

Imunomodulatorni tretman infertilnih muskaraca sa povisenim vrednostima anti-spermatozoidnih antitela

¹Bubanovic I., ²Najman S., ³Kojic S.

"Medika Centar" - Nis¹
Institut za biologiju, Medicinski Fakultet - Nis²
Ginekološko-akusersko odeljenje - Zdravstveni Centar, Paracin³

REZIME

Autoimunska oboljenja muskog genitalnog trakta udružena sa anti-spermatozoidnim antitelima (ASA) i njihova povezanost sa infertilnošću su predmet intenzivnog proučavanja. Iako ne postoje sigurni dokazi da ASA mogu predstavljati uzrok infertiliteta, pouzdano se zna da su zapaljenjska oboljenja testisa, povrede, hirurske intervencije kao i oboljenja druge etiologije, udružena sa autoimunskim orhitisom i porastom titra ASA u serumu i semenoj tečnosti. U nasoj studiji, serum 35 muskaraca iz neplodnih brakova je testiran (ELIZA testom) na serumski nivo ASA pre i posle tretmana 1 α ,25-dihidroksi-vitaminom-D3 (VD3) i/ili deksametazonom. Osamnaest pacijenata je tretirano VD3 i deksametazonom (VD3D), devet pacijenata je tretirano samo deksametazonom, dok je osam pacijenata sacinjavalu kontrolnu grupu. Tretman VD3 i deksametazonom je trajao 30 dana, a sermski nivo ASA je testiran pre pocetka terapije i nakon 90 dana. Osnovni parametri spermograma su takodje verifikovani pre pocetka terapije i nakon 90 dana. Serumski nivo ASA netretirane grupe pacijenata (312,6 U/ml), grupe tretirane samo deksametazonom (288,0 U/ml) i grupe pacijenata tretirane VD3D kombinacijom (123,6 U/ml) pokazao je statisticki znacajnu razliku. Serumski nivo ASA posle VD3D tretmana je znacajno nizi u odnosu na nivo ASA pre tretmana, sto nije slucaj sa ostale dve grupe pacijenata. Tretman VD3 i deksametazonom verovatno ima supresivni efekat u odnosu na produkciju antitela, ekspresiju ko-stimulatornih molekula, komunikaciju imunskih celija i profil citokinske mreze na sistemskom i mikrosredinskom nivou. Da li je snizavanje serumske koncentracije ASA praceno snizenjem koncentracije ASA u semenoj tečnosti kao i konacni efekti terapije na fertilitnost pacijenata sa povisenim ASA, za sada nisu poznati.

UVOD

Etiopatologija autoimunske reakcije na spermatozoide je uglavnom povezana sa cinjenicom da se ove celije prvi put pojavljuju za vreme puberteta, dugo nakon perinatalnog perioda kada se odvija mehanizam uspostavljanja specifične imunske tolerancije na "svoje" celije i tkiva (1,2). I pored toga, postoji nekoliko mehanizama koji ucestvuju u "zastiti" testikularnog epitela od autoimunske agresije. Krv-testis barijera, ciju anatomsku osnovu cine Sertolijeve celije, je jedan od najznacajnijih faktora ovog

vida imunske tolerancije, kao i ogranicena limfna drenaza testisa (3). Specificna citokinska mreza testisa, slaba ekspresija ko-stimulatornih molekula na imunskim celijama testisa i njihova imunosupresivna aktivnost, predstavljaju jos nekoliko faktora prevencije autoimunske reakcije usmerene prema testikularnom epitelu. U slucajevima narusavanja krv-testis barijere (povrede i hirurske intervencije), promene citokinske mreze i aktivacije imunskih celija testisa (zapaljenja testisa ili autoimunska oboljenja drugih organa) dolazi do razvijanja autoimunske reakcije, koja se izmedju ostalog manifestuje i produkcijom ASA. Kao posledica autoimuskog oboljenja testisa i ASA moze se razviti sekundarni infertilitet muskaraca (4,5,6,7,8).

ASA mogu uticati na proces oplodjenja preko nekoliko mehanizama kao sto su imobilizacija i aglutinacija spermatozoida, interakcija sa mukusom zenskog genitalnog trakta i otezavanje transporta spermatozoida. Osim toga, ASA mogu onemoguciti receptorsku interakciju spermatozoida sa zonom pelucidom i oocitom, sto se manifestuje izostankom akrozomalne reakcije, penetracije spermatozoida u jajnu celiju i oplodjenja (9,10).

U literaturi postoji veliki broj podataka o imunosupresivnim efektima deksametazona i VD3. Imunomodulatorni efekti ova dva preparata su visestruki i odnose se na supresiju ekspresije ko-stimulatornih molekula, inhibiciju aktivnosti antigen-prezentujucih i efektnih celija, stimulaciju sekrecije imunosupresornih citokina i inhibiciju produkcije imunoglobulina (11,12). Iz ovih razloga, smatramo da bi terapija VD3 i deksametazonom mogla biti od koristi infertilnim pacijentima sa povisenim vrednostima ASA i slabim bazicnim parametrima spermograma.

MATERIJAL I METODE

Studija je obuhvatala 35 muskaraca iz infertilnih brakova sa serumskim nivoom ASA vecim od 75 U/ml i osnovnim parametrima spermograma koji pokazuju slabije vrednosti u odnosu na normalne. Prosecna starost pacijenata je bila $35,3 \pm 6,9$ godina. Kao moguci etiopatogenetski faktor steriliteta i povecanih vrednosti ASA kod 11,43% pacijenata utvrđena je istorija bilateralnog ili unilateralnog kriptorhizama, kod 2,86% pacijenata hirurska intervencija na testisima, 11,43% orhitis, 2,86% povrede jednog ili oba testisa, 25,71% varikocela, 11,43% epididimitisa, dok kod 34,29% pacijenata nije bilo moguće utvrditi moguci etiopatogenetski faktor. Bazicne vrednosti spermograma i serumske vrednosti ASA pre pocetka terapije i nakon 90 prikazani su na *tabeli 1*.

Tretman pacijenata deksametazonom i vitaminom D3 (VD3D grupa)

Osamnaest pacijenata je tretirano VD3D u trajanju od 30 dana. VD3 je administriran oralno tokom 30 dana (0,025 mcg/kg telesne mase). Tretman deksametazonom dozama od 55 mcg/kg trajao je 20 dana, da bi se u narednih 10 dana dnevna doza deksametazona postepeno smanjivala do potpunog ukidanja.

Tretman pacijenata deksametazonom

Devet pacijenata je tretirano samo deksametazonom u trajanju od 30 dana po istom protokolu kao pacijenti VD3D grupe.

Netretirani pacijenti (kontrola)

Osam pacijenata nije tretirano tokom 90 dana.

Spermogram

Ispitivanje spermograma je sprovedeno prema uputstvu NJHO (13). Normalne vrednosti deskriptivnih parametara spermograma su takodje uskladjene sa uputsvom NJHO (1992), koje su generalno uzete kao referentne vrednosti. Spermogram je kod svih

pacijenata ispitivan pre pocetka terapije i nakon 90 dana. Vreme apstinencije pre davanja uzorka iznosilo je 3-5 dana.

ELIZA test

Serumska koncentracija ASA je merena na **HUMAN ELISA READER** aparatu pomocu **Immuno-Biological Laboratories (IBL)** Sperm Antibody Enzyme Immunoassay Kit. Test je baziran na ne-kompetitivnoj ELIZA metodi. Stripovi su inkubirani sa razblazenim serumom u odnosu (1:50) i nakon nekoliko ispiranja ponovo inkubirani u prisustvu anti-antitela Cperoxidase conjugated anti-human-Ig (IgA, IgG and IgM)S. Posle inkubacije, finalnog ispiranja, dodavanja substrata i ponovnog inkubiranja, merena je absorbanca razvijene boje u stripovima. Po preporuci proizvođača kita (**IBL-Germany**) rezultat koncentracije ASA > 75 UI je prihvatlan za pozitivan.

Statisticka analiza

Svi parametri su statisticki obradjeni. Vrednost P manja od 0,05 je prihvatana kao statisticki znacajna. Sve vrednosti su testirane t-testom, a izracunavanja su sprovedena pomocu MS Excel ® 2002.

REZULTATI

Tabela 1 prikazuje bazicne parametre spermograma sve tri grupe pacijenata pre i posle terapije. Poredeci rezultate sve tri grupe pacijenata ne postoje statisticki znacajne razlike u odnosu na parametre spermograma kao sto su zapremina ejakulata, koncentracija spermatozoida i procenat spermatozoida sa normalnom morfologijom ($P>0,05$). Osim toga ne postoji statisticki znacajna razlika u pokretnosti i vitalnosti spermatozoida pre i posle terapije u grupi pacijenata tretiranih samo deksametazonom i kontrolnoj grupi ($R>0,05$). Procenat pokretnih ($R=0,021$) i vitalnih ($R<0,01$) spermatozoida u VD3D grupi je znacajno veci posle tretman u odnosu na vrednosti pre tretmana. U kontrolnoj ($R=0,54$) i deksametazonom tretiranoj ($R=0,21$) grupi pacijenata nema statisticki znacajnih promena u serumskoj koncentraciji ASA u odnosu na prvi i drugi analizirani uzorak (posle 90 dana). U VD3D grupi pacijenata nivo serumske koncentracije ASA je znacajno nizi u drugom uzorku (posle 90 dana) nego pre pocetka tretmana ($R<0,01$).

Tabela 1. Vrednosti bazicnih parametri spermograma i serumska koncentracija ASA pre terapije* i posle 90 dana**.

		VD3D n=18	Deksamethason n=9	kontrola n=8
Zapremi na (ml)	*	2.52±0.7***	2.63±0.7	2.85±0.9
	**	2.61±0.7	2.69±0.5	2.95±0.4
Koncentracija spermatozoida (10 ⁶ /ml)	*	17.0±9.4	16.0±11.4	17.4±9.0
	**	18.8±8.6	17.0±9.2	19.2±7.0
Pokretni (% , posle 60 mi n.)	*	34.2±16.8	34.1±4.9	33.8±12.9
	**	45.2±14.9	35.3±6.6	34.5±8.3
Vitalni (% , posle 60 mi n.)	*	41.2±7.55	37.4±8.7	38.5±6.2
	**	51.6±9.7	39.1±9.5	36.0±8.2
Sa normalnom morfologijom (%)	*	61.0±15.2	64.2±11.3	62.7±6.0
	**	62.0±12.0	61.8±12.9	60.8±7.7
Koncentracija ASA (U/ml)	*	311.2±77.5	321.9±87.2	317.2±80.0
	**	123.6±39.8	288.0±82.8	312.6±90.9

*** Vrednost oznacava ± SD

DISKUSIJA

Uzimajući u obzir značaj krv-testis barijere i ostale mikrosredinske imunomodulatorne mehanizme koji su značajni za imunsku toleranciju prema spermaticnom epitelu, postoji mogućnost da svako narušavanje integriteta ove barijere i ostalih imunomodulatornih mehanizama može dovesti do autoimunskog orhita, ometanja spermatogeneze i infertiliteta (1,5,6). Mehanizmi koji doprinose razvijanju autoimunskog orhitisa i pojavi ASA su uglavnom sadržani u akceleraciji Th1 tipa imunskog odgovora, povećanoj produkciji i sekreciji pro-inflamatornih citokina kao što su IL-1, IFN- γ i TNF- α , kao i smanjena produkcija anti-inflamatornih i imunomodulatornih Th2 citokina kao što su IL-10 i TGF- β . Osim toga, pojačana ekspresija ko-stimulatornih molekula i nishodna regulacija osetljivosti imunskih celija na apoptoticke signale predstavljaju još jednu od karakteristika autoimunskog orhita (1,4,5,6).

Nasa studija, pokazala je da su povišene vrednosti serumskih ASA, slabi parametri spermograma i infertilitet najčešće udruženi sa postojanjem kriptorhizma, orhitisa, povreda testisa, hirurških intervencija, varikokele i epididimitisa. Samo u manjem broju slučajeva nije postojao jasan etiopatogenetski razlog za postojanje ASA, iako treba znati da ASA mogu biti rezultat i homoseksualnih aktivnosti (14).

Imunosupresivni efekti deksametazona su višestruki. Deksametazon suprimira aktivnost antigen-prezentujućih celija i dendritičnih celija, uglavnom mehanizmima inhibicije ekspresije MHC i ko-stimulatornih molekula, kao i produkciju proinflamatornih citokina. U isto vreme, deksametazon pokazuje snažne inhibitorne efekte na produkciju antitela kao i proliferaciju i aktivnost B limfocita. I pored toga, u našoj studiji efekti deksametazona nisu pokazali značajne efekte u pogledu sniženja nivoa ASA. Curtis i sar. (16) navode slične rezultate. Naime, u njihovoj studiji deksametazon nije doveo do značajnog sniženja spermatozoid-aglutinirajućih antitela u serumu vazektomisanih osoba. Shulman i sar. (17) navode da tretman metilprednizolonom može povećati incidencu trudnoća kod infertilnih parova, iako se nivo serumskih ASA nije značajno razlikovao pre i posle tretmana metilprednizolonom.

VD3 inhibise produkciju citokina kao što su IL-1 α , IL-6 i TNF- α , od strane stimulisanih i nestimulisanih monocita. Proliferacija T limfocita i sekrecija IL-2 i IFN- γ je takođe suprimirana u prisustvu VD3 (18). Iako VD3 nema direktne inhibitorne efekte na B limfocite i produkciju antitela, supresija pomoćničke funkcije T limfocita mogla bi indirektno doprineti inhibiciji produkcije antitela pod uticajem VD3 (19). Ovaj citokinima i hormonima sličan vitamin inhibise sekreciju IFN- γ od strane Th1 limfocita ali ne i sekreciju IL-4 i IL-10 od strane Th2 limfocita (18,19). Ovi podaci opravdavaju terapijsku upotrebu VD3 u svim autoimunskim oboljenjima koja su posredovana povećanom aktivnošću Th1 tipa imunskog odgovora (20). Osim toga, VD3 inhibise sposobnost antigenprezentujućih celija da aktiviraju T limfocite, kao i njihovu međusobnu komunikaciju. Konacni efekti VD3 na proces maturacije antigenprezentujućih i dendritičnih celija je veoma sličan efektima IL-10, citokina čiji se snažni imunosupresivni efekti ocitavaju kao inhibicija sekrecije IL-12 i inhibicija ekspresija ko-stimulatornih molekula (18,21).

Zbirni efekti VD3 i deksametazona bi mogli biti dobro objašnjenje za značajnu razliku nivoa ASA pre i posle terapije kod pacijenata tretiranih VD3D kombinacijom. Osim toga, manji nivo ASA u VD3D grupi pacijenata mogao bi doprineti većem procentu vitalnih i pokretnih spermatozoida.

Danas postoji nekoliko tehnika obrade sperme u cilju dobijanja ASA-free spermatozoida. Ove tehnike uglavnom podrazumevaju proces ispiranja spermatozoida u različitim medijumima i uglavnom su namenjene pacijentima u postupku pripreme za IUI,

IVF ili ICSI. U tom smislu priprema pacijenata sa visokim nivoom ASA u serumu za neku od procedura asistirane reprodukcije mogao bi podrazumevati pretretman deksametazonom i VD3.

Znacajan stepen senzibilizacije na spermatozoide sa visokim serumskim nivoom ASA mogu pokazivati i zene. Kompromitacija procesa oplodjenja posredovana ASA zenskih osoba moze da bude u istoj meri znacajna kao i u slucaju ASA koja vode poreklo od muskaraca. U tom smislu, nasa prva iskustva pokazuju podjednako dobre efekte tretmana zena VD3D kombinacijom kao i kod muskaraca.

ZAKLJUCAK

Infertilni muskarci sa slabim parametrima spermograma i visokim nivoom ASA mogli bi biti tretirani VD3 i deksametazonom sa velikom sansom za poboljsanje nekih parametara spermograma i snizenje nivoa ASA. Uzimajuci u obzir podatke iz literature koji ukazuju na mogucnost da bi ASA mogla biti jedan od faktora koji znacajno umanjuju efikasnost razlicitih procedura asistirane reprodukcije, nasa prva iskustva ukazuju na mogucnost da bi farmakoterapijski pristup lecenja ovog problema mogao doprineti povecanju efikasnosti procedura asistirane reprodukcije. Naravno, farmakoterapijsko lecenje ASA ne isklucuje klasicne (uglavnom mehanicke) metode dobijanja ASA-free spermatozoida. Nasa pretpostavka je da bi kombinacija oba pristupa dala najbolje rezultate.

LITERATURA

1. Naz RK, Menge RC, Antisperm antibodies: origin, regulation and sperm reactivity in human infertility. *Fertil Steril* 1994;61/6:1001-1013.
2. Koide SS, Wang L, Kamada M. Antisperm antibodies associated with infertility: properties and encoding genes of target antigens. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;224-229.
3. Setchell BP, Voglmyer JK, Waites GM. A blood-testis barrier restricting passage from blood rete testis fluid but not into lymph. *J Physiol* 1969;200/1:73-85.
4. Sainio-Pollanen S, Saari T, Simell O, Pollanen P. CD28-CD80/CD86 interactions in testicular immunoregulation. *J Reprod Immunol* 1996;31/3:145-163.
5. McDonald SW. Cellular responses to vasectomy. *Int Rev Cytol* 2000;199:295-339
6. Sakamoto Y, Matsumoto T, Mizunoe Y, Haraoka M, Sakamoto M, Kumazawa J. Testicular injury induces cell-mediated autoimmune response to testis. *J Urol* 1995;153/4:1316-1320.
7. Almagor M, Dan-Goor M, Hovav Y, Kafka I. Antisperm antibodies in men with psychogenic anejaculation. *Arch Androl* 1998;41/1:1-4.
8. Shibahara H, Tsunoda T, Taneichi A, Hirano Y, Ohno A, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. Diversity of antisperm antibodies bound to sperm surface in male immunological infertility. *Am J Reprod Immunol* 2002;47/3:146-150.
9. Marshburn PB, Kutteh WH, The role of antisperm antibodies in infertility. *Fertil Steril* 1994;61/5;799-811.
10. Lombardo F, Gandini L, Dondero F, Lenzi A. Immunology and immunopathology of the male genital tract – antisperm immunity in natural and assisted reproduction. *Hum Reprod Update* 2001;7:450-456
11. Slack J, Risdahl JM, Valberg SJ, Murphy MJ, Schram BR, Lunn DP. Effects of dexamethasone on development of immunoglobulin G subclass responses following vaccination of horses. *Am J Vet Res* 2000;61/12:1530-1533.
12. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 1995;125/6:1704-1708.
13. WHO manual, 3rd edition, 1992.

14. Wolff H, Schill WB. Antisperm antibodies in infertile and homosexual men: relationship to serologic and clinical findings. *Fertil Steril* 1985; 44:673–677.
15. Snyder NK, Kramer CM, Dooley RK, Holsapple MP. Characterization of protein phosphorylation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in murine lymphocytes: indirect evidence for a role in the suppression of humoral immunity. *Drug Chem Toxicol* 1993;16/2:135-163.
16. Curtis GL, Kahl VA, Ryan WL. Serum sperm agglutinating antibody formation in vasectomized men treated with dexamethasone. *Andrologia* 1987;19/6:597-601.
17. Shulman JF, Shulman S. Methylprednisolone treatment of immunologic infertility in male. *Fertil Steril* 1982;38/5:591-599.
18. Muller K, Bendtzen K. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 as a natural regulator of human immune functions. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996;1/1:68-71
19. Muller K, Heilmann C, Poulsen LK, Barington T, Bendtzen K. The role of monocytes and T cells in 1,25-dihydroxyvitamin D3 mediated inhibition of B cell function in vitro. *Immunopharmacology* 1991;21/2:121-128
20. Bubanovic I. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 As New Immunotherapy In Treatment of Recurrent Spontaneous Abortion. Accepted paper, *Medical Hypotheses* 2003, In press.
21. Pichler J., Gerstmayr M., Szepfalusi Z., Urbanek R., Peterlik M., Willheim M. 1 alpha,25(OH)2D3 inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatr Res* 2002;52/1:12-18.