

ные выше методы требуют либо значительных затрат времени и средств для сбора анамнестических данных, либо сложного оборудования для проведения специальных исследований. Имунная система вносит существенный вклад в прогноз течения заболеваний, индивидуальная реакция организма, даже при условии использования одинаковых схем лечения, определяются именно состоянием иммунитета.

Нами разработана простая и эффективная схема прогнозирования вида и тяжести течения заболеваний кожи, основанная на исследовании взаимоотношений иммунокомпетентных клеточных субпопуляций, определяемых в процессе рутинного лабораторного анализа при обращении в стационар. В качестве материала использованы иммунограммы 17 здоровых добровольцев, 167 пациентов с меланомой кожи и 59 пациентов с первичным рожистым воспалением. Путем целого каскада вычислений, позволивших выделить значимые параметры иммунной системы, наиболее четко реагирующие на вид и степень заболеваний кожи подобраны компоненты и построено регрессионное уравнение, позволяющие давать заключение о специфичности и динамике заболевания по данным первичного обследования, полученным при поступлении больного в стационар.

Проверка работы уравнения на обучающей выборке позволила сформировать следующие прогностические критерии:

$$\text{Прогноз} = 1,74624 - 0,373825 \text{Лимф} - 0,00289553 \text{CD}3^{+} - \\ - 0,0674485 \text{CD}11b^{+} + 1,04409 \text{CD}16 + 2,08387 \text{CD}20^{+} - \\ 1,71682 \text{CD}25^{+} + 0,736794 \text{CD}95^{+} + 0,00532813 \text{ФП} + 0,059057 \text{IgA};$$

если значения расчетного коэффициента, полученного при использовании построенной нами модели менее $0,06 \pm 0,02$ пациент не имеет заболеваний кожи, при значениях коэффициента $1,1 \pm 0,2$ заболевание кожи носит неканцерогенный характер, значение коэффициента превышающее $2,1 \pm 0,2$ свидетельствует о раковом заболевании кожи.

Таким образом, предложенный нами способ прогнозирования вида и динамики заболеваний кожи основан на использовании лабораторных показателей иммунной системы, не требует дополнительных затрат времени и других ресурсов, доступен практическому врачу, персонализирован для пациента.

Литература

1. Пат. 2317016 RU Способ оценки риска развития рака кожи / Урбанский А., Левченко К., Часовников К. // <http://www.fips.ru/>
2. Пат. 2310195 RU Способ прогнозирования течения атопического дерматита / Науменко М., Алексеев М., Попова Е., Кветная А. // <http://www.fips.ru/>

УДК 616.697-092-07

ПРИМЕНЕНИЕ НАУКОЕМКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФЕРТИЛЬНОСТИ МУЖЧИН

Д.С. ГРОМЕНКО *

Решение проблемы мужского бесплодия имеет большое социально-экономическое значение для современной России с ее крайне неблагоприятными демографическими показателями. Удельный вес мужского фактора в бесплодном браке составляет не менее 40%. В то же время довольно высок удельный вес категорий мужской infertility, отнесенных к идиопатическим формам.

Примерно у 25% бесплодных мужчин причину патологии не находят. Ухудшение показателей репродуктивного здоровья мужчин связывают с антропогенным загрязнением окружающей среды [1–4]. Распространенность нарушений детородной функции среди мужского и женского населения в 1,5 раза выше в населенных пунктах с высокой техногенной нагрузкой [5].

Однако доказательства существования реальной взаимосвязи между состоянием мужской репродуктивной функции и накоплением в окружающей среде конкретных поллютантов получены сравнительно недавно [6–7]. Содержание диоксинов и диоксиноподобных соединений в суммарных пробах спермы мужчин, проживающих в индустриальных городах, составило в среднем 262,4 пг/г, при соответствующих уровнях в крови тех же мужчин

от 67 до 324 пг/г. Это значительно выше величин, найденных в сперме и крови американских ветеранов и жителей Вьетнама, подвергшихся воздействию «Оранжевого агента» [8]. Факт загрязнения спермы диоксинами свидетельствует о проницаемости гематотестикулярного барьера для этих поллютантов. Взаимодействуя с Ah (aryl hydrocarbon)-рецептором, диоксины могут изменять процессы биотрансформации и свободно-радикального окисления (СРО), что, в совокупности с микросомальным окислением самих диоксинов, может явиться причиной развития патозооспермии [6]. Нарушения процессов липопероксидации может выражаться в виде увеличения генерации активных форм кислорода (АФК) половыми клетками. Хотя окислительный стресс может отрицательно влиять на сперматогенез, нормальное функционирование сперматозоидов требует присутствия физиологических количеств АФК [9]. АФК играют основную роль в процессах гиперактивации сперматозоидов, ведущей к капацитации и развитию акросомальной реакции [10]. АФК в избыточном количестве могут инициировать нарушения в сперматозоидах путем индукции окислительного повреждения клеточных липидов, протеинов и ДНК, что является одним из механизмов патогенеза мужского бесплодия [11]. В исследованиях Iwasaki A. (1992) показан повышенный уровень свободных радикалов в эякулятах 40% бесплодных мужчин [12].

Цель исследования – изучить процессы СРО в семенной жидкости в условиях экзогенного воздействия поллютантов хлорорганической природы.

Материалы и методы. Объектом исследования явились пациенты с бесплодием, проживающие в регионах Республики Башкортостан с различным уровнем техногенной нагрузки, которые были разделены на группы в зависимости от показателей спермограммы и содержания диоксинов и диоксиноподобных соединений в семенной жидкости. Всего было сформировано 4 группы соматически здоровых, сексуально активных мужчин, состоящих в бесплодном браке.

I-я группа – пациенты с высоким уровнем содержания диоксинов и диоксиноподобных соединений в сперме и нормозооспермией на момент исследования; II-я группа – пациенты с высоким уровнем содержания диоксинов и диоксиноподобных соединений в сперме и патозооспермией на момент исследования; III-я группа – пациенты с низким уровнем содержания диоксинов и диоксиноподобных соединений в сперме и нормозооспермией на момент исследования; IV-я группа – пациенты с низким уровнем содержания диоксинов и диоксиноподобных соединений в сперме и патозооспермией на момент исследования. Каждая группа включала 30 человек, удовлетворяющих критериям отбора и исключения. Критерии включения пациентов в исследование: мужчины в возрасте 20–45 лет; продолжительность проживания в конкретном районе ≥ 5 лет; возраст супруги пациента 18–35 лет.

Критерии исключения: концентрация сперматозоидов менее 10 млн/мл; эндометриоз, нарушение менструального цикла, поликистоз яичников, хронические воспалительные процессы, отягощенный акушерско-гинекологический анамнез, невынашивание беременности, эндокринные заболевания, оперативные вмешательства на органах малого таза у супруги пациента; подтвержденные эндокринные причины бесплодия; регулярный прием лекарственных средств; хронический алкоголизм; курение; перенесенные оперативные вмешательства на органах мошонки, паховых каналах и сосудах яичка; эпидемический паротит в детском возрасте; генетические аномалии; острые и хронические воспалительные процессы специфической и неспецифической этиологии (орхоэпидидимиты, простатиты, везикулиты, уретриты); варикозное расширение вен семенного канатика; доказанные иммунологические факторы infertility; соматические заболевания, которые могут повлиять на проведение исследования; участие в других клинических исследованиях в течение последнего месяца до настоящего исследования.

Патозооспермия, выявленная во 2-й и 4-й группах наблюдения, носила идиопатический характер. Состав всех групп был однороден по возрасту, материально-бытовым условиям, обеспеченности квалифицированной медицинской помощью, продолжительности проживания в данном районе, а также здоровью и социальному положению. Всем пациентам проведено клинико-лабораторное обследование с применением инфекционного скрининга (путем полимеразной цепной реакции), гормональных методов диагностики (определение фолликулостимулирующего гормона, тестостерона, пролактина), трансректального УЗИ пред-

* ЦНИЛ Башкирского ГМУ, 450000, г.Уфа, ул.Ленина,3, тел. (347)272-41-73, факс 272-37-51

стательной железы и семенных пузырьков, доплерографии сосудов мошонки. Всем проводились исследования эякулята, включающие оценку семенной жидкости после периода полового воздержания от 2 до 7 дней (в среднем $3,3 \pm 0,11$ дня).

С целью изучения интенсивности свободно-радикальных процессов и антиокислительной активности выполнялся хемилюминесцентный анализ спермы. Регистрацию хемилюминесценции эякулята проводили на аппарате «Хемилюминомер – 003» со специализированным компьютерным обеспечением. Об интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции судили по ряду параметров, в первую очередь, по светосумме и максимальной амплитуде свечения, которые соответствовали скорости образования АФК. Перед измерением свечения исследуемый объем спермы смешивали с 2 мл физраствора, содержащего люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталидин) в конечной концентрации 10^{-5} М, и помещали в светоизолированную камеру прибора. Тщательно перемешивали и вели запись хемилюминесценции при 37°C в течение 5 мин. В норме сперматозоиды характеризуются низкой способностью к генерации АФК (светосумма свечения соответствует уровню $2,9 \pm 0,8$ отн.ед.).

Для оценки антиокислительной активности 0,1 мл сперматозоидов добавляли к модельной системе. В качестве модельной системы использовали 20 мл фосфатного буфера ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - 20 \text{ mM}$, $\text{KCl} - 105 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,45$) с цитратом (50 mM) и люминолом (10^{-5} М). В течение 10 секунд записывали темновой ток, после чего вносили инициатор образования АФК – 1 мл 50 mM раствора сернокислого железа ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$). Запись свечения проводили в течение 5 минут при постоянном перемешивании. При оценке Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции определяли величину спонтанного свечения, длительность латентного периода от момента введения ионов железа до начала медленной вспышки. Также оценивали амплитуду быстрой и медленной вспышек.

Определение суммарной антиокислительной активности сперматозоидов для оценки мужской фертильности включало в себя: оценку железиндуцируемой хемилюминесценции модельной системы, генерирующей АФК; проведение повторной регистрации хемилюминесценции при добавлении сперматозоидов; по степени подавления свечения модельной системы определяли суммарную антиокислительную активность сперматозоидов по формуле: $\text{SAOA} = (\text{SMCCP} - \text{SMC}) / \text{SMC} \times 100\%$,

где SAOA – суммарная антиокислительная активность, %; SMC – светосумма модельной системы, генерирующей АФК, отн. ед.; SMCCP – светосумма модельной системы + сперматозоиды, отн. ед. В норме суммарная антиокислительная активность, определенная при обследовании здоровых фертильных мужчин – доноров спермы, колеблется от 35% до 43%, при более низких значениях суммарная антиокислительная активность недостаточна. Для определения источника АФК в эякуляте проводили разделение путем изопиклотического центрифугирования в градиенте плотности. В качестве градиента использовали фикола/гипак: 20мл 9 % фикола+10,0 мл 50 % гипака; плотность 1,12 г/мл. Уровень pH градиента доводился до 7,5.

Степень взаимосвязи между признаками оценивали по корреляции Пирсона. Количественные признаки представляли в виде $M \pm m$. Значимость различий в группах изучали по t-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Таблица 1

Показатели спермограммы у мужчин наблюдаемых групп

Показатели эякулята	Группы обследованных			
	I группа	II группа	III группа	IV группа
Объем эякулята, мл	$3,1 \pm 0,18$	$3,0 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,27$	$3,7 \pm 0,37$
pH	$7,4 \pm 0,08$	$7,5 \pm 0,08$	$7,5 \pm 0,08$	$7,5 \pm 0,08$
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	$76,4 \pm 4,3$	$41,0 \pm 4,75$	$69,7 \pm 6,27$	$29,9 \pm 4,48$
Подвиж. сперматозоидов, %	категории А	$45,7 \pm 2,51$	$29,7 \pm 2,9$	$43,9 \pm 2,26$
	категории В	$8,8 \pm 1,22$	$14,2 \pm 1,44$	$11,5 \pm 1,22$
	категории С	$14,0 \pm 1,49$	$21,6 \pm 2,0$	$14,9 \pm 2,06$
	категории D	$31,5 \pm 1,27$	$34,4 \pm 2,13$	$30,1 \pm 1,57$
Морфологически полноценные формы, %	$63,9 \pm 1,87$	$46,6 \pm 2,17$	$61,8 \pm 1,88$	$47,5 \pm 2,62$
Клетки сперматогенеза, млн/мл	$0,1 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
Лейкоциты, млн/мл	$0,1 \pm 0,05$	$0,1 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,14$

Результаты. Возраст пациентов колебался от 20 до 45 лет. Средний возраст мужчин в I группе составил $31,2 \pm 0,8$ лет, во II группе – $30,3 \pm 0,8$ лет, в III группе – $30,7 \pm 1,0$ лет, в IV группе –

$31,8 \pm 1,0$ лет. Профессиональная деятельность обследованных мужчин была связана как с умственным трудом – 56 (46,7 %) человек: служащие, частные предприниматели, так и с физическим трудом – 64 (53,3 %). В качестве факторов производственной вредности у мужчин можно назвать работу с нефтепродуктами – 7 человек (5,8 %), органическими растворителями – 5 человек (4,2 %), высокочастотным излучением – 3 человека (2,5 %). Работа в цехах с повышенной температурой была у 2 пациентов (1,7 %). Все обследованные мужчины состояли в бесплодном браке от 1 года до 10 лет. Первичное бесплодие было у 105 пациентов (87,5 %), вторичное бесплодие выявлялось у 15 (12,5 %) мужчин. Результаты исследования семенной жидкости 120 наблюдаемых пациентов по группам приведены в табл. 1.

Достоверных различий по основным параметрам спермограммы между группами I и III (нормозооспермия в экологически неблагополучных и благополучных районах) и группами II и IV (патозооспермия в экологически неблагополучных и благополучных районах) не было выявлено. Характеристика идиопатической патозооспермии по нозологическим характеристикам у мужчин (в группах II и IV) представлена в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика патозооспермии в обследованных группах (n=60)

Вид патозоспермии	II группа		IV группа	
	Абс.ч.	%	Абс.ч.	%
Изолиров. астенозооспермия	3	10%	4	13,3%
Изолиров. олигозооспермия	3	10%	6	20%
Изолиров. тератозооспермия	13	43,4%*	5	16,7%
Астенотератозооспермия	4	13,3%	5	16,7%
Атеноолигозооспермия	3	10%	3	10%
Олиготератозооспермия	3	10%	4	13,3%
Олигоастенотератозооспермия	1	3,3%	3	10%

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с IV группой.

Несмотря на выявленные статистически достоверные различия по показателю изолированной тератозооспермии, сравниваемые группы являются однородными, так как если суммировать все варианты патологии, в которых присутствует тератозооспермия, то данный уровень во II группе составил 70%, а в IV – 57% (различия недостоверны).

Изучение процессов генерации АФК в сперме при нормо- и патозооспермии было выполнено у всех пациентов исследуемых групп по разработанной методике («Способ регистрации активных форм кислорода в семенной жидкости для оценки фертильности»// Патент на изобретения № 2272291 от 20.03.2006г., соавт.: Фархутдинов Р.Р., Галимов Ш.Н., Шемагонов Д.В.).

При исследовании люминолзависимой хемилюминесценции семенной жидкости пациентов сформированных групп наблюдения обращал на себя внимание факт незначительного разброса параметров образцов (рис. 1). Достоверных различий по показателю светосуммы, спонтанной светимости, максимальной светимости между всеми группами не было выявлено.

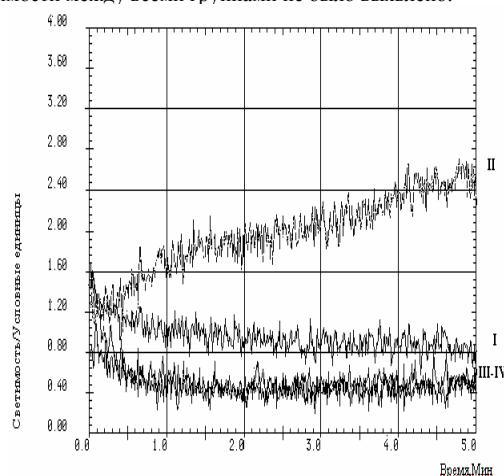


Рис. 1. Пример записи люминолзависимой хемилюминесценции эякулятов пациентов исследуемых групп. Нумерация кривых соответствует номеру группы (кривая I-IV)

Показатели люминолзависимой хемилюминесценции по группам представлены в табл. 3.

Таблица 3

Уровень люминолзависимой хемилюминесценции семенной жидкости

Показатели люминолзависимой хемилюминесценции	Группы обследованных			
	I гр.	II гр.	III гр.	IV гр.
Светосумма, отн.ед.	6,6±1,99	12,0±2,08	6,6±1,85	9,5±1,87
Спонтанная светимость, отн.ед.	1,8±0,32	1,9±0,22	1,6±0,27	1,9±0,36
Максимальная светимость, отн.ед.	2,7±0,43	3,4±0,37	2,5±0,50	3,1±0,39

Данные, полученные при исследовании спермы мужчин, включенных в программу «донорство спермы», приняты за нормативные значения (светосумма – 2,9±0,8 отн. ед., спонтанная светимость – 0,9±0,3 отн. ед., максимальная светимость – 0,7±0,2 отн. ед.) За интегральный показатель принята светосумма свечения. При сравнении данных, полученных на четырех группах наблюдения, с нормативным показателем светосуммы, статистически достоверные различия были получены только для II и IV групп (пациенты с патоспермией). Уровень светосуммы в группах с бесплодием и нормоспермией (I и III) также превышал норму (>2 раза), но различия не были достоверны. При мужском бесплодии происходит увеличение интенсивности процессов СРО в яэкуляте за счет повышенной генерации АФК, причем в случаях с патозоспермией отмечались более значимые изменения. Антиокислительные свойства спермоплазмы оценивали в % от величины угнетения свечения модельной системы, при добавлении к последней 0,1 мл спермоплазмы. Типичные примеры записи представлены на рис. 2.

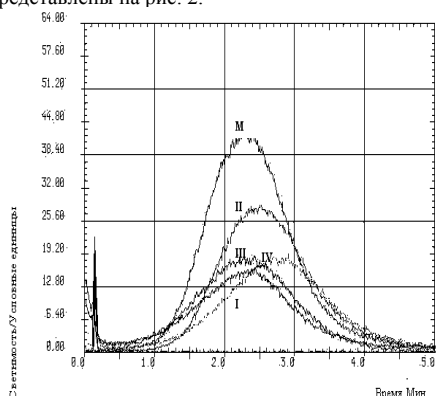


Рис. 2. Запись хемилюминесценции модельной системы, генерирующей АФК (кривая М), и модельной системы, генерирующей АФК, с добавлением 0,1мл спермоплазмы пациентов I, II, III, IV групп (кривая I-IV)

При анализе полученных данных получены статистически достоверные различия между группами. Обращает на себя внимание факт выявления низкой антиокислительной активности во 2-й группе наблюдения (группа с патозоспермией в регионе с неблагоприятной экологической обстановкой), причем наибольшая разница получена с группой III, куда были включены пациенты с нормозоспермией, проживающие в относительно благополучных по экологической обстановке районах. Также получены достоверные различия между I и III группами. Данные различия свидетельствуют о том, что при идиопатической форме патозоспермии в регионе с повышенным риском экзогенного воздействия токсических факторов наблюдается снижение защитных свойств спермоплазмы в виде снижения уровня суммарной антиокислительной активности. Данные представлены в табл. 4.

Таблица 4

Суммарная антиокислительная активность спермоплазмы исследуемых групп в модельной системе, генерирующей АФК

	Группы обследованных			
	I группа	II группа	III группа	IV группа
% угнетения модельной системы	31,4±1,69*	29,1±1,96	38,3±2,43**	35,3±2,0***

Примечание: * - p<0,05 в сравнении с III группой; ** - p<0,01 в сравнении со II группой; *** - p<0,05 в сравнении со II группой

Полученные данные хорошо иллюстрирует рис. 3, на котором представлена разница между продукцией АФК (показателем

светосуммы) и антиокислительной активностью (% угнетения модельной системы, генерирующей АФК).

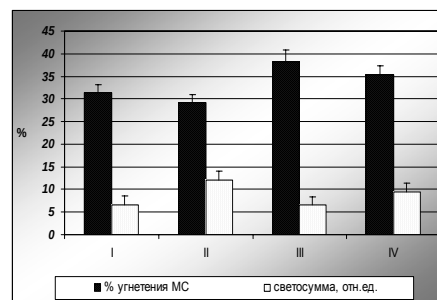


Рис. 3. Показатели СРО в группах наблюдения

При сопоставлении данных, полученных при исследовании люминолзависимой хемилюминесценции и Fe²⁺-индуцированной хемилюминесценции в группах наблюдения, особенно обращает на себя внимание тот факт, что во второй группе уровень светосуммы в исследуемых образцах спермы имел наивысшее значение при уменьшении угнетения свечения модельной системы, генерирующей АФК. При этом снижение уровня антиокислительной активности спермоплазмы у данных пациентов было более выражено (статистически достоверные различия в группах сравнения). Таким образом, у пациентов с бесплодием (жителей районов с неблагоприятной экологической обстановкой) наблюдается нарушение равновесия процессов СРО, что проявляется в виде падения уровня суммарной антиокислительной активности спермоплазмы и повышенного образования АФК морфологически или функционально неполноценными сперматозоидами, которое сочетается с развитием идиопатической патозоспермии.

Выводы. Подводя итоги, можно констатировать, что совокупность собственных и литературных данных позволяет сформулировать гипотезу о ведущей роли активации свободнорадикальных процессов и дисбаланса про- и антиоксидантных систем в мужских репродуктивных органах в патогенезе наблюдаемого практически повсеместно в промышленно развитых странах явления, получившего название «кризис сперматозоида».

Литература

1. Кирпатовский И.Д. Клиническая андрология как новая медицинская дисциплина. Актовая речь. – М.: РУДН, – 1995.
2. Урология по Дональду Смит/ Под ред. Э.Танахо, Дж.Маканинча: Пер. с англ. – М.: Практика, – 2005.
3. Healy D.L. et al. // Lancet. – 1994. – Vol. 343. – P. 1539.
4. Никитин А.И. Вредные факторы среды и репродуктивная система человека (ответственность перед будущими поколениями). – СПб.: ЭЛБИ-СПб. – 2005.
5. Бурденко Л.Г. Репродуктивное здоровье женщин, проживающих в экологически неблагоприятном районе: Дис...канд. мед. наук. – М., 1996.
6. Галимов И.И. и др. // Пробл. репрод. – 2005. – №2. – С. 19.
7. Swan S. et al. // Environ Health Perspect. – 2003. – Vol. 111. – P. 1478–1484.
8. Schecter A. et al. // Am J Ind Med. – 1996. – Vol.30. – P. 647.
9. Aitken R., Fisher H. // BioEssays. – 1994. – Vol.16. – P. 259.
10. De Lamirande E., Gagnon C. // Int. J. Androl. – 1993. – Vol. 16, № 1. – P. 21–25.
11. Griveau J.F., Le Lannou D. // International J. of Androl. – 1997. – Vol. 20. – P. 61–69.
12. Iwasaki A., Gagnon C. // Fertil Steril. – 1992. – Vol.2. – P. 409.

THE USE OF SCIENTIFIC TECHNOLOGIES FOR ESTIMATION OF MAN'S REPRODUCTIVE FUNCTION

D.S. GROMENKO

Summary

The check of a hypothesis about possible participation of the free radical oxidation to infringement of man's reproductive function on a background of intoxications of chlor-organic pollutants is carried out. Increased ability to generation of reactive oxygen species by morphologically defective spermatozoa has been revealed. There is a decrease of total antioxidizing activity of testis.

Key words: man's reproductive function