



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110754** (13) **C2**
(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2014 14224**
(22) Дата подання заявки: **31.12.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.02.2016**
(41) Публікація відомостей про заявку: **12.05.2015, Бюл.№ 9**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.02.2016, Бюл.№ 3**

(72) Винахідник(и):
**Гаврилюк Анна Мирославівна (UA),
Чоп'як Валентина Володимирівна (UA),
Бойко Ярина Євгеніївна (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:
CN 101474374 A 08.07.2009
CN 102908348 A 06.02.2013
US 2010055730 A1, 04.03.2010
Peter K. C. Goon. High circulating frequencies of tumor necrosis factor Alpha- and interleukin-2-secreting human T-Lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease / Peter K. C. Goon, Tadahiko Igakura, Emmanuel Hanon, Angelina J. Mosley, Becca Asquith, Keith G. Gould, Graham P. Taylor, Jonathan N. Weber, Charles R. M. Bangham // J. of Virology. – 2003. - p. 9716–9722
Vera O. Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates / O. Vera, L.A. Vasquez, M.G. Munos // Theriogenology/ -2003. - №60.- p. 553-558.
Camejo M.L. Interleukin-6 (IL-6) In seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. M.L. Camejo, A. Segnini, F. Proverbio. Arch Androl - 2001. - № 47. - p. 97-101.
O'Leary S. Transforming growth factor- β (TGF- β) in porcine seminal plasma. S. O'Leary, D.T. Armstrong, S.A. Robertson. Reprod Fertil - 2011. - № 23. - p. 748-758.

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ІМУНОЗАЛЕЖНОГО ЧОЛОВІЧОГО НЕПЛІДДЯ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу прогнозування імунозалежного чоловічого непліддя, що включає визначення прозапальних та антизапальних цитокінів у сім'яній рідині, в якому визначають співвідношення між рівнями цитокінів та семіологічним параметром (густиною еякуляту): $spTNF-\alpha/spIL-10$, $spTNF-\alpha/spIL-6$, $spTGF-\beta 1$ /густина еякуляту, $spIL-6/spIL-10$. При показнику співвідношення $spTNF-\alpha/spIL-10$, який становить 0,60-0,80 і вище; при показнику співвідношення $spTNF-\alpha/spIL-6$, який становить 0,60-0,80 і вище; при показнику співвідношення

UA 110754 C2

spTGF- β 1/густина еякуляту, який становить 0,60-0,80 і вище, та при показнику співвідношення spIL-6/spIL-10, який становить 0,15-0,10 і нижче, встановлюють негативний прогноз фертильної функції.

Винахід належить до галузі медицини, зокрема урології та клінічної імунології, і може бути застосований для визначення прогнозу фертильності у пацієнтів із непліддям різного ґенезу за співвідношеннями між цитокінами

На сьогоднішній день відомо, що у 45-50 % неплідних пар провідною причиною цього стану є так званий "чоловічий фактор", проте при рутинному обстеженні у 30-45 % таких чоловіків не виявляють патологічних змін параметрів еякуляту. Рутинна діагностика непліддя оправдовує себе тільки у 10-15 % неплідних пар. Формування чоловічого непліддя залежить від наявності базового захворювання та/або ряду факторів ризику. Крім анатомічних та генетичних факторів, чоловіче непліддя може бути спричинене системними хворобами, пухлинами (включно із лімфомами, лейкомією), варикоцеле та іншими. Дисфункція яєчок, яка також спричиняє непліддя, може бути мультифакторіальною, особливо у пацієнтів із хронічними хворобами. Запальні процеси, хронічна ниркова недостатність, імуносупресивне лікування та генетичні дефекти (синдром Klinefelter, мікроделеція Y-хромосоми), антиспермальний імунітет також можуть впливати на фертильність чоловіків [1].

Мікроскопічно еякулят від плідних та неплідних чоловіків є подібним. Проводиться пошук нових параметрів еякуляту, які були б більш відповідними для встановлення діагнозу непліддя [2], зокрема йдеться про цитокіни. Найбільшим джерелом цитокінів є тканина яєчок, тобто тестикулярні макрофаги (продукують IL-1 та IL-6) та тестикулярні соматичні клітини, включно із клітинами Лейдіга та Сертолі [3]. Соматичні тестикулярні клітини (Сертолі, Лейдіга, перитубулярні) при нормальних фізіологічних станах продукують цитокіни, такі як інтерлейкін-1 (IL-1), інтерлейкін-6 (IL-6), які беруть участь у сперматогенезі та дозріванні сперматозоїдів [4]. Цитокіни задіяні у нормальному функціонуванні чоловічих статевих гонад, свідченням цього є їх присутність у сім'яній плазмі [5]. Це такі цитокіни, як інтерлейкіни (ILs), зокрема IL-1 α та IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, їх розчинні рецептори та антагоністи, зокрема, IL-1RA, sR IL-2, sR IL-6, пухлинонекротизуючий або цитолітичний фактор TNF- α , ростові фактори - родина трансформуючого фактора росту TGF (α -, β - та γ), гранулоцитарний колонієстимулюючий ростовий фактор GM-CSF, хемокіни - макрофагальний білок запалення альфа MIP-1 α та бета MIP- β [6].

Цитокіни можуть діяти як аутокринний фактор, але також у паракринний спосіб під час сперматогенезу, дозріванні сперматозоїдів, русі сперматозоїдів та протягом процесу запліднення [7].

Цитокіни впливають на фізіологічні процеси репродукції та регулюють фертильність. TNF- α (tumor necrosis factor - пухлинонекротизуючий фактор), інтерлейкіни та розчинні рецептори до цитокінів синтезуються також імунними клітинами, мезенхімальними клітинами, клітинами Сертолі та сперматогоніями. Такі цитокіни, як IL-6, IL-8 та TNF- α є природними складовими сім'яної рідини чоловіка. У сім'яній рідині неплідних чоловіків рівень IL-6 є суттєво вищим, ніж у плідних, також є чітка негативна кореляція з кількістю сперматозоїдів [8].

Яєчка є імунологічно привілейованими органами. Суть імунологічної толерантності полягає в тому, що імунна система чоловіка не реагує на аутоантигени, наявні на зрілих статевих клітинах. Цей імунологічний феномен потрібний для сперматогенезу. Механізм, що захищає яєчка від аутоагресії (формування аутоімунної хвороби), це імунологічний/анатомічний бар'єр кров - яєчка (blood-testis barrier - BTB), який захищає антигени статевих клітин від контакту з імунними клітинами та переходу антитіл із ендотелію до просвіту семінофорних каналців. Імуносупресивні фактори, синтезовані макрофагами, клітинами Сертолі та Лейдіга, перитубулярними клітинами, обмежують присутність активованих Т-лімфоцитів (особливо Т-цитотоксичних CD8+) та Treg-лімфоцитів (Т-регуляторно-супресорних CD4+/ CD25+), які повинні виконувати свою супресорну дію. Баланс між запаленням та імунопривілейованим статусом у монаді залежить, поміж інших, від функцій цитокінів, які виконують обидві ролі - прозапальних медіаторів та інгібіторів. BTB-регуляція виконується трансформуючим фактором росту TGF- β та пухлинонекротизуючим фактором TNF- α . TNF- α , TGF- β 2 та TGF- β 3 разом із тестостероном регулюють сперматогенез [9].

TNF- α переважно синтезується термінальними клітинами та активує інтерстиціальні макрофаги [10], і його функція є відмінною від інших цитокінів та полягає у дії на андрогенні рецептори, що підвищує активність тестостерону [11]. Цитокіни з родини TNF підтримують виживання клітин протягом сперматогенезу. TNF- α впливає на концентрацію сперматозоїдів порізно. Знайдено суттєвий зв'язок підвищеного рівня TNF- α у сім'яній рідині із пошкодженням ДНК/хроматину у сперматозоїдах та зниженням рухливості сперматозоїдів (прогресивної та тотальної) [12].

Високі рівні прозапальних цитокінів у сім'яній рідині можуть впливати на якість параметрів еякуляту - кількість сперматозоїдів, рухливість та морфологію, здатність пенетрувати ооцит.

Прозапальні цитокіни здійснюють плейотропні ефекти, діють синергічно, доповнюють один одного або є антагоністами щодо своїх функцій (впливів) на клітини-мішені.

Стандартне обстеження еякуляту слабо відображає фертильний потенціал чоловіка, а визначення цитокінів ще не стало рутинною лабораторною процедурою. Все це є підставою для пошуку нових біомаркерів, таких, як прозапальні цитокіни, синтезовані у сім'яній рідині. Визначення певних цитокінів може служити клінічними маркерами чоловічого непліддя. Місцева активність біологічних субстанцій, синтезованих лейкоцитами при запальних реакціях, взаємно пов'язана із іншими запальними медіаторами (бактерії, лейкоцити, прозапальні цитокіни) - це базис, на якому часто розвиваються клінічні ускладнення. Існує ряд медіаторів запальної реакції, які впливають на якісні та кількісні зміни кисневого метаболізму в еякуляті і не спостерігаються у здорових чоловіків та нездорових пацієнтів із патологічними станами *in situ*. Визначення концентрації прозапальних цитокінів у сім'яній рідині може бути чутливим маркером присутності інфекції чи раннього запалення чоловічого статевого тракту та сигналом для призначення антизапального лікування [13].

Відомий спосіб визначення ризику формування непліддя за співвідношенням $spTNF-\alpha/sIL-10$ та $spIL-6/spIL-10$ [14]. Основними функціями нормальної сім'яної рідини є забезпечення транспорту сперматозоїдів, їх виживання і, таким чином, підвищення фертильності. Серед компонентів сім'яної рідини є також імунорегуляторні фактори. Їх функцією на місцевому рівні є модуляція імунної відповіді жінки щодо спермальних антигенів, з якими вона стикається під час статевого життя. Локальна імуносупресія, яку забезпечує сім'яна рідина, сприяє інфікуванню вірусами та бактеріями, які можуть бути присутніми в еякуляті та визначають сім'яну рідину як агента для хвороб, що переносяться статевим шляхом. Вимірювання концентрації цитокінів у сім'яній рідині проводять не тільки для визначення їх синтезу, але і для відображення взаємодій цитокіни - сперматозоїди. Такий цитокін, як $TNF-\alpha$ знижує рухливість сперматозоїдів людини та підвищує продукцію вільних кисневих радикалів людськими сперматозоїдами. Метою цієї роботи було визначення таких якісних характеристик еякуляту: концентрація сперматозоїдів, рухливість сперматозоїдів, морфологія сперматозоїдів биків в порядку кореляції цих параметрів із концентрацією цитокінів у сім'яній рідині. Показана негативна кореляція між рівнями $IL-6/IL-10$ та $IL-6/TNF-\alpha$. Позитивна кореляція була виявлена щодо $IL-10/рухливість$ сперматозоїдів. Обстежено шість биків. Двоє з них мали вищі концентрації $IL-6$, ніж $IL-10$, а чотири тварини мали вищі концентрації $IL-10$, ніж $IL-6$. Подібні тенденції були знайдені у тих же тварин стосовно $IL-6$ та $TNF-\alpha$. Автори цих співвідношень стверджують, що підвищені рівні $TNF-\alpha$ є асоційовані із механізмами, за допомогою яких ці цитокіни можуть здійснювати антизапальну репаративну функцію у статевій системі. Отримані дані показали, що $TNF-\alpha$ проявляє не тільки прозапальну активність, але і відіграє важливу роль у негативній регуляції запального процесу. Ці дані пояснюють строгу кореляцію, знайдену між рівнями $TNF-\alpha$ та $IL-10$ у сім'яній рідині биків, адже $IL-10$ відомий як антизапальний цитокін, який до того ж захищає виживання сперматозоїдів. Оскільки рівень $IL-10$ у здорових особин є підвищеним, можна стверджувати, що його функція у чоловічому статевому тракті - підтримка імунологічного балансу та уникнення пошкодження сперматозоїдів. Цей імунорегуляторний баланс характеризує співвідношення $IL-6/IL-10$ у сім'яній рідині.

Недоліком цього способу є те, що діагноз щодо фертильності встановлюють тільки на основі твердження, що цитокіни продукуються при підвищених кількостях лейкоцитів, тобто при гострому запаленні/інфекції. Окрім того, висновки зроблено на матеріалі від невеликої кількості тварин (тільки на шести биках).

Відомий спосіб визначення чоловічого непліддя шляхом визначення співвідношення $spTNF\alpha/spIL-6$ [15]. Автори визначали $spTNF\alpha$, $spIL-6$ у 37 неплідних та 14 плідних чоловіків, порівнювали його із рівнем малонового діальдегіду (МДА) - маркера пероксидації ліпідів у мембрані сперматозоїдів. Кореляція між рівнями $spIL-6$ та $spTNF\alpha$ у сім'яній рідині і рівнями пероксидації мембран сперматозоїдів (величина МДА) була статистично підвищена. Концентрація $spIL-6$ у сім'яній рідині неплідних чоловіків була статистично достовірно вищою, ніж у плідних чоловіків ($p < 0,05$). Рівень пероксидації мембран сперматозоїдів за МДА також був статистично достовірно вищим у мембранах сперматозоїдів неплідних чоловіків у порівнянні з плідними ($p < 0,001$). Суттєву позитивну кореляцію було знайдено між рівнем $spIL-6$ та МДА у неплідних чоловіків ($p < 0,001$), але такої кореляції не знайдено між $spIL-6$ та $spTNF\alpha$. Ці результати переконують щодо можливої асоціації між $spIL-6$ та пероксидацією мембрани сперматозоїдів.

Недоліком цього способу є необхідність порівнювати показники цитокінів із рівнем малонового діальдегіду - продукту переокисного окислення ліпідів. Ця речовина, по-перше, визначається неімунологічним методом лабораторного дослідження; по-друге, переокисне

окислення ліпідів у мембранах сперматозоїдів не завжди асоційоване тільки із рівнями прозапальних цитокінів у сім'яній рідині. Цей спосіб не виявляє імунного ґенезу непліддя у чоловіків.

Відомий також спосіб визначення чоловічого непліддя за співвідношенням $spTGF-\beta 1$ /густина еякуляту [16]. Біоактивні фактори у сім'яній рідині індують клітинні та молекулярні зміни у чоловічому репродуктивному тракті після статевих контактів. Активною складовою частиною сім'яної рідини мишей та людини є потенційний імуномодулюючий цитокін трансформуючий фактор росту бета $TGF-\beta$. Щоби дослідити, для чого $TGF-\beta$ є присутній у сім'яній рідині кнур (самця свині), визначали $TGF-\beta 1$ та $TGF-\beta 2$. Високі рівні цих двох цитокінів із родини $TGF-\beta$ були виявлені у всіх обстежуваних зразках сім'яної рідини. Обидва були в активній, не латентній формі. Їх рівні можуть варіювати між собою у різних кнурів, але корелюють з іншими показниками та з густиною еякуляту, в тому залишаються постійними у кожного індивідуума-кнур протягом 6-ти місяців. Зроблено висновок, що сім'яна рідина кнур є багатою на $TGF-\beta$. Можна припустити, що у свиней $TGF-\beta$ є агентом взаємодії самець-самка та причетний до імунних змін у жіночому репродуктивному тракті.

Недоліками цього способу є застосування визначення загального рівня цитокіну $TGF-\beta$, а не $TGF-\beta 1$, який має більш виражені імунорегуляторні властивості, та застосування цього способу тільки у свиней.

Найближчим аналогом запропонованого нами винаходу є спосіб прогнозування чоловічого непліддя, що включає дослідження у сім'яній рідині чоловіків із непліддям невідомого ґенезу за допомогою імуноферментного методу визначення цитокінів [8]. У способі-прототипі також визначали групу прозапальних цитокінів IL-6, IL-8, $TNF-\alpha$ та антизапальний цитокін IL-23, а також їх співвідношення - IL-6/IL-23, IL-8/IL-23, $TNF-\alpha$ /IL-23. Принцип визначення однаковий - співвідношення вираховувалося так: прозапальний цитокін/антизапальний цитокін. Всі три співвідношення продемонстрували статистично достовірне підвищення у групі неплідних чоловіків у порівнянні із плідними.

Однак цей спосіб визначення чоловічого непліддя має кілька недоліків. Вибір авторами IL-23 як антизапального цитокіну є неоднозначним, бо цей цитокін, по-перше, не має однозначно антизапальних властивостей, а, по-друге, не підтримує імунологічної привілейованості яєчок. Вибір IL-8 як маркерного для прогнозування імунозалежного непліддя також є невідповідним, бо, по-перше, цей цитокін не входить в групу цитокінів, які забезпечують цитокінову регуляцію репродуктивної функції, по-друге, він володіє дуалістичними властивостями, тобто може при різних станах проявляти або прозапальні, або антизапальні властивості.

В основу винаходу поставлено задачу створити спосіб прогнозування чоловічого непліддя для визначення фертильної функції у чоловіків із неплідних сімей шляхом визначення співвідношення між рівнями цитокінів та семіологічним параметром (густиною еякуляту).

Поставлене завдання вирішується тим, що у способі прогнозування імунозалежного чоловічого непліддя, що включає визначення прозапальних та антизапальних цитокінів у сім'яній рідині, згідно з винаходом, визначають співвідношення між рівнями цитокінів та еміологічним параметром (густиною еякуляту): $spTNF-\alpha/spIL-10$, $spTNF-\alpha/spIL-6$, $spTGF-\beta 1$ /густина еякуляту, $spIL-6/spIL-10$, і при показнику співвідношення $spTNF-\alpha/spIL-10$, який становить 0,60-0,80 і вище, при показнику співвідношення $spTNF-\alpha/spIL-6$, який становить 0,60-0,80 і вище, при показнику співвідношення $spTGF-\beta 1$ /густина еякуляту, який становить 0,60-0,80 і вище, та при показнику співвідношення $spIL-6/spIL-10$, який становить 0,15-0,10 і нижче, встановлюють негативний прогноз фертильної функції.

Вибрані нами співвідношення $spTNF-\alpha/spIL-10$, $spTNF-\alpha/spIL-6$, $spIL-6/spIL-10$, $spTGF-\beta 1$ /густина еякуляту точніше відображають зміни в еякуляті, бо вони мають своє визначене місце у регуляції чоловічої фертильності: $spTNF-\alpha$ є асоційованим із дозріванням сперматозоїдів та їх рухливістю; $spIL-6$ є асоційованим із ризиком активації антитілопродукуючої функції В-лімфоцитів; $spTGF-\beta 1$ є головним імуносупресивним цитокіном, який підтримує цілісність бар'єру кров-яєчко.

Для внесення у прогностичні співвідношення пропонуємо два прозапальних цитокіни $spTNF-\alpha$, $spIL-6$; два антизапальних цитокіни $spIL-10$ та $spTGF-\beta 1$ та густину еякуляту, яка є найпростішим, але чутливим маркером запального процесу на місцевому рівні.

Пропонується використовувати співвідношення $spTNF-\alpha/spIL-10$, $spTNF-\alpha/spIL-6$, $spTGF-\beta 1$ /густина еякуляту, $spIL-6/spIL-10$ для визначення фертильного потенціалу у неплідних пацієнтів (валідність цих співвідношень підтверджена у обстеженнях пацієнтів із анатомічними вадами (варикоцеле), із соматичною патологією, пацієнтів із ідіопатичним непліддям).

$TGF-\beta 1$ - мультипотентний цитокін із клітинною та дозозалежною активністю. Ця молекула продукується великою кількістю клітин та типів тканин. За допомогою визначення $TGF-\beta 1$

можемо визначити у сироватці крові чоловіка потенційний рівень стимуляції ембріонального розвитку в матці, циклічного розвитку клітин зародка, продукцію екстрацелюлярного матриксу. Рівень TGF- β 1 у сироватці крові відображає імуносупресивний статус у сім'яній рідині чоловіка: інгібіцію T- та B-клітинної проліферації, дозрівання та активність макрофагів, пригнічення активності натуральних кілерів та кілерних клітин, активованих лімфокінами, що дуже важливо для оцінки його імунітету та можливого імунозалежного непліддя.

Густина еякуляту (семіологічний параметр) дуже важлива для оцінки фертильного потенціалу еякуляту - небезпечною є як низька, так і висока густина.

Спосіб здійснюють таким чином. Отримують зразки сироватки крові за стандартною процедурою із венозної крові без антикоагулянта. Проводять забір еякуляту. Визначають вміст цитокінів у сироватці крові та сім'яній рідині. Визначають співвідношення між цитокінами та семіологічним параметром - густиною еякуляту: співвідношення spTNF- α /spIL-10, spTNF- α /spIL-6, spTGF- β 1/густина еякуляту, spIL-6/spIL-10. При показнику співвідношення spTNF- α /spIL-10, який становить 0,60-0,80 і вище, при показнику співвідношення spTNF- α /spIL-6, який становить 0,60-0,80 і вище, при показнику співвідношення spTGF- β 1/густина еякуляту, який становить 0,60-0,80 і вище, та при показнику співвідношення spIL-6/spIL-10, який становить 0,15-0,10 і нижче, встановлюють негативний прогноз фертильної функції.

Для створення та обґрунтування пропонованого способу було обстежено 100 чоловіків (27 - здорові плідні чоловіки та 73 - неплідні). Всі неплідні чоловіки (73) були направлені клініками планування сім'ї. Для обстеження сформували п'ять підгруп неплідних чоловіків: пацієнти із органоспецифічними та системними аутоімунними хворобами - 18; пацієнти із анатомічними вадами (варикоцеле) - 22; пацієнти із соматичною патологією (гепатит А в анамнезі, дерматит, метаболічний синдром, кардіосклероз, пухлини внутрішніх органів та щитоподібної залози, хронічні запальні захворювання ЛОР-органів) - 10; пацієнти з ідіопатичним непліддям - 13; соматично здорові чоловіки, дружини яких мали 3-4 ранніх викидні - 10.

Зразки сироватки крові отримували за стандартною процедурою із венозної крові без антикоагулянта. Зразки сім'яної рідини відбирали після повного розрідження еякуляту шляхом центрифугування при 3000 об./хв протягом 20 хв. Проводили аналіз еякуляту. Перед забором еякуляту у чоловіків була статева абстиненція протягом 3-5 діб. Еякулят збирали методом мастурбації. Після повного розрідження та вимірювання об'єму та густини еякуляту виконували стандартну процедуру визначення основних параметрів еякуляту (рекомендації BOOЗ 2012 р.). За допомогою рутинного семіологічного аналізу визначали кількість сперматозоїдів, їх рухливість, морфологію, кількість лейкоцитів у еякуляті.

Визначали вміст цитокінів у сироватці крові та сім'яній рідині. Сироватка крові та сім'яна рідина були заморожені (-40 °C), відразу після розморожування у них визначали вміст цитокінів IL-1 β , 6, 10, 18; TNF- α , IFN- γ та TGF- β 1 імуноферментним методом. Набори для визначення IL-1 β , 6, 10, 18, TNF- α та IFN- γ були вироблені фірмою WECTOR-BEST (Новосибірськ, Росія); набори для визначення TGF- β 1 - фірмою DRG (Diagnostics, Німеччина).

Для імуноферментних досліджень було використано автоматичний лічильник SUNRISE TECAN (Австрія) з діагностичним автоматичним додатком Microwell ELISA (США). Рівні цитокінів у сім'яній рідині позначали літерами sp.

Визначали співвідношення між цитокінами та семіологічним параметром - густиною еякуляту. Нами вираховувалися наступні співвідношення: spTNF- α /spIL-10 [14], spIL-6/spIL-10 [14], spTNF- α /spIL-6 [15], spTGF- β /густина еякуляту [16].

Після визначення цитокінів методом ІФА встановлювали їх концентрацію за допомогою калібрувальних кривих. Ці дані були статистично оброблені за допомогою методу Манн-Уїтні (Mann-Whitney).

Визначали співвідношення між різними цитокінами, семіологічним та імунологічними параметрами. Пропорції визначали у групі здорових плідних чоловіків та групах неплідних чоловіків із аутоімунними хворобами, анатомічними порушеннями, соматичною патологією (гепатит А в анамнезі, дерматит, метаболічний синдром, кардіосклероз, пухлини внутрішніх органів та щитоподібної залози, хронічні запальні хвороби ЛОР-органів), ідіопатичним непліддям та у соматично здорових чоловіків, дружини яких мали 3-4 ранніх викидні. Статистично достовірну різницю між цими співвідношеннями було знайдено в групах неплідних чоловіків із анатомічними дефектами (варикоцеле), соматичною патологією та ідіопатичним непліддям (дані наведені у Таблиці).

Статистично достовірне, у порівнянні із контрольною групою, підвищення співвідношення spIL-6/spIL-10 є асоційоване із ризиком непліддя у групі пацієнтів з варикоцеле (коефіцієнт кореляції $r=0,57$). Статистично достовірне, у порівнянні із контрольною групою, підвищення співвідношення spTNF- α /spIL-10 (коефіцієнт кореляції $r=0,69$) та співвідношення spTGF-

β 1/густина еякуляту (коефіцієнт кореляції $r=0,88$) є асоційоване із ризиком непліддя у групі пацієнтів із соматичною патологією.

Підвищений ризик непліддя знайдено у групі пацієнтів із ідіопатичним непліддям, асоційований із $\text{spTNF-}\alpha/\text{spIL-6}$ (коефіцієнт кореляції $r=0,76$) та $\text{spTGF-}\beta$ 1/густина еякуляту (коефіцієнт кореляції $r=0,61$).

Таблиця

Співвідношення між цитокінами та семіологічним параметром у контрольній групі та групах неплідних чоловіків

№ п/п	Співвідношення	Контрольна група n=27 (співвідн.)	Чоловіки із анатомічним дефектом n=22 (співвідн.)	Чоловіки із соматичною патологією n=10 (співвідн.)	Чоловіки із ідіопатичним непліддям n=13 (співвідн.)
1.	$\text{spTNF-}\alpha/\text{spIL-10}$	0,54*	0,30	0,69*	0,10
2.	$\text{spTNF-}\alpha/\text{spIL-6}$	0,47*	0,14	0,61	0,76*
3.	$\text{spTGF-}\beta$ 1/густина еякуляту	0,04	0,15	0,88*	0,61*
4.	$\text{spIL-6}/\text{spIL-10}$	0,60*	0,57*	0,14	0,10
Примітка: * $p<0,05$ - статистично достовірна різниця між контрольною групою та групою неплідних чоловіків.					

Проведені дослідження підтвердили, що достовірний прогноз непліддя дає визначення співвідношень $\text{spTNF-}\alpha/\text{spIL-10}$, $\text{spTNF-}\alpha/\text{spIL-6}$, $\text{spTGF-}\beta$ 1/густина еякуляту, $\text{spIL-6}/\text{spIL-10}$.

Джерела інформації:

- Long Y Ji.G., Zhou Y., et al. Common variants in mismatch repair genes associated with increased risk of sperm DNA damage and male infertility. BMC Medicine 2012; 10:49-59
- Pacey A.A. Assessment of male factor. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 2012, pp.1-8 doi:10.1016/j.bpobgyn.2012.05.006.
- 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 10.1007/978-1-61779-776-7_9, Springer Science+Business Media, LLC 2012, pp. 179-205.
- Hedger M., Klug J., Fröhlich S. et al. Regulatory cytokine expression and interstitial fluid formation in the normal and inflamed rat testis are under Leydig cell control. J Androl. 2005; 26: 379-386.
- Maegawa M., Kamada M., Irahara M. Et al. A repertoire of cytokines in human seminal plasma. J Reprod Immunol. 2002; 54:33-42.
- Politch J.A., Tucker L., Bowman F.P. et al. Concentrations and significance of cytokines and other immunologic factors in semen of healthy fertile men. Hum Reprod. 2007; 22:2928-2035.
- Jacobo P., Guazzone V.A., Theas M.S. et al. Testicular autoimmunity. Autoimmun Rev. 2011;10: 201-204.
- Qian Li, Sun G., Zhou B., Wang G., Song W., He H.-M. Study on the Relationship Between Different Cytokines in the Semen of Infertility Patients. Am J of Reprod Immunol 2011; 66:157-161.
- Cheng C.Y., Mruk D.D. A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. Nat Rev Endocrinol. 2010; 6: 380-395.
- Lazaros L.A., Xita N.V., Chatzikyriakidou A.L. et al. Association of $\text{TNF}\alpha$, TNFR1 and TNFR2 Polymorphisms With Sperm Concentration and Motility. J Andrology 2012; 33 No 1:74-80.
- Su L. Mruk D.D. et al. Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. J Endocrinol. 2011; 208 (3): 207-223.
- Cavalcanti M.C.O., Steilmann C, Falling K., Bergmann M., Kliesch S., Weidner W., Steger K. Apoptotic gene expression in potentially fertile and subfertile men. Molecular Human reproduction, 2011.Vol. 17, No 7 pp.415-420.
- Eggert-Kruse W., Kiefer I., Beck C, et al. Role for tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin 1-beta (IL-1beta) determination in seminal plasma during infertility investigation. Fertil Steril 2007 Apr; 87(4):810-823.
- Vera O., Vasquez L.A., Munos M.G. Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates. Theriogenology 60 (2003) 553-558.

15. Camejo M.I., Segnini A., Proverbio F. Interleukin-6 (IL-6) in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. Arch Androl 2001 Apr-Jun; 47(2):97-101.

16. O'Leary S., Armstrong D.T., Robertson S.A. Transforming growth factor- β (TGF- β) in porcine seminal plasma. Reprod Fertil Dec 2011;23(6):748-758.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб прогнозування імунозалежного чоловічого непліддя, що включає визначення прозапальних та антизапальних цитокінів у сім'яній рідині, який **відрізняється** тим, що визначають співвідношення між рівнями цитокінів та семіологічним параметром (густиною еякуляту): $spTNF-\alpha/spIL-10$, $spTNF-\alpha/spIL-6$, $spTGF-\beta 1/\text{густина еякуляту}$, $spIL-6/spIL-10$, і при показнику співвідношення $spTNF-\alpha/spIL-10$, який становить 0,60-0,80 і вище, при показнику співвідношення $spTNF-\alpha/spIL-6$, який становить 0,60-0,80 і вище, при показнику співвідношення $spTGF-\beta 1/\text{густина еякуляту}$, який становить 0,60-0,80 і вище, та при показнику співвідношення $spIL-6/spIL-10$, який становить 0,15-0,10 і нижче, встановлюють негативний прогноз фертильної функції.

10

15

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