

# Зміни клітинної ланки імунної системи у інфертильних чоловіків за токсокарозної інвазії

Л.Л. Воронцова, М.І. Дуб, В.А. Коваленко

ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України»,  
e-mail: ztaro32@gmail.com

*Досліджували стан клітинної ланки імунної системи у 89 чоловіків віком від 20 до 45 років без та з порушеннями репродуктивної функції. Всім чоловікам було проведено комплексне вивчення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів, наявності токсокарозної інвазії та оцінку специфічної ланки імунної системи. У інфертильних чоловіків спостерігалися різнонаправлені зміни в клітинній ланці специфічного імунітету залежно від вмісту антитіл імуноглобуліну G до антигенів токсокар, від гіперреактивності до імунодепресії. Встановлено, що на кількість фрагментованих сперматозоїдів впливає як стан імунної системи, так і проживання чоловіків з порушенням репродуктивної функції в несприятливих умовах навколишнього середовища. Таким чином, інфертильним чоловікам, що мешкають на території м. Запоріжжя та області, властиві порушення імунного статусу, а зараження токсокарозом вносить певні зміни в стан імунної системи, саме в клітинну ланку.*

*Ключові слова:* клітинна ланка імунної системи; токсокарозна інвазія; фрагментація ДНК сперматозоїдів; чоловіче безпліддя.

## ВСТУП

Проблема неплідних шлюбів набуває поширеності в усьому світі, актуальність якої зростає з «нульовим» приростом населення в Європі, і є вкрай актуальною і для України [1-3]. На думку сучасних фахівців саме чоловічий фактор займає 50 % в структурі причин безпліддя, при цьому в 22,8 % випадків причина патоспермії є не встановленою та має тенденцію до збільшення [4-8]. Останнім часом зниження фертильності у чоловіків пов'язують зі шкідливими факторами навколишнього середовища, стресами, неправильним харчуванням, шкідливими звичками, але такому фактору, як зараження глистяними інвазіями, а саме токсокарозу, не надають достатнього значення, він залишається недооціненим, тоді як майже 30 % дорослого населення заражено ним і знаходиться поза увагою лікарів. В Україні щороку виявляють 300-400 тис. випадків захворювань, що не повною мірою відповідає дійсності. Мабуть це пов'язано з тим, що перебіг захворювання найчастіше зустрічається у вигляді латент-

© Л.Л. Воронцова, М.І. Дуб, В.А. Коваленко

них та субклінічних форм, без специфічної симптоматики [9-11], тоді як секреторно-екскреторно-соматичні продукти або метаболіти гельмінтів призводять до мутації в статевих клітинах, що являє собою найбільшу небезпеку для чоловіків, і таким чином загрожує здоров'ю майбутніх поколінь [12].

Відомо, що токсокароз призводить до генотоксичних ефектів і утворення первинних ушкоджень ДНК (утворення одно- і дволанцюгових розривів) внаслідок чого підвищуються рівні генних і хромосомних мутацій, що дуже важливо для розуміння виникнення порушень фертильності різного ступеня: від незначних змін сперматогенезу до повної дисфункції гонад [13]. Токсокароз (довготривала інвазія) впливає на імунну систему хазяїна, а саме на клітини імунітету, як найбільш важливу ланку імунної системи, що конституційно призначена для елімінації клітин, що несуть ознаки генетичної чужорідності, до яких можна віднести личинки токсокар.

Також у результаті численних досліджень доведено, що токсокароз викликає імуноло-

гічні та імунопатологічні реакції [14, 15], зумовлені ступенем взаємної адаптації паразита та хазяїна [16]. Однак невідомо, коли саме адекватна фізіологічна відповідь стає імунопатологічною, що є причиною тяжких змін [17], в яких ланках імунної системи можуть виникати зміни, як саме порушуються нормальні співвідношення клітинних субпопуляцій, чи розвивається дисгамма- та дизімунноглобулінемія тощо. Тим не менш точних висновків про механізми впливу паразитарної інвазії на імунну систему в доступній нам літературі не зустрівся.

Метою нашої роботи було виявлення особливостей клітинної ланки імунної системи у чоловіків з порушенням фертильності на фоні токсокарозної інвазії.

## МЕТОДИКА

Обстежено 89 чоловіків віком від 20 до 45 років, які дали інформовану письмову згоду на участь в дослідженні, схваленому комітетом з біоетики ДЗ «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України» та відповідно до етичних і морально-правових вимог Наказу Міністерства охорони здоров'я України № 281 від 01.11.2000 р. Пацієнти були розділені на п'ять груп. Першу (контрольну) групу склали 12 фертильних, практично здорових чоловіків, які пройшли обстеження, як донори банку сперми (згідно з наказом № 787 від 09.09.2013 р.). До другої групи (порівняння) увійшли 27 інфертильних пацієнтів з нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та з відсутністю антитіл до токсокар. Третю групу склали 20 інфертильних чоловіків з нормальним рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та наявністю антитіл до токсокар. До четвертої і п'ятої груп увійшло по 15 інфертильних чоловіків з високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів і наявністю антитіл до токсокар та відсутністю відповідно.

Всім чоловікам було проведено дослідження наявності токсокарозної інвазії,

рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів, а також оцінку специфічної ланки імунної системи. Рівень фрагментації ДНК сперматозоїдів визначали за допомогою методу Sperm Chromatin Dispersion test (патент РФ № 2373288). За нормальні значення вважали рівень цього показника до 30 % із підрахованих 500 сперматозоїдів.

Наявність токсокарозної інвазії досліджували виявленням кількості антитіл імуноглобулінів G до антигенів токсокар імуноферментним методом (з використанням набору реактивів «Вітротест», Україна), для кожної дослідної проби розраховували індекс позитивності за відношенням оптичної густини досліджуваного зразка до граничного значення негативного контролю. Результат вважали позитивним при значеннях  $>1,1$ .

Оцінку показників специфічної ланки імунної системи (субпопуляційного складу лімфоцитів) проводили фенотипуванням з використанням моноклональних антитіл до антигенів виробництва НВО «Гранум» (м. Харків). Метод оснований на визначенні субпопуляцій T- і B-лімфоцитів за допомогою реакцій розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла до рецепторів CD3<sup>+</sup> (T-лімфоцити), CD4<sup>+</sup> (T-хелпери), CD8<sup>+</sup> (T-супресори/цитотоксичні лімфоцити), CD16<sup>+</sup> (NK-клітини), CD22<sup>+</sup> (B-лімфоцити).

За допомогою світлового мікроскопа підраховували відсоток лімфоцитів у пофарбованих мазках, які утворили розетки (зв'язали не менше ніж 3 еритроцити) із CD-діагностикумами на 200 лімфоцитів.

Статистичну значимість показників, які порівнювали з розподіленням, відмінним від нормального, встановлювали з використанням критерію Kruskal-Wallis ANOVA. При  $P < 0,05$  проводили попарне порівняння груп (Wald-Wolfowitz runs test) з поправкою Бонферроні для оцінки значень вірогідності. Розраховували медіану (Me) та інтерквартильний розмах (RQ). Статистичну обробку результатів проводили з використанням

комп'ютерних програм пакету Statistica (Stat Soft Statistica v.7.0).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід відмітити, що у чоловіків другої групи, хоча й спостерігалися зміни показників спермограми, однак кількість фрагментованих сперматозоїдів в середньому була 16 %. У третій групі цей показник не перевищував нормальні значення (17,7 %), водночас вміст антитіл імуноглобуліну G (Ig G) до антигенів токсокар відповідав індексу позитивності 1,8. У чоловіків четвертої групи рівень фрагментації ДНК перевищував норму (48,7 %) на тлі збільшення антитіл Ig G до антигенів токсокар (індекс позитивності 2,4). Отримані результати свідчать про наявність токсокар-розної інвазії, як в третій, так і в четвертій групах. Дослідження рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів у пацієнтів п'ятої групи виявило незначне перевищення нормальних значень (32,5 %).

У результаті вивчення Т-клітинної ланки імунної системи у чоловіків другої групи встановлено, що концентрація загальної кількості Т-лімфоцитів з фенотипом CD3<sup>+</sup> майже відповідала значенням контрольної групи, тоді як вміст CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> змінювався різнонаправлено – підвищувався на 35 % та знижувався на 17 % відповідно до контрольної групи. Імунорегуляторний індекс був підвищений на 40 %, а вміст CD16<sup>+</sup> і CD22<sup>+</sup> – на 66 та 36 % відносно групи контролю. Отже, у чоловіків групи порівняння спостерігався дисбаланс показників імунної системи, збереження загальної кількості лімфоцитів, активація NK-клітин та В-лімфоцитів, що ймовірно свідчить про наявність проявів хронічної інфекції, можливо грибкової природи (табл. 1).

Стан Т-клітинної системи у чоловіків третьої групи характеризувався підвищеними рівнями практично всіх показників: збільшення CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> – на 25, 55 та 11 % відносно контролю та на 25, 16 і 35 % – від-

носно групи порівняння відповідно, тоді як імунорегуляторний індекс був підвищеним на 40 % щодо контрольної групи та відповідав показнику групи порівняння. Вміст CD16<sup>+</sup> та CD22<sup>+</sup> був збільшений на 238 і 245 % та 103 і 153 % відносно групи контролю та групи порівняння відповідно.

Вочевидь, при інвазії невеликою кількістю личинок токсокар (рівень антитіл IgG до антигенів токсокар – індекс позитивності 1,8) стимулюється імунна система господаря за рахунок метаболітів, які знаходяться на поверхні личинок та мають властивості суперантигенів, з подальшою солюбілізацією в кровотік. Така гіперактивація Т-клітин забезпечує достатньо швидке виведення патогенів з організму, що робить практично неможливим пошкодження ДНК сперматозоїдів.

Стан Т-клітинної системи у чоловіків четвертої групи характеризувався збереженням загальної кількості Т-лімфоцитів щодо груп контролю та порівняння, збільшенням CD4<sup>+</sup> на 25 % порівняно з контролем та зниженням на 8 % відносно групи порівняння. Вміст CD8<sup>+</sup> практично відповідав значенням контрольної групи та підвищувався на 23 % відносно групи порівняння. Імунорегуляторний індекс змінювався різнонаправлено – підвищувався на 24 % відносно контрольної групи та знижувався на 12 % відносно групи порівняння. Вміст CD16<sup>+</sup> був збільшений щодо групи контролю на 11 % та знижений на 31 % відносно групи порівняння, тоді як кількість CD22<sup>+</sup> була знижена як відносно групи контролю, так і групи порівняння на 9 та 33 % відповідно.

Таким чином, розвиток процесу, який викликаний великою кількістю личинок токсокар (вміст антитіл IgG до антигенів токсокар – індекс позитивності 2,4) сприяє розвитку патологічної імунної відповіді. При гельмінтозній інвазії і її хронізації, починає розвиватись імунодепресія, що призводить до заміни гострої фази на хронічну. При такому процесі паразитогенна депресія може виникати в різноманітних ланках імунної

системи (зокрема, в системі В-лімфоцитів). Саме наявність імунодепресії сприяє персистенції патогену, що надалі призводить до фрагментації ДНК сперматозоїдів.

На думку сучасних фахівців, на виникнення неплідності негативно впливають досить багато різних чинників. Треба взяти до уваги, що у всіх чоловіків, які мешкають в м. Запоріжжя та на території її області є один спільний чинник – це забруднення навколишнього середовища викидами промислових підприємств, що містять 52 пріоритетні хімічні речовини із загального списку та включають 80 хімічних полютантів, які можуть шкідливо впливати на здоров'я [18]. За даними аналізу ризику для здоров'я населення найбільш впливають на репродуктивну систему 1,3-бутадиєн (дивініл), акрилонітрил, бензол та інші, що саме і є викидами основних промислових підприємств.

Виходячи з вищевикладеного, наступним етапом нашої роботи стало дослідження стану імунної системи в групі чоловіків з фрагментацією ДНК, але без наявності антитіл до токсокар. Встановлено, що у чоловіків п'ятої групи знижувалась концентрація CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> та CD8<sup>+</sup> на 33 і 33 %, на 23 % та на 27 і 12 % як відносно контрольної, так і групи порівняння відповідно, в той же час вміст CD4<sup>+</sup> відповідав показникам контролю. Імунорегуляторний індекс був підвищеним на 40 % щодо контрольної групи та відповідав показнику групи порівняння. Вміст CD16<sup>+</sup> та CD22<sup>+</sup> був підвищеним на 11 та 9 % відносно контрольної групи та зниженими на 34 і 20 % відносно групи порівняння відповідно. Отримані результати свідчать про наявність імунодефіцитного стану, який притаманний мешканцям м. Запоріжжя та області, які є зоною «екологічного лиха».

## ВИСНОВКИ

1. Чоловікам з порушенням репродуктивної функції, що мешкають на території м. Запоріжжя та області, властиві порушення

імунного статусу, а зараження токсокарозом вносить певні зміни в стан імунної системи, саме в клітинну ланку.

2. У інфертильних чоловіків при незначному інфікуванні личинками токсокар (вміст антитіл IgG до антигенів токсокар – 1,8) спостерігається гіперактивація Т-клітинної ланки імунної системи, що забезпечує достатньо швидке виведення патогену з організму та робить практично неможливим пошкодження ДНК сперматозоїдів.

3. За наявності чоловічого безпліддя при значному інфікуванні личинками токсокар (вміст антитіл IgG до антигенів токсокар – 2,4) виявляється імунодепресія, що сприяє персистенції патогену, і призводить до фрагментації ДНК сперматозоїдів.

4. При порушеннях чоловічої фертильності з високим рівнем фрагментації ДНК сперматозоїдів та без токсокарозою інвазії спостерігається наявність імунодефіцитного стану, що вочевидь викликано проживанням цього контингенту хворих в несприятливих умовах середовища (дія хімічних полютантів).

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co authors of the article.*

Л.Л. Воронцова, М.И. Дуб, В.А. Коваленко

## ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ИНФЕРТИЛЬНЫХ МУЖЧИН ПРИ ТОКСОКАРОЗНОЙ ИНВАЗИИ

Исследовали состояние клеточного звена иммунной системы у 89 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет без и с нарушениями репродуктивной функции. Всем мужчинам было проведено комплексное изучение уровня фрагментации ДНК сперматозоидов, наличия токсокарозою инвазии и оценку специфического звена иммунной системы. В инфертильных мужчин наблюдались разнонаправленные изменения в клеточном звене специфического иммунитета в зависимости от содержания антител иммуноглобулинов G к антигенам токсокар, от гиперреактивности к иммуно-

депрессии. Установлено, что на количество фрагментированных сперматозоидов влияет как состояние иммунной системы, так и проживание мужчин с нарушением репродуктивной функции в неблагоприятных условиях окружающей среды. Таким образом, инфертильным мужчинам, проживающим на территории г. Запорожья и области, свойственны нарушения иммунного статуса, а заражение токсокарозом вносит определенные изменения в состояние иммунной системы, именно в клеточное звено.

Ключевые слова: клеточное звено иммунной системы; токсокарозная инвазия; фрагментация ДНК сперматозоидов; мужское бесплодие.

**L.L. Vorontsova, M.I. Dub, V.A. Kovalenko**

### **CHANGES IN THE CELLULAR LINK OF THE IMMUNE SYSTEM IN INFERTILE MEN AT THE TOXOCARIASIS INVASION**

The state of the cellular link of the immune system was studied in 89 men aged 20 to 45 years without and with reproductive disorders. All men underwent a comprehensive study, including determining the level of fragmentation of sperm DNA, the presence of toxocariasis invasion, as well as evaluating the specific link of the immune system. We observed multidirectional changes in the cellular link of specific immunity, depending on the level of immunoglobulins G against toxocariasis antigens, from hyperreactivity to immunosuppression in infertility men. It has been established that the number of fragmented spermatozoa is affected both by the state of the immune system and by the residence of men with a violation of reproductive function under adverse environmental conditions. Thus, infertile men, who lives in the territory of Zaporizhzhya and the region, are characterized by violations of the immune status, and toxocariasis invasion makes certain changes in the state of the immune system, namely, in the cellular link.

Key words: cellular link of the immune system; toxocariasis invasion; fragmentation of sperm DNA; male infertility.

*State establishment "Zaporizhzhya Medical Academy of Post Graduate Education Ministry of Health of Ukraine"*

#### **REFERENCES**

1. Povorozniuk MV. Factors, which affecting to the state of fertility in men with infertility in marriage. *Med Asp Men's health*. 2015; 12 (17):63-8. [Ukrainian].
2. Kopkov VS, Tsanko II. Assisted reproductive technology in solving demographic problems. Legal perspectives. *Med Asp Women's health*. 2013; 4 (68):55-7. [Ukrainian].
3. Tsiporenko S.Yu. Influence of hepatomax on male fertility. *Fiziol Zh*. 2013; 3 (59): 119-25. [Ukrainian].
4. Dudarova AKh, Smolnikova VYu, Zobova AV, Makarova NP, Kalinina EA, Andreeva MG, Naimi ZMS. Advances and prospects in overcoming male infertility in assisted reproductive technology using different sperm selection procedures. *Obstetrics and Gynecology*. 2016; 2:28-33. [Russian].
5. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C. European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol*. 2012; 62(2): 324-32.
6. Vladychenko KA, Usko VO, T. Savchuk L. Analysis of the semen Medical center of infertility treatment in 2010 – 2014. *Men's Health*. 2015; 3:140-1. [Ukrainian].
7. Bozhedomov VA, Rohlikov IM, Tretyakov AA et al. Actual issues of rendering assistance to couples with the male factor of infertile marriage: clinical and organizational-methodological aspects. *Andrology and Genital Surgery*. 2013; 4:7-16. [Russian].
8. Abdella AM. Biochemical markers in semen and their correlation with fertility hormones and semen quality among Sudanese infertile patients. *Afr J Biochem Res*. 2010; 11 (4):255-60.
9. Zakharchuk AI. Sero-epidemiological characteristics invasion with toksokariasis in children Bukovina. *Infect Diseases*. 2013; 4 (74):60-3. [Ukrainian].
10. Gasanova TA. Toksokaroz: distribution and impact on reproductive health. *Med Parasitology and Parasit diseases*. 2003; 4:11-4. [Russian].
11. Yukhimenko GG, Maidannik VG. Toxocarosis in children. *Int J Ped, Obst and Gyn*. 2012; 1(2):124-34. [Russian].
12. Bekishev VYa. Parasitic invasions and ways to protect the host genome with helminthiasis. Abstract of the thesis for a doctoral degree. Vitebsk. 2005. [Russian].
13. Kolmogorov VI, Bekish VYa. Damage to the owner's genome during experimental toxocarosis and with sensitization by protein product from *Toxocara canis* tissues. *Vestnik VGMU*. 2004, 3(3):81-9. [Russian].
14. Novikov PD, Nikulin YuT, Khotetovskaya ZhV, Novikov DK. Immunodiagnosis of toxocariasis. *Immun Infect Allerg*. 2007; 2:65-72. [Russian].
15. Adamenko GP, Nikulin YuT. Toksokaroz – an urgent public health problem. *Med News*. 2005; 1:31-5. [Russian].
16. Stybel VV, Pryyma OB, Ponomar SI. Research the number of T- and B- lymphocytes for the acts of invasion *Toxocara canis*. *Scient Herald SZ Gzhytsky LNUVMBT*. 2014; 3 (16):330-4. [Ukrainian].
17. Bodnya EI, Bodnya IP. Clinical and immunological aspects of parasitic diseases. *Klin immun, allerg, infekt*. – 2007, 8:25-30 [Russian].
18. Turoso OI. Analysis of the risk to the population's health from atmospheric air pollution by industrial enterprises in Zaporozhye. *Med perspekt*. 2008, 1(13):93-7. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов до редакції 06.03.2017*