

LÖKOSPERMİLİ VE İDİYO PATİK OLİGOASTENOSPERMİK İNFERTİL HASTALARDA SİTOKİNLERİN ROLÜ

THE ROLE OF CYTOKINES IN INFERTILE PATIENTS WITH LEUCOSPERMIA AND IDIOPATIC OLIGOASTHENOSPERMIA

Rahmi ONUR, Mehmet Nuri BODAKÇI, Fatih FIRDOLAŞ, İrfan ORHAN, Ahmet GÖDEKMERDAN, Aslan ARDIÇOĞLU

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress has previously been shown to be related to increase in the levels of proinflammatory cytokines in seminal plasma of infertile patients. All of the measured cytokines seem to be produced locally as well as by white blood cells (WBC) and that, due to the presence of higher numbers of WBC, it was suggested that accessory gland infection may exert a deleterious effect on sperm quality through the production of ROS and/or of particular cytokines. In this study, seminal plasma cytokine levels were investigated in infertile patients with or without leucospermia and in control cases that have a normal semen analysis. Our aim was to determine the possible role of infection and inflammation in male infertility.

Materials and Methods: Three groups of patients were examined in our study. First group consisted of 10 patients who had oligoasthenospermia (OAS) with leukocytospermia, whereas in the second group we evaluated 10 patients who had OAS without leucospermia (isolated oligoasthenospermia) and negative mixed antiglobulin test (MAR). Finally, ten volunteer men who had normal fertility evaluations and at least one child (control group) constituted the control group and were included into the study. After a 3 to 5 days of abstinence period, ejaculate was obtained from all patients and the samples were left at the room temperature for 30 minutes. The samples were then centrifuged at 4000 rpm period for 10 minutes. Seminal plasma interleukin-2 (IL-2), IL-4 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels were measured using ELISA in supernatant seminal plasma samples.

Results: Measurement of seminal plasma cytokine levels in study and control groups revealed that the level of IL-2 was significantly increased in infertile patients without leucospermia (isolated oligoasthenospermia) than the other two groups. Seminal plasma cytokine measurement in patients with OAS plus leucospermia revealed statistically significant increase in the level of TNF- α when compared to the control and isolated OAS groups. Interleukin-4 levels did not show statistically significant difference between OAS and OAS plus leucospermia groups ($p>0.05$).

Conclusion: Our data revealed that infection and increased cytokine levels may have roles in male infertility. The measurement of several cytokines in semen may provide clinically useful information for the diagnosis of male accessory gland infection, as well as in the absence of WBC where it can provide information about certain mechanisms of male reproductive function and dysfunction. However, to determine the exact role of cytokines in male genital system and to develop different methods for alternative diagnosis and treatment, there is still need for further studies.

Key words: Infertility, seminal plasma, cytokine, leucospermia

ÖZET

Erkek infertilitesinde rol oynayan nedenlerden biri de genital sistem enflamasyonudur. Enflamasyonda etkin olan sitokinlerin infertilite etiolojisindeki yerini belirlemek için, infertilite nedeni ile incelenen lökospemili hastalarda, lökospemisi olmayan infertil olgularda ve kontrol grubunda, seminal plazma sitokin düzeylerinin araştırılarak karşılaştırılması amaçlandı.

İnfertilite nedeni ile kliniğimize başvuran ve rutin değerlendirmelerinde oligoastenospermi (OAS) saptanan ve aynı zamanda lökospemisi olan 10 hasta, OAS'si olan ancak lökospemisi saptanmayan, aynı zamanda Mikst Antiglobulin Reaksiyon (MAR) testi negatif olan 10 hasta ile fertilité değerlendirilmeleri normal olan ve en az bir çocuğu olan 10 gönüllü (kontrol grubu) çalışmaya alındı. Hastalarda seminal plazma interlökin (IL) -2, IL-4 ve tümör nekrotizan faktör (TNF) -alfa düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Her üç gruptaki seminal plazma sitokin düzeyleri karşılaştırmasında; izole oligoastenospermi olan infertil hastalarda IL-2 düzeylerinin, lökospemili oligoastenospermili olgularda ise TNF-alfa düzeylerinin diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). Lökospemili infertil ve OAS'li infertil gruplar arasında IL-4 düzeyleri açısından anlamlı farklılık belirlenmedi($p>0.05$).

Dergiye Geliş Tarihi: 04.01.2005

Yayına Kabul Tarihi: 03.05.2005

Erkek infertilitesinde enfeksiyon ve artmış sitokinler, etiyolojik faktör olarak saptanabilirler. Ancak, erkek genital sisteminde ve testiküler sperm fizyolojisinde sitokinlerin gerçek rollerinin daha geniş serili, kontrollü ve randomize çalışmalarla tam olarak ortaya konulması, tanı ve tedavide farklı seçenekleri de beraberinde getirecektir.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, seminal plazma, sitokin, lökosperti

GİRİŞ

İnfertil çiftlerin yaklaşık %20-50'sinde erkek faktörün infertilitede etkin olabileceği bildirilmektedir¹. Aynı zamanda infertil çiftlerin yaklaşık % 25'inde infertiliteyi açıklayacak nedene dönük bir patoloji saptanamamaktadır. Özellikle idiyopatik infertil erkeklerde, erkek genital sistemine ait sub-klinik enfeksiyonlar veya enflamatuar olaylar infertilite etiyopatogenezinde rol oynayabilecek nedenlerdir^{2,3}.

Genital sistemdeki semptomatik veya subklinik enfeksiyonlar semende lökosit varlığı ile değerlendirilmekle birlikte, özellikle bu enfeksiyonlarda sitokinlerin etkinliği net olarak bilinmemektedir⁴.

Enfeksiyon sonucu ortaya çıkacak lökospertide, lökosit ve lökosit ürünlerinin sperm üzerine toksik etki yaparak fertilizasyonu olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır³. Enfeksiyon sonucu gelişecek infertilitede, lökosit ürünleri yanında çeşitli sitokinlerin de etkin rol oynayabileceği bildirilmektedir^{5,6}. Yine bir grup idiyopatik infertil hastada da sitokinlerin infertilite etiyolojisinde etkin olabileceği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, infertilite nedeniyle kliniğimizde değerlendirilen lökospertili ve idiyopatik infertil hastalarda, seminal plazma sitokin düzeylerinin erkek infertilitesindeki rolünün araştırılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

İnfertilite nedeni ile kliniğimize başvuran ve rutin değerlendirmelerinde (semen analizi, hormon parametreleri, v.b.) oligoastenospermi (OAS) (sperm sayısının ml'de 20 milyondan düşük olması ve ileri hareketli sperm oranının %50'den az olması) saptanan ve aynı zamanda lökospertisi olan 10 hasta, OAS'si olan ancak lökosperti saptanmayan ve Mikst Antiglöbulin Reaksiyon (MAR) testi negatif olan 10 hasta ile fertilite değerlendirmeleri normal olan 10 gönüllü (kontrol grubu) çalışmaya alındı. Tüm hastalardan 48-72 saatlik cinsel perhiz sonrası masturbasyon yolu ile elde edilen semen, steril tüplere konularak 37°C'de 30 dakika bekletildi ve Dünya Sağlık Örgütü'nce (WHO) tanımlanan kriterlere göre semen analizi gerçekleştirildi⁷.

Semen analizinde lökospertinin tayini

Bilinen semen analiz yöntemlerinde, immatür germ hücreleri ve lökositler benzer morfolojik yapılar gösterdiklerinden ayırt edilmeleri mümkün olmayabilmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda semende lökosit varlığını saptamak için, peroksidaz boyama yöntemi kullanıldı. (Lökosit granüllerindeki peroksidaz enzimi, kromojenik maddeleri oksidasyona uğratarak renkli bileşikler oluşmasına neden olur). Çalışmamızda lam üzerinde bir damla erimiş semen ve özel çözelti (FertiPro NV, Beernem, Belgium) en az 1 dakika süre ile karıştırıldı ve 10 dk'lık inkübasyon sonrası mikroskop ile incelendi. Sarıdan kahverengiye kadar olan hücresel boyanmalar; peroksidaz pozitif lökosit varlığını, pembe boyanmalar ise diğer hücreleri (immatür germ hücreleri) göstermekte idi. Semen analizinde her ml'de 1×10^6 lökosit saptanması lökosperti olarak değerlendirildi.

Seminal plazma sitokin düzeylerinin ölçülmesi

Hastalardan elde edilen ejakülat örnekleri oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra 4000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant seminal plazma örnekleri alınarak, çalışılmaya kadar -80°C'de bekletildi. Bu örneklerde interleukin-2 (IL-2), IL-4 ve tümör nekrotizan faktör alfa (TNF- α) sitokinleri Biosource (Biosource International Human Immunoassay kits, CA, USA) kitleri kullanılarak Elx 800 (Bio Tek Instruments, Inc. USA) cihazında, ELISA yöntemi kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel analizlerde Mann Whitney-U ve Student's t testleri kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan lökospertili infertil, izole oligoastenospermi ve kontrol grubundaki hastaların yaş ortalaması sırası ile 32.7 ± 5.2 , 32.5 ± 2.4 ve 31.4 ± 3.1 idi. Her üç grup arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p > 0.05$). İnfertil hastaların hormon parametreleri açısından karşılaştırılmalarında da her iki oligoastenospermi grup arasında anlamlı farklılık belirlenmedi. Aynı şekilde oligoastenospermi gruplar arasında semen analiz sonuçları açısından da farklılık yoktu (Tablo 1).

Her üç grup, seminal plazma IL-2 düzeyi açısından karşılaştırıldığında, kontrol grubu ve lökospermili, oligoastenospermik grup arasında anlamlı fark saptanmadı. Ancak, idiyopatik oligoastenospermik grupta IL-2 düzeyi her iki gruptan da istatistiksel olarak yüksek seviyede bulundu ($p<0.05$). Seminal plazma TNF- α düzeyi açısından, kontrol grubu ve idiyopatik oligoastenospermik gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı halde, lökospermili oligoastenospermik hastalarda her iki gruba göre istatistiksel olarak yüksek oranlarda belirlendi ($p<0.05$). Seminal plazma IL-4 düzeyleri açısından ise her üç grup arasında istatistiksel bir fark saptanmadı ($p<0.05$).

Lökospermi saptanan oligoastenospermik hastalar, tek başına oligoastenospermisi olan olgular ve kontrol grubuna ait semen analiz sonuçları, hormon profilleri ve seminal plazma IL-2, IL-4 ve TNF- α düzeyleri Tablo 1’de özetlenmiştir.

TARTIŞMA

Erkek infertilite etiolojisindeki nedenlerden biri de genital sistem enfeksiyonlarıdır⁸. Dünya Sağlık Örgütü’nce (WHO) yapılan tanımlamada, seminal plazmada 1×10^6 /mL’den daha fazla lökosit saptanması patolojik olarak kabul edilmektedir⁷. Ancak, basit mikroskopik inceleme ile semendeki immatür spermatogenetik hücrelerle lökositlerin ayırt edilmesi oldukça zordur. Bu nedenle, morfolojik olarak benzer özellikte olan bu iki yuvarlak-hücre grubunu ayırt etmede farklı tekniklerin kul-

lanılması önerilmiştir⁹. Bu tanımlamanın esas alındığı, Wolf ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, piyosperminin bozulmuş semen parametrelerine yol açtığını saptamışlardır¹⁰. Enfeksiyonun sperm fonksiyonlarındaki bozulmada ve infertilite parametrelerine olan olumsuz etkilerinde, lökositlerce salgılanan sitokinlerin etkin olabileceği bildirilmiştir¹¹.

Sitokinler, konağın cevabının bir parçası olan, inflamatuvar hücrelerden açığa çıkan potent polipeptidlerdir. Özellikle immüno-enflamatuvar olayların başlattığı birçok fizyolojik ve patolojik süreçte düzenleyici moleküller olarak önemli rol oynarlar^{12,13}. Sanocka ve arkadaşları, genital sistem enfeksiyonu olan 39 hasta ve 22 sağlıklı erkeği inceledikleri çalışmalarında, pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-1 beta, IL-6, IL-8 ve TNF-alfa’da artış saptamışlardır. Sitokinlerde ortaya çıkan bu artışın serbest oksijen radikallerinde yükselmeye, antioksidan düzeylerinde ise azalmaya yol açarak semen dansitesini, motiliteyi ve sperm morfolojisini olumsuz yönde etkilediklerini bildirmişlerdir¹¹. Aynı şekilde, Shimoya ve arkadaşları da, lökospermili infertil hastalarda seminal plazmada artmış IL-8 düzeyleri saptamış ve bu hastalarda infertilite patofizyolojisinde sitokinlerin rolü olabileceğini bildirmişlerdir¹⁴. Çalışmamızda, pro-inflamatuvar bir sitokin olan TNF-alfa ile T-hücre kökenli IL-2 ve IL-4’ün erkek infertilitesindeki yeri araştırıldı.

	Kontrol (n=10)	OAS+Lökospermi (n=10)	OAS (n=10)
Sayı ($\times 10^6$ /ml)	96 \pm 19*	9.7 \pm 6	9 \pm 7
Motilite (% , ilk 1 saatte)	72 \pm 4*	37 \pm 13	32 \pm 17
Normal form	76 \pm 4	60 \pm 10	57 \pm 6
Hormon profili			
FSH (mIU/mL)	6.1 \pm 2	7.2 \pm 2	6.3 \pm 1
LH (mIU/mL)	5.4 \pm 1	5.2 \pm 1	5.2 \pm 1
Testosteron (ng/dL)	605 \pm 190	622 \pm 204	580 \pm 165
Prolaktin (ng/dL)	8 \pm 1	8.2 \pm 2	9.1 \pm 2
Sitokinler			
IL-2 (pg/mL)	14 \pm 4.7	14 \pm 3.3	36 \pm 6*
IL-4 (pg/mL)	8.3 \pm 1.8	7.7 \pm 1.2	7.9 \pm 1.3
TNF- α (pg/mL)	2.9 \pm 2.6	7.3 \pm 0.6*	2.8 \pm 0.6

Tablo 1. Çalışmaya alınan grupların spermogram, hormon profili ve seminal sitokin değerleri (OAS: Oligoastenospermi, IL: İnterlökin, TNF: Tümör nekrotizan faktör, *: $p<0.05$)

TNF-alfa; esas olarak monosit/makrofaj ve Kupffer hücrelerden salınan, direk antiviral etkili, immünmodülatör, sitotoksik ve multipl biyolojik özellikler gösteren bir sitokindir. TNF-alfa, özellikle yabancı antijenler yada enfeksiyon varlığında salgılanır ve inflamasyon ile hücrel immün cevapta önemli rol oynar^{15,16}. Lökospemili hastalarla, normal ve astenospemili olgular karşılaştırıldığında, lökospemili olgularda anlamlı oranda artmış TNF-alfa düzeyleri saptanacağı bildirilmiştir⁸. Aynı şekilde, Gruschwitz ve arkadaşları, seminal plazma TNF-alfa düzeyini genital sistem enfeksiyonu olan infertil hastalarda anlamlı olarak yüksek bulunduğunu saptamışlardır. Artmış sitokin düzeyinin de sperm motilitesini direkt veya indirekt yolla etkileyerek infertilitede rol oynayabileceği bildirilmiştir¹⁷. Çalışmamızda, lökospemili OAS'li olan olgularda kontrol grubuna oranla yüksek TNF-alfa düzeyleri saptandı (7.3 ± 0.6 pq/ml, 2.9 ± 2.6 pq/ml). Aynı şekilde tek başına OAS olan olgulara oranla da lökospemili grupta yüksek TNF-alfa düzeyleri mevcuttu.

IL-2; T hücresi büyüme faktörü olarak isimlendirilen glikoprotein yapısında bir sitokindir. Genellikle CD4+T hücreleri tarafından, daha az olarak da CD8+T hücrelerince üretilir. IL-2'nin temel etkisi lenfositler üzerinedir¹⁸. OAS'li infertil hasta grubunun incelendiği bir çalışmada, IL-2 düzeylerinin kontrol grubuna oranla arttığı ve bunun da sperm sayısı, motilite ve morfoloji ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir¹⁹. Matalliotakis ve ark., 90 infertil hastada IL-2'nin seminal plazmadaki oranını kontrol olgularına göre oldukça yüksek olarak saptamış ve bu sitokinin infertilite incelemelerinde potansiyel bir marker olabileceğini belirtmişlerdir²⁰. Çalışmamızda da literatür verilerine paralel olarak idiyopatik OAS'li olgularda diğer iki gruba oranla IL-2 düzeylerinde anlamlı artış saptandı.

Temel fizyolojik etkisi, alerjik olayları düzenlemek olan IL-4, yardımcı T hücreleri, aktive mast, bazofilik ve bazı CD8+T hücreleri tarafından salgılanır. IL-4, immünglobulin-E ve eozinofil aracılığı ile gelişen inflamatuvar reaksiyonlarda, makrofaj aktivasyonu ve T-hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynar¹⁸. İnfertil hastalarda ve kontrol gruplarında IL-4 düzeylerinin incelendiği farklı çalışmalarda genellikle seminal plazmada ölçülebilir düzeyde IL-4 saptanamamıştır^{8,19}. Çalışmamızda ise IL-4 ölçülebilir düzeyde olmasına

rağmen kontrol, lökospemili infertil ve OAS'li infertilite grupları arasında IL-4 düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p < 0.05$).

Sonuç olarak; asemptomatik erkeklerdeki genital sistem enflamasyonları farklı mekanizmalarla semen kalitesini ve sperm fonksiyonlarını bozabilir. Çalışmamızda, erkek infertilitesinde enfeksiyonun olası rolü ve artmış sitokinlerin etiopatogenezde rol oynayabilecekleri gösterilmiştir. İnfertilite incelemelerinde ve subklinik genital sistem enfeksiyonu tanısında IL-2 ve TNF-alfa'nın etkili olabileceği belirlendi. Ancak, erkek genital sisteminde ve testiküler sperm fizyolojisinde sitokinlerin gerçek rollerinin daha geniş serili, kontrollü ve randomize çalışmalarla tam olarak ortaya konulması, tanı ve tedavide farklı seçenekleri de beraberinde getirecektir.

KAYNAKLAR

- 1- **Lipshultz LI, Howards SS (eds):** Infertility in the Male, ed 2. St. Louis, Mosby-Year Book, p 179, 1991.
- 2- **Deborah J:** The effect of genital tract infection and inflammation on male infertility. Liphultz L, Jowards S (editors). Infertility in the male. 7th ed, New York: Williams & Wilkins, 326-333, 1997.
- 3- **Aitken RJ, Baker HWG:** Seminal leukocytes: Passenger, terrorists or good Samaritans? Hum Reprod. 10: 1736-1739, 1995.
- 4- **Litvin YS, Nagler H:** Infertility and genitourinary infections. Infect Urol. 5: 104-107, 1992.
- 5- **Jochum M, Pabst W, Schill WB:** Granulocyte elastase as a sensitive diagnostic parameter of silent male genital tract inflammation. J Androl. 18: 413-419, 1986.
- 6- **Micic S, Macura M, Lalic N, Dotlic R:** Elastase as an indicator of silent genital tract infection in infertile men. Int J Androl. 12: 423-429, 1989.
- 7- **World Health Organization:** Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, ed 2. Cambridge, Press syndicate of the University of Cambridge, p 27, 1987.
- 8- **Maegawa M, Kamada M, Irahara M, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, et al:** A repertoire of cytokines in human seminal plasma. Am J Reprod Immunol. 54: 33-42, 2002.
- 9- **Bar-Chama N, MD, Goluboff E, MD, and Fisch H, MD:** Infection and pyospermia in male infertility. Urologic Clinics of North America. 21: 469-475, 1994.
- 10- **Wolf H, Poltich JA, Martinez A, et al:** Leucospermia is associated with poor semen quality. Fertil Steril 53: 528-534, 1990.
- 11- **Sanocka D, Jedrzejczak P, Szumala Kakol A, Fraczek M and Kurpisz M:** Male Genital Tract Inflammation: The Role of Selected Interleukins in Regulation of Pro-Oxidant and Antioxidant Enzymatic Substances in Seminal Plasma. J Androl. 24: 448-455, 2003.
- 12- **Rutanen EM:** Cytokines in reproduction. Ann Med. 25: 343-347, 1993.

İNFERTİL HASTALARDA SİTOKİNLER
(*Cytokines in Infertile Patients*)

- 13- **Rees RC:** Cytokines as biological response modifiers. *J Clin Pathol.* 45: 93-98, 1992.
- 14- **Shimoya K, Matsuzaki N, Tsutsui T, Taniguchi T, Saji F, Tanizawa O:** Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma and elevated IL-8 in seminal plasma of infertile patients with leucospermia. *Fertility and Sterility.* 59: 885-888, 1993.
- 15- **Aydos K, Yaman Ö, Yaman LS:** Erkek infertilitesinin araştırılmasında antisperm antikorların araştırılması. *Klinik Bilimler.* 2: 44-49, 1996.
- 16- **Dousset B, Hussenet F, Daudin M, Bujan L, Foliguet B, Nabet P:** Seminal cytokine concentrations (IL-1 β , IL-2, IL-6, sR IL-2, sR IL-6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility. *Hum Reprod.* 12: 1476-1479, 1997.
- 17- **Gruschwitz MS, Brezinschek R, Brezinschek HP:** Cytokines levels in the seminal plasma of infertile males. *J Androl.* 17: 158-163, 1996.
- 18- **Güner İ, Özmen D, Bayındır O:** Sitokinler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri.* 17: 65-74, 1997.
- 19- **Paradisi R, Capelli M, Mandini M, Bellavia E, Focacci M, Flamigni C:** Interleukin-2 in seminal plasma of fertile and infertile men. *Arch Androl.* 35: 35-41, 1995.
- 20- **Matalliotakis I, Arici A, Goumenou A, Koumantakis G, Selam B, Matalliotakis G, Koumantakis E:** Distinct expression pattern of cytokines in semen of men with genital infection and oligo-terato-asthenospermia. *Am J Reprod Immunol.* 48: 170-175, 2002.