Гданськ, Польща, 2011); міжнародній науково-практичній конференції «Імунопрофілактика – нові підходи» (Київ, Україна, 2012); VI-му Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (Сімферополь-Місхор, Україна, 2012); об'єднаному міжнародному конгресі Американського Товариства імунології репродукції та Європейського товариства імунології репродукції (Гамбург, ФРН, 2012); I-му Всеукраїнському конгресі «Молекулярна алергологія та імунологія» (Одеса, Україна, 2013); науково-практичній конференції «Актуальні питання лабораторної діагностики в акушерстві та гінекології» (Львів, Україна, 2013); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання ендокринології,

клінічної імунології та алергології» (Чернівці, Україна, 2013); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Репродуктивне здоров'я: актуальні питання сьогодення» (Київ, Україна, 2013); міжнародній науково-практичній конференції «Нові стратегії в діагностиці та лікуванні алергічних, аутоімунних, імунодефіцитних захворювань» (Трускавець, Україна, 2014); другій науково-практичній конференції з міжнародною участю «Гармонія гормонів – основа здоров'я жінки» (Київ, Україна, 2014); 11-му конгресі Європейського та Угорського Товариств імунології репродукції (Будапешт, Угорщина, 2014); 15-му з'їзді Польського Товариства клінічної та експериментальної імунології (Вроцлав, Польща, 2014); 15-му ювілейному з'їзді Товариства польських дитячих хірургів (Гданськ, Польща, 2014); міжнародному симпозиумі «Урологія майбутнього» (м. Кам'янець-Подільський, Україна, 2015); 13-му конгресі Міжнародного та Європейського товариства імунології репродукції (Ерфурт, Німеччина, 2016); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Патологія слизових оболонок у жінок: роль мікробіоти» (Київ, Україна, 2016); міжнародній конференції «Різдвяні читання з імунології та алергології» (Львів, Україна, 2017).

Публікації. Основні результати дослідження та положення дисертації опубліковані у 109 публікаціях: розділах 7 монографій та підручників; 65 наукових статтях, із яких 28 – у провідних наукових фахових виданнях України, 37 – у інших журналах за спеціальністю; 31 тезах конференцій та конгресів, двох винаходах. За кордоном опубліковано: три розділи у монографіях (два – англійською, один – польською), 11 статей (10 – англійською, 1 – польською) та 15 тез (англійською мовою).

Структура та обсяг дисертації. Текст дисертації викладений на 308 сторінках (основна частина – 270 сторінки), ілюстрований: 33 таблиць, 50 рисунки. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, семи розділів результатів власних досліджень, аналізу й узагальнень результатів дослідження, висновків і практичних рекомендацій, чотирьох додатків. Перелік використаних літературних джерел містить 382 назви, із них 25 – вітчизняних авторів і 357 – зарубіжних авторів.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень.

Робота складається з експериментальної та клінічної частини. Індукція колагенового артриту в щурів. Усього в експерименті були задіяні 21 безпородних щурів-самців (вік 10-12 тижнів) із середньою вагою 200 г та 11 контрольних інтактних тварин. Тварини знаходилися у віварії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при температурі 20-22 °С, відносна вологість 50-70%, з 12-ти годинним циклом світло/темрява. Протягом експерименту про тварин турбувалися згідно із законодавством України. Для імунізації використовували розчин: неповний ад'ювант Freund (Calbiochem-Behring Corp., США) та колаген типу II із бичачої

перегородки із стандартною концентрацією 2,93 мг/мл. Дослідні тварини були рандомізовані за вагою і розподілені на дві групи: контрольні інтактні щурі (n=11), щурі з індукованим колагеновим артритом (n=21). Колагеновий артрит викликали за двома схемами. У першій схемі використали 10 тварин, індукцію проводили за методом Pandey, 2010 (вводили підшкірно у п'ять точок вздовж хребта розчин колагену Collagen Bovine, type II в 15 mM оцтової кислоти з неповним ад'ювантом Freund з концентрацією 2 мг/мл). Наступний цикл експерименту проводили за другою схемою (Leonaviciene L. et al., 2008), імунізуючи 11 тварин: розчин колагену Collagen Bovine, type II в 15 mM оцтової кислоти з неповним ад'ювантом Freund з концентрацією 2 мг/мл вводили по 100 мкл у колінний суглоб щура. Реімунізацію проводили через 24 години. Критерієм служив набряк суглобів на лапках щурів. Найсуттєвіші зміни отримали при імунізації за другою схемою. Усі наступні дослідження проводили через 3 місяці після індукції захворювання у біопсійному матеріалі, сироватці та плазмі крові.

Біохімічні дослідження. Для визначення білків сироватки крові щурів використовували метод електрофорезу (Горячковський А.М., 1998). Вміст загального білка, креатиніну, сечовини, активність аспартатамінотрансферази (АсАТ), аланінамінотрансферази (АлАТ) та лужної фосфатази (ЛФ) визначали на автоматичному біохімічному аналізаторі Chem Well 2900 (Awareness Technology Inc., США) із застосуванням стандартних наборів реактивів фірми „ELITech Diagnostics” (Франція). У плазмі крові щурів вимірювали також показники оксидативного і нітрозативного стресу. Для визначення активності NO-синтаз (Ca^{2+} -залежної та Ca^{2+} -незалежної) використовували комбінацію класичного методу із сучасною його модифікацією, пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитрулінуза кольоровою реакцією з антипірином. Для визначення активності iNOS використовували аналогічну методику. Сумарну активність sNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS. Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного L-цитруліну за 1 хв. в розрахунку на 1 мг загального білка в пробі. Кількість нітрит-аніону (NO_2^-) визначали в безбілкових аліквотах гомогенатів плазми крові в колориметричній реакції за допомогою реактиву Griess методом Green L., 1982. Кількість нітрат-аніону (NO_3^-) визначали бруциновим методом в безбілкових аліквотах проб спектрофотометричним методом. Базальну аргіназну активність оцінювали за утворенням сечової кислоти, її вміст визначали в колориметричній реакції в аліквотах плазми крові за допомогою реактивів фірми „Філіст-Діагностика” (Дніпропетровськ, Україна). Визначення вмісту H_2O_2 проводили за Conte D., 1996. Визначення вмісту ТБК-позитивного продукту малонового діальдегіду (МДА) проводили за Сибірною Н.О., 2006. Швидкість генерації $\text{O}_2^{\cdot-}$ визначали за окисненням цитохрому c (фірма Sigma-Aldrich, США), оцінюючи зміну оптичного поглинання при 550 нм за Kuthan H., 1982. Швидкість генерації OH^{\cdot} -радикалу визначали в інкубаційній суміші з 2-дезоксид-рибозою (фірма Sigma-Aldrich, США), як приріст МДА за

показником оптичного поглинання при 532 нм за Humphries K.M., 1998. Вміст H_2S визначали за методом Svenson A., 1980.

Макроскопові дослідження. Аутопсійне дослідження експериментальних тварин проведено за загальноприйнятою методикою. При макроскоповому дослідженні оцінювали розмір, форму, анатомічну будову органів (суглобів, серця, печінки, нирок, селезінки, яєчок, додаткових залоз).

Гістологічні дослідження. Фрагменти органів фіксували у 1 % розчині формаліну, препарати виготовляли за загальноприйнятою методикою, забарвлювали гематоксилін-еозином. Препарати оцінювали за допомогою фотосистеми OLYMPUS C5060, збільшення 400.

Імуногістохімічні дослідження. У другому циклі експерименту проводили дослідження яєчок та додатків з використанням антитіл до Caspase 3 та FAS-ligands за стандартним імуногістохімічним методом з використанням щурячих моноклональних антитіл проти щурячих каспази 3 та FasLigand виробництва фірми DBS (США). Препарати оцінювали за допомогою фотосистеми OLYMPUS C5060, збільшення 400.

Клінічна частина. Було обстежено 230 хворих чоловічої статі з верифікованими діагнозами: 110 хлопчиків різного віку з крипторхізмом, 49 хлопчиків, які хворіли на ентезит-артрит асоційовану форму (ЕАА) ювенільного ідіопатичного артриту (ЮІА); 18 чоловіків із системними захворюваннями сполучної тканини (СЗСТ), 10 чоловіків із хронічними запальними захворюваннями, 22 хворих на варікоцеле, 13 соматично здорових чоловіків з ідіопатичним непліддям, 8 соматично здорових чоловіків, дружини яких мали 2-3 викидні у першому триместрі вагітності. Контрольна група складалася із 176 здорових хлопців та 27 фертильних здорових чоловіків у віці 22-35 років. Хлопці з крипторхізмом та ЮІА лікувалися у Львівській комунальній міській дитячій клінічній лікарні та Регіональному спеціалізованому дитячому медичному центрі. Набір дорослих неплідних чоловіків здійснювався у ревматологічному та урологічному відділеннях ЛОКЛ, консультативно-поліклінічному відділенні РЦКІА ЛОКДЦ, Львівському обласному центрі планування сім'ї. Усі обстежені чоловіки перебували в стадії клінічної ремісії.

Загальноклінічні семіологічні дослідження. Дослідження еякуляту проводили за стандартними методами згідно з рекомендаціями ВООЗ (2010) та критеріями Kruger (1986). Воно складалося з визначення об'єму еякуляту, в'язкості, кількості сперматозоїдів у всьому еякуляті та 1 мл еякуляту, рухливості, морфології та життєздатності; оцінювали наявність лейкоцитів та спермаглютинації, відсоток живих сперматозоїдів. Морфологію сперматозоїдів оцінювали на фіксованих мазках сперматозоїдів після забарвлення за Раранісолаоу на світловому мікроскопі, збільшення 900 разів.

Імунологічні дослідження. Для визначення кількості Т-лімфоцитів $CD3^+$, В-лімфоцитів $CD19^+$, НК-клітин $CD16^+/56^+$, субпопуляцій Т-лімфоцитів: Т-лімфоцитів-хелперів $CD4^+$, Т-лімфоцитів-цитотоксичних $CD8^+$, Т-лімфоцитів регуляторних $CD4^+CD25^+$ та Т-лімфоцитів $CD4^+CD25^-$; пізніх активаційних маркерів $CD3^+HLA-DR^+$ та $CD3^-HLA-DR^+$ застосовували метод проточної

цитометрії із моноклональними антитілами, міченими флуоресцеїном. Кількість цих лімфоцитів визначали на проточному цитометрі BD FACS Calibur (Becton Dickinson, США), використовуючи реактиви тієї ж фірми. Для визначення прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-18, ІФН- γ , ФНП- α та протизапального цитокіну ІЛ-10 у сироватці крові і сім'яній рідині використовували набори фірми WESTOR-BEST (Новосибірськ, Російська Федерація), антизапального цитокіну ТФР- β 1 – набір фірми DRG Diagnostics (ФРН). Методики проводили згідно до інструкцій. Для проведення аналізу використовували автоматичний лічильник SUNRISE (Австрія) з автоматичним додатком Microwell ELISA (США). Визначали також концентрацію системних аутоантитіл у сироватці крові та сім'яній рідині фертильних і неплідних чоловіків. Для виявлення ІgG-антитіл до загальних ядерних антигенів використовували набори фірми DAI (США), ІgM- і ІgG-антитіл до фосфоліпідів – ORGENTEC Diagnostika GmbH (ФРН), ІgM- і ІgG-антитіл до β 2-глікопротеїну 1 – ORGENTEC Diagnostika GmbH (ФРН), ІgG-антитіл до мієлопероксидази – Хема (Російська Федерація). Дослідження проводили на імуноферментному аналізаторі SUNRISE (Австрія) з автоматичним додатком Microwell ELISA (США). Аутоантитіла ізотипів ІgM і ІgG до структурних компонентів клітини (концентрацію або наявність) визначали на аналізаторі Bio-Plex 2200 (Bio-Rad, США) за допомогою тест-систем цієї ж фірми. Визначення антиспермальних антитіл проводили у сироватці крові та сім'яній рідині за допомогою непрямого тесту IDIBT з навантаженими антитілами полістироловими намистинами (Bio-Rad Laboratories, Santa Ana, California 92705, USA). Результат оцінювали на фазово-контрасному мікроскопі, збільшення 900.

Імуногенетичні дослідження. Типування HLA-антигенів II-го класу та визначення KIR-рецепторів. Ізоляцію геномної ДНК проводили, використовуючи протеїназу K і комерційний набір для екстракції ДНК (Isoquick Nucleic Extraction Kit, Invitex GmbH, Berlin, Germany). HLA-алелі II-го класу типували, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію з послідовно специфічними праймерами (PCR-SSP) – метод з низькою роздільною здатністю. Типування HLA-DRB1*, DQB1* було проведене з використанням набору для типування Dynal DRB1*, DQB1* (AIISet SSP DRB1, DGB1, Dynal Biotech. Ltd., Bromborough, UK) і виконане згідно з інструкцією фірми-виробника. Ампліфікація PCR проводилася з використанням геномної ДНК (50 нг/мл), суміші зразків (Dynal Biotech. Ltd., Bromborough, UK), PlatinumTaq-полімераза (InvitrogenBrazil, 5U/мл), та праймерів (24 для HLA-DRB1 та 8 для HLA-DQB1). Для виявлення KIR-рецепторів геномну ДНК ізолювали за допомогою Maxwell* 16 LEV Blood DNA Kit (Cat. AS1290, Promega). Усі зразки збирали разом на інструментальній платформі типу AS2000 і виконували протокол Maxwell* 16 з «ДНК–кров», для визначення генів KIR використовували набір Olerup SSPKIR- генотипування, який містив Taq-полімеразу (Olerup GmbH, Vienna, Austria) на ПЛР-аналізаторі Biometra Thermocyclers (Німеччина). Антигени HLA-C групи C1 та C2 виявляли, використовуючи Olerup SSP®KIR HLA ліганд (Olerup) за відповідною інструкцією фірми-виробника.

Статистичні дослідження. Статистичне вичислення показників проводили непараметричними методами з допомогою стандартних комп'ютерних програм (Statistica Version 6, StatSoft, Inc.; SPSS Statistics 17.0, IBM) з визначенням середнього арифметичного (M), стандартного відхилення (SD). Різницю між незалежними групами обчислювали за Mann-Whitney, залежними – за Wilcoxon. Використовували також класичний критерій χ^2 за Пірсоном (Pearson). Різницю вважали істотною при $p < 0,05$. При малих частотах для покращення точності χ^2 -квадрат використовували поправку Йетса (Yates). Проводили також кореляційний аналіз Spearman з вичисленням R, Pearson з визначенням коефіцієнта кореляції r, дисперсійний аналіз (ANOVA). Для визначення чинників ризику розвитку непліддя і неефективності лікування використовували множинний регресійний аналіз та дискримінантний аналіз. Прогностичне значення показників оцінювали за наступними критеріями: специфічність, чутливість, точність діагностичного тесту, прогностична цінність позитивного і від'ємного результатів.

Результати досліджень та їх обговорення.

Моделювання системного захворювання сполучної тканини у щурів-самців (колаген-індукованого артрити). При індукції колагенового артрити в щурів у першому циклі експерименту (рання стадія формування артрити) виявили ознаки аутоімунної реакції: лімфоцитарну інфільтрацію в печінці, яечках та їх додатках, помірне накопичення макрофагів у стромі додатків. У сироватці крові вірогідно збільшилася активність лужної фосфатази ($Z = -2,31$, $p = 0,020922$): до $515,05 \pm 87,66$ од/л (у контролі $288,05 \pm 28,14$ од/л), концентрація аланінамінотрансферази зросла у середньому в 1,94 рази, індекс de Ritis знизився в 1,88 рази, альбуміно-глобуліновий коефіцієнт - на 26,82%. Рівень пероксиду водню вірогідно зріс у середньому в 2,65 рази, швидкість генерації гідроксильного радикалу - у 3,38 рази, супероксиданіон-радикалу $O_2^{\cdot-}$ - на 143,5% у порівнянні з інтактними щурами. Вірогідно зросла концентрація МДА до $2,533 \pm 0,141$ мкмоль/л (у контрольній групі – $1,142 \pm 0,207$ мкмоль/л ($Z = -3,97$, $p = 0,000071$); знизилася активність конститутивного кальцій-залежного *de novo* синтезу оксиду нітрогену – на 26,22% порівняно з групою інтактних щурів ($Z = 3,64$, $p = 0,000268$). Інтенсивність індукцйбельного синтезу оксиду нітрогену зросла, активність кальцій-незалежної NO-синтази збільшилася в 2,03 рази порівняно з контрольною групою ($Z = -3,97$, $p = 0,000071$). Частка фізіологічного конститутивного синтезу оксиду нітрогену (окисного метаболізму L-аргініну за відсотком cNOS) у сироватці крові здорових щурів у середньому становила $51,75 \pm 2,72\%$, а у щурів з ранньою стадією формування артрити знизилася до $28,08 \pm 4,09\%$ ($Z = 3,97$, $p = 0,000071$). Щодо неокислювального метаболізму L-аргініну, то активність аргінази зросла в 6,39 рази порівняно з контрольною групою. Співвідношення аргіназа/NOS достовірно збільшилося в 4,6 рази порівняно з інтактними щурами. Вірогідно зросли рівні NO_3^- до $0,879 \pm 0,119$ нмоль/л (контроль $0,307 \pm 0,121$ нмоль/л, $Z = -3,97$, $p = 0,000071$) і NO_2^- до $0,062 \pm 0,008$ нмоль/л (контроль $0,023 \pm 0,006$ нмоль/л, $Z = -3,97$, $p = 0,000071$) у

плазмі крові. А маркер співвідношення реактивних форм нітрогену і кисню (АФН/АФК) – $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ був незмінним. Вірогідно зросла концентрація сечової кислоти до $0,101 \pm 0,016$ нмоль/л порівняно з контрольною групою $0,030 \pm 0,008$ нмоль/л ($Z = -3,97$, $p = 0,000071$).

У другому циклі експерименту (артрит, що розвинувся), у суглобах пальців досліджуваних щурів виявляли морфологічні ознаки підвищеної проліферації синовіоцитів, вогнищева інфільтрація сполучної тканини лімфоцитами, макрофагами та плазматичними клітинами. У серці визначалося повнокрів'я дрібних судин, у печінці - слабка дистрофія гепатоцитів у різних відділах печінкових часточок, помірна вогнищева інфільтрація лімфоцитами переважно за ходом порталних трактів та синусоїдів. У нирках виявлялося помірно виражене повнокрів'я дрібних судин кіркового і мозкового шарів, слабка інфільтрація лімфоцитами, макрофагами та нейтрофільними лейкоцитами, у селезінці - помірне повнокрів'я червоної пульпи та незначна гіперплазія білої пульпи. У сім'яних канальцях яєчок виявляли помірні морфологічні ознаки сперматогенезу, у їх стромі за ходом дрібних судин визначалася незначна інфільтрація лімфоцитами, макрофагами та нейтрофілами, злущування зародкових клітин і тубулярна атрофія, а у дрібних кровоносних судинах - збільшена кількість ендотеліоцитів з вакуольною дистрофією. У стромі додатків виявлялася помірно виражена інфільтрація поодинокими лімфоцитами, макрофагами, нейтрофільними лейкоцитами. При ініціації артриту в яєчках спостерігався початок лімфоцитарної інфільтрації, а при розвинутому артриті вона була більш виражена з розвитком васкуліту, а у другій серії експерименту ми виявили більш виражені зміни в суглобах, яєчках та їх додатках. У порівнянні з першим циклом експерименту, з усіх досліджуваних біохімічних параметрів змінився тільки рівень γ -глобулінів, який зріс, інші показники практично не змінилися. Напруженість оксидативного/нітрозативного стресу при сформованому колаген-індукованому артриті в щурів збереглася на сталому рівні. Однак, знизилася активність індукбельної NO-синтази, інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів (за концентрацією МДА). Зниження рівня оксиду нітрогену відбулося за рахунок його посиленого розпаду до NO_3^- і NO_2^- . У плазмі крові знизилася концентрація сечової кислоти – $0,085 \pm 0,011$ нмоль/л порівняно з контролем ($0,030 \pm 0,008$ нмоль/л, $Z = -3,32$, $p = 0,000911$) і з результатами першого циклу ($0,101 \pm 0,016$ нмоль/л, $Z = 2,01$, $p = 0,044424$). Рівень сульфиду водню вірогідно підвищувався на початковій стадії колаген-індукованого артриту у щурів до $0,207 \pm 0,037$ мкмоль/л (у інтактних щурів $0,103 \pm 0,012$ мкмоль/л) ($Z = 3,97$, $p = 0,000071$) і стабільно утримувався на високих рівнях при сформованому артриті – $0,225 \pm 0,034$ мкмоль/л ($Z = 1,30$, $p = 0,191367$), що значно перевищило контрольні показники ($Z = 3,32$, $p = 0,000911$). Рівень H_2S вірогідно прямо позитивно корелював з активністю аргінази ($R = 0,942857$, $p = 0,004805$). Вивчивши зв'язки між активними формами кисню і нітрогену, ми встановили, що пероксид водню сприяв утворенню гідроксильного радикалу (вірогідна пряма кореляційна залежність $R = 0,76$, $r = 0,84$, $p < 0,05$). Супероксидний аніон спричиняв утворення пероксиду водню, що було доведено кореляційним аналізом ($R = 0,73$, $r = 0,71$,

$p < 0,05$). Індуцибельна NOS активувала процеси пероксидного окиснення ліпідів, кореляційна залежність між активністю кальцій-незалежної NO-синтази і рівнем малонового діальдегіду ($R=0,88$, $r=0,93$, $p < 0,05$) була прямою і достовірною. Виявили вірогідну зворотню кореляційну залежність між активністю конститутивної NO-синтази з рівнем H_2O_2 ($R=-0,55$, $p=0,002135$), швидкістю генерації $\cdot OH$ ($R=-0,66$, $p=0,000151$) і $O_2^{\cdot -}$ ($R=-0,65$, $p=0,000178$).

За результатами імуногістохімічних досліджень виявили посилений апоптоз гермінативних клітин у тварин із сформованим артритом. Реакція на FasL була виражено позитивна у стромі яєчок, а у додатках – у стромі між протоками, де накопичувалися лімфоцити та макрофаги, там же виявили апоптичні тільця. Кількість сильно FasL-позитивних сперматоцитів, сперматид, інтерстиціальних клітин корелювала зі ступенем пошкодження яєчок. Встановили, що сперматоцити і сперматиди з яєчок щурів з артритом були імунореактивними для каспази 3, позитивна реакція на неї визначалася у додатках у стромі між протоками. Отже, нами виявлено, що механізм формування непліддя при ранньому артриті ґрунтується на прозапальних факторах, синтезованих лімфоцитами та макрофагами інфільтратів сім'яників та додатків, а при сформованому артриті - внаслідок посиленого апоптозу сперматоцитів у пошкоджених сім'яних каналцях.

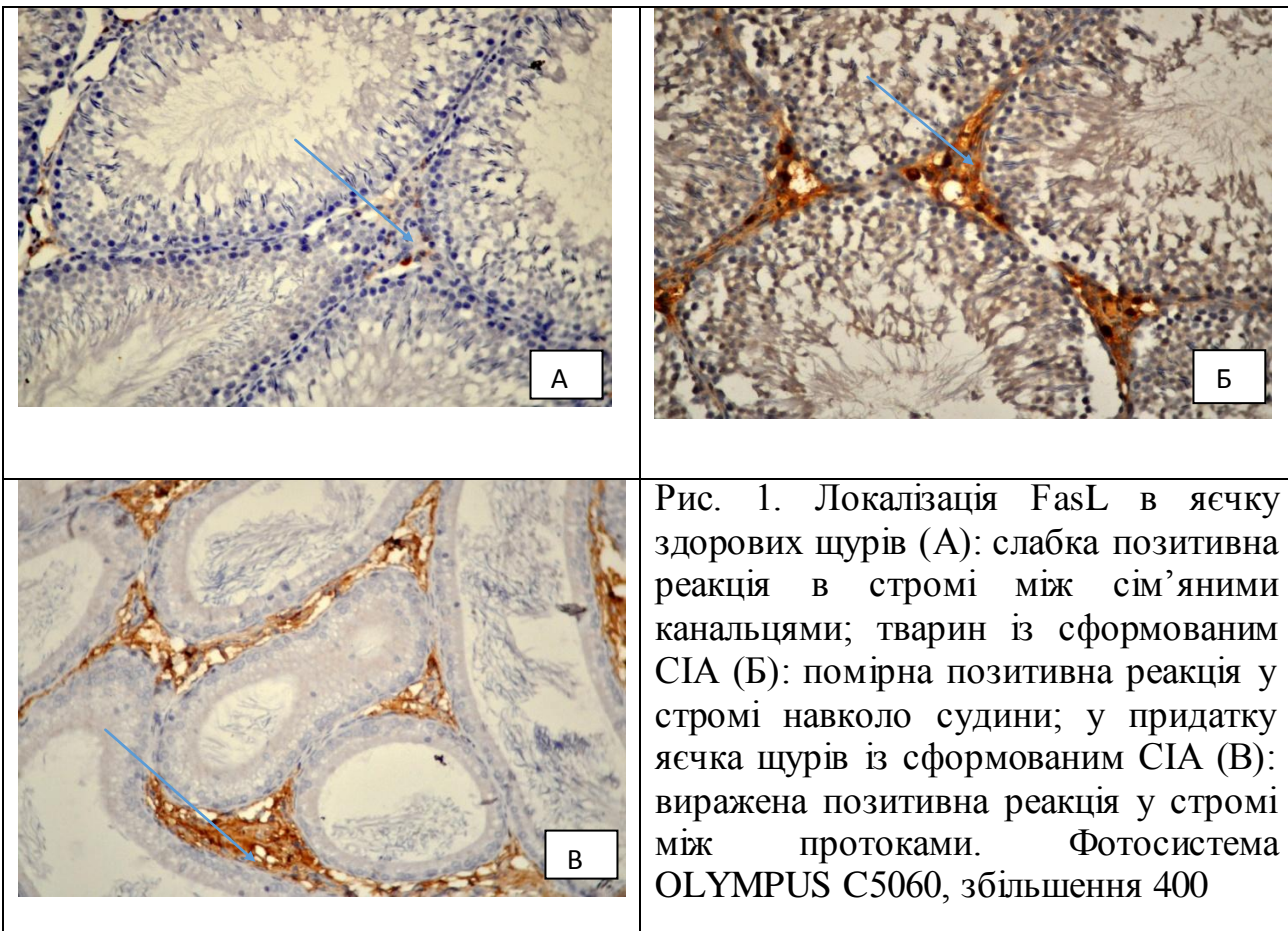


Рис. 1. Локалізація FasL в яєчку здорових щурів (А): слабка позитивна реакція в стромі між сім'яними каналцями; тварин із сформованим СІА (Б): помірна позитивна реакція у стромі навколо судини; у придатку яєчка щурів із сформованим СІА (В): виражена позитивна реакція у стромі між протоками. Фотосистема OLYMPUS C5060, збільшення 400

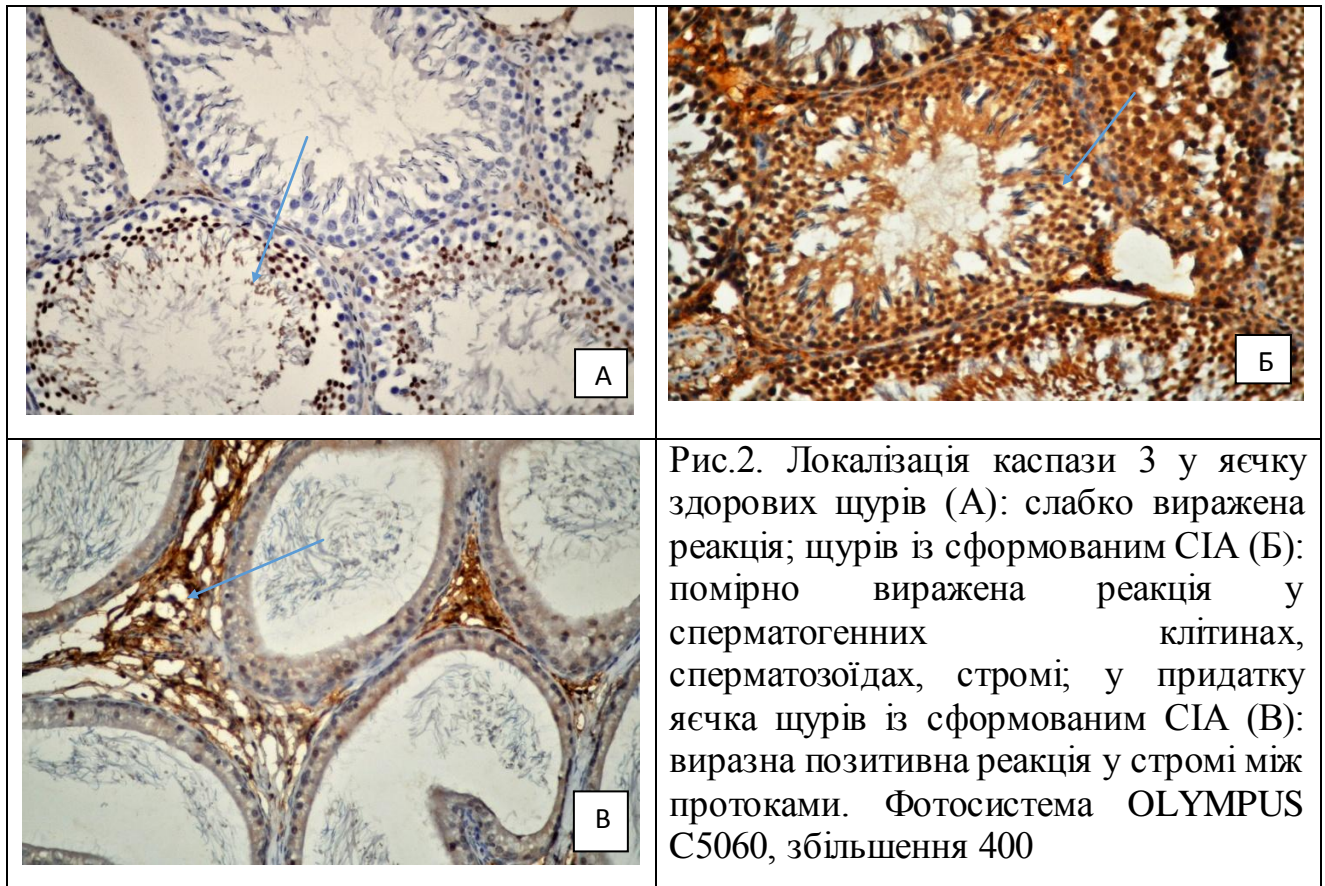


Рис.2. Локалізація каспази 3 у яєчку здорових щурів (А): слабо виражена реакція; щурів із сформованим СІА (Б): помірно виражена реакція у сперматогенних клітинах, сперматозоїдах, стромі; у придатку яєчка щурів із сформованим СІА (В): виразна позитивна реакція у стромі між протоками. Фотосистема OLYMPUS C5060, збільшення 400

Антиспермальний антитілогенез у хлопчиків при патології аутоімунного генезу. Було проведено визначення наявності, ізотипів АСАТ та сайтів їх прикріплення, а також імуногенетичні фактори схильності до їх синтезу, у хлопчиків з крипторхізмом; ЮІА, та молодих людей із непліддям на тлі варікоцеле, АСАТ у сироватці крові виявили у 30,0% хворих на крипторхізм. Не було відзначено різниці в появі АСАТ залежно від форми крипторхізму ($\chi^2=1,56$, $p=0,2118$), а також віку (0,5 – 14 років). При цьому визначалися антитіла, які належали до ізотипів ІgА, М і G. Антитіла лише одного ізотипу визначено у 22 (66,7%) хлопчиків, а кількох – в 11 (33,33%). Антитіла ізотипу ІgА виявили у 19 (57,6%) пацієнтів, ІgМ – у 18 (54,5%) і Іg G – у 13 (39,4%). У хлопчиків з крипторхізмом антиспермальні антитіла мали такі сайти прикріплення: до кінчика (Тt) хвостика - 27 (81,8%), голівки (Н) сперматозоїда - 8 (24,2%), середини (Т) - 6 (18,2%). У 5 (15,2%) хворих АСАТ мали кілька сайтів прикріплення. При обстеженні 22 хлопців з варікоцеле АСАТ у двох чоловіків виявлені у сім'яній рідині, а у сироватці крові були визначені тільки в одного хворого. При дослідженні еякуляту у хворих на варікоцеле була виявлена олігозооспермія – в 4 (18,2%), оліго-астенозооспермія – у 2 (9,1%), астенозооспермія – у 4 (18,2%), лейкоспермія – у 2 (9,1%), азооспермія - в одного чоловіка (4,6%). Кількісні та якісні зміни сперматозоїдів були виявлені у 11 (50,0%) пацієнтів з варікоцеле.

Оскільки крипторхізм має вроджений характер, ми дослідили, чи аутоантитілоутворення у таких хворих може бути асоційоване з НLА-антигенами ІІ-го класу (DR, DQ сублокуси). Визначили, що наявність АСАТ

при крипторхізмі чітко корелювала з наявністю HLA-DRB1*08. Виявлена відмінність між групою АСАТ-позитивних хлопчиків з крипторхізмом та групою АСАТ-негативних хлопчиків з цією ж патологією за експресією DRB1*08 ($\chi^2=4,85$, $p<0,05$) та DQB1*06 ($\chi^2=3,86$, $p<0,05$). Нами були визначені алелі сублокусів HLA- DR: B1*01,*03, *04, *07, *08, *11, *12, *13, *14, *15, *16, B3*01/02/03, B4*01, B5*01 та HLA-DQ: B1*02, B1*03, B1*05 та B1*06. Вивчивши експресію генів KIR у хлопчиків з крипторхізмом, позитивних і негативних за наявністю АСАТ, ми показали, що у них при наявності АСАТ виявлявся ген KIR-2DS5. Експресія гену KIR - 2DS5 у хворих на крипторхізм свідчить про переважання експресії активаторних рецепторів НК-клітин, наслідком чого може бути ураження власних клітин організму, що сприяє синтезу АСАТ. Також кореляційний аналіз показав, що у хлопчиків із крипторхізмом без АСАТ експресія гену 2DS5 позитивно корелює з антигеном HLA-II-го класу – DRB1*08 ($R=0,41$, $p=0,0154$), а також DRB1*12 ($R=0,41$, $p=0,0154$) і DRB1*15 ($R=0,50$, $p=0,0026$). При виявленні АСАТ подібна кореляція була відзначена між експресією KIR-2DS5 і наявністю DRB1*07 ($R=0,52$, $p=0,0022$). Отже, крипторхізм може бути причиною появи в дітей у крові антиспермальних антитіл, що в подальшому може спровокувати непліддя в дорослому віці. Наявність у таких осіб гену DRB1*08 одночасно з експресією гену KIR-2DS5 сприяє розвитку аутоімунного механізму при цій патології.

Антиспермальні антитіла в хлопчиків з ювенільним ідіопатичним артритом (ЮІА) виявлено у 17 (34,7%) із 49 хворих. АСАТ тільки одного ізотипу визначено у 14 (82,4%) хлопчиків, а декількох – в 3 (17,7%). Антитіла ізотипу IgA виявили у 7 (41,2%) пацієнтів, IgM – у 9 (52,9%) і Ig G – у 5 (29,4%). Значно частіше у хлопчиків, хворих на ЮІА, виявлялися АСАТ ізотипу IgM. У цих хворих Тt локалізація АСАТ виявлена у 14 (82,4%), Н-локалізація- у 5 (29,4%), Т – в одного (5,9%). Тільки у 2 (11,8%) хворих АСАТ мали декілька сайтів прикріплення. При порівнянні ізотипів АСАТ та їх сайтів прикріплення між хлопчиками з крипторхізмом (органоспецифічна аутоімунна патологія) та ентезит-артрит-асоційованою формою ЮІА (системна аутоімунна хвороба), виявилось, що у хлопчиків з ЮІА зустрічалася Н-локалізація, натомість у хлопчиків з крипторхізмом такої локалізації ми взагалі не виявили. АСАТ, локалізовані на кінці хвостика, за відсотком співпадали в обох групах.

Аутоантитілогенез у чоловіків з різними формами імунозалежного непліддя. При базовому обстеженні всім чоловікам було зроблено спермограму. У хворих із СЗСТ виявили астенозооспермію у 6 (35,3%) пацієнтів, лейкоспермію – в 11 (64,7%). У чоловіків із хронічними запальними хворобами була визначена астенозооспермія – у 4 (44,4%), олігоастенозооспермія та лейкоспермія - у 2 (22,2%) хворих, азооспермія – в одного (11,1%). При ідіопатичному неплідді олігоастенозооспермію та астенозооспермію виявили у трьох пацієнтів (23,1%), олігозооспермію та лейкоспермію діагностували в одного пацієнта (7,7%). У чотирьох чоловіків (50,0%), дружини яких мали ранні викидні, у спермограмі була визначена астенозооспермія. Лейкоспермія значно частіше виявлялася у хворих з СЗСТ, порівняно з пацієнтами із хронічними запальними хворобами ($\chi^2=4,25$,

$p=0,0393$), ідіопатичним непліддям ($\chi^2=9,98$, $p=0,0016$) і чоловіками, дружини яких мали декілька ранніх викиднів ($\chi^2=6,47$, $p=0,0110$). Було проведено визначення АСАТ у сироватці крові й еякуляті цих чоловіків. У контрольній групі АСАТ не виявлено. У сім'яній рідині чоловіків з ідіопатичним непліддям (66,6%) і чоловіків, дружини яких мали ранні викидні (37,5%), виявили АСАТ ізотипів G і M, фіксовані до хвостиків сперматозоїдів. Були виявлені АСАТ типу IgA у сім'яній рідині неплідних чоловіків з СЗСТ (25,0%), ідіопатичним непліддям (50,0%) та чоловіків, дружини яких мали ранні викидні (37,5%), і всі мали сайт прикріплення до кінця хвостика. Щодо визначення у сироватці крові, то найвище число АСАТ ізотипу IgG ми виявили у пацієнтів із СЗСТ (58,8%).

Для оцінки взаємозв'язку аутоімунного процесу з непліддям ми визначили рівень і специфічність циркулюючих аутоантитіл у неплідних чоловіків із аутоімунною та іншою супутньою патологією. У неплідних чоловіків із СЗСТ у сироватці крові виявили антиядерні антитіла (56,3% хворих), що перевищувало показники в інших групах, та інші аутоантитіла. Характерним є підвищення у сироватці крові цих пацієнтів антифосфоліпідних аутоантитіл ізотипу IgM у 4,0 рази, IgG у 5,0 разів, аутоантитіл до $\beta 2$ -GP 1 IgM у 5,0 разів, IgG у 4,0 рази, аутоантитіл до МРО ізотипу IgG – у 8,0 разів. Підвищений рівень антитіл ізотипу IgG до $\beta 2$ -глікопротеїну 1 у неплідних чоловіків з СЗСТ корелював з підвищенням у сироватці крові рівня ІЛ-18 ($F=9,26$, $p=0,00875$) (рис.3).

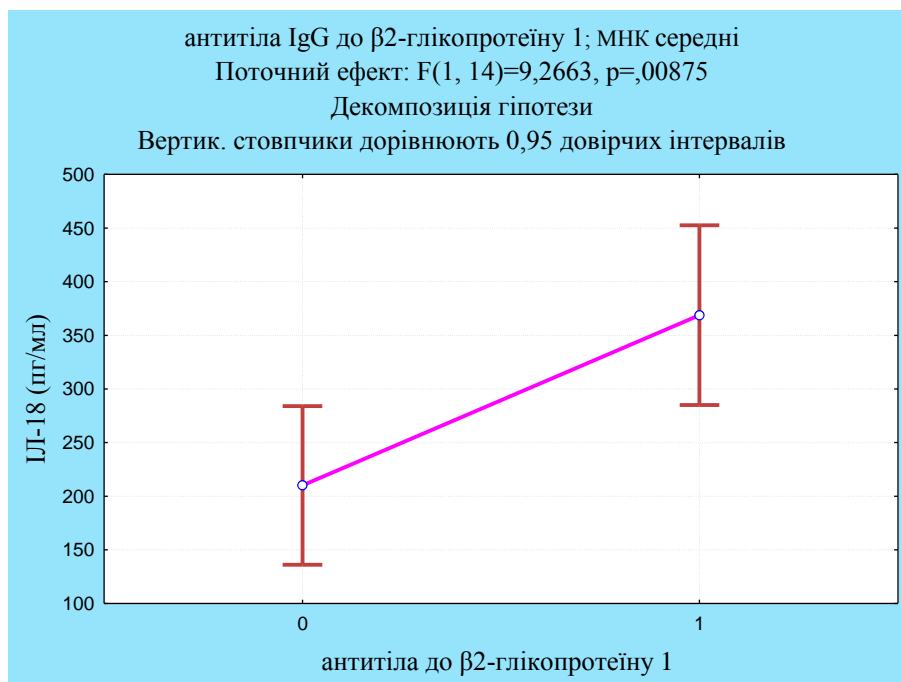


Рис.3. Взаємозв'язок між наявністю антитіл ізотипу IgG до $\beta 2$ -глікопротеїну 1 та концентрацією ІЛ-18 у сироватці крові у неплідних чоловіків з СЗСТ

Підвищений рівень антитіл ізотипів IgG і IgM до фосфоліпідів та $\beta 2$ -глікопротеїну 1 визначили у чоловіків, дружини яких мали ранні викидні - антифосфоліпідних аутоантитіл ізотипу IgM у 6,0 разів, ізотипу IgG у 8,0 разів, антитіл до $\beta 2$ -GP 1 ізотипів IgM та IgG у 7,0 разів, аутоантитіл до

мієлопероксидази (МПО) ізотипу IgG у 5,8 разів. У неплідних чоловіків з ідіопатичним непліддям виявили підвищення рівнів антифосфоліпідних аутоантитіл ізотипів IgM та IgG у 2,0 рази, аутоантитіл до $\beta 2$ -GP 1 ізотипу IgM у 3,8 разів, ізотипу IgG у 1,5 разів, аутоантитіл до МРО ізотипу IgG – у 2 рази.

Наявність підвищеного рівня антитіл ізотипу IgM до $\beta 2$ -глікопротеїну 1 у чоловіків з непліддям і СЗСТ супроводжувалася зниженням у крові кількості $CD3^+$ -лімфоцитів - $1,250 \pm 0,282$ Г/л порівняно з контролем $1,902 \pm 0,716$ Г/л ($Z = -2,10042$, $p = 0,00875$) і $CD8^+$ -лімфоцитів - $0,512 \pm 0,248$ Г/л порівняно з контролем $0,780 \pm 0,423$ Г/л ($Z = -1,99540$, $p = 0,046000$). Виявлення антитіл ізотипу IgM до фосфоліпідів у чоловіків, дружини мали ранні викидні, асоціювалося із зниженням у крові кількості $CD4^+$ -лімфоцитів - $0,765 \pm 0,154$ Г/л порівняно з контролем $1,205 \pm 0,032$ Г/л ($Z = -2,00000$, $p = 0,045501$).

У неплідних чоловіків із СЗСТ, ідіопатичним непліддям та чоловіків, дружини котрих мали ранні викидні, ми виявили підвищений рівень антитіл до мієлопероксидази, який був особливо високим у чоловіків з СЗСТ. Підвищення рівня антитіл до мієлопероксидази у пацієнтів з СЗСТ достовірно зворотно корелювало з концентрацією ІЛ-18 у сироватці крові ($F = 7,5221$, $p = 0,01587$), що видно з рисунку 4.

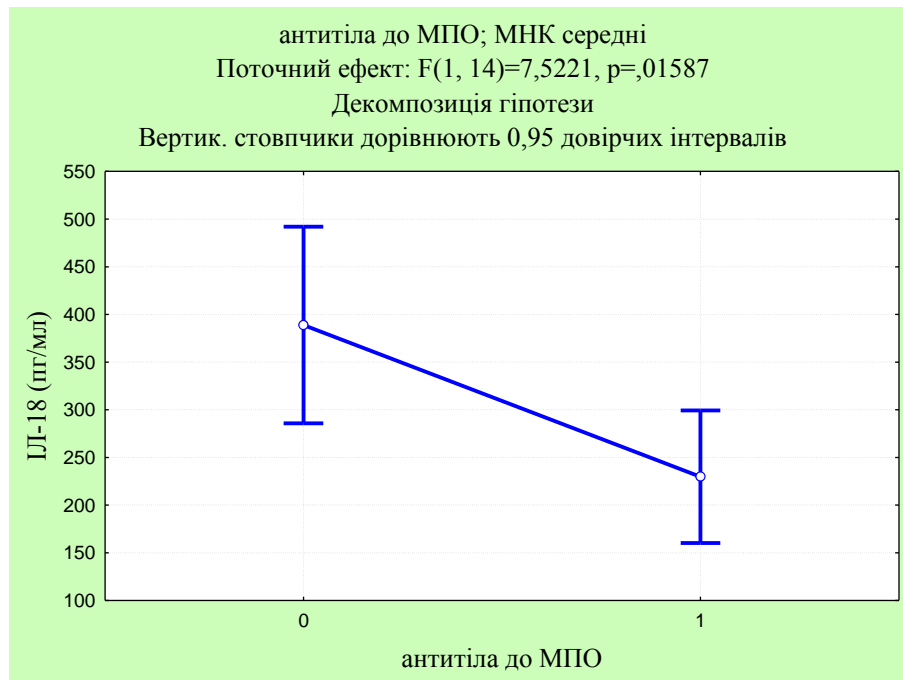


Рис.4. Взаємозв'язок між наявністю антитіл до мієлопероксидази та концентрацією ІЛ-18 у сироватці крові у чоловіків з непліддям і СЗСТ

Оскільки у значної кількості обстежених неплідних пацієнтів з аутоімунною та іншою супутньою патологією було виявлено АСАТ у сироватці крові або у сім'яній рідині, нами був проведений пошук кореляцій між присутністю антиспермальних антитіл та аутоантитіл іншої специфічності у всіх групах дорослих неплідних чоловіків. Була виявлена пряма кореляція між частотою виявлення АСАТ ізотипу IgM та антитілами до RNP ізотипу IgG у крові неплідних чоловіків із СЗСТ ($r = 0,60$, $p < 0,05$). Взаємозв'язки були також

встановлено між частотою виявлення АСАТ ізотипу IgG та IgG антитіл до ДНК ($r=0,74$, $p<0,05$), АСАТ ізотипу IgG та IgG антитіл до RNP ($r=0,74$, $p<0,05$), АСАТ ізотипу IgM та АФА IgG ($r=0,59$, $p<0,05$), АСАТ ізотипу IgM та антитіл до $\beta 2$ -глікопротеїну 1 ізотипу IgG ($r=0,93$, $p<0,05$) у крові чоловіків з ідіопатичним непліддям. У інших групах дорослих чоловіків таких кореляцій не встановлено. Отже, порушення фертильності у групі чоловіків з ідіопатичним непліддям має імунозалежний генез. У групах пацієнтів із СЗСТ та чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, формування системної аутоагресії супроводжується присутністю антиспермальних аутоантитіл.

Лімфоцитарно-цитокінові асоціації і оксидаційні показники у неплідних чоловіків. При проведенні цитофлуориметричного дослідження було встановлено, що у чоловіків з ідіопатичним непліддям у крові було вірогідне підвищення кількості $CD4^+CD25^+$ Т-лімфоцитів ($p<0,05$) – клітин, які гальмують перебіг клітинних та гуморальних імунних реакцій.

Для порівняльної оцінки і характеристики особливостей кількісних показників лімфоцитів у неплідних чоловіків з різною супутньою патологією – системними захворюваннями сполучної тканини, хронічними запальними хворобами, варікоцеле, ідіопатичним непліддям та чоловіків, дружини котрих мали ранні викидні, було побудовано діаграму (рис.5). По радіусах відкладені відхилення досліджених показників (%) пацієнтів з непліддям від аналогічних показників чоловіків контрольної групи, значення яких прийняті за 100%. У чоловіків з ідіопатичним непліддям і неплідних чоловіків з хронічними запальними хворобами профіль діаграми був подібним і характеризувався підвищеною кількістю регуляторних клітин ($p<0,05$) та зниженою кількістю $CD4^+CD25^-$ Т-лімфоцитів ($p<0,05$). У неплідних чоловіків з СЗСТ відмітною особливістю була підвищена кількість активованих Т-лімфоцитів ($p<0,05$). У чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, ми виявили підвищену кількість $CD8^+$ Т-лімфоцитів ($p<0,05$) у порівнянні з неплідними чоловіками з іншою супутньою патологією. Загалом у чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, було виявлено тільки 6 зв'язків ($\chi^2=4,43$, $p=0,0353$) між імунологічними показниками з 14-ти, виявлених у контролі. Це свідчить про порушення регуляції імунної відповіді у цій групі.

Нами встановлено, що кількість популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у неплідних чоловіків із СЗСТ та чоловіків з ідіопатичним непліддям також відрізнялися від контролю. Додатково ми дослідили зв'язок показників клітинного імунітету з наявністю у неплідних чоловіків у сироватці крові АСАТ. Тільки в осіб з ідіопатичним непліддям виявилось, що наявність сироваткових АСАТ асоціюється з зниженням кількості $CD4^+CD25^-$ Т-лімфоцитів ($p=0,00379$). У АСАТ-позитивних пацієнтів з СЗСТ виявлена підвищена кількість $CD4^+CD25^+$ лімфоцитів ($p<0,05$). Кількість Т-лімфоцитів цієї ж субпопуляції у АСАТ-позитивних осіб цієї групи була в 1,54 разів більшою порівняно із аналогічним показником у АСАТ-негативних осіб і в 1,49 разів – порівняно з контрольною групою. У АСАТ-позитивних чоловіків з хронічними запальними захворюваннями значно зростає кількість Т-лімфоцитів-хелперів – до $1,061\pm 0,116$ Г/л порівняно з $0,765\pm 0,236$ Г/л у АСАТ-

негативних чоловіків з тієї ж групи ($p < 0,05$). У чоловіків з ідіопатичним непліддям антиспермальне антитілоутворення асоціюється з зниженням кількості лімфоцитів без регуляторної функції $CD4^+CD25^-$ ($p < 0,05$), тоді як у чоловіків, бездітних у шлюбі внаслідок викиднів у дружини, кількість таких клітин, навпаки, значно зростає ($p < 0,05$). У цих пацієнтів також збільшується загальна кількість $CD3^+$ Т-клітин. Присутність АСАТ в еякуляті не корелювала зі змінами показників клітинного імунітету в жодній з обстежених груп. У АСАТ-позитивних неплідних чоловіків із СЗСТ визначили зниження рухливості сперматозоїдів при збільшенні $CD4^+CD25^+$ -Т-клітин до $0,531 \pm 0,098$ Г/л, порівняно з $0,345 \pm 0,254$ Г/л у АСАТ-негативних пацієнтів тієї ж групи ($Z=2,31$, $p=0,020801$). Це дає підстави вважати, що кількість $CD4^+CD25^+$ -лімфоцитів може бути предиктором зниження рухливості сперматозоїдів у неплідних чоловіків із СЗСТ ($AUC \geq 0,8$).

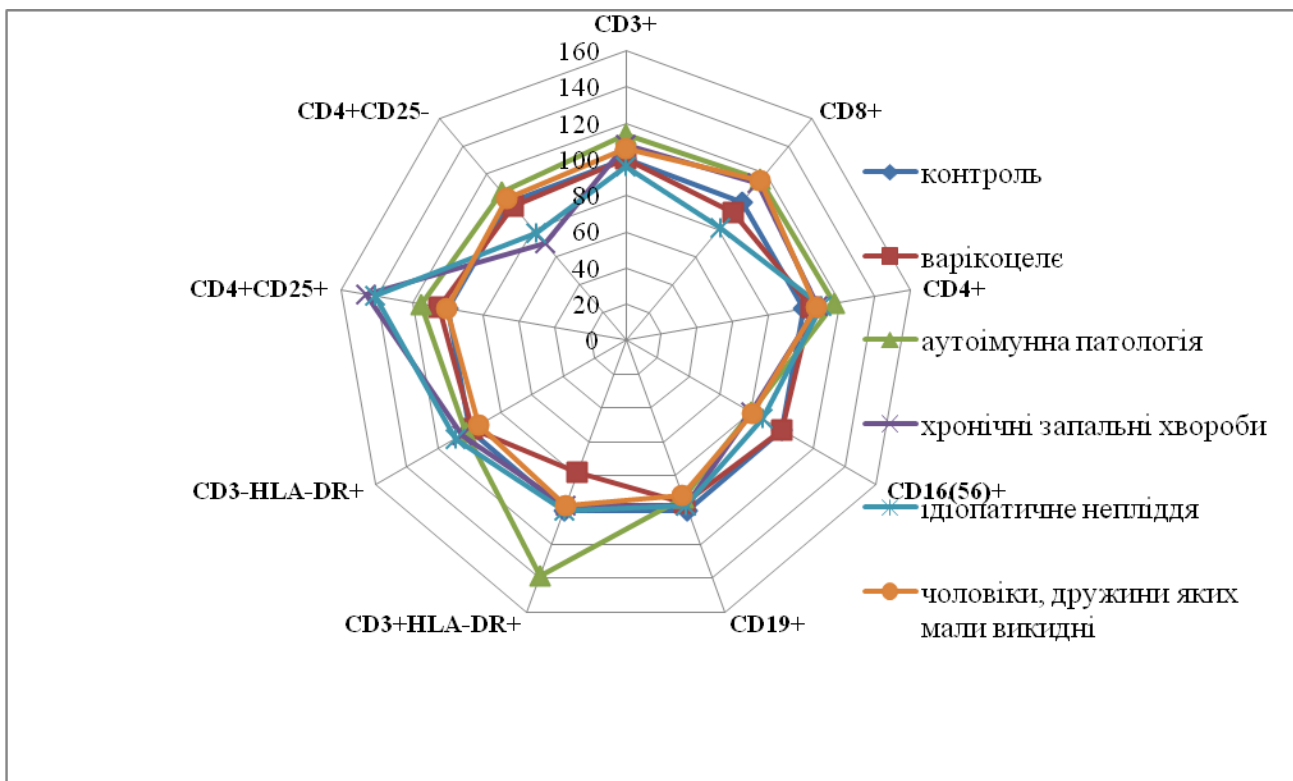


Рис. 5. Кількісні показники лімфоцитів різних популяцій та субпопуляцій у чоловіків з непліддям різного генезу у порівнянні з здоровими фертильними чоловіками (їх показники прийняті за 100%)

У пацієнтів досліджуваних 5-ти груп було визначено концентрації про- і протизапальних цитокінів у крові та сім'яній рідині. У хворих на варикоцеле не було знайдено змін рівнів досліджуваних цитокінів у сироватці крові, порівняно з контрольною групою, окрім концентрації ІФН- γ , яка була вищою від контролю ($p < 0,05$). У неплідних чоловіків із СЗСТ у сироватці крові концентрація ІЛ-18 перевищувала в середньому в 1,38 рази показники

фертильних чоловіків, а рівень ІЛ-6 був вищим у 7, 1 рази. У неплідних чоловіків з хронічними запальними хворобами у сироватці крові виявили значне зниження рівня ІЛ-1 β - у 3,37 разів, а також зниження рівня ТФР- β 1 у 2,43 разів. Можливо, за рахунок цього у пацієнтів з хронічними запальними хворобами утримувалася рівновага між про- і протизапальними цитокінами. Найсуттєвіші зміни цитокінового профілю були зафіксовані у чоловіків з ідіопатичним непліддям: підвищення концентрації прозапальних цитокінів: ІЛ-18 – на 50,45%, ІЛ-6 – на 216,13%, ІФН- γ – на 173,28%. Паралельно збільшувалася концентрація протизапальних медіаторів ІЛ-10 – на 209,24%, ТФР- β 1 – на 14,42%, що може бути свідченням компенсаторної реакції імунної системи. У чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, у сироватці крові зріс вміст ІФН- γ у 3,23 разів.

Також ми визначали співвідношення цитокінів-антагоністів: ІЛ-10/ІФН- γ , ІЛ-10/ФНП- α . Тільки у чоловіків з ідіопатичним непліддям показник співвідношення ІЛ-10/ФНП- α був підвищеним порівняно з контролем ($p < 0,05$), що може впливати на розвиток імунної відповіді за гуморальним типом, тобто продукцію аутоантитіл. У неплідних чоловіків з СЗСТ і хронічними запальними захворюваннями, а також у чоловіків, жінки котрих мали ранні викидні, позитивні кореляції між сироватковими концентраціями цитокінів різної спрямованості у сироватці крові були такі ж, як у контролі.

Визначення показників місцевого імунітету в сім'яній рідині є важливими для встановлення їх впливу на розвиток непліддя. У сім'яній рідині неплідних чоловіків із СЗСТ була знижена концентрація ТФР- β 1 та ІЛ-1 β одночасно зі зростанням вмісту ІЛ-18 ($p < 0,05$), що сприяло посиленню запалення і порушенню процесів диференціювання статевих клітин. При розвитку непліддя на тлі хронічних запальних хвороб виявлялося зниження ІЛ-1 β ($p < 0,05$) одночасно з підвищенням концентрації ІЛ-18 і ФНП- α . При ідіопатичному неплідді зростав рівень ІФН- γ і знижувалася концентрація ІЛ-1 β . У чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, зміни цитокінів мали прозапальну тенденцію зі зростанням концентрації ІЛ-6 – у середньому на 270,8%, ІЛ-18 – на 83,4%, ФНП- α – на 133,9%. Були розраховані коефіцієнти балансу Th2/Th1 у сім'яній рідині пацієнтів обстежених груп. Відхилення від норми цих показників виявлені тільки у пацієнтів, дружини яких мали ранні викидні, та у неплідних чоловіків із хронічними запальними хворобами. Отже, загальною закономірністю місцевого цитокінового профілю неплідних чоловіків із різних груп було переважання цитокінів Th1- профілю, що у них може бути однією з причин розвитку непліддя, бо нівелює імуносупресивний статус сім'яної рідини. Зміни місцевої концентрації різних цитокінів асоціювалися з патологічними змінами сперматозоїдів – у найбільшій мірі з рухливістю сперматозоїдів ($Z = -2,02$, $p = 0,043309$).

У неплідних чоловіків з хронічними запальними захворюваннями виявили зниження вмісту ІЛ-1 β у сироватці крові, яке корелювало зі зниженням його концентрації в сім'яній рідині ($R = 0,73$, $r = 0,68578$, $p < 0,05$). У неплідних чоловіків із СЗСТ був визначений зв'язок між зниженою концентрацією ІЛ-1 β у сироватці крові і підвищеною у сім'яній рідині ($R = -0,51$, $p < 0,05$). На нашу

думку, вищеперелічені зміни цитокінового складу сім'яної рідини сприяли міграції лейкоцитів до еякуляту, внаслідок чого у ньому зросла їх кількість і була відзначена лейкоспермія. За результатами наших досліджень з використанням дисперсійного аналізу було визначено, що з усіх груп тільки у неплідних чоловіків із СЗСТ зниження рівнів ІЛ-1 β і ТФР- β 1 ($F=2,14$, $p=0,00034$) у сім'яній рідині вірогідно корелювало з лейкоспермією (рис.6).

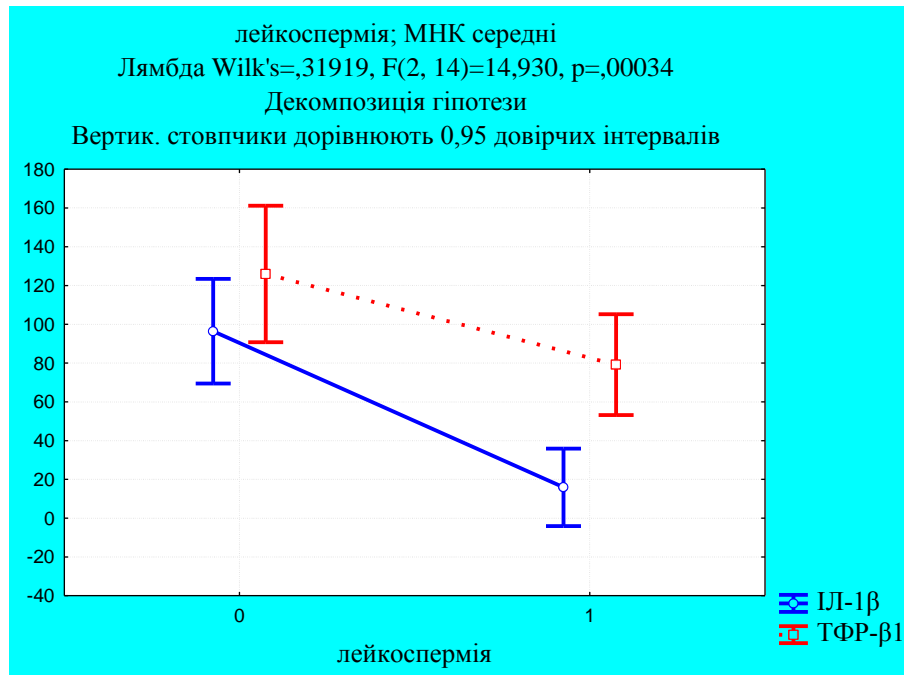


Рис.6. Взаємозв'язок між наявністю лейкоспермії та концентрацією ІЛ-1 β і ТФР- β 1 у сім'яній рідині неплідних чоловіків з СЗСТ

У чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, збільшення концентрації ІЛ-6 у сім'яній рідині вірогідно корелювало зі зниженням рухливості сперматозоїдів ($Z=-2,02073$, $p=0,043309$). Ця концентрація склала $158,67 \pm 99,63$ пг/мл, що значно перевищило аналогічний показник ($45,22 \pm 32,69$ пг/мл) пацієнтів з цієї групи з нормальною рухливістю сперматозоїдів ($p < 0,05$).

Не тільки присутність АСАТ, але і зміна концентрації прозапальних цитокінів у сім'яній рідині, може сприяти аглютинації сперматозоїдів. Посилення аглютинації сперматозоїдів при неплідді у чоловіків із СЗСТ вірогідно корелювала зі зниженням рівнів ІЛ-1 β і ТФР- β 1 у сім'яній рідині ($F=14,93$, $p=0,0034$), що видно з рисунку 7.

У неплідних чоловіків з СЗСТ зміни кількості і рухливості сперматозоїдів (патологічність сперми) були діагностовані при зниженні концентрації ІЛ-1 β – $52,85 \pm 45,81$ пг/мл проти показника в контрольній групі $85,48 \pm 66,90$ пг/мл ($Z=2,99$, $p=0,0027773$), збільшенні концентрації ІЛ-6 – $67,30 \pm 51,52$ пг/мл проти $39,52 \pm 47,11$ пг/мл в контрольній групі ($Z=-2,43$, $p=0,015271$), підвищенні концентрації ФНП- α – $23,81 \pm 16,62$ пг/мл проти $16,95 \pm 15,16$ пг/мл в контрольній групі ($Z=-2,14$, $p=0,032792$) у сім'яній рідині (рис.8).

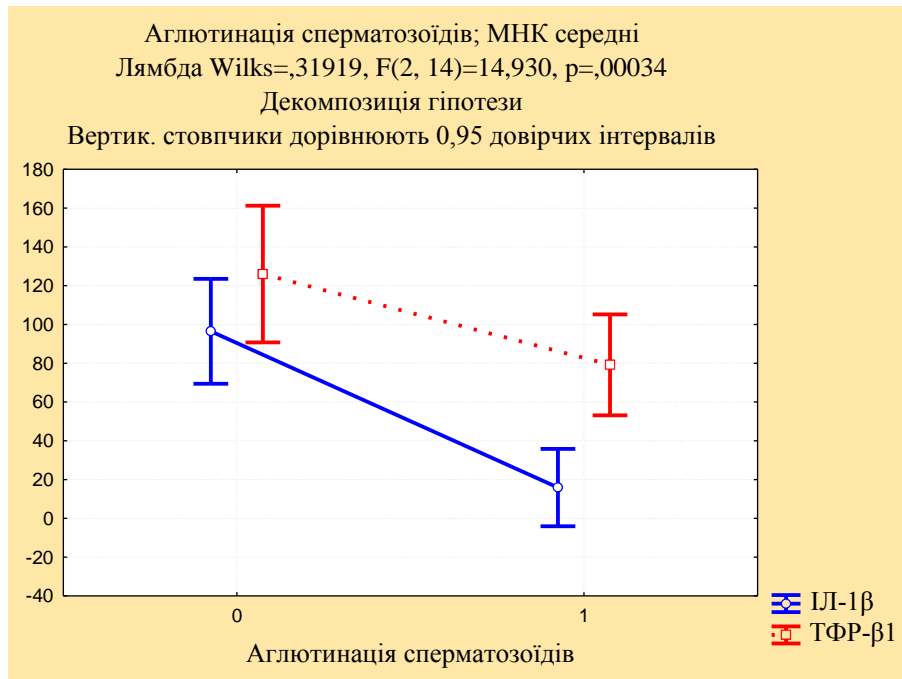


Рис.7. Взаємозв'язок між аглютинацією сперматозоїдів та рівнями цитокінів ІЛ-1β і ТФР-β1 у сім'яній рідині неплодних чоловіків із СЗСТ

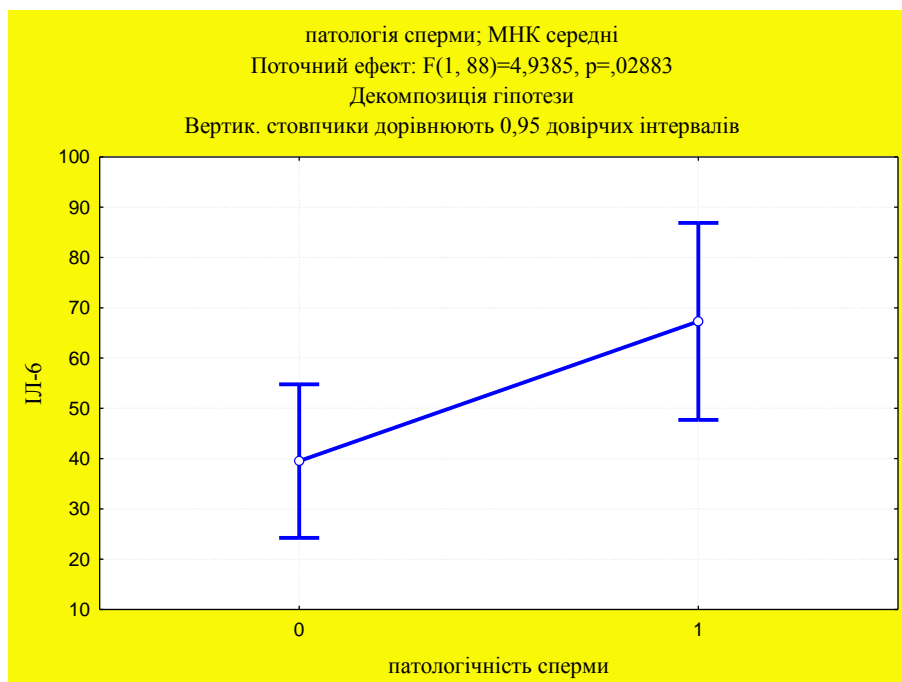


Рис.8. Взаємозв'язок між патологічними змінами у сперматозоїдах та концентрацією ІЛ-6 у сім'яній рідині неплодних чоловіків із СЗСТ.

У пацієнтів з СЗСТ, які мали астенозооспермією, порівняно з неплодними чоловіками цієї групи з нормозооспермією ($91,74 \pm 81,56$ пг/мл), була знижена концентрація ІЛ-1β у сім'яній рідині до $31,11 \pm 28,22$ пг/мл ($Z=2,22$, $p=0,026619$). У чоловіків з астенозооспермією, порівняно з чоловіками з олігозооспермією,

вірогідним було підвищення у сім'яній рідині рівня ІЛ-18 ($19,83 \pm 9,45$ пг/мл проти $7,30 \pm 4,92$ пг/мл; $Z=2,56987$, $p=0,010174$), а у сироватці крові зниження концентрації ІЛ-1 β $1,45 \pm 0,76$ пг/мл проти $7,92 \pm 6,34$ пг/мл ($Z=-2,45$, $p=0,014457$) і ФНП- α $3,04 \pm 2,31$ пг/мл проти $5,29 \pm 2,92$ пг/мл ($Z=-2,04$, $p=0,041541$). При оцінці кількості лімфоцитів периферійної крові було виявлено, що, порівняно з неплідними чоловіками з нормозооспермією, в осіб з олігозооспермією кількість НК-клітин ($0,591 \pm 0,247$ Г/л проти $0,369 \pm 0,176$ Г/л; $Z=1,98$, $p=0,047348$) є вищою; у осіб з астенозооспермією зростає кількість CD4⁺CD25⁺-лімфоцитів ($0,490 \pm 0,161$ Г/л проти $0,360 \pm 0,191$ Г/л; $Z=2,79$, $p=0,005120$); в осіб з олігоастенозооспермією зростає кількість CD4⁺CD25⁺-клітин ($0,558 \pm 0,264$ Г/л проти $0,360 \pm 0,191$ Г/л; $Z=2,08$, $p=0,037158$), в осіб з азооспермією зростає кількість регуляторних Т-лімфоцитів ($0,771 \pm 0,069$ Г/л проти $0,360 \pm 0,191$ Г/л; $Z=2,15$, $p=0,031610$). В осіб з олігоастенозооспермією порівняно з чоловіками, в яких виявлена олігозооспермія, у периферійній крові спостерігалось зниження рівня НК-клітин ($0,347 \pm 0,152$ Г/л проти $0,591 \pm 0,247$ Г/л; $Z=-2,00832$, $p=0,044611$) і підвищення кількості В-лімфоцитів ($0,274 \pm 0,045$ Г/л проти $0,179 \pm 0,025$ Г/л; $Z=2,74$, $p=0,006170$). Загалом з усіх досліджуваних показників імунної системи зі змінами у спермограмі обстежених неплідних чоловіків найбільш асоціювалися: знижений вміст ІЛ-1 у сім'яній рідині і сироватці крові; знижена концентрація ІЛ-10 у сім'яній рідині; зниження вмісту ТФР- β 1 у сироватці крові і сім'яній рідині; підвищена кількість лімфоцитів CD16⁺/56⁺. Поява АСАТ у сім'яній рідині супроводжувалася зниженням рівня ТФР- β 1 до $88,93 \pm 41,09$ пг/мл проти $121,90 \pm 91,96$ пг/мл ($Z=2,15$, $p=0,031667$), ІЛ-1 β – до $33,34 \pm 32,84$ пг/мл проти $80,49 \pm 58,48$ пг/мл ($Z=2,17$, $p=0,030365$).

У всіх групах обстежених неплідних чоловіків виявили вірогідне підвищення рівня важливого медіатора запалення - МДА. При цьому у хворих із СЗСТ його концентрація перевищила показники контрольної групи в 2,25 рази, при хронічних запальних хворобах – у три рази, при ідіопатичному неплідді – у 2,16 рази, а у пацієнтів з варикоцеле – у 2,30 рази. У хворих з хронічними запальними хворобами середні показники концентрації МДА були найвищими серед всіх груп пацієнтів, також у них визначили вірогідну зворотню кореляцію між концентрацією МДА, відносною ($R=-0,81$, $r=-0,8473$) і абсолютною кількістю CD4⁺-лімфоцитів ($R=-0,74$, $r=-0,7306$). При аналізі сім'яної рідини виявили, що рівень МДА був достовірно вищим від контролю у пацієнтів з варикоцеле, чоловіків з хронічними запальними хворобами та СЗСТ (найвищий рівень) (рис. 9). Це може бути пов'язане з лейкоспермією, виявленою у цих хворих, що було підтверджено при дисперсійному ($F=24,11$, $p=0,00019$), а також кореляційному аналізі ($R=0,94$, $p=0,000001$).

Натомість, при ідіопатичному неплідді концентрація МДА, була в межах норми, що вказує на інші механізми формування непліддя при цій патології, ніж активація оксидативного стресу.

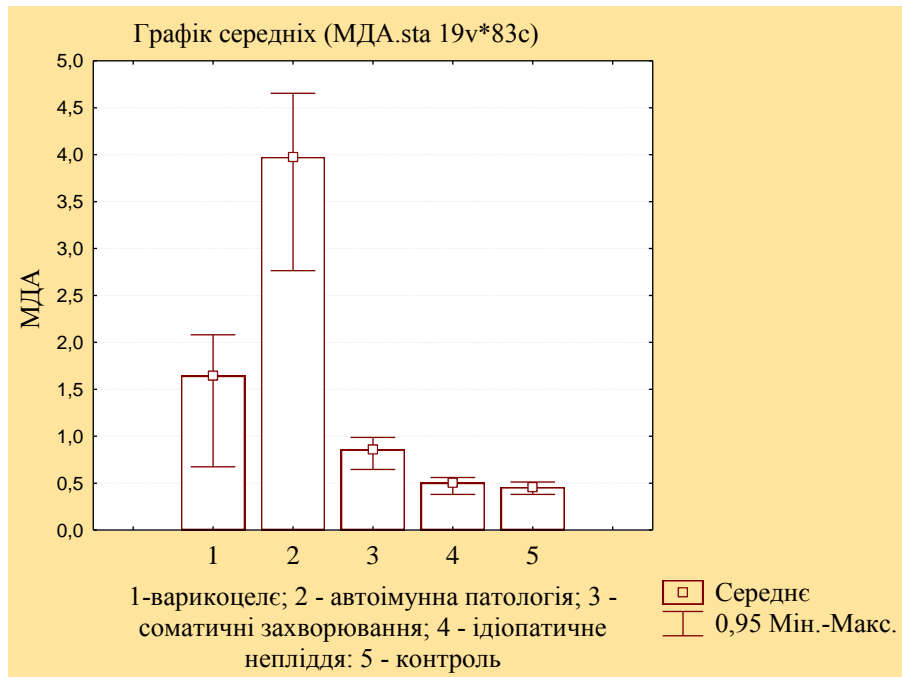


Рис. 9. Концентрація МДА в сім'яній рідині неплідних чоловіків з СЗСТ та іншою супутньою патологією

У всіх обстежених чоловіків не було знайдено кореляції між концентраціями МДА у сироватці крові та сім'яній рідині. У чоловіків із варикоцеле була відзначена пряма кореляція між концентрацією МДА і виникненням змін у спермограмі. Концентрація МДА зворотно корелювала з кількістю рухливих ($R=-0,98$, $p=0,000001$), а також морфологічно нормальних сперматозоїдів ($R=-0,54$, $p=0,011661$).

У чоловіків з непліддям та СЗСТ активність пероксидного окиснення ліпідів суттєво пошкоджувала рухливість сперматозоїдів ($R=-0,80$, $p=0,000103$; $r=-0,69$, $p<0,05$) (рис.10), а також сприяла їх аглютинації ($F=24,11$, $p=0,00019$) (рис.11). У цій же групі виявлено достовірну зворотню кореляційну залежність між вмістом МДА у сім'яній рідині і концентрацією в ній ІЛ-1 β ($R=-0,66$, $p=0,004207$). Паралельно із збільшенням рівня ІЛ-1 β підвищувався відсоток рухливих сперматозоїдів ($R=0,54$, $p=0,023822$).

Не було виявлено вірогідних кореляційних зв'язків між показниками спермограми і рівнем малонового діальдегіду в сім'яній рідині у чоловіків з ідіопатичним непліддям і непліддям при хронічних запальних хворобах. У всіх групах неплідних чоловіків підтверджено, що при астенозооспермії рівень МДА у сироватці крові вищий і становить $3,50\pm 0,53$ мкмоль/л проти $2,86\pm 0,26$ мкмоль/л ніж у хворих з олігозооспермією ($Z=2,56$, $p=0,010475$).

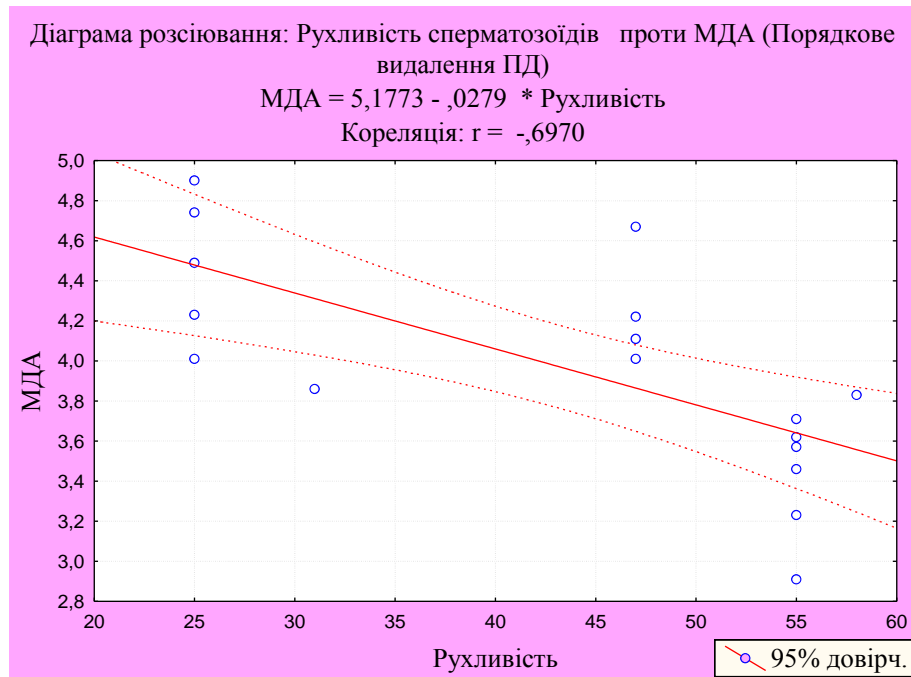


Рис. 10. Кореляційний зв'язок між концентрацією МДА і рухливістю сперматозоїдів у неплідних чоловіків з СЗСТ.



Рис. 11. Кореляційний зв'язок між концентрацією МДА та аглютинацією сперматозоїдів у неплідних чоловіків з СЗСТ.

Узагальнений аналіз результатів

Зміни імунологічних показників у неплідних чоловіків з аутоімунною та іншою супутньою патологією виявив закономірності, характерні для трьох типів імунозалежних механізмів розвитку непліддя – генетично

детермінованого, антитілоопосередкованого та спричиненого прозапальними лімфоцитарно-цитокіновими асоціаціями.

Зокрема, при крипторхізмі синтез антиспермальних антитіл може детермінуватися генетично і залежить від домінування експресії HLA-DRB1*07,08 та KIR-2DS5. АСАТ у сироватці крові виявили у 30,0% хворих на крипторхізм. У хлопчиків, хворих на крипторхізм, найчастіше виявляли АСАТ ізотипів IgA і IgM. Прогностичне значення для фертильної функції в майбутньому мають топографічні особливості сайтів прикріплення антитіл проти сперматозоїдів. Ми визначили, що найпоширенішою був сайт прикріплення Tt (кінець хвостика). Такі АСАТ можуть в майбутньому блокувати рухливість сперматозоїдів. У юних пацієнтів з ЮІА було визначено, крім локалізації Tt, ще і локалізація Н. АСАТ з такою локалізацією в майбутньому можуть пошкоджувати голівку сперматозоїда і ДНК всередині клітини. У сім'ях чоловіків, які мають такий сайт прикріплення АСАТ, існує ризик раннього невиношування у дружини. Отже, у хлопчиків з крипторхізмом ведучим механізмом формування непліддя є генетично детермінована продукція антиспермальних антитіл, а у хлопчиків з ЮІА - формування «натуральних», перехресно реагуючих з іншими аутоантигенами, АСАТ.

У неплідних пацієнтів із СЗСТ було виявлено низку змін показників імунної реактивності (рис.12). Утворення АСАТ в крові цих хворих асоціювалося із збільшенням числа регуляторних $CD4^+CD25^+$ лімфоцитів, що корелювало також зі зниженням рухливості їх сперматозоїдів. Це дозволяє розглядати кількість $CD4^+CD25^+$ -лімфоцитів предиктором зниження рухливості сперматозоїдів і розвитку непліддя у чоловіків із СЗСТ. Також важливим механізмом розвитку непліддя у чоловіків з цієї групи слід вважати порушення локального (у сім'яній рідині) і системного (у сироватці крові) цитокінового профілю. Сироваткова концентрація ІЛ-18 у неплідних пацієнтів із СЗСТ перевищувала в середньому в 1,38 рази показники фертильних чоловіків, а рівень ІЛ-6 був вищим у 7,1 рази. Також у сім'яній рідині цих хворих визначили знижену концентрацію ТФР- β 1 та підвищену - ІЛ-18 (в 2,52 рази), що може свідчити про підтримку запального процесу. Зміни концентрацій двох цитокінів з протилежною дією (ТФР- β 1 і ІЛ-18) супроводжувалися зниженням вмісту у сім'яній рідині іншого прозапального цитокіну ІЛ-1 β – в 1,69 рази. У неплідних чоловіків із СЗСТ зниження ІЛ-1 β і ТФР- β 1 у сім'яній рідині асоціювалося з підвищенням кількості лейкоцитів у еякуляті, посиленням аглютинації сперматозоїдів. Зважаючи на те, що у крові 56,3% неплідних пацієнтів цієї групи виявили антиядерні антитіла, та у 16% були визначені антитіла до хроматину і вірогідно підвищений рівень загальних антитіл класів IgG і IgM до фосфоліпідів та β 2-глікопротеїну 1, не можна виключити перехресної реактивності антитіл цієї специфічності з антигенами сперматозоїдів. Поява антитіл класу IgG до β 2-глікопротеїну 1 у цих чоловіків асоціювалася із підвищенням у сироватці крові рівня ІЛ-18 та зниженням у крові кількості $CD3^+$ -лімфоцитів і $CD8^+$ -лімфоцитів. Підвищення рівня антитіл до МПО у цих пацієнтів достовірно зворотньо корелювало з концентрацією ІЛ-18 у сироватці крові. Ми виявили, що у неплідних чоловіків з СЗСТ зміни

кількості показників імунної реактивності у порівнянні з нормою є найбільшою серед інших груп. Отже, природа імунозалежних механізмів формування непліддя у цих пацієнтів є комплексною: патологічні цитокінові асоціації, антитілозалежні імунні реакції, опосередковані аутоантитілами різної специфічності, та активація оксидативного стресу.

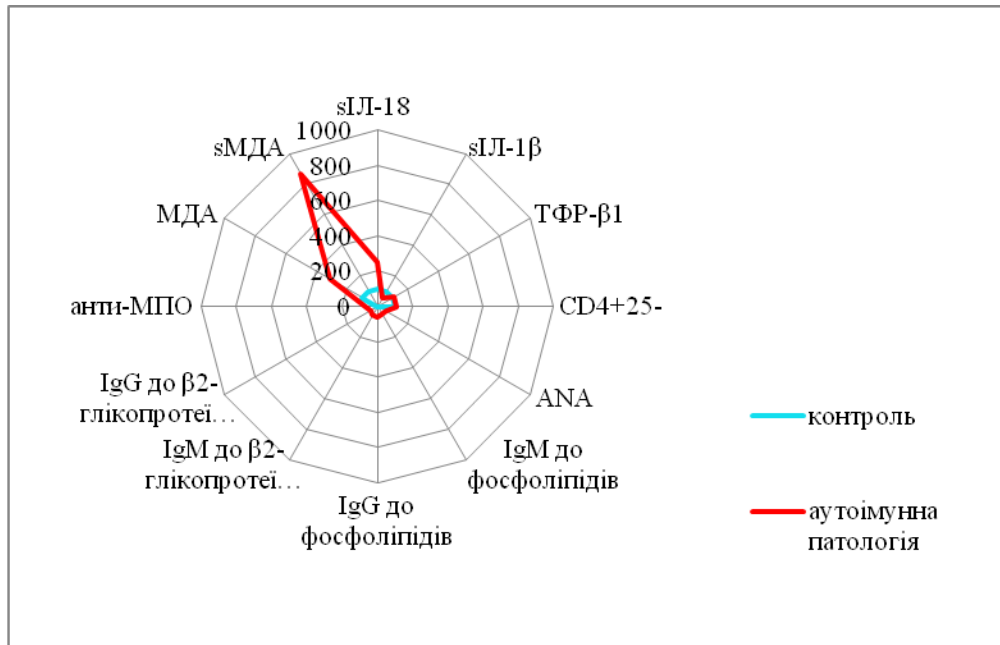


Рис. 12. Показники імунної реактивності у неплідних чоловіків із СЗСТ

У обстежених нами хворих на варікоцеле виявлено незначні зміни досліджених показників імунної реактивності (рис.13). Було визначено, що у чоловіків з варікоцеле основними імунними показниками, які впливають на фертильність, є підвищені рівні ІФН-γ у крові і ФНП-α і ТФР-β1 - у сім'яній рідині. При варікоцеле-асоційованому неплідді оксидативний стрес взаємопов'язаний із цитокіновим дисбалансом. Другим імунозалежним механізмом порушення фертильності у цих хворих є проапоптотична дія ФНП-α на сперматозоїди у еякуляті. Отже, у хворих з варікоцеле ведучим механізмом є цитокіноопосередкований оксидативний стрес і апоптоз.

Зміни імунологічних показників у неплідних пацієнтів з хронічними запальними хворобами (рис.14) подібні до таких у групі чоловіків з ідіопатичним непліддям. Було визначено наступні фактори ризику непліддя у чоловіків з хронічними запальними хворобами: концентрація у сім'яній рідині ІЛ-1β, 10, 18, у сироватці крові – ТФР-β1 та ІЛ-6. Концентрація МДА у цій групі перевищувала показники контрольної групи в крові у три рази, між ним та кількістю CD4⁺-лімфоцитів нами визначено зворотню кореляційну залежність. У сім'яній рідині рівень МДА перевищував нормальний показник, але зв'язків між цим результатом та параметрами спермограми не було виявлено. Таким чином, ведучим імунним механізмом розвитку непліддя у цієї групи пацієнтів є

запальний процес, асоційований з порушенням локального і системного цитокінового профілю, та прояви оксидативного стресу.

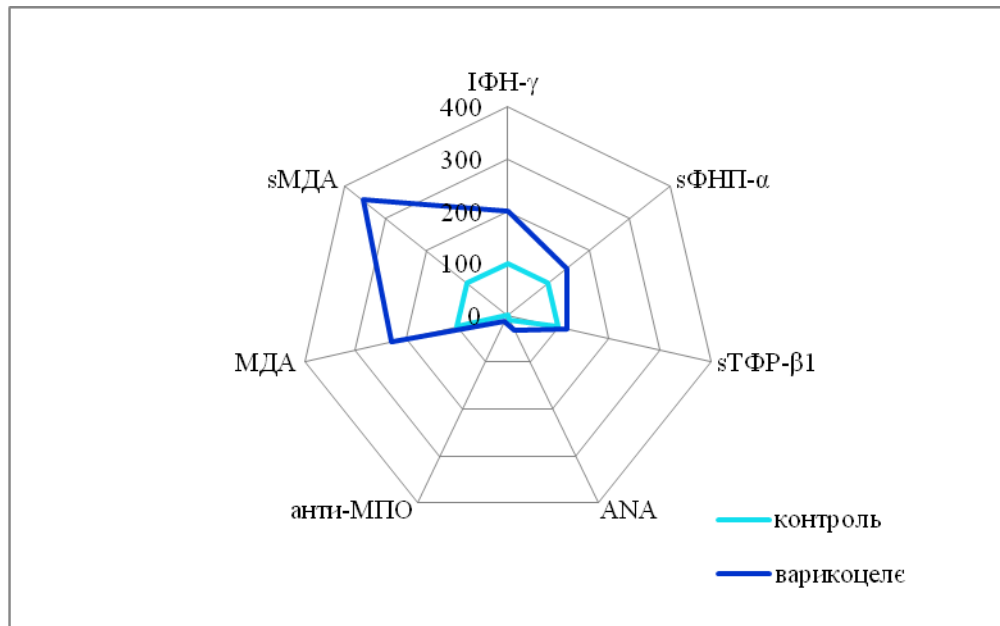


Рис. 13. Показники імунної реактивності у чоловіків з варикоцеле

У обстежених нами чоловіків з ідіопатичним непліддям (рис.15) були виявлені порушення показників імунної реактивності, які характеризують цитокін-асоційований імунопатогенез цієї патології, засвідчений прозапальним цитокіновим профілем сім'яної рідини (ІЛ-6, ІЛ-18, ІФН-γ) і зниженням фактора диференціювання сперматозоїдів – ІЛ-1β. Однак, на основі детального аналізу отриманих нами результатів можна стверджувати, що пацієнти з ідіопатичним непліддям мають ведучий імунозалежний механізм його формування, опосередкований аутоантитілами: АСАТ різних ізотипів, антитілами до ДНК ізотипу IgG, до RNP ізотипу IgG, АФА ізотипу IgG та антитілами до β2-глікопротеїну 1 ізотипу IgG, антитіла до МПО ізотипу IgG.

Проблема невоношування у жінки внаслідок запліднення дефективними сперматозоїдами також носить імунозалежний характер (рис.16). У чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, були виявлені відмінності зв'язків між імунологічними показниками, які свідчили про розбалансованість їх імунної системи. Так як чоловіки даної групи були соматично здоровими, знайти чинники впливу відхилень від норми цих показників було складно. Отже, нами виявлено, що провідні механізми чоловічого фактору непліддя у таких подружніх парах мають гуморальну та клітинну природу. Це локальні (ІЛ-1β, ІЛ-6, ФНП-α) та системне (ІФН-γ) підвищення концентрації прозапальних цитокінів у поєднанні з збільшенням кількості активованих CD3⁺HLA-DR⁺ і зменшенням кількості регуляторних CD4⁺25⁺- лімфоцитів. Наявність підвищеної кількості аутоантитіл до фосфоліпідів та β2-глікопротеїну 1 може відігравати імунопатогенетичну роль при цій формі непліддя, потребує

додаткового поглибленого вивчення з урахуванням можливості розвитку антифосфоліпідного синдрому в чоловіків цієї групи.

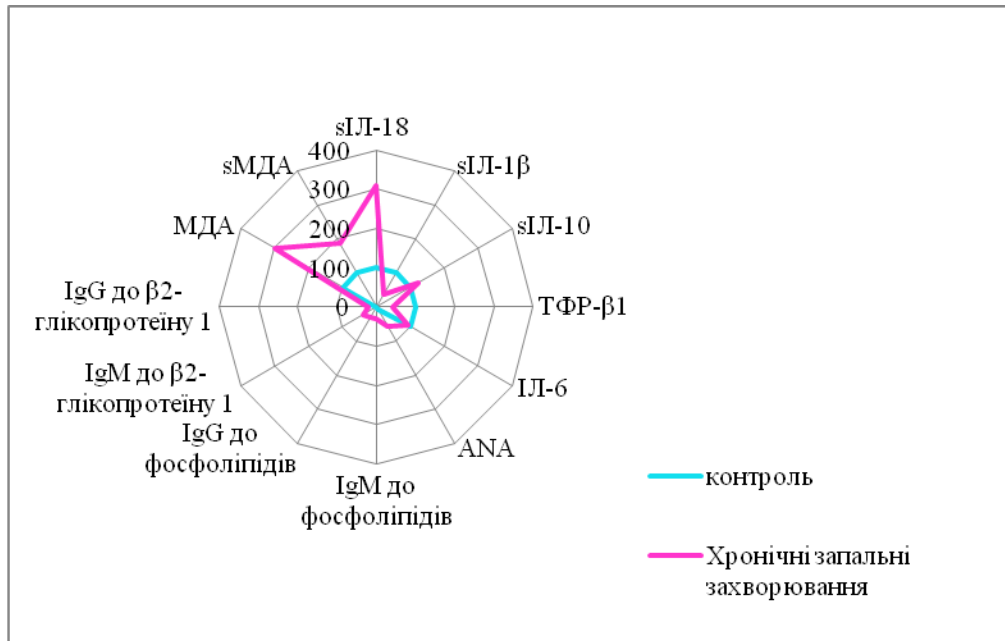


Рис.14. Показники імунної реактивності у чоловіків із хронічними запальними захворюваннями

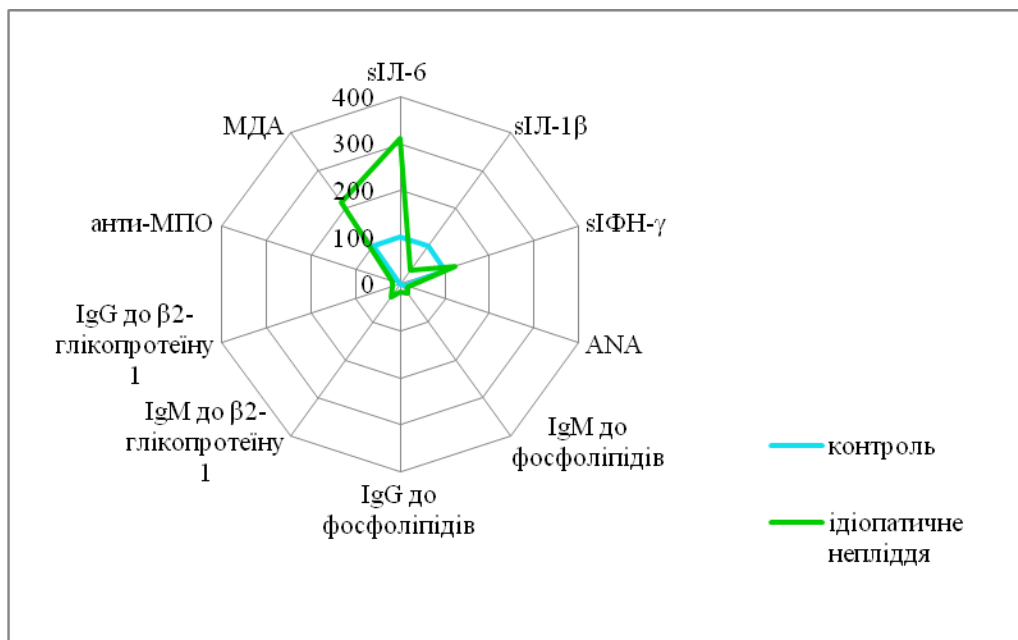


Рис. 15. Показники імунної реактивності у чоловіків з ідіопатичним непліддям

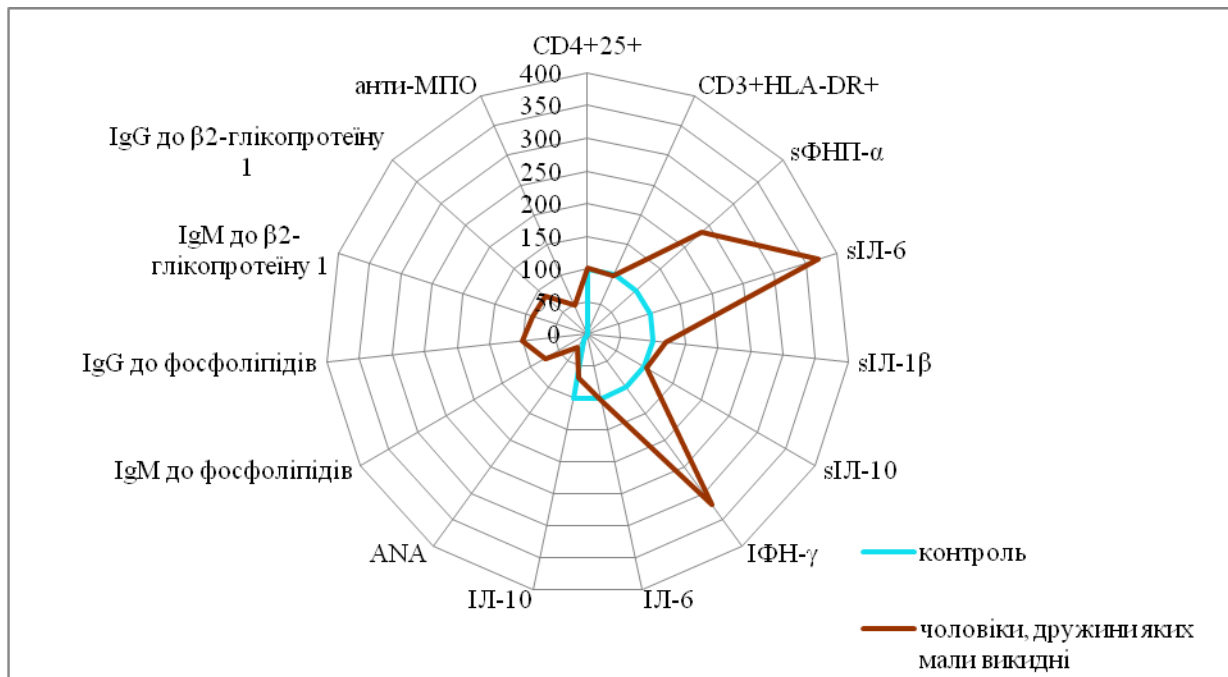


Рис.16. Показники імунної реактивності у чоловіків, дружини яких мали ранні викидні

Загалом зміни в чоловічій статевій системі, які призводять до суб- або ін-фертильності, можуть ініціювати різноманітні чинники імунної системи. Ключову роль у хворих з усіма дослідженими формами непліддя, асоційованого з різною супутньою патологією, відіграють лімфоцитарно-цитокіновий дисбаланс та оксидаційний стрес, пов'язаний з апоптозом. Однак, існують додаткові імунопатогенетичні механізми, за якими досліджені нами групи неплідних чоловіків відрізняються між собою. Тому проблема раннього виявлення і диференційної діагностики імунозалежного непліддя у чоловіків, яка поступово набуває першочергового значення у структурі родинного непліддя, потребує подальшого поглибленого дослідження з метою підвищення ефективності діагностики і лікування цієї патології.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети проведено комплексне дослідження механізмів розвитку імунозалежного непліддя в експерименті та клініці за умов аутоімунної патології та інших супутніх захворювань. Встановлено основні імунозалежні чинники, які впливають на формування чоловічого непліддя імунного генезу.

1. Розвиток колаген-індукованого артриту в щурів супроводжується значним посиленням експресії ліганду Fas та каспази 3 у зародкових клітинах з розвитком локальної запальної реакції, посиленої інфільтрації яєчок імуніцитами та системною запальною реакцією з підвищенням активності лужної фосфатази у 1,8 разів, аланінамінотрансферази – у 2 рази, сироваткового рівня активних форм кисню та азоту – в 2,5 та 2 рази, відповідно.

2. Виявлена присутність антигену HLA-DRB1*07,08 та експресія рецептора KIR-2DS5, які асоціюються із наявністю у крові хлопчиків з крипторхізмом АСАТ ($R=0,52$). У 30% хлопчиків із крипторхізмом у сироватці крові виявлені АСАТ ізотипів IgA (57,6%) і IgM (54,6%), сайти їх зв'язування були переважно розташовані на кінчику хвостика сперматозоїда (81,8%). Не було відзначено різниці у характеристиках АСАТ залежно від форми крипторхізму – однобічного або двобічного, а також віку.
3. Встановлено, що у 34,7% хлопчиків, хворих на ентезит-асоційовану форму ювенільного ідіопатичного артриту, в сироватці крові виявлено антиспермальні антитіла ізотипу IgM (52,9%) із сайтом прикріплення Tt (82,4%).
4. Встановлено, що серед неплідних чоловіків найбільша кількість осіб з присутніми у сім'яній рідині АСАТ належала до чоловіків, дружини яких мали ранні викидні (37,5%), та пацієнтів з ідіопатичним непліддям (30,8%) Усі АСАТ в сім'яній рідині мали сайт прикріплення на хвостика сперматозоїдів і були ізотипу IgA у 66,0% випадків.
5. Показано, що у неплідних пацієнтів з СЗСТ характерним є підвищення у сироватці крові антифосфоліпідних аутоантитіл ізотипу IgM - у 4,0 рази, IgG - у 5,0 разів, аутоантитіл до $\beta 2$ -GP 1 IgM - у 5,0 разів, IgG - у 4,0 рази, аутоантитіл до МПО ізотипу IgG – у 8,0 разів; з ідіопатичним непліддям - антифосфоліпідних аутоантитіл ізотипів IgM та IgG - у 2,0 рази, аутоантитіл до $\beta 2$ -GP 1 ізотипу IgM - у 3,8 разів, ізотипу IgG - у 1,5 разів, аутоантитіл до МПО ізотипу IgG – у 2 рази; чоловіків, дружини котрих мали ранні викидні - антифосфоліпідних аутоантитіл ізотипу IgM -у 6,0 разів, ізотипу IgG - у 8,0 разів, антитіл до $\beta 2$ -GP 1 ізотипів IgM та IgG - у 7,0 разів, аутоантитіл до МПО ізотипу IgG - у 5,8 разів.
6. Визначено, що для неплідних пацієнтів з хронічними запальними хворобами характерною була підвищена відносна кількість $CD8^+$ клітин у - 1,2 разів, $CD4^+25^+$ клітин - у 1,5 разів та знижена кількість $CD16^+/56^+$ клітину - у 1,5 разів; для чоловіків з ідіопатичним непліддям – підвищена кількість $CD4^+$ лімфоцитів – у 1,2 разів та $CD4^+25^+$ лімфоцитів - у 1,6 разів; для чоловіків, дружини котрих мали ранні викидні, підвищена у 1,2 разів кількість $CD8^+$ Т-лімфоцитів. У чоловіків з аутоімунними захворюваннями кількість $CD4^+CD25^+$ -лімфоцитів є предиктором зниження рухливості сперматозоїдів.
7. Визначено, що у сироватці крові хворих на варикоцеле, СЗСТ, ідіопатичне непліддя та у чоловіків, дружини котрих мали ранні викидні, рівень ІФН- γ був підвищений у середньому в 2,7 разів, у чоловіків з СЗСТ та ідіопатичним непліддям рівень ІЛ-6 зріс у 5,3 рази, ІЛ-18 – 1,5 разів, у чоловіків з хронічними запальними хворобами виявлено зниження рівня ІЛ-1 β у 3,36 рази та ТФР- $\beta 1$ у 2,42 рази.
8. Показано, що у сім'яній рідині чоловіків із варикоцеле, СЗСТ, хронічними запальними хворобами та у чоловіків, дружини яких мали ранні викидні, є підвищені рівні ІЛ-6 в середньому в 2,5 разів, ІЛ-18 - у

2,3 рази , ФНП- α - у 2,3 рази та знижені рівні ІЛ-1 β - у 2,3 рази та ТФР- β 1 - у 1,3 рази, у пацієнтів з хронічними запальними хворобами були знижені рівень ІЛ-1 β - у 2,7 рази та ТФР- β 1 - у 1,2 рази та підвищені рівні ІЛ-6 - у 2,5 разів та ІЛ-18 - у 3 рази.

9. Визначено, що у хворих на СЗСТ діагностичним алгоритмом прогнозування ризику порушення фертильності є наступні імунологічні зміни: підвищені рівні ІЛ-6 - у 7 разів, ІЛ-18 - у 1,5 рази, ІФН- γ - у 3,5 рази в сироватці крові; підвищені концентрації ФНП- α - у 1,2 рази, ІЛ-6, ІЛ-18 - у 3,5 разів та знижені рівні ТФР- β 1 та ІЛ-1 β - у 2,1 рази у сім'яній рідині; підвищена кількість у крові CD4⁺CD25⁺ Т-клітин - у 1,3 разів та знижена CD4⁺CD25⁻ Т-клітин - у 1,2 разів; підвищена кількість сироваткових аутоантитіл до ДНК у 5,3 рази, до фосфоліпідів - у 4,5 разів, до мієлопероксидази - у 8,0 разів; підвищення рівня малонового диальдегіду в крові - у 2,25 разів, у сім'яній рідині - у 8,6 разів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях:

1. Гаврилюк А.М. Зміна експресії поверхневих маркерів Т-лімфоцитів периферичної крові у хворих на генералізований пародонтит під впливом натрію диклофенаку *in vitro* / І.С. Денега, А.М. Гаврилюк // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2002. – Т. 18. - № 2. – С. 48-54. *(Здобувачкою проведено визначення поверхневих маркерів Т-лімфоцитів периферичної крові, зроблено статистичну обробку результатів, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку)*
2. Havrylyuk A. Antisperm antibodies in prepubertal boys with cryptorchidism / A. Domagala, A. Havryluk, A. Nakonechnyj, M. Kamieniczna, V. Chopyak, M. Kurpisz // Archives of Andrology. - 2006. – Vol. 52. – № 6. – P. 411–416. *(Здобувачкою проведено визначення антиспермальних антитіл у сироватці крові хлопчиків з крипторхізмом, зроблено статистичну обробку результатів, аналіз і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку).*
3. Гаврилюк А.М. Біохімічні властивості антитіл у хворих на системний червоний вовчак / Ю.Я. Кіт, І.Р. Магорівська, А.М. Гаврилюк, В.В.Чоп'як, Я.Ф. Толстяк, Р.О.Білий, Р.С.Стойка // Імунологія та алергологія. – 2008. – №3 (додаток). – С. 66–71.*(Здобувачкою проведено аналіз літератури і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку).*
4. Гаврилюк А.М. Оцінка факторів ризику розвитку імунозалежних захворювань і апоптозу у молодих людей / В.В. Чоп'як, А.М. Гаврилюк, Я.Ф. Толстяк // Імунологія та алергологія. – 2008. – №3 (додаток). – С. 24-30. *(Здобувачкою проведено аналіз літератури і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку).*
5. Гаврилюк А. Імунологічні наслідки хірургічного лікування крипторхізму / А. Наконечний, М. Курпіш, В. Чоп'як, А. Гаврилюк, М. Каменічна //

- Імунологія та алергологія. – 2008. – № 3/1. – С.76–84.*(Здобувачкою проведено визначення антиспермальних антитіл у сироватці крові хлопчиків з крипторхізмом, екстраговано ДНК з крові для імуногенетичних досліджень, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
6. Havrylyuk A. Evaluation of immunological criteria for rheumatoid arthritis / A. Havrylyuk, R. Bilyu, J. Tolstiak, I. Kril, M. Synenka, J. Zabek, A. Palacz, J. Bogaczewicz, V. Chopyak, R. Stoika // Central European Journal of Immunology. – 2009. – Vol. 34. – № 3. – P.176–182.*(Здобувачкою проведено фенотипування популяцій лімфоцитів та субпопуляцій Т-лімфоцитів у периферичній крові, аутоантитіл у сироватці крові пацієнтів із РА, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
 7. Havrylyuk A. Apoptosis-related changes in plasma membrane glycoconjugates of peripheral blood lymphocytes in rheumatoid arthritis / R. Bilyu, L Nemesh, V. Antoniuk, Yu. Kit, I. Valchuk, A. Havrylyuk, V. Chopyak, R. Stoika // Autoimmunity. – 2009. – Vol. 42. – № 4. – P.334–336. *(Здобувачкою виконано визначення апоптозу лімфоцитів периферичній крові пацієнтів із РА, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
 8. Гаврилюк А.М. Протеолітична активність IgG сироватки крові хворих на системний червоний вовчак / Ю.Я. Кіт, І.Р. Магорівська, А.М. Гаврилюк, В.В.Чоп'як, Р.О.Білий, Р.С.Стойка // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81., №3. – С. 77–83.*(Здобувачкою проведено аналіз літератури і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку).*
 9. Гаврилюк А.М. HLA-маркери крипторхізму / А.Й. Наконечний, А.М. Гаврилюк, В.В.Чоп'як, Б. Новаковська, П. Кушнерчик, М. Курпіш // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2009. – № 4. – С. 65–68. *(Здобувачкою екстраговано ДНК з крові для імуногенетичних досліджень, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
 10. Havrylyuk A. Anti-histone H1 IgGs from blood serum of systemic lupus erythematosus patients are capable of hydrolyzing histone H1 and myelin basic protein / I.B. Magorivska, R.O.Bilyu, A.M. Havrylyuk, V.V. Chopyak, R. S. Stoika, Y.Y. Kit // Journal of Molecular Recognition. – 2010. – Vol.23. – P. 495–502. *(Здобувачкою проведено аналіз літератури і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку).*
 11. Havrylyuk A. Flow cytometry application in the evaluation of antisperm antibodies in sera samples of infertile people and prepubertal boys with gonadal disorders / M. Kamieniczna, A. Havrylyuk, A. Nakonechnyj, J. Wojko, V. Chopyak, M. Kurpisz // Ginecol. Pol. – 2010. – Vol. 81. – P. 588– 593. *(Здобувачкою проведено визначення антиспермальних антитіл у сироватці крові хлопчиків з крипторхізмом, екстраговано ДНК з крові для імуногенетичних досліджень, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
 12. Гаврилюк А.М. Погляд на патологію опускання яєчок з боку імунної системи / А.Й. Наконечний, А.М. Гаврилюк, М. Курпіш, Р.А.Наконечний

- // Клінічна та експериментальна патологія. – 2010. – Т. IX, № 4 (34). – С. 147–150. *(Здобувачкою проведено аналіз літератури і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку).*
13. Havryluk A. Cryptorchidism and long-term consequences / M.Kurpisz, A.Havryluk, A. Nakonecznyj, M.Kamieniczna // Reproductive Biology. – 2010. -Vol. 10. - №1. - P. 19-35. *(Здобувачкою проведено визначення статевих гормонів у хлопчиків з крипторхізмом, аналіз літератури і підготовлено матеріали до друку).*
 - 14.Гаврилюк А.М. Синдром змішаної кріоглобулінемії як імунопатологічний синдром / В.В. Чоп'як, А.М. Гаврилюк, Н.В. Марітчак, А.С.Кульчицька, Н.М.Влох, Р.Д.Шваліковська // Імунологія та алергологія. – 2010. – №2(2). – С. 3–13. *(Здобувачкою проведено аналіз літератури і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку).*
 - 15.Havrylyuk A. Weak association of anti-sperm antibodies and strong association of familial cryptorchidism/infertility with HLA-DRB1 polymorphisms in prepubertal Ukrainian boys / M. Kurpisz, A. Nakonechnyy, W. Niepiekło-Miniewska, A. Havryluk, M. Kamieniczna, B. Nowakowska, V. Chopyak, P. Kusnierczyk // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2011. – Vol. 9. – P. 129–134. *(Здобувачкою екстраговано ДНК з крові для імуногенетичних досліджень, проведено визначення HLA-антигенів, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
 - 16.Гаврилюк А.М. Вплив хірургічного лікування на показники місцевого та системного імунітету у хворих на варикоцеле / А.М.Гаврилюк, В.В.Чоп'як, Й.А. Наконечний, А.Й. Наконечний, І.Й. Кріль, М.П. Ломіковська, М. Курпіш // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2014. – № 3/1. – С. 107–110. *(Здобувачкою проведено визначення числа популяцій лімфоцитів та субпопуляцій Т-лімфоцитів у периферичній крові хворих з варикоцеле, проведено визначення цитокінів, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
 - 17.Havrylyuk A.M. Proteolytic activity of IgGs from blood serum of wistar rats at experimental rheumatoid arthritis / Yu. Ya. Kit, S. L. Myronovsky, I. I. Kril, A.M.Havrylyuk, V. V. Chopyak, R. S. Stoika // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2014. – Vol. 86., N 5. – P. 95 – 101. *(Здобувачкою проведено моделювання в експерименті ревматоїдного артрити у щурів, проведено електрофорез їх сироваток, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
 - 18.Гаврилюк А.М. Зміни функціональної активності нейтрофілів щурів за умов експериментального колагенового артрити / І.Й.Кріль, А.М.Гаврилюк, В.В.Чоп'як, Ю.Я. Кіт, А.В.Коцюруба, Р.С.Стойка // Біологія тварин. – 2014. – Том. 16., № 3. – С. 60– 67. *(Здобувачкою проведено моделювання в експерименті ревматоїдного артрити у щурів, проведено визначення фагоцитарної активності нейтрофілів, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
 - 19.Гаврилюк А.М. Активні форми кисню та нітрогену в сироватці крові щурів за умов гострого та хронічного експериментального артрити / І.Й.

- Кріль, А.М.Гаврилюк, А.В.Коцюруба, Ю.Я. Кіт, В.В.Чоп'як, Р.С. Стойка //Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2014. – Том 8., №3–4. – С. 5–14.*(Здобувачкою проведено моделювання в експерименті ревматоїдного артриту у щурів, проведено біохімічні дослідження, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
- 20.Гаврилюк А.М. Характеристика ензиматичної активності та білкового складу сироватки крові щурів за умов індукованого імунізацією запалення суглобів / І.Й. Кріль, А.М. Гаврилюк, В.В.Чоп'як, Стойка Р.С., Ю.Я. Кіт // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2014. – № 2. - С.16–23.*(Здобувачкою проведено моделювання в експерименті ревматоїдного артриту у щурів, проведено біохімічні дослідження, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
21. Havrylyuk A. Two New Cases of KIR3DP1, KIR2DL4-negative Genotypes, one of which is also Lacking KIR3DL2 / W. Niepeklo-Miniewska, N. Zuk, A. Havrylyuk, P. Kusnierczyk, M. Kurpisz, V. Chopyak // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). – 2014. – Vol. 18. -№ 3. – 423-429. *(Здобувачкою зібрано групу здорових осіб для проведення досліджень, екстраговано ДНК з їх крові, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
22. Havrylyuk A. Cytokines in the Blood and Semen of Infertile Patients / A. Havrylyuk, V. Chopyak, Y. Boyko, I. Kril, M. Kurpisz // Central European Journal of Immunology. – 2015. – Vol.40. - №3. – P.337-344. *(Здобувачкою зібрані групи пацієнтів для проведення досліджень, проведено визначення цитокінів, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
- 23.Havrylyuk A. Killer Cell Immunoglobulin-like receptor gene association with Cryptorchidism / W. Niepeklo-Miniewska, P. Kusnierczyk, A. Havrylyuk M. Kamieniczna, A. Nakonechnyy, V. Chopyak, M. Kurpisz // Reproductive Biology. – 2015. – Vol.163. – Pages 6. *(Здобувачкою екстраговано ДНК із крові хлопчиків з крипторхізмом, проведено визначення експресії KIR-рецепторів, проаналізовано отримані дані, підготовлено матеріали до друку).*
- 24.Havrylyuk A. Nowe aspekty nieplodnosci partnerskiej: czynnik meski / A. Havrylyuk, V. Chopyak, A. Nakonechnyy, M. Kurpisz // PHMD (Postepy higieny medycznej i doswiadczalnej).- 2015. – Vol.69. – P.1228- 1238. *(Здобувачкою проведено аналіз літератури і узагальнення отриманих даних, підготовлено матеріали до друку).*
- 25.Гаврилюк А.М. Клінічне та патогенетичне значення моделювання ревматоїдного артриту в експерименті / Гаврилюк А.М. // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2015. – № 3. –С.90–98. *(Здобувачкою складено схему імунізації щурів для моделювання РА, проведено аналіз літератури, підготовлено матеріали до друку).*
- 26.Гаврилюк А.М. Оксидативні процеси на різних стадіях розвитку колаген-індукованого артриту у щурів / А.М. Гаврилюк, В.В. Чоп'як, Г.О. Потьомкіна, І.Й. Кріль // Експериментальна і клінічна фізіологія та біохімія. – 2016. - №2(74). – С. 21-28. *(Здобувачкою проімунізованої щурів,*

проведено біохімічні дослідження, аналіз літератури, підготовлено матеріали до друку).

27. Гаврилюк А.М. Антиспермальні антитіла у хлопчиків препубертатного віку з імунопатологією / А.М. Гаврилюк, В.В. Чоп'як, Я.Є. Бойко, А.Й. Наконечний, М.Ю. Каменічна, М.М. Курпіш // Експериментальна і клінічна фізіологія та біохімія. – 2016. - №3(75). – С. 66- 74. *(Здобувачкою виконано визначення антиспермальних антитіл у сироватках хлопчиків з крипторхізмом та ЮІА, проведено аналіз літератури, підготовлено матеріали до друку).*
28. Гаврилюк А.М., Аутоантитіла в сироватці крові неплідних чоловіків із супутньою патологією / А.М. Гаврилюк, В.В. Чоп'як, І.Й. Кріль, Н.В. Марітчак, Н.М. Влох, Г.С. Кульчицька, Р.Д. Шваліковська // Вісник Львівського національного університету ім. І.Франка, Серія біологічні науки. – 2016. - Випуск 73. – С. 265-275. *(Здобувачкою виконано визначення ауто антитіл у сироватках неплідних чоловіків з аутоімунною та іншою супутньою патологією, статистично опрацьовано результати, проведено аналіз літератури, підготовлено матеріали до друку).*

За темою дисертаційної роботи зареєстровані патенти на винахід:

29. Гаврилюк А.М. Спосіб прогнозування формування імунозалежного непліддя у хворих після варицелектомії / Гаврилюк А.М., Чоп'як В.В., Наконечний Й.А., Кріль І.Й., Курпіш М. (PL); заявник і патентовласник Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького МОЗ України. – Патент на винахід № 111800, Україна UA 111800 C2; МПК G01N 33/487, 33/49, 33/53 (2006.01) Бюл. №11, 10.06.2016.
30. Гаврилюк А.М. Спосіб прогнозування імунозалежного чоловічого непліддя / Гаврилюк А.М., Чоп'як В.В., Бойко Я.Є., Кріль І.Й., Курпіш М.(PL); заявник і патентовласник Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького МОЗ України. – Патент на винахід № 110754 Україна, UA 110754 C2; МПК G01N 33/53 (2006.01) Бюл. №3, 10.02.2016.

Основні тези за матеріалами наукових конференцій:

31. Havrylyuk A. Predictive factors in immune-mediated couples infertility by west-region of Ukraine / W. Chopyak, M. Kurpisz, M. Kamenichna, J. Leshega, D. Zastawna, A. Havrylyuk // XIII Congres of Polish Society of Experimental and Clinical Immunology: abstracs. – Krakow, 2008. - Central European Journal of Immunology. - 2008. - Vol. 33. - Suppl.1. - P.66.
32. Havrylyuk A. Detection of antisperm antibodies by flow cytometry Measurement in serum samples of infertile patients and prepubertal boys with testicular failures / M. Kamieniczna, T. Kolanowski, A. Nakonecznyj, A. Havrylyuk, V. Chopyak, M. Kurpisz // Cytometria w diagnostyce lekarskiej: VII Konferencja: streszczenia. - Poznan, 2009.- P. 42-43.

33. Havrylyuk A. Is PTP N22 SNP associated with autoantibodies in spontaneous Abortion and cryptorchidism as in rheumatoid arthritis? / E. Majorczyk, I. Nowak, Pawlik, A. Malinowski, H. Tchórzewski, E. Barcz, J.R. Wilczyński, M. Kurpisz, M. Kamieniczna, A. Havryluk, A. Nakonechnyi, V. Chopyak, R. Płoski, P. Kuśnierczyk // 3rd Göttingen Workshop on Immunology and Immunogenetics: abstracts. - Göttingen, 2010. – P. 22–23.
34. Havrylyuk A. Immunological factors in pre-pubertal boys / M. Kurpisz, M. Kamieniczna, A. Havryluk, A. Nakonechnyj // 14th International Congress of Immunology: abstracts. – Kobe, 2010. – P. 35–36.
35. Havryluk A. HLA class II typing of cryptorchidism in prepubertal boys and the strong association with DRB1*11 / M. Kurpisz, W. Niepiekło-Miniewska, A. Nakonechnyy, A. Havryluk, M. Kamieniczna, B. Nowakowska, V. Chopyak, P. Kuśnierczyk // XIV Congress of the Polish Society of Experimental and Clinical Immunology: abstracts. – Gdansk, 2011. – P. 130–131.
36. Havrylyuk A. Associations of anti-sperm antibodies and familial Cryptorchidism with *HLA-DRB1* polymorphisms in prepubertal Ukrainian boys / M. Kurpisz, W. Niepiekło-Miniewska, A. Havryluk, A. Nakonechnyj, M. Kamieniczna, B. Nowakowska, V. Chopyak, P. Kuśnierczyk // 9th European Congress of Reproductive Immunology: abstracts. - Copenhagen, 2011. - Journal of Reproductive Immunology. – 2011. – Vol. 90, Issue 2. – P. 175–176.
37. Havryluk A. Detection of antisperm antibodies by flow Cytometry measurement in serum samples of infertile patients and prepubertal boys with testicular failures / M. Kamieniczna, T. Kolanowski, A. Havryluk, Nakonechnyj, M. Zawiszewska, V. Chopyak, M. Kurpisz // 9th European Congress of Reproductive Immunology: abstracts. - Copenhagen, 2011. - Journal of Reproductive Immunology. – 2011. – Vol. 90, Issue 2. – P. 174–175.
38. Гаврилюк А.М. Фактори ризику та прогнозування сімейного непліддя: світовий досвід / В.В.Чоп'як, А.М.Гаврилюк // Міжнародна науково-практична конференція, присвячена всесвітньому дню здоров'я: тези. - Київ, 2012. – Східноєвропейський журнал громадського здоров'я. – 2012. - №1(17). – С. 109–110.
39. Гаврилюк А.М. Сучасні можливості діагностики імунозалежного чоловічого непліддя в Україні / В.В.Чоп'як, А.М.Гаврилюк, Д.А. Салюк, М. Курпіш, М. Фрончек, М. Каменічна // Імунопрофілактика – нові підходи: науково-практична конференція: матеріали. – Київ, 2012. - С. 10-13
40. Гаврилюк А.М. Вміст сірководню у сироватці крові щурів за гострого і хронічного експериментального артрити / Ю.Я. Кіт, І.Й. Кріль, А.М.Гаврилюк, А.В. Коцюрuba, В.В. Чоп'як, Р.С. Стойка Р.С. // 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом: збірник тез. – Ужгород, 2014. – С. 105.
41. Гаврилюк А. Рівень апоптичних лімфоцитів у крові щурів за умов гострого та хронічного артрити / І. Кріль, А. Гаврилюк, В. Чоп'як,

- Р. Стойка, Ю. Кіт // 4-й з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом: збірник тез. – Ужгород, 2014. – С. 116.
42. Havrylyuk A. Novel investigations of immunological parameters of patients with varicocele after surgical treatment / A. Havrylyuk, V. Chopyak, A. Nakonechnyy, I. Kril, M. Lomikowska, M. Kurpisz // 11th Congress of European and Hungarian society for Reproductive Immunology: abstracts. - Budapest, 2014. - Journal of Reproductive Immunology. – 2014. – Vol. 101-102. – P. 57– 58.
43. Havrylyuk A. The Study of Immunological Parameters and Cytokines in the Blood and Semen of Infertile Patients / A. Havrylyuk, V. Chopyak, J. Wojko, I. Kril, M. Kurpisz // 15th Congress of Polish SECI: abstracts. –Wroclaw, 2014. – Central European Journal of Immunology. – 2014. – Vol.39. Suppl 1. – P.32
44. Havrylyuk A. Evaluation of local and systemic immunity in patients with varicocele at stages of surgical treatment/ A. Havrylyuk, V. Chopyak, A. Nakonecznyj, J. Nakonechnyj, I. Kril, M. Lomikowska, M. Kurpisz // Standardy medyczne: XV Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Chirurgow dziecięcych: abstracts. – Gdansk, 2014. – T. 4, No1. – P. 56.
45. Гаврилюк А.М. Роль «жіночого фактора» у патогенезі родинного непліддя / Гаврилюк А.М., Чоп'як В.В., Курпіш М. // Матеріали Другої науково-практичної конференції з міжнародною участю «Гармонія гормонів – основа здоров'я жінки», 15-16 травня 2014 року, м. Київ, Україна. – Репродуктивная эндокринология. – 2014. - №2(16). – С. 100-101.
46. Havrylyuk A. Different mechanisms of formation of immune-dependent infertility in various groups of infertile males / A. Havrylyuk, V. Chopyak, M. Kurpisz // Journal of Reproductive Immunology. – 2016. – Vol. 115. – P. 60.

АНОТАЦІЯ

Гаврилюк А.М. Механізми формування імунозалежного непліддя в осіб чоловічої статі з органоспецифічними та системними аутоімунними хворобами. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.09 – імунологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

Дисертація присвячена дослідженню імунозалежних механізмів розвитку непліддя у осіб чоловічої статі з аутоімунними захворюваннями та іншою супутньою патологією в експерименті та клініці. Нами проведено моделювання системного захворювання сполучної тканини (колаген-індукований артрит) в експерименті на щурах-самцях та доведено, що оксидативний стрес та апоптоз є ведучими патогенетичними факторами, вторинного пошкодження яєчок та додаткових залоз щурів. На клінічному матеріалі нами було вивчено механізми формування аутоімунних процесів, асоційованих з крипторхізмом і ЮІА. При крипторхізмі синтез антиспермальних антитіл може детермінуватися генетично

і залежить від домінування експресії HLA-DRB1*07,08; HLA-DQB1*06 та KIR-2DS5. Формування непліддя у різних групах дорослих пацієнтів можна прогнозувати за змінами таких імунних чинників: АСАТ в сім'яній рідині ізотипу IgA із сайтом прикріплення до кінця хвостика; збільшення числа лімфоцитів CD4⁺CD25⁺; підвищення рівнів ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-18 у сироватці крові; зниження концентрації ТФР- β 1 та ІЛ-1 β у сім'яній рідині; підвищений рівень ІЛ-18 у сім'яній рідині; підвищений рівень антитіл ізотипів IgG і IgM до фосфоліпідів та β 2-глікопротеїну 1, ізотипу IgG антитіл до МПО; підвищений рівень МДА у крові та сім'яній рідині. Загалом у формуванні імунозалежного чоловічого непліддя ключові ролі відіграють АСАТ, лімфоцитарно-цитокіновий дисбаланс, оксидаційний стрес та активація апоптозу в клініці та експерименті.

Ключові слова: колаген-індукований артрит, системна аутоімунна хвороба, органоспецифічна аутоімунна хвороба, імунозалежне непліддя, лімфоцитарно-цитокіновий дисбаланс, оксидаційний стрес, апоптоз.

АННОТАЦІЯ

Гаврилюк А.М. Механизмы формирования иммунозависимого бесплодия у особей мужского пола с органоспецифическими и системными аутоиммунными заболеваниями. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.09 – иммунология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка МОН Украины, Киев, 2017.

Диссертация посвящена исследованию иммунозависимых механизмов развития бесплодия у особей мужского пола с аутоиммунными болезнями и другой сопутствующей патологией в эксперименте и клинике. Нами проведено моделирование системного аутоиммунного заболевания соединительной ткани (коллаген-индуцированный артрит) в эксперименте на крысах-самцах и доказано, что оксидативный стресс и апоптоз являются ведущими патогенетическими факторами вторичного повреждения яичек и придатков крыс. На клиническом материале нами было изучено механизмы формирования аутоиммунных процессов, ассоциированные с крипторхизмом и ЮИА. При крипторхизме синтез антиспермальных антител может детерминироваться генетически і зависит от доминирования экспрессии HLA-DRB1*07,08; HLA-DQB1*06 и KIR-2DS5. Формирование бесплодия в разных группах взрослых пациентов можно прогнозировать за изменениями таких факторов: АСАТ в семенной жидкости изотипа IgA с сайтом прикрепления к концу хвостика; увеличение числа лимфоцитов CD4⁺CD25⁺; повышение уровней ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-18 в сыворотке крови; снижение концентрации ТФР- β 1 и ИЛ-1 β в семенной жидкости; повышенный уровень ИЛ-18 в семенной жидкости; повышенный уровень антител изотипов IgG и IgM к фосфолипидам и β 2-глікопротеїну 1, антител к МПО изотипа IgG; повышенный уровень МДА в крови и семенной жидкости. В итоге в формировании иммунозависимого мужского бесплодия

ключевые роли играют АСАТ, лимфоцитарно-цитокиновый дисбаланс, оксидационный стресс и активация апоптоза в клинике и эксперименте.

Ключові слова: коллаген-індуційований артрит, системна аутоімунна хвороба, органоспецифічна аутоімунна хвороба, імунозалежне безпліддя, лимфоцитарно-цитокиновий дисбаланс, оксидационний стресс, апоптоз.

ANNOTATION

Havrylyuk A.M. Mechanisms of formation of immune-dependent infertility in individuals of male gender with organ-specific and systemic autoimmune diseases. – Manuscript.

Dissertation for the doctor of biological sciences degree in specialty 03.00.09 – immunology. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

Aim of the work was to investigate the immune-dependent mechanisms of infertility in boys, men and animals with autoimmune and other accompanying diseases in experiment and clinical practice. We conducted modeling of the systemic disease of the connective tissue (collagen-induced arthritis) in experiments in male rats. We found that activation of the synthesis of active radicals of oxygen and nitrogen plays one of the key roles in the pathogenesis of the experimental collagen-induced arthritis, in which testicles and epididymis get damaged. Death of germinal cells occurs through the mechanism of apoptosis with the involvement of the system Fas-FasL, induced system of cytokines, that are closely associated with oxidative and nitrosative stress. We showed that morphologic examination of the tissue of testicles and epididymis and immune-histochemical determination of the markers of apoptosis FasL and caspase-3 are the most evident confirmation of the diagnosis of primary and secondary orchitis.

Using clinical material we investigated other mechanisms of the formation of autoimmune processes, associated with the defects of development of male sexual organs, genetically mediated, antibodies-mediated and lymphocyte-cytokine associations. In cryptorchidism synthesis of antisperm antibodies may be genetically determined and depends on the domination of the expression of HLA-DRB1*08, HLA-DQB1*06 and KIR-2DS5. Antisperm antibodies (ASA) in blood serum were found in 30.00% patients with cryptorchidism, they belonged to classes IgG, IgA and IgM and had topographical localization to the end of the spermatozoon's tail (Tt). The following factors have prognostic significance towards formation of infertility in boys with cryptorchidism: character of defect; immunogenetic factors, which belong to MHC of I and II classes; class and topographic peculiarities of the fixation of antibodies to spermatozoa. In boys with juvenile idiopathic arthritis (JIA) ASA were found in 34.69% patients, they belonged to IgM class and had localization H (head) and Tt.

Formation of infertility in men with systemic inflammatory diseases of the connective tissue (SIDCT) occurs under the conditions of changes of such

semiological and immunological parameters: leukospermia; agglutination of spermatozoa; ASAD of IgA class in seminal fluid with the localization Tt; increased number of lymphocytes $CD4^+CD25^+$ and $CD4^+CD25^-$ T-cells; increased levels of TNF- α , IL-6, IL-18 in blood serum; decreased concentration of TGF- β 1 and IL-1 β in seminal fluid; increased level of IL-18 in seminal fluid; increased level of antinuclear and antibodies of the classes IgG and IgM to phospholipids and β 2-glycoprotein 1, antibodies to myeloperoxidase of the class IgG; increased level of MDA in blood and seminal fluid. In men with infertility on the background of the autoimmune diseases number of factors, affecting fertility, is the highest among the other groups.

We revealed that determination of ASA in patients with varicocele is not indicial and formation of infertility occurs under the conditions of changes of the following semiological and immunological parameters: increased levels of IFN- γ and IL-18 in blood; TNF- α and TGF- β 1 in seminal fluid; increased level of MDA in blood. Oxidation stress and apoptosis are the main mechanisms of cytokine-mediated disfunction of testicles in varicocele.

For patients with diseases on the background of chronic inflammatory processes the most important are the following prognostic factors: decreased number of $CD4^+$ -lymphocytes; decreased levels of IL-6 and TGF- β 1 in blood and IL-1 β , IL-10, IL-18 in seminal fluid, increase of the concentration of IL-18 and TNF- α in seminal fluid; increase of the level of MDA.

We showed that in patients with idiopathic infertility the latter has immune-dependent character, if: in seminal fluid ASA of IgA class with the localization Tt are determined; in blood increased number of $CD4^+CD25^+$ T-lymphocytes, decreased quantity of $CD4^+CD25^-$ cells; increase of the level of IL-6, IFN- γ , decrease of IL-1 β ; increase of MDA level in blood are evaluated.

Immune-independent character of infertility in somatically healthy men, whose wives had early miscarriages: in seminal fluid ASA of IgA class with the localization Tt are determined; in blood increased number of $CD3^+CD4^+25^+$ and $CD3^+HLA-DR^+$, increased levels of IL-6, IL-10, IFN- γ in blood, IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α in seminal fluid; increased level of MDA in seminal fluid; increased level of antibodies of classes IgG and IgM to phospholipids and β 2-glycoprotein.

We evaluated that changes in male sexual system, causing sub- and infertility are initiated by different factors – triggers of the mechanisms of infertility formation. Lymphocytes-cytokines disbalance, oxidative stress and activation of apoptosis in clinical practice and experimental investigations play a key role in this.

Keywords: collagen-induced arthritis, systemic autoimmune disease, organospecific autoimmune disease, immune-independent infertility, lymphocyte-cytokines disbalance, oxidative stress, apoptosis.