



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 111800

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2015 03722**
- (22) Дата подання заявки: **20.04.2015**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.06.2016**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **26.10.2015, Бюл.№ 20**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.06.2016, Бюл.№ 11**
- (72) Винахідник(и):
**Гаврилюк Анна Мирославівна (UA),
Чоп'як Валентина Володимирівна (UA),
Наконечний Йосип Андрійович (UA),
Кріль Ірина Йосипівна (UA),
Курпіш Мацей (PL)**
- (73) Власник(и):
**ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА
ГАЛИЦЬКОГО,
вул. Пекарська, 69, м. Львів, 79010 (UA)**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
- Hala L Al-Daghistani et al.: "Evaluation of serum testosterone, progesterone, seminal antisperm antibody, and fructose levels among Jordanian males with a history of infertility", Biochemistry research international, Volume 2010, Article ID 409640, 8 pages
- Koji Shiraishi et al.: "Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology", International Journal of urology (2012) 19, 538-550
- Brigitte Dousset et al.: "Seminal cytokine concentrations (IL-1beta, IL-2, IL-6, sR IL-2, sR IL-6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility", Human reproduction vol. 12, no. 7, pp. 1476-1479, 1997
- Oscar Vera et al.: "Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates", Theriogenology 60 (2003) 553-558
- Zdenka Ulcova-Gallova et al.: "Sperm antibodies, ultra-acrosomal sperm proteins, and cytokines in semen in men from infertile couples", American Journal of reproductive immunology 61 (2009) 236-245
- Izzet Kocak et al.: "Relationship between seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha with semen parameters in fertile and infertile men", Urol Res (2002) 30:263-267 (seminal plasma interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha with semen parameters in fertile and infertile men", Urol Res (2002) 30:263-267
- Галимов Ш.Н. и др. Цитокиновый спектр сыворотки крови и спермоплазмы при идиопатическом бесплодии. Пермский медицинский журнал, Том 29, 6 (2012) (Реферат)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ФОРМУВАННЯ ІМУНОЗАЛЕЖНОГО НЕПЛІДДЯ У ХВОРИХ ПІСЛЯ ВАРИКОЦЕЛЕКТОМІЇ**(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі медицини, зокрема урології та клінічної імунології, і стосується способу прогнозування формування імунозалежного непліддя у хворих після варикоцелектомії,

UA 111800 C2

що включає визначення кількості сперматозоїдів у еякуляті, рухливість сперматозоїдів, індекс Фарріса та кількість лейкоцитів, наявність у сім'яній рідині цитокінів spIL-бета, spIL-6, spIL-10 та spTNF-альфа і при підвищенні кількості сперматозоїдів у еякуляті до показника більше 210 млн., їх рухливості до показника більше 50 % (категорії A+B) та індекса Фарріса до показника більше 115 та підвищенні рівнів цитокінів: сироваткового IL-1бета до показника більше 4,5 пг/мл, цитокінів у сім'яній рідині spIL-бета до показника більше 170 пг/мл, spIL-6 до показника більше 45 пг/мл та spIL-10 до показника більше 20 пг/мл - прогнозують відновлення плідного потенціалу пацієнтів з варикоцеле після хірургічної операції.

Винахід належить до галузі медицини, зокрема урології та клінічної імунології, і може бути застосований для прогнозування формування імунозалежного непліддя у хворих після варикоцелектомії.

Розвиток варикоцеле є багатофакторним. Патофізіологічні механізми варикоцеле - асоційованого непліддя залишаються незрозумілими. Існують різні теорії виникнення непліддя: дисбаланс між активними формами кисню та антиоксидантами в еякуляті; варикоцелезалежне непліддя, асоційоване з цитокинами; пошкодження ДНК в сперматозоїдах; низький рівень тестостерону в крові. Атрофія яєчок асоціюється з патологічними параметрами еякуляту (кількість сперматозоїдів у 1 мл та їх загальне число). Варикоцелектомія є найбільш поширеною операцією в плані лікування чоловічого непліддя [1]. Хірургічне лікування варикоцеле підвищує ці показники, отже, знижує темпи атрофії тканини яєчок. У чоловіків, які позитивно відреагували на варикоцелектомію, спостерігалися суттєво нижчі рівні апоптозу в біопсійному матеріалі з яєчок. Отримані результати доводять, що покращення після варикоцелектомії передбачає зниження рівня апоптозу [2]. варикоцеле -асоційоване непліддя залежить також від впливу цитокінів. Цитокини, які регулюють запалення та імунну відповідь, є розчинними білками, котрі синтезуються клітинами імунної системи. Вони діють як ростові фактори та фактори диференціації, а також допомагають в узгодженні клітинних взаємодій за нормальних фізіологічних умов [3].

Еякулят чоловіка складається з різних клітин (сперматозоїди, епітеліальні клітини, лейкоцити) та сім'яної рідини. Остання містить білки та небілкові продукти, що синтезуються клітинами Сертолі, епідидимуса, сім'яних каналців, простати та додаткових статевих залоз. Також у сім'яній рідині наявні різні цитокини (фактор некрозу пухлини α (TNF- α), інтерлейкіни (IL), трансформуючий фактор росту β (TGF- β) та інші) та їх розчинні рецептори. Цитокини продукуються багатьма клітинами у чоловічому репродуктивному тракті і діють, в основному, локально. Вони можуть синтезуватися в яєчках, епідидимусі та/або виділятися імунокомпетентними клітинами, що присутні навіть за відсутності запального процесу. Семінофорний епітелій виступає також джерелом різних прозапальних цитокінів. IL-1, IL-6 та TNF- α , які можуть діяти як ростові фактори сперматогенезу, були ідентифіковані у клітинах Сертолі та термінальних клітинах. Деякі цитокини можуть впливати на рухливість сперматозоїдів, їх життєздатність та можливість до penetрації яйцеклітини.

Для підтвердження зв'язку цих медіаторів та фертильності потрібно визначати їх рівень у сім'яній рідині чоловіків і використовувати отримані результати в клінічній практиці з метою прогнозування ризику непліддя.

Відомий спосіб лабораторного обстеження з метою виявлення ризику формування імунозалежного непліддя у хворих з варикоцеле, який встановлює такі показники: життєздатність та рухливість сперматозоїдів, їх кількість та морфологія (відсоток нормальних форм); визначення фруктози у сім'яній рідині; визначення антиспермальних антитіл скринінговим методом та визначення стероїдних гормонів - тестостерону та прогестерону [4]. Недоліками цього способу можна вважати: 1) визначення фруктози у сім'яній рідині не належить до імунологічних, визначається несучасним методом і тільки опосередковано відображає функціональний стан сперматозоїдів; 2) визначення тестостерону також не належить до імунологічних досліджень, крім цього, коливання його рівня носять циклічний характер без підтвердженого зв'язку із змінами імунних показників, а щодо прогестерону, то його зв'язок як із імунними показниками, так і показниками фертильності не є однозначним; 3) визначення антиспермальних антитіл скринінговим методом не дає інформації про їх топографію та клас як імуноглобулінів.

Відомий також, як найближчий аналог, спосіб лабораторного обстеження з метою прогнозування імунозалежного непліддя у хворих після варикоцелектомії, за яким досліджують фактори оксидативного стресу - супероксиданіону, гідроксильних груп, пероксидів, гідропероксидів, оксидів азоту, виявляють антиоксиданти SOD, GSR, GPX, GST, каталази та HO-1 та білки теплового шоку, визначають стан фрагментації ДНК у сперматозоїдах, здійснюють тестикулярну біопсію, виявляють білки CCM, CCM2 та CCM3 для підтвердження зрілості термінальних клітин [2].

Можна виокремити кілька недоліків прототипу. Автори способу-прототипу досліджують фактори оксидативного стресу - супероксиданіону, гідроксильних груп, пероксидів, гідропероксидів, оксидів азоту, виявляють антиоксиданти SOD, GSR, GPX, GST, каталази та HO-1 та білки теплового шоку. Однак окреме визначення факторів оксидативного стресу є дорогавартісним, вимагає наявності у лабораторії рідкісної апаратури; підготовка хворого до проведення біопсії вимагає дообстеження перед маніпуляцією, тобто додаткових витрат часу і

коштів, а отримані результати мають не пряме, а опосередковане значення щодо визначення функціонального стану сперматозоїдів.

Визначення стану фрагментації ДНК у сперматозоїдах є технічно складним для виконання методом, а трактування цього показника є неоднозначним в тому розумінні, що високий відсоток фрагментації імовірно, але не обов'язково, забезпечує погану якість ембріона, який розвинувся після запліднення сперматозоїдом із високим рівнем фрагментації. Здійснення тестикулярної біопсії, яка є інвазивним методом, потребує використання анестезії, на яку у пацієнта може розвинути реакція, і щоби цьому запобігти, пацієнтові потрібно робити проби *in vitro* з анестетиком перед проведенням біопсії, а це займає додатковий час та збільшує витрати на лабораторні аналізи. Виявлення білків ССМ, ССМ2 та ССМ3 для підтвердження функціональної готовності сперматозоїдів малоінформативне, тому що ці білки не є специфічно асоційованими тільки із функціональною активністю сперматозоїдів, мають ширше трактування, у більшій мірі вони відображають біохімічний статус еякуляту.

Недоліками прототипу можна також вважати використання такого інвазивного методу забору матеріалу як біопсія для визначення стану сперматозоїдів та дороговартісність методів дослідження.

В основу винаходу поставлено задачу створити оптимальний спосіб лабораторного обстеження хворих після варикоцелектомії для визначення ризику формування у них імунозалежного непліддя.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі прогнозування формування імунозалежного непліддя у хворих після варикоцелектомії, що включає лабораторні дослідження, згідно з винаходом, визначають кількість сперматозоїдів у еякуляті, рухливість сперматозоїдів, індекс Фарріса та кількість лейкоцитів, наявність у сім'яній рідині цитокінів $spIL-\beta$, $spIL-6$, $spIL-10$ та $spTNF-\alpha$ і при підвищенні кількості сперматозоїдів у еякуляті до показника більше 210 млн., їх рухливості до показника більше 50 % (категорії A+B) та індекса Фарріса до показника більше 115 та підвищенні рівнів цитокінів: сироваткового $IL-1\beta$ до показника більше 4,5 пг/мл, цитокінів у сім'яній рідині $spIL-\beta$ до показника більше 170 пг/мл, $spIL-6$ до показника 45 пг/мл та $spIL-10$ до показника більше 20 пг/мл - прогнозують відновлення плідного потенціалу пацієнтів з варикоцеле після хірургічної операції.

У запропонованому винаході визначенням рівнів цитокінів $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-10$, які прямо пов'язані із дозріванням сперматозоїдів, підтверджується готовність сперматозоїдів до виконання своїх функцій. Для цього пропонується визначення тільки цитокінів $IL-1\beta$ та $IL-6$, які є маркерами цитокінопосередкованого оксидативного стресу і наслідком активації вищенаведених продуктів. Запропонованим способом також визначають $IL-10$ для відображення цілісності гематотестикулярного бар'єру, яка забезпечує правильне дозрівання сперматозоїдів. Використовуючи результати визначення групи із трьох цитокінів $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-10$ у сироватці крові та сім'яній рідині, по-перше, встановлюють стан зрілості сперматозоїдів і оксидативний статус, а по-друге, використовують значно дешевший метод (імунферментний) та зовсім не використовують інвазивного методу забору матеріалу, такого, як біопсія.

Кількість сперматозоїдів у еякуляті є одним із найважливіших базових показників спермограми, бо відображає фізіологічну здатність організму чоловіка продукувати зрілі форми сперматозоїдів. Якщо їх менше норми, це може мати різні причини (анатомічну, ендокринну, імунологічну і т.д.), і на цій основі пацієнта потрібно детально та більш поглиблено обстежувати далі в інших спеціалістів (уролога, лікаря УЗД, ендокринолога, репродуктолога).

Загальний плідний потенціал чоловіка відображає індекс Фарріса, бо у ньому враховані не тільки кількість, але і функція сперматозоїдів, тобто їхня рухливість. Індекс Фарріса вираховують за формулою: у чисельнику - сума показника кількості сперматозоїдів у еякуляті помножена на суму відсотків активнорухомих сперматозоїдів та малорухомих сперматозоїдів (A+B); у знаменнику - 100 %. Після виконання ділення отримують показник - індекс Фарріса.

$IL-1\beta$ є прозапальним цитокіном та відіграє важливу роль в аутокринній та паракринній регуляції нормальної тестикулярної функції. У літературі є дані щодо підвищення експресії $IL-1\alpha$ у клітинах Лейдіга, Сертолі та сперматогоніях шурів-підлітків з експериментальним лівобічним варикоцеле. Відомо, що інтерлейкіни з родини $IL-1$ впливають на проліферацію як термінальних клітин, так і незрілих клітин Лейдіга, а також модулюють функції зрілих клітин Лейдіга та Сертолі. Знижений рівень $IL-1\beta$ є небезпечним для фертильної функції, бо цей цитокін не тільки стимулює сперматогенез, але і пов'язаний із густиною еякуляту та морфологією сперматозоїдів [2]. Прозапальний цитокін $IL-6$ у підвищеній концентрації є асоційованим із оксидативним стресом, разом вони можуть взаємодіяти і здійснювати патофізіологічний вплив на фертильність чоловіків з варикоцеле. Антизапальний цитокін $IL-10$ в нормальній концентрації є

необхідним для функціонування бар'єру кров-яєчко, проте у підвищеній концентрації може пригнічувати біологічні процеси в еякуляті.

Цитокинопосередкований оксидативний стрес є гіпотезою формування непліддя, відмінною від інших. Експресія IL-1 β та IL-6, які обидвоє потенційно є прозапальними активаторами, відображає високий рівень цитокинової регуляції у клінічних випадках варикоцеле. Підвищений вміст IL-6 у сім'яній рідині асоціюється з поганими показниками спермограми в осіб з 2-3-м ступенем варикоцеле. Визначення рівня IL-6 може допомогти у встановленні клінічного діагнозу чоловічого непліддя у хворих на варикоцеле. Показано, що вміст IL-1 β та IL-10 у сім'яній плазмі також тісно зв'язаний із чоловічою репродуктивною здатністю [2].

Етіологія пошкодження ДНК у хворих на варикоцеле також є мультифакторіальною. Більшість дослідників категорично стверджують, що власне оксидативний стрес, аберантне ремоделювання (компактизація) хроматину та абортивний апоптоз можуть в результаті призводити до пошкодження ДНК у сперматозоїдах. Інший механізм, за допомогою якого варикоцеле може індукувати пошкодження ДНК у сперматозоїдах, - це посилення апоптозу у яєчках. У пацієнтів з варикоцеле на апоптоз клітин у тканині яєчок впливають різноманітні ендогенні та екзогенні фактори: зміна концентрації внутрішньоклітинного кальцію, гіпоксія, зниження рівня андрогенів, експозиція до токсинів, підвищення вмісту апоптозного фактора IL-6 та інші гонадальні чинники. варикоцеле-асоційований апоптоз викликає зниження здатності до проліферації термінальних клітин. Внаслідок цього формується олігоспермія. У варикоцеле-асоційованих випадках непліддя в індукції апоптозу може брати участь розчинний рецептор Fas, виявлений у сім'яній рідині (sFas). У пошуку кращих маркерів чоловічого непліддя протягом останнього десятиріччя визначення ступеня інтеграції ДНК у сперматозоїдах визнано важливим біомаркером якості сперматозоїдів. Етіологія пошкодження ДНК полягає в абортивному апоптозі, оскільки апоптоз є потенційною причиною пошкодження ДНК у сперматозоїдах неплідних пацієнтів. варикоцеле впливає на різні характеристики сперматозоїдів, у т.ч. їх кількість, рухливість та морфологію. Чим вищий ступінь варикоцеле, тим нижчою є густина еякуляту.

Спосіб прогнозування формування імунозалежного непліддя у хворих після варикоцелектомії здійснюють таким чином.

У пацієнта з варикоцеле після хірургічної операції імуноферментним методом визначають вміст цитокинів IL-1 β , IL-6, IL-10 у сироватці крові та еякуляті. Визначають кількість сперматозоїдів у еякуляті, рухливість сперматозоїдів, індекс Фарріса та кількість лейкоцитів, наявність у сім'яній рідині цитокинів spIL-1 β , spIL-6, spIL-10 та spTNF- α та встановлюють рівень показника периферичної крові цитокину IL-1 β . При підвищенні кількості сперматозоїдів у еякуляті до показника більше 210 млн., їхньої рухливості до показника більше 50 % (категорії A+B) та індекса Фарріса до показника більше 115 та підвищенні рівнів цитокинів: сироваткового IL-1 β до показника більше 4,5 пг/мл, цитокинів у сім'яній рідині spIL- β до показника більше 170 пг/мл, spIL-6 до показника 45 пг/мл та spIL-10 до показника більше 20 пг/мл - прогнозують відновлення плідного потенціалу пацієнтів з варикоцеле після хірургічної операції.

Для створення пропонованого способу та підтвердження його ефективності було обстежено 49 чоловіків (27 чоловіків - контрольна група; 12 чоловіків - з неоперованим варикоцеле; 10 чоловіків - після варикоцелектомії). Зразки сироватки крові були отримані за стандартною процедурою. Зразки сім'яної рідини були отримані шляхом центрифугування тривалістю 20 хв. при 3000 об./хв. зібраного еякуляту після його розрідження.

Здорові чоловіки та пацієнти утримувалися від статевих контактів протягом 3-5 днів. Еякулят був отриманий шляхом добровільної мастурбації. Після повного розрідження були визначені основні семіологічні параметри згідно з процедурою, затвердженою Всесвітньою організацією охорони здоров'я (рекомендації від 2012 року). У рутинному аналізі еякуляту було визначено його густину, а також рухливість, життєздатність, морфологію сперматозоїдів та кількість лейкоцитів в еякуляті. Рівні цих показників у контрольній групі суттєво відрізнялися від результатів у групах пацієнтів. Індекс Фарріса вираховували як добуток кількості сперматозоїдів у еякуляті на кількість рухомих сперматозоїдів (A+B), поділений на 100. Кількість лейкоцитів у еякуляті вираховувалася як середнє число у полі зору.

Визначали вміст цитокинів у сироватці крові та еякуляті. Виділена сироватки крові та сім'яна рідина зберігалися при 20 °C. Рівні цитокинів IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18; TNF- α , IFN- γ та TGF- β 1 визначали імуноферментним методом (ELISA). Набори для визначення IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α та IFN- γ виготовлені фірмою WECTOR-BEST (Росія, м. Новосибірськ); набір для визначення TGF- β 1 виготовлений фірмою DRG Diagnostics (Німеччина). Для проведення імуноферментного аналізу використовували автоматичний лічильник SUNRISE TECAN (Австрія) з автоматичною приставкою Microwell ELISA (США).

Визначали кількість сперматозоїдів у еякуляті, рухливість сперматозоїдів, індекс Фарріса та кількість лейкоцитів, наявність у сім'яній рідині цитокінів spIL- β , spIL-6, spIL-10 та spTNF- α та встановлювали рівень цитокіну IL-1 β у периферичній крові, і якщо рівні цих показників після варикоцелектомії були статистично достовірно відмінними від показників у хворих з варикоцеле та наближалися до контрольних рівнів, встановлювали позитивний прогноз щодо фертильної функції, якщо ж ці показники після варикоцелектомії не відрізнялися від аналогічних у хворих з варикоцеле і були статистично достовірно відмінними від контрольних, визначали негативний прогноз для фертильності.

Після проведення досліджень згідно із стандартними методиками були збудовані калібрувальні криві та вираховані результати. Для їх порівняння використовували статистичну програму за Стьюдентом.

Були виявлені статистично достовірні відмінності між параметрами спермограми у групі пацієнтів з варикоцеле та групою пацієнтів після варикоцелектомії. Зокрема, підвищилася кількість сперматозоїдів у еякуляті, але цей показник є статистично недостовірним. Статистично достовірно покращилася рухливість сперматозоїдів категорії A+B після варикоцелектомії (49,1 \pm 7,86 % після варикоцелектомії в порівнянні із 30,6 \pm 6,06 % до операції, $p < 0,05$) та підвищився індекс Фарріса (114,9 \pm 41,35 після варикоцелектомії в порівнянні із 58,1 \pm 18,66 до операції, $p < 0,05$). Після варикоцелектомії зросла кількість лейкоцитів у еякуляті (5,8 \pm 0,9 після варикоцелектомії в порівнянні із 0,92 \pm 0,2 до операції, $p < 0,05$). Після варикоцелектомії зросла також кількість нормальних форм сперматозоїдів у еякуляті (47 \pm 6,12 після варикоцелектомії в порівнянні із 37,9 \pm 2,11 до операції, $p < 0,05$) (Табл. 1).

Таблиця 1

Рівень параметрів спермограми у групах пацієнтів з варикоцеле та після варикоцелектомії

№	Групи пацієнтів	В'язкість (од.)	К-ть сперматозоїдів в 1 мл еякуляту	Загальна к-ть сперматозоїдів в еякуляті	Рухливість A+B	Норм, морфологія сперматозоїдів	Пато-логічна морфологія сперматозоїдів	К-ть, лейкоцитів, Г/л	Індекс Фарріса, од.
1.	Контроль	0,8 \pm 0,36	64,8 \pm 9,3	302,1 \pm 60,8	53,4 \pm 4,0	64,8 \pm 3,5	35,2 \pm 3,5	2,1 \pm 0,4	172,1 \pm 35,7
2.	Пацієнти варикоцеле	0,39 \pm 0,06	45,1 \pm 12,18	177,5 \pm 52,2	30,6 \pm 6,06*	37,9 \pm 2,11*	51,0 \pm 10,06	0,92 \pm 0,2*	58,1 \pm 18,66*
3.	Пацієнти після варикоцелектомії	0,35 \pm 0,05	48,8 \pm 13,25	210,7 \pm 72,03	49,1 \pm 7,86	47 \pm 1,12#	53 \pm 6,12	5,8 \pm 0,9#	114,9 \pm 41,35

Примітка: * - існує достовірна різниця ($p < 0,05$) поміж групами варикоцеле та з контрольною; # - існує достовірна різниця ($p < 0,05$) поміж групами варикоцеленеоперованими із хворими після варикоцелектомії.

У хворих до і після варикоцелектомії ми визначали цитокіни IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, TGF- β 1, TNF- α , IFN- γ та виявили серед них один статистично достовірно підвищений рівень цитокіну IL-1 β у сироватці крові: 4,58 \pm 0,14 пг/мл після варикоцелектомії в порівнянні із 2,24 \pm 0,49 пг/мл до операції, $p < 0,05$ (Табл. 2).

Таблиця 2

Рівні цитокінів у сироватці крові пацієнтів з варикоцеле та після варикоцелектомії

№	Групи пацієнтів	IL-1 β пг/мл	IL-6, пг/мл	IL-10, пг/мл	IL-18, пг/мл	TGF- β 1, пг/мл	TNF- α , пг/мл	IFN- γ , пг/мл
1.	Контроль	5,8 \pm 1,6	3,9 \pm 1,0	1,2 \pm 0,4	191,3 \pm 29,0	466,3 \pm 23,7	6,2 \pm 1,8	11,7 \pm 2,4
2.	Пацієнти варикоцеле	2,24 \pm 0,49*	3,08 \pm 0,79	1,78 \pm 0,84	180,87 \pm 24,97	425,99 \pm 61,91	4,57 \pm 0,64	15,66 \pm 1,78
3.	Пацієнти після варикоцелектомії	4,58 \pm 0,14#	3,14 \pm 1,37	18,93 \pm 0,91#	172,49 \pm 27,9	497,87 \pm 33,11	3,09 \pm 0,96*	19,15 \pm 8,8

Примітка: * - існує достовірна різниця ($p < 0,05$) поміж групами варикоцеле та з контрольною; # - існує достовірна різниця ($p < 0,05$) поміж групами варикоцеленеоперованими із хворими після варикоцелектомії.

У сім'яній рідині пацієнтів після варикоцелектомії ми визначали цитокіни spIL-1 β , spIL-6, spIL-10, spIL-18, spTGF- β 1, spTNF- α , spIFN- γ та виявили статистично достовірне підвищення рівнів трьох цитокінів spIL-1 β , spIL-6, spIL-10 та зниження spTNF- α (sp-seminal plasma). Показники цитокінів spIL- β (172,64 \pm 19,65 пг/мл після варикоцелектомії в порівнянні із 98,07 \pm 9,14 пг/мл у неоперованих хворих, $p < 0,05$), spIL-6 (45,22 \pm 3,51 пг/мл після варикоцелектомії в порівнянні із

25,55±5,03 пг/мл до операції, $p<0,05$) та spIL-10 (20,38±1,08 пг/мл після варикоцелектомії в порівнянні із 11,85±1,51 пг/мл у неоперованих, $p<0,05$). Показник цитокіну spIL-6 у хворих з варикоцеле був нижчим від такого показника у контрольній групі (25,55±5,03 пг/мл у хворих з варикоцеле в порівнянні із 85,4±4,1 пг/мл у практично здорових, $p<0,05$) (Табл. 3).

5

Таблиця 3

Рівні цитокінів у сім'яній плазмі пацієнтів з варикоцеле та після варикоцелектомії

№	Групи пацієнтів	spIL-1 β , пг/мл	spIL-6, пг/мл	spIL-10, пг/мл	spIL-18, пг/мл	spTGF- β 1, пг/мл	spTNF- α , пг/мл	spIFN- γ , пг/мл
1.	Контроль	66,8±11,3	85,4±4,1	16,3±3,8	25,7±7,5	116,3±10,5	21,9±4,2	61,7±4,4
2.	Пацієнти варикоцеле	98,07±9,14	25,55±5,03*	11,85±1,51	14,73±4,09	140,94±21,09	20,82±1,30	62,84±4,77
3.	Пацієнти після варикоцелектомії	172,64±19,65#	45,22±3,51#	20,38±1,08#	10,14±1,78	127,4±13,97	14,53±1,05#	65,89±4,48

Примітка: * - існує достовірна різниця ($p<0,05$) поміж групами варикоцеле та з контрольною; # - існує достовірна різниця ($p<0,05$) поміж групами варикоцеленеоперованими із хворими після варикоцелектомії.

В епоху допоміжних репродуктивних технологій більшість урологів та андрологів дійшли висновку, що хірургічне лікування варикоцеле сприяє настанню природної вагітності, успішному здійсненню внутрішньоматкової інсеминації і є дешевшим, ніж процедури екстракорпорального запліднення (IVF) та інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїда (ICSI) [1].

Показане нами підвищення кількості лейкоцитів у еякуляті хворих після варикоцелектомії є опосередкованим відображенням підвищеного рівня оксидативного стресу та продукції цитокінів. У дослідженнях ми показали, що рівень TNF- α у сім'яній рідині після операції знизився по відношенню як до контролю, так і до неоперованих пацієнтів з варикоцеле. Також підвищується рівень антизапального цитокіну IL-10 (Табл. 2 і Табл. 3). Виявлене нами підвищення рівня IL-1 β є доказом активації процесу сперматогенезу. У підсумку стверджуємо, що варикоцелектомія залишається найбільш дорогим, але ефективним способом лікування неплодних чоловіків з варикоцеле.

Підвищення кількості сперматозоїдів у еякуляті до показника більше 210 млн., їх рухливості до показника більше 50 % (категорії A+B) та індекса Фарріса до показника більше 115 є добрим прогнозом. Підвищення рівнів цитокінів: сироваткового IL-1 β до показника більше 4,5 пг/мл; цитокінів у сім'яній рідині spIL- β до показника більше 170 пг/мл, spIL-6 до показника більше 45 пг/мл та spIL-10 до показника більше 20 пг/мл - є особливими доказами відновлення плідного потенціалу пацієнтів з варикоцеле після хірургічної операції. Ці результати (особливо у сім'яній рідині) є вагомим аргументом на користь зміни плідного потенціалу пацієнтів після варикоцелектомії.

Джерела інформації:

1. Tornaye H.J., Cohlen B.J. Management of male-factor infertility. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 2012, pp. 1-7 doi:10.1016/j.bpobgyn.2012.05.005.

2. Shiraishi K., Matsuyama H., Takihara H. Pathophysiology of varicocele in the male infertility in the era of assisted reproductive technology. International Journal of Urology (2112) 19, 538-550.

3. Fraczek M., Czernikiewicz A., Kurpisz M. Cytokines and Oxidative Stress in the Germ Line. Chapter 9 in A.Agarwal et.al (eds). Studies on Men's Health and Fertility, Oxidative Stress in Applied Basic research and Clinical Practice, DOI 10.1007/978-1-61779-776-779, Springer Science+Business Media, LLC 2012, pp. 179-205.

4. Al-Daghistani H.I., Hamad A.-W. R., Abdel-Dayem M., Al-Swaifi M., Zaid M.A. Evaluation of Serum Testosterone, Progesterone, Seminal Antisperm Antibody, and Fructose Levels among Jordanian Males with a History of Infertility. Biochemistry Research International. 2010, Article ID 409640, 8 pages, doi: 10.1155/2010/409640.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб прогнозування формування імунозалежного неплоддя у хворих після варикоцелектомії, що включає лабораторні дослідження, який **відрізняється** тим, що визначають кількість сперматозоїдів у еякуляті, рухливість сперматозоїдів, індекс Фарріса та кількість лейкоцитів, наявність у сім'яній рідині цитокінів spIL- β , spIL-6, spIL-10 та spTNF- α і при підвищенні кількості сперматозоїдів у еякуляті до показника більше 210 млн., їх рухливості до показника більше 50 % (категорії A+B) та індекса Фарріса до показника більше 115 та підвищенні рівнів цитокінів:

сироваткового IL-1 β до показника більше 4,5 пг/мл, цитокінів у сім'яній рідині spIL- β до показника більше 170 пг/мл, spIL-6 до показника більше 45 пг/мл та spIL-10 до показника більше 20 пг/мл - прогнозують відновлення плідного потенціалу пацієнтів з варикоцеле після хірургічної операції.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601