



Божедомов В.А.

Лабораторная диагностика иммунного мужского бесплодия.

// Новости прикладной иммунологии и аллергологии.- 2003.- №7.- С.7-9

Введение

По данным ВОЗ (2000) в настоящее время в среднем каждая седьмая пара в мире бесплодна, и в половине случаев это связано с нарушениями репродуктивной функции у мужчин.

Одной из причин мужского бесплодия являются аутоиммунные реакции против сперматозоидов, которые сопровождаются выработкой антиспермальных антител (АСАТ). Уже более 20 лет диагноз «иммунологическое бесплодие» выделен в отдельную нозологию (Лопаткин Н.А.,1998; ВОЗ,1980-2000). Однако до сих пор многие медицинские клиники и лаборатории в нашей стране игнорируют существование такой специфической патологии и не диагностируют иммунологический фактор бесплодия у мужчин. Такой «нигилизм» обусловлен несколькими обстоятельствами.

К объективным факторам следует отнести:

- существование большого числа различных методов определения АСАТ, результаты которых слабо коррелируют друг с другом;
- отсутствие строго установленных нормативных значений для используемых тестов (за последние 20 лет эксперты ВОЗ трижды меняли границы нормы);
- низкая информативность существующих методов в предсказании восстановления фертильности;
- противоречивые данные о влиянии АСАТ на отдельные этапы репродуктивного процесса (сперматогенез, показатели спермограммы, капацитацию и акросомальную реакцию, проникновение в цервикальную слизь, оплодотворение яйцеклетки).

К субъективным факторам можно отнести:

- недостаточное знакомство урологов, гинекологов, иммунологов, эмбриологов и других специалистов, работающих в области репродукции, с данной проблемой;

- отсутствие соответствующего раздела в курсах повышения квалификации врачей клиницистов и врачей лаборантов;
- отсутствие производства и централизованных закупок соответствующих тест-систем.

Распространенность иммунологического фактора мужского бесплодия.

Частота выявления АСАТ у мужчин зависит от используемых методов. Суммируя данные публикаций разных авторов, применявших серологические методы исследования (более 6000 образцов сывороток), Л.Йегер [Jager L., 1988] делает заключение, что у мужчин при бесплодии в браке частота антител к спермиям составляет 3,4-14,6%. По данным обзора А. Heidenreich et al. (1994), АСАТ были обнаружены непосредственно на сперматозоидах у 7-26% бесплодных мужчин. По нашим данным (более 3500 образцов эякулята) АСАТ-позитивные сперматозоиды имеются у 18% мужчин, причем в 8% случаев антителами покрыты более половины подвижных гамет (Божедомов В.А. и соавт., 2000).

У мужчин с подтвержденной фертильностью АСАТ так же могут быть обнаружены (0-2,5% случаев). Однако в этом случае процент подвижных сперматозоидов, покрытых IgG, никогда не превышал 60%, а IgA – 40% (Божедомов В.А. и соавт., 2001; Takahashi K. et al., 1992).

Основные сведения об этиопатогенезе аутоиммунного мужского бесплодия.

В настоящее время следует считать доказанным, что аутоиммунные реакции против сперматозоидов приводят к снижению вероятности наступления беременности в результате нарушения сперматогенеза, усиления фагоцитоза половых клеток, ухудшения подвижности сперматозоидов, нарушения акросомальной реакции, проникновения в цервикальную слизь и оплодотворения яйцеклетки (Божедомов В.А. и соавт., 1993-2001; Mazumdar S., Levin A.S., 1998; Choudhury S.R., Knapp L.A., 2000; Check J.H. et al., 2002 и др.).

Преобладающими этиологическими факторами аутоиммунного мужского бесплодия по нашим данным (Божедомов В.А. и соавт., 2000) являются повреждение гемато-тестикулярного барьера в результате механической травмы мошонки (14% случаев), орхита (6%), и варикоцеле (31%), а так же инфекции репродуктивного тракта (57%). Риск образования АСАТ при этом составляет 71%, 67%, 42% и 32% соответственно. Аутоиммунные реакции зависят от вида микроорганизма: преобладают перекрестные реакции (*Mycoplasma hominis*) или повреждение гемато-тестикулярного барьера (*Chlamydia trachomatis*).

Характерными признаками развития аутоиммунных реакций против сперматозоидов являются активация В-клеточного звена, системы НК-клеток и фа-

гоцитоза, повышенная продукция интерферонов и свободных радикалов (Божедомов В.А. и соавт., 2000).

Лабораторные методы диагностики АСАТ.

Различные тест-системы используются в настоящее время для определения АСАТ, причем ни один из методов, как признают все исследователи (Mazumdar M.D., Levine A.S., 1998; Helmerhorst F.M. et al., 1999 и др.), не удовлетворяет всем требованиям клиницистов – определять наличие АСАТ, их локализацию и изотип, быть высоко чувствительным и специфичным.

Перечень методов, частота обнаружения АСАТ при их применении и клинически значимые уровни представлены в Таблице.

Характеристика методов определения АСАТ

(по Божедомову В.А. и соавт., 1999-2001; Haas G.G Jr. et al., 1991; Rajah S.V. et al., 1992; Eggert-Kruse W. et al., 1993; Andreou E. et al., 1995; Helmerhorst F.M. et al., 1999; Keel B.A. et al., 2000 и др.).

| Тесты | Частота выявления у бесплодных мужчин | Критические значения |
|-----------------------------------|--|-----------------------------|
| Макроспермоагглютинации | 3-40% | >1:2-1:32 |
| Спермоиммобилизации | 0-10% | >1:32 |
| Иммунофлуоресценции | 0-6% | >10% (?) |
| ТАТ | 0-15% | >1:32 |
| IBD | 10% | >20% |
| Радиомеченным агглютинином | 0-7% | >3 SDs |
| MAR% | 2-26% | >50% (>10%?) |
| ИФА (ELISA) | 1-15% | >75 U/ml |
| Проточная цитометрия (ПЦМ) | 5% (?) | >0%? |

Исторически первым начал применяться метод спермоагглютинации (по Kibrick), основанный на феномене агглютинации сперматозоидов в присутствии АСАТ при добавлении сыворотки в различных разведениях. Позже начала применяться микро-модификация этого метода по Friberg (ТАТ-тест), при котором учет агглютинатов осуществляется в микроплате под микроскопом. Однако оба метода являются рутинными и субъективными, нет единства в величине клинически значимого титра (1:2-1:32). Кроме того, существует вероятность

получения ложно-положительных результатов, т.к. тест может быть положительным в присутствии неспецифических агглютининов, например микроорганизмов.

Тест иммобилизации по Isojima и Lehmann (1972) основан на утрате сперматозоидами подвижности при инкубации в инактивированной сыворотке в присутствии комплемента. Однако многие АСАТ локализируются на головке сперматозоидов и не влияют на их подвижность, то есть существует вероятность того, что при использовании этого метода не выявляются АСАТ, связанные с поверхностными антигенами на головке сперматозоида. Кроме того, тест является субъективным (микроскопия) и с его помощью нельзя оценить количество АСАТ на поверхности сперматозоидов и выявлять АСАТ класса IgA, которые не активируют комплемент. Недавно Nakanishi K. et al. (2000) предложена модификация данного метода, основанная на использовании цифровых технологий обработки изображения, что позволило повысить его объективность и точность.

Метод непрямой иммунофлуоресценции по Coons и Kaplan, основанный на связывании меченных флуорохромом антител к человеческим иммуноглобулинам с АСАТ на поверхности сперматозоидов, показывает их локализацию, но дает высокую частоту ложно-положительных результатов, так как при фиксации обнажаются внутренние спермальные антигены.

С помощью теста, использующего радиоактивно-меченные антитела к иммуноглобулинам человека, которые связываются со сперматозоидами, покрытыми АСАТ, (Haas G.G Jr. et al., 1980) невозможно определить область локализации АСАТ на поверхности клетки и процент сперматозоидов, покрытых АСАТ.

Недостатками иммуноферментного метода (ИФА/ELISA), с одной стороны, является использование фиксированных клеток, при котором происходит связывание АСАТ как с поверхностными, так и с внутренними спермальными антигенами, а с другой – возможность используемых специфических антител неспецифически связываться с фиксированными клетками, что приводит к ложно-положительным результатам. Однако главным недостатком ИФА является низкая чувствительность метода (по нашим данным около 10%). С этим согласны многие исследователи. По категоричному мнению W.Eggert-Kruse et al. (1993) «ELISA не может быть использована для оценки бесплодия» (p.1405).

Наиболее удобными для клинического применения и поэтому рекомендованными ВОЗ (1992, 1999) в качестве стандартных являются MAR и ИВТ-тесты. MAR-тест основан на связывании латексных шариков, покрытых человечески-

ми иммуноглобулинами IgG со сперматозоидами, покрытыми АСАТ, после добавления бивалентной антисыворотки к Fc-фрагменту IgG человека (Jager S. et al., 1978). Метод ИВТ основан на связывании полиакриламидных шариков, покрытых античеловеческими иммуноглобулинами G, A, M классов с поверхностью живых сперматозоидов, покрытых АСАТ (Bronson R. et al., 1984; Clark G.N. et al., 1985). MAR-тест производится и используется преимущественно в странах Европы, ИВТ-тест – Америки. Данные методы позволяют определять наличие, классы и локализацию АСАТ. Для этого после перемешивания капли раствора шариков со спермой, а затем – с антисывороткой, с помощью фазово-контрастного микроскопа при увеличении $\times 400$ производят подсчет процента подвижных сперматозоидов, связанных с шариками и локализацию прикрепления шариков. Полученный результат выражают в MAR% или ИВТ%. Однако с помощью данных методов невозможно оценить количество АСАТ, связанных с поверхностью сперматозоида. Кроме того, они не могут быть использованы при отсутствии активно-подвижных сперматозоидов.

Клиническая интерпретация результатов использования MAR- и ИВТ-тестов в наших исследованиях (Божедомов В.А. и соавт., 2000, 2001) показала, что даже при нормальных показателях спермограммы (нормозооспермия) существует значимая положительная корреляция между процентом АСАТ-позитивных сперматозоидов и вероятностью нарушения фертильности: первичными нарушениями и продолжительностью вынужденного бесплодия. Причем различия по сравнению с фертильными мужчинами становятся достоверными даже при MAR%IgG 1-10%, а по сравнению с бесплодными без АСАТ – при MAR%IgG $\geq 50\%$. Однако взаимосвязь результатов этих тестов с количественными показателями спермограммы – концентрацией, подвижностью и морфологией сперматозоидов, - хотя и является статистически достоверной, но весьма слабой ($r = +/ - 0,08 - 0,28$ при $n > 1000$). Очевидно, слабая зависимость количественных показателей спермограммы от результатов этих тестов является причиной мнения некоторых исследователей об отсутствии влияния АСАТ на качество спермы.

Одним из наиболее современных и перспективных методов, позволяющих оценивать количество АСАТ на поверхности живых сперматозоидов после их взаимодействия с антителами к IgG человека, ковалентно связанными с флуоресцентной меткой, является проточная цитофлуорометрия (ПЦМ) – метод, который позволяет определять не только наличие АСАТ, их классы, но и количество на каждую клетку (Haas G.G., Cunningham M.E., 1984). В основе метода

лежит оценка связывания IgG с поверхностью живых сперматозоидов, что можно рассматривать как существенное преимущество, позволяющее исключить неспецифическое взаимодействие иммуноглобулинов с мертвыми клетками, которое имеет место при проведении иммуноферментного, радиоизотопного и иммунофлуоресцентного анализов. Этот метод позволяет выявлять АСАТ даже на неподвижных сперматозоидах, анализировать до 500 клеток в 1 с и в течение короткого времени проводить исследования большого числа образцов. Анализ результатов обследования 153 бесплодных мужчин с использованием ПЦМ-метода в наших исследованиях (Божедомов В.А. и соавт., 2001) показал, что общий процент живых клеток, покрытых IgG, IgA, IgM имеет более строгую обратную корреляцию с количественными показателями спермограммы. Количество АСАТ на одну клетку дает информацию не только об активности аутоиммунных реакций против сперматозоидов, но и о дополнительных факторах – наличии инфекций репродуктивного тракта (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и др.), активности локальных воспалительных реакций, нарушениях акросомальной реакции. Однако чувствительность метод ПЦМ-теста существенно снижена по сравнению с MAR-тестом, и при использовании в качестве положительного контроля образцов MAR-положительной сыворотки (MAR%IgG=100%) составляет от 45 до 93% (Nikolaeva M.A. et al., 1993).

Важно отметить, несмотря на то, что нарушения подвижности, концентрации и морфологии сперматозоидов, концентрация лейкоцитов и агглютинация статистически значимо связаны с наличием АСАТ, эти показатели спермограммы ни изолированно, ни все вместе не могут быть использованы для предсказания наличия или отсутствия аутоиммунных реакций против сперматозоидов: 27% обследованных нами пациентов с иммунологическим бесплодием (MAR%IgG \geq 50%) имели нормальный процент активно-подвижных сперматозоидов, 82% – нормальную концентрацию, 91% - нормальную морфологию гамет, 90% – концентрацию лейкоцитов до 0,5 млн/мл, у 72% отсутствовала агглютинация. В 25% случаев бесплодные мужчины с АСАТ имели совершенно нормальные показатели спермограммы. Поэтому для исключения аутоиммунных реакций против сперматозоидов и выбора правильной тактики лечения пары **исследование на наличие АСАТ требуется проводить во всех случаях бесплодного брака**. При этом скрининговым методом следует считать MAR-тест, а одним из наиболее информативных при дальнейшем обследовании - ПЦМ.

Актуальные проблемы диагностики иммунного мужского бесплодия.

Использование для выявления АСАТ живых клеток (MAR-, ИВТ- и ПЦМ-методы) создает ряд методических проблем, затрудняющих интерпретацию результатов тестов.

Известно, что связывание поверхностных антигенов поливалентными антителами, а также связывание поверхностных комплексов антиген-антитело вторыми антителами могут приводить к реорганизации иммунных комплексов: на первом этапе их агрегации и образованию скоплений, называемых *пэтчами* (от англ. patches – пятна), затем объединению пэтчей в т.н. *кэпы* («шапочка» на одном из полюсов клетки), и, наконец, удалению с поверхности клетки в виде эндо- или экзоцитоза. Этот обычный для многих клеток (лимфоциты, эндотелиоциты и др.) процесс недавно был подтвержден и для сперматозоидов человека (Cross N.L., Moore S., 1990; Nikolaeva M.A. et al., 1998, 2000). Учитывая маленький объем цитоплазмы, для зрелого сперматозоида наиболее вероятен процесс сбрасывания комплексов антиген-антитело в семенную плазму. Следствием такой реорганизации количество АСАТ, связавшихся с поверхностью сперматозоида *in vivo*, и количество АСАТ, выявляемых при этом с помощью ПЦМ *in vitro*, могут существенно отличаться. Дополнительным стимулирующим этот процесс фактором, очевидно, является сама процедура ПЦМ-анализа, при котором клетка подвергается гидродинамическим и механическим воздействиям при ее передвижении в потоке жидкости под давлением. При определенных условиях интенсивность сбрасывания может оказаться настолько высокой, что приводит к полному удалению комплексов антиген-антитело с поверхности и получению ложно-отрицательных результатов. Хотя при выполнении MAR-теста травмирующие манипуляции сведены к минимуму, сбрасывание комплексов антиген-антитело в этом случае тоже возможно. Проявлением данного процесса является уменьшение доли АСАТ-позитивных сперматозоидов в некоторых образцах эякулята с увеличением времени наблюдения, или фазное изменение процента сперматозоидов, связанных с иммунными шариками.

Очевидно, что активность процессов образования и сбрасывания комплексов антиген-антитело зависит от многих факторов: условий проведения анализа, концентрации эндогенных АСАТ и вторых (используемых для тестирования) антител, особенностей липидного состава плазматической мембраны и метаболизма сперматозоидов. Последнее особенно важно, поскольку в отличие от внешних манипуляций, которые можно стандартизировать, отражает функцио-

нальное состояние гамет и имеет непосредственное отношение к их потенциальной фертильности.

Характерным для плазматической мембраны сперматозоидов является высокое содержание полиеновых жирных кислот, обеспечивающих высокую степень ее жидкостности (Lenzi A. et al., 2000). Способность к свободному перемещению в пределах домена и агрегация поверхностных антигенов сперматозоидов лежат в основе функционального созревания сперматозоидов: капацитации и акросомальной реакции (АР) (Lassalle B., Testart J., 1996). Важнейшей составляющей метаболизма сперматозоидов, контролирующей жидкостные свойства мембраны, и, следовательно, эти реакции, является регулируемый процесс свободнорадикального окисления (Aitken R.J., 1997). Но высокое содержание ненасыщенных жирных кислот делает плазматическую мембрану чрезвычайно чувствительной к повреждающему действию свободных радикалов (СР). Хотя цитоплазма сперматозоидов содержит антиоксидантные ферменты глутатионпероксидазу, каталазу и другие, небольшой объем цитоплазмы ограничивает возможности внутриклеточной антиоксидантной системы. Поэтому важным фактором, защищающим сперматозоид от повреждений, является высокая концентрация антиоксидантных ферментов и скэвенджеров СР в семенной плазме (Sanoka D. et al., 1996). Но манипуляции со спермой, центрифугирование и выделение сперматозоидов из семенной плазмы приводит к увеличению образования СР в 20-450 раз (Aitken R.J. et al., 1989; Iwasaki A. et al., 1992). Следствием этого нерегулируемое усиление генерации СР в ходе экспериментальных манипуляций при выявлении АСАТ может приводить к повреждению или изменению плазматической мембраны в результате перекисного окисления липидов (Storey B.T., 1997), сбрасыванию связанных с ней комплексов антиген-антитело (Hino T. et al., 1999) и получению ложноотрицательных результатов при выявлении АСАТ.

С другой стороны, поскольку все существующие методы выявления АСАТ на сперматозоидах основаны на обнаружении Fc-фрагмента иммуноглобулинов на поверхности клетки, любые микроорганизмы, способные адгезироваться к плазматической мембране и против которых имеется гуморальный ответ, могут стать причиной ложноположительных результатов. Такой способностью обладают микоплазмы, вирусы (например ВПГ), некоторые бактерии (Jermias J, Witkin S.S., 1996). Одновременно в этих случаях могут возникать перекрестные реакции. Отличить эти две ситуации можно только при неоднократных анализах с учетом результатов антимикробной и/или противовирусной терапии.

Выводы:

- исследование эякулята и/или крови на наличие АСАТ является обязательным этапом обследования мужчин из бесплодных пар;
- для целей клинической диагностики предпочтение следует отдавать методам определения АСАТ непосредственно в сперме;
- наиболее чувствительными и информативными в прогнозе фертильности следует считать методы обнаружения антител непосредственно на живых подвижных сперматозоидах (MAR- и ИВТ-тесты);
- для оценки активности антиспермального иммунитета и особенностей функциональных нарушений сперматозоидов информативным методом является ПЦМ;
- интерпретация данных тестов на АСАТ требует учета особенностей проводимых манипуляций и условий проведения анализов, данных микробиологического и вирусологического анализов, результатов определения содержания свободных радикалов в сперме и непосредственно на плазматической мембране.

Литература:

1. Божедомов В.А. и соавт. // Андрология и генитальная хирургия. 2001. №1. С.72-77, 78-87.
2. Божедомов В.А. и соавт. // Андрология и генитальная хирургия. 2000. №2. С.25-33.
3. Божедомов В.А. и соавт. // Андрология и генитальная хирургия. 2001. №2. С.38-44.
4. Руководство по урологии: В 3-х т. Т.3 / Под ред. Н.А.Лопаткина. 1998. С.590-601.
5. Aitken R.J. // Mol. Hum. Reprod. 1997. Vol. 3. P. 169-173.
6. Aitken R.J. et al.// Biol. Reprod. 1989. Vol.40. P.183-197.
7. Andreou E. et al. // Hum. Reprod. 1995. V.10. P.125-131.
8. Bronson R. et al. // Fertil. Steril.- 1984.-V.42.- P.171-183.
9. Check J.H. et al.// Arch. Androl. 2002. Vol. 48. P. 73-83.
10. Choudhury S.R., Knapp L.A. // Hum. Reprod. Update. 2000. Vol. 7. P. 113-134.
11. Clark G.N. et al. // Am. J. Reprod. Immunol. 1985. V.7. P.118-123.
12. Cross N.L., Moore S. // Hum. Reprod. 1990. Vol. 5. P.47-51.
13. Friberg J.// Acta. Obstet. Gynecol. Scand. Suppl. 1974. V.36. P.21-29.
14. Haas G.G Jr. et al.// Ibid. 1991. Vol. 55. P. 377-388.
15. Haas G.G. Jr. et al. // N. Engl. J. Med. 1980. V.303. P.722-727.

- 16.Heidenreich A. et al. // Am. J. Reprod. Immunol. 1994. V31. P.69-76.
- 17.Helmerhorst F.M. et al. // Hum. Reprod. 1999. Vol. 14. P.1669-1671.
- 18.Hino T. et al.// Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1999. Vol. 20. P.122-128.
- 19.Isojima S. et al. // Am. J. Obstet. Gynecol. 1972. V.112. P.199-207.
- 20.Iwasaki A., Cagnon C. // Fertil. Steril. 1992. Vol. 57. P. 409-416.
- 21.Jager L. // Int. J. Fertil. 1978. V.23. P.12-21.
- 22.Jermias J, Witkin S.S. // Hum. Reprod. 1996. Vol. 2. P.195-202.
- 23.Keel B.A. et al. // Hum. Reprod. 2000. V.15. P.680-686.
- 24.Kibrick S. // Fertil. Steril. 1952. V.3. P.430-438.
- 25.Lassalle B., Testart J. // Mol. Hum. Reprod. 1996. Vol. 2. P. 651-658.
- 26.Lenzi A. et al. // Front. Biosci. 2000. Vol. 5. P.1-15.
- 27.Mazumdar S., Levin A.S. // Fertil. Steril. 1998. V.70. P.799-810.
- 28.Nakanishi K. et al. // Second International Conference on Experimental and Clinical Reproductive Immunology. 15-18 November 2000. Amsterdam, 2000. P.84.
- 29.Nikolaeva M.A. et al. // Hum. Reprod. 2000. Vol. 15. P.
- 30.Nikolaeva M.A. et al. // Fertil. Steril. 1993. Vol. 59. P. 639-644.
- 31.Nikolaeva M.A. et al. // Mol. Hum. Reprod. 1998. Vol. 4. P. 243-250.
- 32.Rajah S.V. et al. // Fertil. Steril. 1992. V.57. P.1300-1303.
- 33.Sanoka D. et al. // J. Androl. 1996. Vol. 17. P. 449-454.
- 34.Storey B.T. // Mol. Hum. Reprod. 1997. Vol. 3. P. 203-213.
- 35.WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semem-cervical mucus interaction. WHO, 4-th edn.: Cambridge universiti press, 1999. 128 p.
- 36.WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple . WHO: Cambridge universiti press. 2000. 124 p.