

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra BABIČ

**VPLIV LEVKOCITOV, STIMULIRANIH Z LIPOPOLISAHARIDOM,
NA APOPTOZO SPERMIJEV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF LEUKOCYTES ACTIVATED WITH
LIPOPOLYSACCHARIDE ON APOPTOSIS OF SPERMATOZOA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za pretočno citometrijo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Alojza Ihana in za recenzenta prof. dr. Vladimirja Kotnika.

Mentor: prof. dr. Alojz Ihan

Recenzent: prof. dr. Vladimir Kotnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Alojz IHAN

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Vladimir KOTNIK

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Petra Babič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 611.013.1: 612.112: 612.616.2 (043)=163.6
- KG spermiji/živost spermijev/neplodnost/vnetje urogenitalnega trakta/levkociti/aktivacija PMN/reaktivne kisikove zvrsti/lipopolisaharidi/apoptoza spermijev
- AV BABIČ, Petra
- SA IHAN, Alojz (mentor)/KOTNIK, Vladimir (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2008
- IN VPLIV LEVKOCITOV, STIMULIRANIH Z LIPOPOLISAHARIDOM, NA APOPTOZO SPERMIJEV
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XI, 62 str., 15 pregl., 12 sl., 56 vir.
- IJ sl
- Jl sl/en
- AI Okužba urogenitalnega trakta je eden od glavnih vzrokov moške neplodnosti. Okužba sproži aktivacijo fagocitnih celic, predvsem polimorfonuklearnih levkocitov (PMN) in makrofagov. Aktivacija se odraža v obliki oksidativnega izbruha, tekom katerega nastajajo povečane količine reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ). Aktivirani levkociti so glavni vir RKZ v semenu in tudi sprožitelj apoptoze, vendar pa ni pojasnjeno, ali povečane zunajcelične koncentracije RKZ lahko sprožijo apoptozo spermijev v ejakulatu. S poskusom *in vitro* smo želeli ponazoriti situacijo *in vivo*, v kateri morebitna bakterijska okužba aktivira levkocite in zaradi povečane tvorbe RKZ poveča delež apoptotičnih spermijev. Za stimulacijo oksidativnega izbruha levkocitov smo uporabili lipopolisaharid (LPS) in forbol-12-miristat-13-acetat (PMA). Delež apoptotičnih spermijev v vzorcih native sperme smo ugotavljali z metodo merjenja mitohondrijskega membranskega potenciala (MMP). Potrdili smo delovanje oksidativnega izbruha PMN, ki je bil po stimulaciji značilno povečan (povp. indeks stimulacije = 1,74). Statistično značilne vrednosti smo dobili v poskusu z 20 % in 40 % PMN v reakcijski mešanici. Odstotek PMN v reakcijski mešanici ni vplival na MMP. Zaradi odsotnosti statistično značilnih razlik nismo potrdili povezave med oksidativnim izbruhom PMN in začetno fazo apoptoze spermijev.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 611.013.1: 612.112: 612.616.2 (043)=163.6
CX spermatozoa/sperm viability/infertility/urogenital tract
inflammation/leukocytes/activated PMN/reactive oxygen
species/lipopolysaccharides/apoptosis of spermatozoa
AU BABIČ, Petra
AA IHAN, Alojz (supervisor)/KOTNIK, Vladimir (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2008
TI INFLUENCE OF LEUKOCYTES ACTIVATED WITH
LIPOPOLYSACCHARIDE ON APOPTOSIS OF SPERMATOZOA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 62 p., 15 tab., 12 fig., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Urogenital infections are one of the major causes of male infertility. Infections lead to activation of phagocytic cells, first of all polymorphonuclear leukocytes (PMN) and macrophages. Activation results in an oxidative burst and excessive production of reactive oxygen species (ROS). Activated leukocytes are the main source of ROS in semen and inducers of apoptosis. To date it is not clear whether ejaculated sperm cells are able to initiate an apoptotic process in response to external stimuli such as high levels of ROS. The aim of this *in vitro* experiment was to mimic *in vivo* situation where bacterial infections activate leukocytes and due to higher ROS production increase the percentage of apoptotic spermatozoa. Lipopolysaccharide (LPS) and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) were used as ROS inducers in PMN. The percentage of apoptotic spermatozoa in samples of native sperm was studied by mitochondrial membrane potential (MMP) measurements. ROS production in PMN was significantly induced after stimulation with PMA (average index of stimulation was 1,74). It was demonstrated that mitochondrial activity of spermatozoa decreased in the presence of activated PMN but values were statistically significant only in the case of exposition of spermatozoa with 20% and 40% PMN. Incubation of sperm samples with different percentage of PMN did not turn out to have any effect on MMP of spermatozoa. Due to the lack of statistically significant values we could not confirm the correlation between the oxidative burst of PMN and early stage of apoptosis in spermatozoa.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK.....	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MOŠKI GENITALNI TRAKT	2
2.1.1 Zgradba moških spolovil.....	2
2.1.2 Sestava semena.....	3
2.1.3 Zgradba spermijev	4
2.2 VNETJE.....	6
2.2.1 Mediatorji vnetja	7
2.3 EFEKTORSKE CELICE PRI VNETJU	8
2.3.1 Oksidativni mikrobicidni mehanizmi nevtrofilcev	10
2.3.1.1 Reaktivne dušikove zvrsti.....	13
2.3.2 Encimski (od kisika neodvisni) mikrobicidni mehanizmi nevtrofilcev	14
2.4 VNETJE GENITALNEGA TRAKTA, LEVKOCITI IN RKZ	15
2.5 VPLIVI RKZ NA SPERMIJE	20
2.5.1 Fiziološki pomen RKZ	20
2.5.2 Patološki vplivi RKZ	21
2.5.2.1 Peroksidacija lipidov	21
2.5.2.2 Poslabšanje gibljivosti spermijev	22
2.5.2.3 Poškodbe DNK.....	22
2.6 APOPTOZA SPERMIJEV	23
3 MATERIAL IN METODE	28
3.1 SHEMA POTEKA DELA.....	28
3.1.1 Potek dela	29

3.2 IZOLACIJA POLIMORFONUKLEARNIH CELIC (PMN).....	29
3.2.1 Določanje števila PMN	30
3.3 PRIPRAVA VZORCEV NATIVNE SPERME	31
3.4 MERJENJE REAKTIVNIH KISIKOVIH ZVRSTI (RKZ) IN DODATNA STIMULACIJA S PMA IN LPS	32
3.4.1 Stimulacija PMN celic s PMA in LPS.....	32
3.4.1.1 Lastnosti PMA in LPS	32
3.4.1.2 Priprava delovne raztopine PMA in LPS	32
3.4.2 Merjenje RKZ s hidroetidinom (HE)	33
3.4.2.1 Lastnosti HE	33
3.4.2.2 Priprava delovne raztopine HE in postopek merjenja RKZ	33
3.5 DOLOČANJE APOPTOZE SPERMIJEV	34
3.5.1 Lastnosti DiOC₆(3)	34
3.5.2 Merjenje MMP spermijev	35
3.6 STATISTIČNA ANALIZA.....	35
4 REZULTATI.....	36
4.1 CITOFLUOROMETRIČNE ANALIZE	36
4.1.1 Merjenje oksidativnega izbruha PMN	36
4.1.2 Merjenje MMP spermijev in določanje apoptoze	39
4.1.3 Povezava med oksidativnim izbruhom levkocitov in apoptozo spermijev..	48
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	49
5.1 UVOD.....	49
5.2 ANALIZA REZULTATOV	49
5.3 SKLEPI.....	53
6 POVZETEK.....	54
7 VIRI	55

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rezultati analize svetilnosti ločenih populacij celic v nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) vzorcih native sperme.	38
Preglednica 2: Primerjava povprečnih svetilnosti ločenih populacij PMN in spermijev v nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) vzorcih native sperme.	39
Preglednica 3: Primerjava povprečnih svetilnosti in indeksov stimulacije ločenih populacij celic v nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) vzorcih native sperme.	39
Preglednica 4: Rezultati analize svetilnosti zajete populacije spermijev v vzorcih native sperme z dodanimi 5 % nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije.	42
Preglednica 5: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC ₆ (3)+) subpopulacij spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih z dodanimi 5 % nestimuliranih (PMA–) oziroma stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije.	42
Preglednica 6: Rezultati analize svetilnosti zajete populacije spermijev v vzorcih native sperme z dodanimi 10 % nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije.	43
Preglednica 7: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC ₆ (3)+) subpopulacij spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih z dodanimi 10 % nestimuliranih (PMA–) oziroma stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije.	43
Preglednica 8: Rezultati analize svetilnosti zajete populacije spermijev v vzorcih native sperme z dodanimi 20 % nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije.	44
Preglednica 9: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC ₆ (3)+) subpopulacij spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih z dodanimi 20 % nestimuliranih (PMA–) oziroma stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije.	44
Preglednica 10: Rezultati analize svetilnosti zajete populacije spermijev v vzorcih native sperme z dodanimi 40 % nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije.	45
Preglednica 11: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC ₆ (3)+) subpopulacij spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih z dodanimi 40 % nestimuliranih (PMA–) oziroma stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije.	45
Preglednica 12: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC ₆ (3)+) in neaktivnih (DiOC ₆ (3)–) subpopulacij spermijev v nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) vzorcih native sperme po različnih časih inkubacije.	46

Preglednica 13: Indeks svetilnosti aktivne (DiOC₆(3)+) subpopulacije spermijev v nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) vzorcih nativne sperme po 15- in 60-minutni inkubaciji vzorcev..... 46

Preglednica 14: Povprečna svetilnost aktivne (DiOC₆(3)+) subpopulacije spermijev pri različnem deležu dodanih nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN v vzorcu nativne sperme po 0- in 15-minutni inkubaciji..... 47

Preglednica 15: Povprečna svetilnost aktivne (DiOC₆(3)+) subpopulacije spermijev pri različnem deležu dodanih nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN v vzorcu nativne sperme po 0- in 60-minutni inkubaciji..... 47

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba spermija (Virant-Klun, 2002: 130).....	5
Slika 2: Shematski prikaz fagocitoze, degranulacije in tvorbe kisikovih radikalov v nevtrofilcu (Roos, 1991: 976).....	9
Slika 3: Shematski prikaz oksidaze NADPH (Assari, 2006: 4).....	11
Slika 4: Oksidativni in encimski mehanizmi delovanja nevtrofilcev (Witko-Sarsat in sod., 2000: 625).....	15
Slika 5: Odnos med citokini, oksidanti, antioksidanti in lastnostmi semena (Sanocka in sod., 2003: 452).....	18
Slika 6: Shema poteka dela.....	28
Slika 7: Shematični prikaz ločevanja krvnih celic z metodo Ficoll-Paque Plus.....	29
Slika 8: Prikaz rezultatov merjenja RKZ s pretočnim citometrom.....	37
Slika 9: Povprečni indeks stimulacije za ločeni populaciji PMN in spermijev ter mešanico PMN in spermijev v vzorcih.....	38
Slika 10: Prikaz rezultatov merjenja MMP spermijev s pretočnim citometrom.....	40
Slika 11: Histogram svetilnosti barvila DiOC ₆ (3) v ločeni populaciji spermijev v vzorcu.....	40
Slika 12: Grafični prikaz odnosa med količino RKZ in MMP aktivnih spermijev v stimuliranih vzorcih.....	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin-3-fosfat
DiOC ₆ (3)	3, 3-diheksiloksakarbo Cianin jodid
FAD	flavin adenin dinukleotid
FITC	fluorescein izotiocianat
HE	hidroetidin
IL	interlevkin
LPS	lipopolisaharid
MMP	mitohondrijski membranski potencial
MPO	encim mieloperoksidaza
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
PI	propidijev jodid
PKC	proteinska kinaza C
PMA	forbol-12-miristat-13-acetat, forbolni ester
PMN	polimorfonuklearni levkociti
RKZ	reaktivne kisikove zvrsti
SOD	encim superoksidna dismutaza
TNF	tumorski nekrozni faktor
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)

SLOVARČEK

AKROSOMSKA REAKCIJA: Med akrosomsko reakcijo se iz akrosomskih veziklov sprostijo encimi za razgradnjo kumulusa, da spermij lahko prodre do jajčne celice. Reakcija se sproži z zlitjem zunanje akrosomske membrane in plazmaleme spermija, pri čemer se sprostijo vsebine akrosomskih veziklov. Gre za sekretorni proces, odvisen od koncentracije kalcija.

APOPTOZA: Zaporedje morfoloških in biokemičnih sprememb, ki povzroči samouničenje celice, imenovano tudi programirana celična smrt. Služi kot mehanizem za odstranjevanje poškodovanih in odvečnih celic ter celic, katerih naloge niso več potrebne.

KAPACITACIJA: Aktivacija spermijev in priprava na oploditev. Med kapacitacijo se s površine spermijev odstranijo substance nadmodka in semenske plazme, ki preprečujejo akrosomsko reakcijo spermijev. Proces kapacitacije omogoča spermiju, da med celicami kumulusa prodre do jajčne celice. Med tem procesom se spremeni lipidna zgradba membrane spermijev, pojavi se hiperaktivno gibanje.

LEVKOCITOSPERMIJA: Kadar koncentracija levkocitov v semenu presega mejno vrednost 1 milijon levkocitov na ml, ki jo predpisuje Svetovna zdravstvena organizacija (ang. WHO), govorimo o levkocitospermiji.

MITOHONDRIJSKI MEMBRANSKI POTENCIAL: Med procesom oksidativne fosforilacije v notranji mitohondrijski membrani se črpajo protoni iz notranjosti mitohondrija preko membrane, pri čemer se ustvari elektrokemični gradient, imenovan mitohondrijski membranski potencial. Uporaba potenciometričnih barvil omogoča oceno viabilnosti celic.

OKSIDATIVNI STRES: Stanje, v katerem oksidativni procesi prevladujejo nad antioksidativnimi. Čezmerno nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti pospeši nastanek celičnih poškodb; potencialne tarče oksidativnega stresa so vse celične komponente, vključno z lipidi, beljakovinami, nukleinskimi kislinami in sladkorji.

1 UVOD

Eden izmed glavnih vzrokov moške neplodnosti je okužba urogenitalnega trakta. Vdor mikroorganizmov v genitalni trakt izzove vnetna dogajanja, ki lahko pomembno vplivajo na reproduktivne procese. Vnetje lahko prizadene proces spermatogeneze, povzroči nepravilnosti v zgradbi in delovanju spermijev in nastanek okvar pomožnih spolnih žlez.

Prvi obrambni mehanizem, ki preprečuje napredovanje okužbe, je posredovanje fagocitnih celic, predvsem polimorfonuklearnih levkocitov – nevtrofilcev (PMN) in makrofagov. Mikrobicidna dejavnost teh celic poteka v kombinaciji z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (RKZ), ki so potencialno toksične za vse celice in lahko, poleg tega, da odstranijo mikrobo, poškodujejo tudi zdrave, normalne celice v neposredni bližini. Okužba sproži aktivacijo fagocitnih celic. Ta se odraža v obliki oksidativnega izbruha, med katerim nastajajo povečane količine RKZ. Znano je, da so RKZ v fizioloških pogojih pomembne za nekatere ključne stopnje v delovanju spermijev. V kolikor količina RKZ preseže zmogljivost antioksidativnih sistemov, nastali oksidativni stres poškoduje zgradbo spermijev, poslabša njihove funkcionalne lastnosti (gibljivost, oploditvena sposobnost) in pospeši programirano celično smrt – apoptozo.

Aktivirani levkociti so glavni vir RKZ v semenu in tudi sprožitelji apoptoze, vendar pa še ni pojasnjeno, ali so spermiji v ejakulatu sposobni sprožiti apoptozo kot odziv na povečane zunajcelične koncentracije RKZ. V nalogi smo želeli s poskusom *in vitro* ponazoriti situacijo *in vivo*, v kateri morebitna bakterijska okužba aktivira levkocite in posledično zaradi povečane tvorbe RKZ poviša delež apoptotičnih spermijev. Za stimulacijo oksidativnega izbruha levkocitov smo uporabili lipopolisaharid (LPS) in forbol-12-miristat-13-acetat (PMA). Delež apoptotičnih spermijev v vzorcih nativne sperme smo ugotavljali z metodo merjenja mitohondrijskega membranskega potenciala (MMP). Meritve MMP smo opravili po treh različno dolgih inkubacijah.

Pričakovali smo povečano levkocitno tvorbo RKZ po stimulaciji z LPS in PMA in znižano mitohondrijsko aktivnost spermijev po inkubaciji le-teh z aktiviranimi levkociti.

1.1 NAMEN DELA

Namen naloge je bil ugotoviti morebiten vpliv RKZ, nastalih med oksidativnim izbruhom levkocitov, na apoptozo spermijev v vzorcih native sperme.

Najprej smo želeli preveriti delovanje oksidativnega izbruha po stimulaciji nevtrofilcev z LPS in PMA. Nastanek RKZ smo izmerili z uporabo barvila hidroetidina (HE). Za primerjavo smo izmerili tudi nastanek RKZ pri nestimuliranih nevtrofilcih. Obenem nas je zanimal še vpliv odstotka PMN v reakcijski mešanici na moč oksidativnega izbruha.

Po dodatku stimuliranih nevtrofilcev k vzorcem native sperme smo želeli določiti vpliv RKZ na aktivnost spermijev. Aktivnost smo spremljali z merjenjem MMP po treh različnih inkubacijskih časih. Uporabili smo potenciometrično barvilo DiOC₆(3). Zanimalo nas je, ali tudi dolžina izpostavitve oksidativnemu stresu vpliva na mitohondrijsko aktivnost. Meritve MMP smo opravili še v vzorcih sperme, inkubiranih z nestimuliranimi nevtrofilci.

Z merjenjem MMP kot splošnega pokazatelja aktivnosti celice in njenega energetskega statusa smo želeli ugotoviti začetek apoptotskega procesa. Upadanje MMP je namreč splošna značilnost celične smrti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MOŠKI GENITALNI TRAKT

2.1.1 Zgradba moških spolovil

Moška spolovila sestavljajo moda, kjer nastajajo moške gamete (spermiji) in moški spolni hormoni, genitalni trakt, skozi katerega se spermiji prenašajo (nadmodek, semenovod), pomožne spolne žleze (prostata ali obsečnica, semenjak, bulbouretralna žleza) in spolni ud, ki omogoča telesno združitev. V modih poteka nastanek spermijev – spermatogeneza. Spermiji v modu so zaradi nezrelosti večinoma negibljivi, na mestu gibljivi ali počasi

progresivno gibljivi. Sprostijo se iz moda in potujejo skozi nadmodek, pri čemer nadalje zorijo, pridobijo normalno gibalno funkcijo, spremeni pa se tudi kemična in fizikalna zgradba lipidov v plazmalemi spermijev. V nadmodku pride tudi do nadaljnjega dozorevanja jedra spermijev, močno naraste tudi negativni naboj plazmaleme glave. Nadmodek je skladišče spermijev, žleze v njegovi steni pa izločajo kisle izločke (kisla fosfataza). Semenjaka sta parni žlezi, ki ležita ob prostati. Izločata bazične izločke, ki skupaj z izločki prostate tvorijo večino izliva. Velika vsebnost ogljikovih hidratov (fruktoze) v izločkih skrbi za energijo spermijev. Prostata je največja in najpomembnejša pomožna moška spolna žleza. Izloček prostate je bazičen in daje spermijem dobre pogoje za gibanje (Drobnič, 2002).

Neplodnost je lahko posledica vnetja moda (orhitis), nadmodka (epididimitis) pa tudi drugih pomožnih spolnih žlez in celo trdovratnejšega vnetja sečnice. Akutno vnetje moda se praviloma konča z zmanjšanjem in atrofijo moda, v katerem ni več spermijev. Podobne okvare lahko povzroči tudi dalj časa trajajoče kronično vnetje, ki praviloma poteka brez bolezenskih znakov (skrito vnetje). Vnetje nadmodka lahko pusti v tkivu nadmodka brazgotine, ki preprečijo spermijem prehod skozenj. Vnetja drugih pomožnih spolnih žlez, semenjaka in prostate, lahko spremenijo sestavo njihovih izločkov in s tem tudi okolje spermijev. Spermiji v spremenjenem okolju slabše dozorevajo, spremeni se njihova oblika in upočasni njihovo gibanje. S tem se zmanjša oploditvena sposobnost spermijev (Virant-Klun in sod., 2002).

2.1.2 Sestava semena

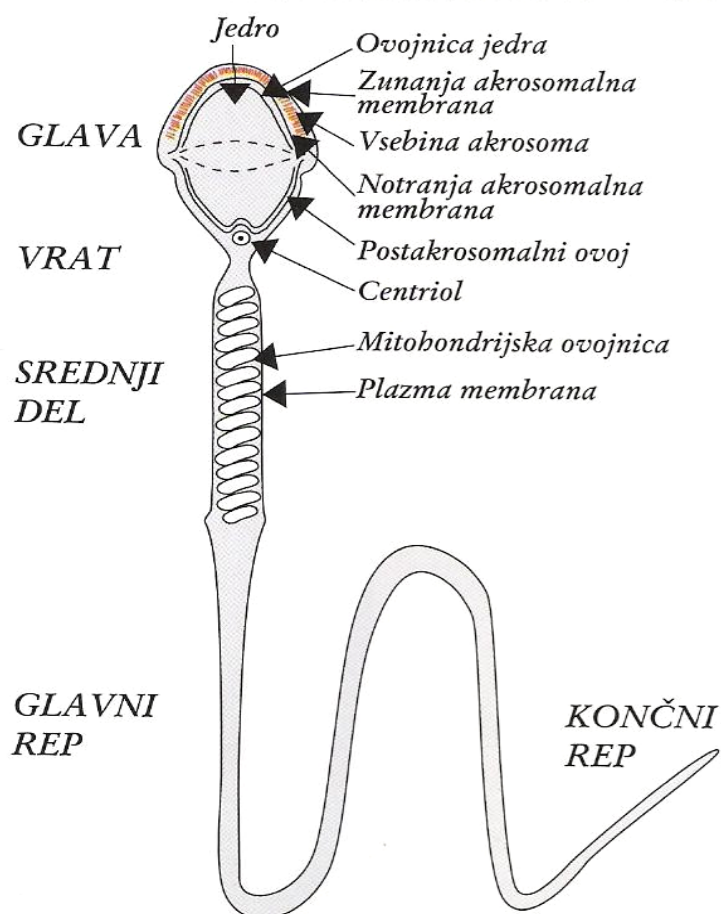
Seme je sestavljeno iz semenske plazme in spermijev. Večino izliva sestavljajo izločki semenjakov in prostate, manjši delež prispevajo izločki bulbouretralnih žlez in semenskih cevok moda. Spermiji se sprostijo iz nadmodka in semenovodov. Ob ejakulaciji se sprosti tudi manjši delež nezrelih zarodnih celic. V semenu so lahko prisotni tudi levkociti kot pomemben znak vnetja pri moškem. Če je v semenu 1 milijon ali več levkocitov na ml glede na merila Svetovne zdravstvene organizacije, govorimo o levkocitospermiji (Virant-Klun, 2002). Prevladujoče levkocitne celice v semenu so PMN (50–60 %) in makrofagi

(20–30 %), ki ob aktivaciji sproščajo RKZ. Tudi spermiji s slabšo gibljivostjo ali morfologijo so lahko vir RKZ v semenu. Ob vnetju se v semenski tekočini poveča delež nekaterih citokinov (npr. interleukini IL-1, IL-6 in IL-8, tumorski nekrozni faktor TNF), ki lahko negativno vplivajo na funkcionalne lastnosti spermijev.

Semenska plazma ima več učinkovitih antioksidativnih obrambnih mehanizmov, ki ščitijo spermije pred oksidativnimi poškodbami. Ti mehanizmi v glavnem vključujejo encimske sisteme superoksidno dismutazo (SOD), katalazo, glutation peroksidazo, ki skupaj z ustreznimi koncentracijami kemičnih antioksidantov, kot so askorbinska kislina (vitamin C), tokoferol (vitamin E) in reduciran glutation, zmanjšujejo nastajanje in delovanje RKZ.

2.1.3 Zgradba spermijev

Normalen, zrel spermij ima glavo, kratek vrat, srednji del in dolg rep. Ovalna glava, ki je spredaj rahlo sploščena in zašiljena, je v glavnem sestavljena iz jedra z genetskim materialom. Prednji del, približno dve tretjini glave spermija, pokriva akrosom ali kapi podobna struktura. Akrosom vsebuje encime, potrebne za prodor spermija skozi ovojnico jajčne celice ob oploditvi. Zadnji del glave, postakrosomski del, vsebuje jedro, ki sega pod akrosom. Dolžina glave je 4–5 μm in širina 2–3 μm . Kratek vrat povezuje glavo in srednji del. Dolžina srednjega dela je približno 5 μm . Sestavljen je iz dveh centriolov, aksoneme in ovojnice iz mitohondrijev, ki ovija aksialni filament. Rep spermija je dolg 50–55 μm in ima dva predela: glavni in končni del. Glavni del repa je najdaljši predel repa, dolg približno 45 μm . V tem delu je 9 parov perifernih in 1 centralni par mikrotubulov aksoneme, obdan s fibrozno ovojnico (Virant-Klun in sod., 2002).



Slika 1: Zgradba spermija (Virant-Klun, 2002: 130).

Plazemska membrana spermijev ima specifično lipidno zgradbo. Posebna je zaradi visoke vsebnosti fosfolipidov, sterolov, nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin, ki zagotavljajo ustrezno fleksibilnost in funkcionalnost membrane. Lipidna zgradba se spreminja med zorenjem spermijev v nadmodku in med procesom kapacitacije ter akrosomske reakcije. Največji del lipidne frakcije predstavljajo fosfolipidi, od katerih prevladujeta fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin. Poseben delež fosfolipidov je v obliki plazmalogenov (lipidi z etersko vezjo).

Za membrano spermijev je značilna velika količina polinenasičenih maščobnih kislin, še posebej dokosaheksaenojske kisline, ki naj bi imela glavno vlogo v regulaciji fluidnosti membrane in regulaciji spermatogeneze (Sanocka in Kurpisz, 2004). Vsebnost te kisline je

značilno večja v membrani nezrelih spermijev in med zorenjem spermijev prihaja do neto znižanja vsebnosti le-te (Ollero in sod., 2000).

Holesterol v bioloških membranah regulira fluidnost in prepustnost teh membran. V plazemski membrani spermijev se med kapacitacijo odstrani holesterol, to pa omogoči vnos zunajceličnih kalcijevih ionov. Povečana znotrajcelična koncentracija kalcija ima pomembno vlogo pri akrosomski reakciji (Sanocka in Kurpisz, 2004).

2.2 VNETJE

Organizem se brani pred okužbo z aktivacijo mehanizmov prirojene (naravne, nespecifične) imunosti na lokalni ravni, nato se obramba stopnjuje z reakcijo akutne faze in antigen-specifičnimi odzivi na sistemski ravni. Zgodnji obrambni mehanizem za premagovanje okužbe in njeno omejitev je vnetje. Vnetne reakcije v okuženem tkivu močno okrepijo obrambno sposobnost tkiva s kopičenjem imunskih celic in njihovo aktivacijo. Trije najpomembnejši dogodki akutnega vnetja so: 1) razširjanje kapilar in povečana prekrvavljenost, 2) povečanje prepustnosti kapilar in prehod plazme, plazemskih proteinov in levkocitov iz obtoka v tkivo, 3) povečan prehod vnetnih celic iz kapilar in kopičenje teh v prizadetem tkivu.

Povečan dotok krvi prinaša veliko levkocitov in serumskih molekul v vneto tkivo in povečana prepustnost žilja omogoči izstopanje velikih serumskih molekul (protiteles, proteinov komplementa) iz žil v tkivo. Pritekanje krvi v vnetišče in prehajanje molekul iz krvi v tkiva uravnavajo mediatorji, ki izhajajo iz plazemskih encimskih sistemov in iz dopolnilnih celic, kot so mastociti, trombociti in bazofilci. Prepustnost kapilar lahko spreminjajo tudi mediatorji iz makrofagov in limfocitov, predvsem levkotrieni in prostaglandini (Vozelj, 2000).

2.2.1 Mediatorji vnetja

Ob okvari tkiva se aktivirajo encimski sistemi v krvni plazmi, ki izdelujejo številne vnetne mediatorje. Ti mediatorji povzročajo spremembe žilja in delujejo kemotaktično.

Kinini nastajajo iz beljakovin kininogenov. Encimska kaskada se sproži z aktivacijo Hagemanovega faktorja (plazemski strjevalni faktor), ta aktivira encim kalikrein, ki cepi kininogene. Med kinini je najbolj znan bradikinin, ki razširja žile in poveča prepustnost žilja. Podobno delujejo fibrinopeptidi, ki prav tako zvečajo prepustnost žilja in so kemotaktični za nevtrofilce.

Plazmin je močan proteolitični encim, ki razgrajuje fibrinske strdke v manjše molekule, ki so kemotaktične za nevtrofilce. K vnetju prispeva tudi z aktivacijo komplemента po klasični poti.

Pri aktivaciji komplemента po klasični in po alternativni poti nastanejo številni fragmenti komplemента, ki so pomembni mediatorji vnetja. Anafilatoksini C3a, C4a in C5a sprožijo aktivacijo in degranulacijo mastocitov, pri čemer se sproščajo še drugi mediatorji, kot sta histamin in levkotrien B4. Ker se vežejo na gladko mišičje arteriol in spodbujajo krčenje, se zvečata tudi širjenje in prepustnost žilja. Najbolj učinkovit je C5a, ki je kemotaktičen za nevtrofilce in makrofage pri izredno majhni koncentraciji 1 nM.

Pomemben vir mediatorjev so mastociti, ki se aktivirajo neposredno prek senzibilizacije s protitelesi IgE ali posredno s fragmenti komplemента C3a in C5a. Aktivirani mastociti izločajo vsebino bazofilnih zrn skupaj z mediatorji (histamin) in hkrati začnejo sintezo novih. Z razgradnjo membranskih fosfolipidov nastanejo lipidni vnetni mediatorji, kot so prostaglandini, levkotrieni in faktor, ki aktivira trombocite – PAF. Delujejo kemotaktično in povečajo prepustnost žilja. Prostaglandin E2 okrepi kemotaktično aktivnost in vazoaktivne lastnosti drugih mediatorjev, predvsem levkotriena B4, C5a, histamina in kininov. Faktor PAF vpliva na aktivacijo in degranulacijo nevtrofilcev in eozinofilcev (Vozelj, 2000).

Pri vnetju sodelujejo tudi citokini, ki posredujejo številne lokalne in sistemske učinke. Sestavine bakterijske stene (lipopolisaharid) in aktivirani proteini komplekta spodbudijo makrofage v vnetišču k izločanju interleukinov IL-1 in IL-6 ter tumorskega nekroznega faktorja TNF- α . Ti trije citokini povečajo prepustnost žil, IL-1 in TNF- α delujeta na makrofage in endotelijske celice in spodbujata izdelovanje kemokina IL-8. Ta prispeva k vdoru nevtrofilcev, okrepi njihovo pritrjevanje na žilne endotelijske celice in deluje močno kemotaktično. Na sistemskem nivoju IL-1, TNF- α in IL-6 delujejo na možganski termoregulacijski center in povzročijo vročino, v jetrih spodbudijo izdelovanje proteinov akutne faze vnetja (C-reaktivni protein), v žilnih endotelijskih celicah pa vplivajo na pospešeno izločanje kolonije spodbujajočih faktorjev, ki prispevajo k levkocitozi.

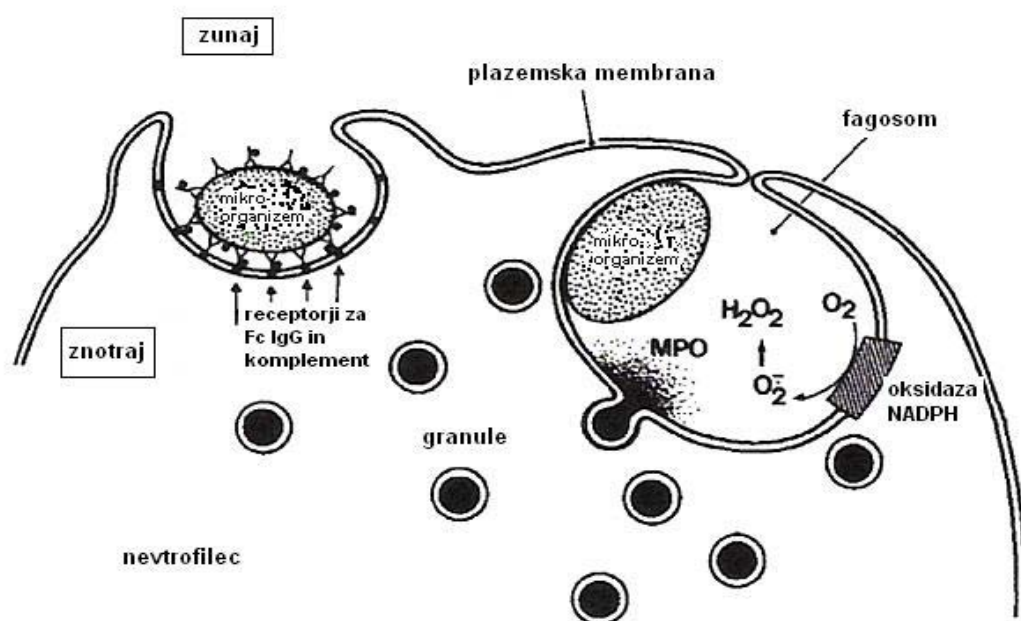
2.3 EFEKTORSKE CELICE PRI VNETJU

Pri akutnem vnetnem odzivu imajo ključno vlogo fagocitne celice, ki učinkovito požirajo in uničujejo različne patogene mikrobo. Te celice so znane kot profesionalni fagociti, katerih predstavniki so nevtrofilci, mononuklearni fagociti – monociti, makrofagi in eozinofilci. Najbolj številčni so nevtrofilci, ki so tudi prve celice, ki potujejo iz krvi v vnetišče. Nato jim sledijo monociti. Nekaj ur po začetku vnetnega procesa se na kemotaktične dražljaje odzovejo še tkivni makrofagi, ki prispejo v vnetišče kot aktivirani makrofagi z okrepljeno zmožnostjo fagocitiranja in izločanja vnetnih mediatorjev.

Nevtrofilci predstavljajo 50–60 % vseh levkocitov v krvnem obtoku. Nastajajo v kostnem mozgu, od koder prehajajo v kri, v kateri preživijo od 1 do 2 dneva in nato odmrejo. Jedro nevtrofilcev je segmentirano, citoplazma pa je napolnjena s številnimi zrnji. Mikrobicidna aktivnost nevtrofilcev temelji na kombinaciji RKZ, nastalih med respiratornim izbruhom, in različnih hidrolitičnih encimov in antimikrobnih proteinov v citoplazemskih zrnih.

Proces fagocitiranja (požiranja) mikrobov s strani makrofagov in nevtrofilcev poteka v več stopnjah. Sprožilni dejavnik fagocitoze je vezava opsoniziranih mikrobov na receptorje za opsonine (protitelesa in komponente komplekta) ali na nespecifične glikozilirane receptorje na površini fagocitnih celic, ki prepoznajo določene lektine na mikrobni

površini. Fagocitoza se začne s povečano tvorbo aktinskega filameta, kar vodi v iztegovanje psevdopodijev, ki obdajo mikrob. Na ta način se lahko večje število receptorjev na površini fagocitne celice veže z opsonini na mikrobnii površini. Ko psevdopodiji popolnoma obdajo mikrob, se zlijejo in oblikujejo zaprt, z membrano obdan vezikel – fagosom znotraj fagocitne celice. Hkrati s fagocitozo se aktivirata še dva mikrobicidna procesa: 1) oksidativni izbruh, tako imenovan zaradi 50- do 100-krat povečane porabe molekularnega kisika (O_2), katerega posledica je nastanek citotoksičnih RKZ in po drugem mehanizmu verjetno tudi reaktivnih dušikovih zvrsti, in 2) degranulacija, med katero se sprosti vsebina azurofilnih (primarnih) in specifičnih (sekundarnih) zrn v fagosom in nastane fagolizosom, v katerem poteka uničenje in razgradnja mikroba (Smith, 1994; Roos, 1991).



Slika 2: Shematski prikaz fagocitoze, degranulacije in tvorbe kisikovih radikalov v nevtrofilcu. Mikroorganizmi, opsonizirani s specifičnimi protitelesi IgG in komponentami komplementa C3b/iC3b, se pritrdijo na receptorje za Fc γ in komplemte. Pritrditev sproži fagocitozo, zlitje znotrajceličnih granul z membrano fagosoma in aktivacijo oksidaze NADPH. Superoksid se spontano pretvori v vodikov peroksid. Mieloperoksidaza (MPO) katalizira nastanek hipokloridne kisline iz vodikovega peroksida in klorovih ionov (Roos, 1991: 976).

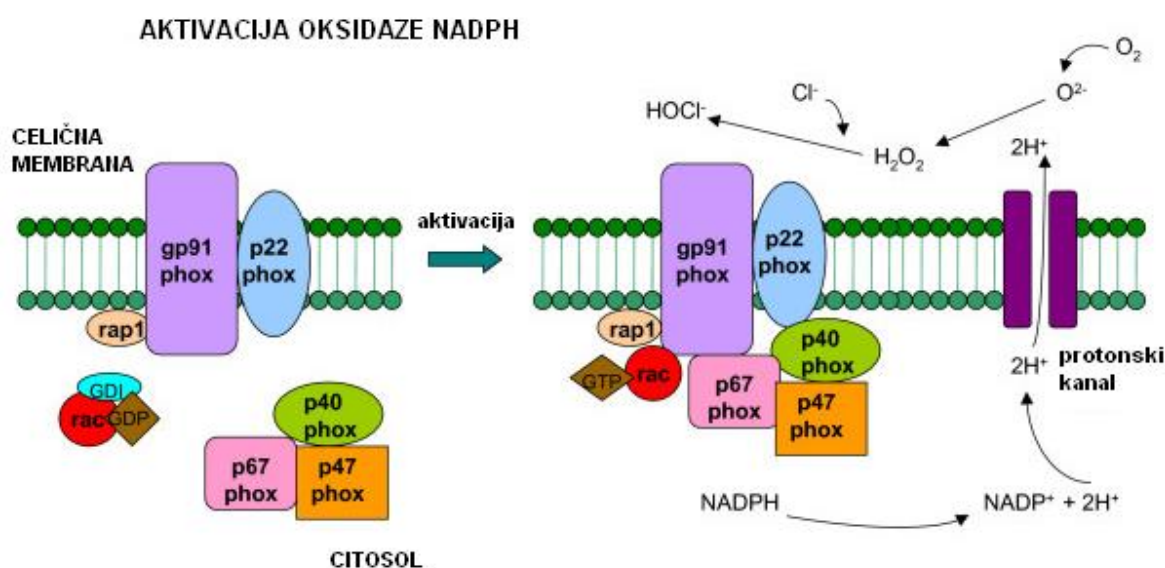
2.3.1 Oksidativni mikrobicidni mehanizmi nevtrofilcev

Oksidativni ali respiratorni izbruh nevtrofilcev se sproži po fagocitozi ali po aktivaciji s sintetičnim spodbujevalcem *in vitro*. Kisikovi radikali in njihovi reakcijski produkti, na katere se nanaša poenoten izraz reaktivne kisikove zvrsti (RKZ), nastajajo v seriji reakcij, ki jih s svojo aktivnostjo začne NADPH oksidazni kompleks v plazemski membrani nevtrofilcev. Oksidaza sprejme elektron z reduciranega nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) na citosolni strani plazemske membrane in ga prenese na molekularni kisik na drugi strani fagolizosoma ali v neposreden zunajcelični prostor, pri čemer nastane superoksid (O_2^-). Baktericidni potencial tega iona je nizek, a se bistveno poveča s pretvorbo v druge citotoksične kisikove produkte. Večina nastalega superoksida se pretvori (dismutira) v vodikov peroksid (H_2O_2), ta oksidira različne aromatske spojine in pri tem nastanejo substratni radikali, reagira s klorovimi ioni v hipokloridno kislino (HOCl), v Fentonovi reakciji se s prehodnim kovinskim katalizatorjem pretvori v močno reaktiven hidroksilni radikal ($\cdot OH$) (Sheppard in sod., 2005).

Oksidacijo klorovih ionov v hipokloridno kislino ob porabi vodikovega peroksida opravlja encim mieloperoksidaza, ki se sprosti iz azurofilnih zrn. HOCl velja za najmočnejši baktericidni produkt nevtrofilcev in je od 100- do 1000-krat bolj učinkovita od H_2O_2 (Klebanoff, 1968). Njeni citotoksični učinki vključujejo oksidacijo in dekarboksilacijo membranskih proteinov, oksidacijo komponent bakterijskih respiratornih verig in inaktivacijo bakterijskih penicilin-vezavnih proteinov (Albrich in sod., 1986; Rakita in Rosen, 1991; Rakita in sod., 1989, cit. po Rosen in sod., 1995).

Del plazemske membrane, ki je bil pred fagocitozo izpostavljen zunanosti, je po nastanku fagosoma obrnjen v njegovo notranjost. Oksidaza v membrani sprošča superoksidni ion v notranjost fagosoma. Superoksid služi kot izhodiščni ion za nastanek velikega nabora reaktivnih oksidantov, vključujoč oksidirane halogene, proste radikale in singlet obliko kisika. Poleg letalnega učinka na mikrobo imajo ti oksidanti lahko tudi škodljiv vpliv na celice in tkiva v neposredni bližini, zato mora biti njihov nastanek natančno reguliran, tako da so na voljo ob pravem času in na pravem mestu (Babior, 1999).

Oksidaza NADPH je sestavljena iz membranskih in citosolnih komponent. Membransko vezani podenoti skupaj sestavljata heterodimerni citokrom b_{558} . Ob aktivaciji oksidaze tri citosolne podenote potujejo k plazemski membrani in se vežejo s citokromom b_{558} . V sestavljanje in aktivacijo oksidaze so vključeni še majhni GTP-azni proteini. Citokrom b_{558} je flavohemoprotein, ki prenaša elektrone, katerih vir je citosolni NADPH, prek membrane v fagolizosom ali na zunajcelični molekularni kisik. Del tega citokroma so tudi flavin adenin dinukleotid (FAD), ki služi kot vezavno mesto za NADPH, in dve hem prostetični skupini (Sheppard in sod., 2005). Proces sestavljanja aktivne oksidaze je dobro reguliran, kar vključuje številne fosforilacije, translokacije in konformacijske spremembe, ki omogočajo ustrezne interakcije med posameznimi proteini in v končni fazi tudi pravilno delovanje oksidaze, to je proizvodnja superoksidnega iona. Ločitev oksidaznih komponent na posamezne podenote in njihova razporeditev v različne celične kompartmente/oddelke zagotavlja nevtrofilcem kontrolo nad začetkom in trajanjem oksidativnega izbruha (Quinn in Gauss, 2004).



Slika 3: Shematski prikaz oksidaze NADPH. Dve membranski podenoti p22phox in gp91phox sestavljata citokrom b_{558} . Dve citosolni podenoti p67phox in p47phox ter pomožna beljakovina p40phox in Rac-GTP vezavna beljakovina ob aktivaciji potujejo k celični membrani in sestavijo oksidazo NADPH, ki povzroči oksidativni izbruh fagocitne celice (Assari, 2006: 4).

Nevtrofilci so lahko glede na aktivnost oksidaze NADPH v treh različnih fazah. Nevtrofilci v mirujoči fazi prosto krožijo po obtoku in so okrogle oblike. Vnetni signal v žilnem endoteliju povzroči, da nevtrofilci preidejo iz mirujočega stanja v stanje

predaktivacije/pripravljenosti (ang. primed), v katerem se spremeni njihova oblika, postanejo zmožni prilepljanja na endotelijske celice in poveča se dovzetnost za aktivacijske signale. Ko prispejo v vnetišče, se z aktivacijo oksidaze NADPH lahko začne njihova mikrobicidna dejavnost (aktivirana faza) (Sheppard in sod., 2005).

V odgovor na okužbo vnetni signali potujejo skozi tkiva v ožilje in aktivirajo žilni endotelij, kar povzroči sproščanje kemokinov, ki privabljajo nevtrofilce na endotelijsko površino. Sledi s selektini posredovano kotaljenje nevtrofilcev po endoteliju in z integrini ter celičnimi adhezijskimi molekulami (ICAM-1) posredovano čvrsto prilepljanje nevtrofilcev na endotelijske celice. Ti nevtrofilci, ki so prešli iz neadhezivnega v adhezivni fenotip, so zdaj v stanju predaktivacije, ki okrepi mikrobicidne funkcije ob dodatnem signalu in spremeni aktivnost tako, da signali, ki običajno ne povzročijo aktivacije mirujočih nevtrofilcev, zdaj lahko aktivirajo pripravljene nevtrofilce. Sledi migracija nevtrofilcev skozi endotelij, kemotaktično gibanje proti mestu okužbe in fagocitoza ter uničenje patogenov (Silliman in sod., 2005).

Stanje predaktivacije oksidaze NADPH pomeni povečano nastajanje superoksidnega iona po odzivu na dodaten, sekundarni aktivacijski signal. V tem stanju oksidaza še ni aktivirana. Strukturna organizacija oksidaze na tej stopnji je drugačna v tem, da fosforilacija in translokacija podenot iz citosola v plazemsko membrano sicer potečeta, vendar ne pride do popolne sestave, ki je potrebna za nastanek superoksida. Fosforilacija in translokacija citosolnih komponent v plazemsko membrano povečata oksidazno aktivnost, ko se na receptor na površini nevtrofilcev veže sekundarni signal (Sheppard in sod., 2005).

Aktiviran fenotip nevtrofilcev je rezultat aktivacije oksidaze NADPH s popolno sestavo vseh oksidaznih komponent v plazemski membrani in izmenjavo elektronov prek membrane, pri čemer se sprošča superoksidni ion. Za aktivacijo je potrebna dodatna fosforilacija citosolnih podenot s kinazami, kot je npr. proteinska kinaza C (PKC). Nato poteče translokacija vseh citosolnih komponent v plazemsko oz. fagosomalno membrano. Končna stopnja aktivacije je združitev vseh oksidaznih komponent v membrani, kar sproži oksidacijo NADPH v NADP in sprostitvev dveh elektronov, ki se prek FAD preneseta prek

membrane na molekularni kisik v fagolizosomu. Pri tem nastane superoksidni ion, ki se pretvarja v druge baktericidne produkte, kot je H_2O_2 (Sheppard in sod., 2005).

2.3.1.1 Reaktivne dušikove zvrsti

Reaktivni dušikovi intermediati vključujejo dušikov oksid (NO), ki lahko reagira s kisikom in tvori močnejše oksidante, kot je dušikov dioksid (NO_2). Neposredna toksičnost NO je skromna, a se močno poveča v reakciji s superoksidom, kjer nastane peroksinitrit ($ONOO^-$) (Witko-Sarsat in sod., 2000). NO nastaja z delovanjem inducibilne sintaze NO (iNOS), ki pretvarja L-arginin v L-citrulin (Smith, 1994; Vozelj 2000). Medtem ko je oksidaza NADPH namenjena za uničenje zunajceličnih mikrobov, zajetih s fagocitozo v fagocitni vakuoli, deluje mehanizem NO proti mikrobom, ki vdrejo v citosol (Vozelj, 2000). Stimulacija človeških monocitov in makrofagov z $IFN-\gamma$ in lipopolisaharidom spodbudi transkripcijo gena za iNOS. Količina reaktivnih dušikovih zvrsti je značilno povišana v mnogih boleznih, kar nakazuje povečano nastajanje NO *in vivo*. iNOS so našli v nevtrofilcih, izoliranih iz urina pacientov z infekcijami urinarnega trakta (Wheeler in sod., 1997). Ker pa so metode za merjenje prisotnosti NO *in vitro* večinoma posredne in nespecifične (Smith, 1994), soudeležba NO v oksidativnih mikrobicidnih reakcijah nevtrofilcev *in vivo* še ni dokončno potrjena.

Tako oksidativni kot encimski mehanizmi lahko neodvisno drug od drugih sicer uničijo nekaj mikrobov, vendar kombinacija obojih znatno poveča antimikrobni potencial nevtrofilcev. Žal pa se obenem poveča tudi potencial za nastanek poškodb v gostiteljevih tkivih. Hidrolitične poškodbe tkiva in zaradi tega tudi kronični vnetni pogoji se lahko pojavijo, ko je premagana antioksidantna in antiproteazna zaščita. Oksidativni stres lahko poškoduje tkiva zaradi znižanja koncentracije ekstracelularnih antiproteaz pod raven, ki je potrebna za inhibicijo sproščenih proteaz (Smith, 1994).

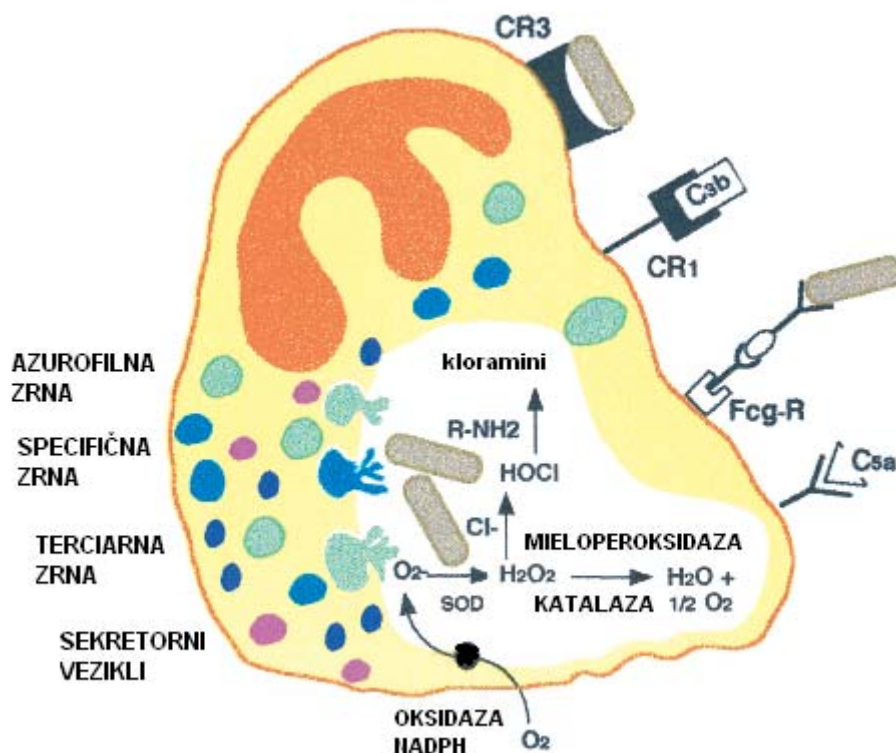
2.3.2 Encimski (od kisika neodvisni) mikrobicidni mehanizmi nevtrofilcev

Citoplazma nevtrofilcev je napolnjena z zrn. Znani so štirje tipi zrn, ki vsebujejo različne receptorje, encimske komponente in antimikrobne proteine (Smith, 1994; Borregaard in sod., 1995). Prevladujeta azurofilni in specifični tip zrn (Segal, 2005).

Azurofilna zrna vsebujejo veliko proteolitičnih in saharolitičnih encimov, zmožnih razgradnje mikrobnih strukturnih proteinov in mukopolisaharidov. Specifična zrna so napolnjena z vezavnimi proteini, kot je laktoferin, ki mikroorganizmom odvzema esencialna hranila, z lizocimom ter kolagenazo, ki uničujeta komponente celičnih ovojnici. Hidrolitični encimi prispevajo k poškodbam, ki jih povzročajo RKZ in sodelujejo v razgradnji odmrlih mikrobov in poškodovanih gostiteljevih celic. Elastaza in katepsin G hidrolizirata proteine v bakterijski celični ovojnici, lizocim pa razgradi polisaharidne komponente. Defenzini so majhni antimikrobni peptidi, citotoksični za širok spekter bakterij, gliv in nekaterih virusov, in predstavljajo od 30 do 50 % azurofilnih proteinov (Smith, 1994).

Poleg katepsinov, defenzinov, elastaze in lizocima je pomembna tudi mieloperoksidaza, ki predstavlja 25 % azurofilnih proteinov in katalizira od H_2O_2 odvisno oksidacijo halidnih ionov (Cl). Specifična zrna vsebujejo še številne membranske proteine, vključno s flavocitokromom b_{558} (Segal, 2005).

Preostala dva tipa citoplazemskih zrn sta terciarni tip, ki vsebuje želatinazo, in sekretorni vezikli, ki predstavljajo dragocen rezervoar membranskih komponent. Njihovo zlitje s plazemsko membrano nadomesti proteine, ki se porabljajo za proces fagocitoze, in tudi druge plazemske proteine, kot sta receptor za komplement (CR1) in citokrom b_{558} (Segal, 2005).



Slika 4: Oksidativni in encimski mehanizmi delovanja nevtrofilcev (Witko-Sarsat in sod., 2000: 625).

2.4 VNETHJE GENITALNEGA TRAKTA, LEVKOCITI IN RKZ

Poslabšanje funkcionalnih lastnosti semena zaradi čezmernega nastajanja RKZ ali oslabljenih antioksidativnih mehanizmov je pomemben dejavnik moške neplodnosti. Levkociti so glavni vir RKZ v semenu, sproščajo pa se lahko tudi iz spermijev slabe kakovosti. Povezava med okužbo ali vnetjem moškega genitalnega trakta in sproščenimi RKZ je še vprašljiva oziroma je malo poročil o tem, da so visoke koncentracije RKZ posledica okužbe. Razlog je predvsem v tem, da je težko natančno določiti mesto in izvor RKZ, najdenih v semenu (Ochsendorf, 1999).

Aktivacija levkocitov v semenu lahko med vnetjem genitalnega trakta sproži sproščanje proteolitičnih encimov, citokinov in RKZ. Znano je, da lahko levkociti neugodno vplivajo na funkcije spermijev, odvisno od lokacije vnetja, aktivacijskega statusa levkocitov in količine nastalih RKZ ter protivnetnih lastnosti posameznika (Wolff, 1995). V semenski plazmi so spermiji v stiku z levkociti precej kratek čas, to je od ejakulacije do vstopa v

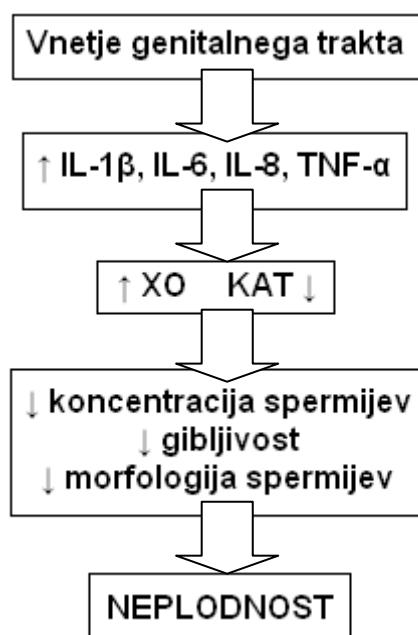
maternični vrat (cerviks). Poleg tega ima semenska plazma učinkovite obrambne mehanizme, ki preprečujejo celične poškodbe, če ni čezmernega števila levkocitov. Visoke levkocitne koncentracije lahko premagajo obrambne mehanizme, do prvega stika z RKZ pa lahko pride med vnetjem nadmodka ali mod, kjer ni zaščitnih antioksidantov. V takih okoliščinah RKZ škodljivo vplivajo na spermije. Poškodbe nastajajo tudi po odstranitvi semenske plazme v postopkih priprave semena za pomožne reprodukcijske tehnike (umetna oploditev) (Ochsendorf, 1999).

Limfociti in makrofagi v semenu izhajajo v veliki meri iz nadmodka in mod, medtem ko k prisotnosti nevtrofilcev največ prispevata prostata in semenjak (Ochsendorf, 1999). Levkociti v prostati so lahko povezani z vnetjem, ker izločki normalne prostate zelo redko vsebujejo nevtrofilce (Schaeffer in sod., 1981, cit. po Ochsendorf, 1999). V primeru levkocitospermije naj bi bila prostata glavni vir levkocitov v semenu (Wolff, 1995).

Pasqualotto in sod. (2000) so raziskali oksidativni stres v semenu pacientov s kroničnim prostatitisom in v semenu zdravih moških ter vpliv levkocitospermije na količino RKZ v semenu. Primerjali so tri skupine moških: tiste s kroničnim prostatitisom in levkocitospermijo, tiste s kroničnim prostatitisom brez levkocitospermije in kontrolno skupino zdravih posameznikov. Količina RKZ pri pacientih z levkocitospermijo je bila značilno višja v primerjavi s pacienti brez levkocitospermije in kontrolami. Količina RKZ se ni razlikovala med pacienti brez levkocitospermije in kontrolami. Skupna antioksidativna kapaciteta semenske plazme je bila glede na kontrole značilno nižja tako pri pacientih s kroničnim prostatitisom in levkocitospermijo kot pri pacientih s kroničnim prostatitisom brez levkocitospermije. Med pacienti z in brez levkocitospermije v skupni antioksidativni kapaciteti ni bilo razlik. Avtorji so v tej študiji dokazali visoke koncentracije RKZ in nizko raven antioksidativne kapacitete v semenski plazmi pacientov s kroničnim prostatitisom in na podlagi tega predvidevali, da so pacienti z levkocitospermijo bolj izpostavljeni tveganju za razvoj neplodnosti od tistih z enako boleznijo brez levkocitospermije. Povišana raven RKZ, znižanje antioksidativne kapacitete in nastanek oksidativnega stresa je lahko eden izmed možnih mehanizmov, ki prispeva k neplodnosti v tej populaciji pacientov.

Sanocka in sod. (2003) so prikazali, da čezmerno nastajanje RKZ v semenu med genitalno okužbo lahko spremeni oksidativno in antioksidativno aktivnost v semenski plazmi. Zdi se, da vnetni citokini IL-1 β , IL-6, IL-8 in TNF- α vzdržujejo aktivnost oksidativnih in antioksidativnih encimov in lahko resno vplivajo na osnovne parametre semena. IL-1 β , IL-6 in IL-8 so se izkazali kot statistično značilni pokazatelji patoloških procesov v semenu. Hipotetično, patogeni bakterijski sevi v semenu lahko povzročijo povišanje koncentracije citokinov, ki lahko izmenoma odpravijo aktivnost katalaze in povečajo delovanje ksantin oksidaze. Te spremembe so posledice prisotnosti RKZ, izčrpavajo antioksidativno kapaciteto in zaradi tega okvarjajo membransko strukturo spermijev. Citokini naj bi imeli odločilno vlogo pri dolgotrajnih vnetnih procesih in so lahko pomemben posrednik med vnetjem in moško neplodnostjo. V študiji iz leta 2004 so isti avtorji raziskovali antioksidativni status semenske plazme moških z genitalno okužbo. V raziskavo sta bili vključeni dve skupini moških: plodni z normalnim izvidom spermiograma in neplodni s patološkim izvidom spermiograma. Vsaka skupina je bila razdeljena na več podskupin pacientov glede na prisotnost levkocitov in bakterij v ejakulatu. Vdor mikrobov v moški genitalni trakt in njegove posledice so avtorji razvrstili v tri različne stopnje. V prvi stopnji, takoj po okužbi, so lahko v semenu opaženi patološki bakterijski sevi, na začetku okužbe še brez značilnega števila privabljenih levkocitov. V drugi stopnji se v ejakulatu pojavijo aktivirani levkociti, najverjetneje kot del imunskega odziva na prisotne mikrobe. V tretji stopnji, ko imunski sistem odstrani bakterije, so levkociti še nekaj časa prisotni v semenu. Vdor mikrobov najverjetneje povzroči porušenje ravnotežja med oksidativnimi in antioksidativnimi sistemi v semenu, in sicer z aktivacijo levkocitov, nastajanjem RKZ in povečanjem koncentracij vnetnih citokinov. V prvi stopnji lokalnega vnetja se oksidativni stres vzdržuje z delovanjem ksantin oksidaze, dobro znanega vira RKZ, ki zmanjšuje delovanje katalaze. V vzorcih z levkocitospermijo nastajanje RKZ v večini primerov presega fiziološke potrebe in lahko vodi v neplodnost, kadar je začetna antioksidativna kapaciteta semena močno zmanjšana. V študiji so ugotovili, da se je v skupini plodnih pacientov z genitalno okužbo v drugi stopnji vnetne reakcije oksidativna aktivnost zmanjševala vse do točke, ko začnejo prevladovati antioksidanti, to je v tretji stopnji okužbe. Nasprotno je v skupini neplodnih pacientov ostala visoka raven aktivnosti ksantin oksidaze tudi po odstranitvi mikrobov, kar še dodatno prispeva k poškodbam spermijev. Koncentracije IL-8 in IL-6 so bile v obeh glavnih skupinah jasno povečane, po infiltraciji

levkocitov pa so bile razlike med skupinama še bolj očitne. V tej stopnji okužbe so v skupini plodnih moških opazili značilno povečane koncentracije IL-6, medtem ko so v skupini neplodnih koncentracije IL-1 β in IL-8 dosegle najvišje vrednosti. Avtorji predvidevajo, da okužba genitalnega trakta pri neplodnih pacientih lahko povzroči prevlado oksidantov v semenu, kar lahko dodatno oslabi oploditveno sposobnost spermijev in poslabša prognozo plodnosti.



Slika 5: Odnos med citokini, oksidanti, antioksidanti in lastnostmi semena (Sanocka in sod., 2003: 452).

Sharma in sod. (2001) so v svoji študiji dokazali pozitivno korelacijo med oksidativnim stresom in naraščajočim številom levkocitov v semenu. Minimalnega števila na stres vplivajočih levkocitov niso ugotovili, saj se je izkazalo, da se je količina RKZ povečala celo pri pacientih z zelo nizkimi koncentracijami levkocitov, to je pod mejno vrednostjo, ki jo predpisuje WHO. Prisotnost kakršnih koli levkocitov, ne glede na njihovo število, je bila povezana z oksidativnim stresom. Natančen vzrok za prisotnost levkocitov v semenu ni pojasnjen. Po navedbah Kiesslingove in sod. (1995) je privabljanje levkocitov lahko pospešeno zaradi vnetja genitalnega trakta, ki ga najprej povzročijo bakterije, nato pa se v njihovi odsotnosti nadaljuje zaradi nepretrgane imunološke aktivnosti. Levkociti naj bi sodelovali tudi pri odstranjevanju nenormalnih spermijev.

Okužbe pomožnih spolnih žlez, epididimitis in orhitis vodijo vsaj začasno v poslabšanje in nepravilnosti v poteku spermatogeneze (Keck in sod., 1998). Tako okužba sama kot tudi bakterije lahko poslabšajo kakovost semena (Eley in sod., 2005). Da sta levkocitospermija in bakteriospermija v neplodnih moških lahko dva neodvisna pojava, še posebej če ni prisotnih značilnih znakov okužbe, so v študiji zaključili Lackner in sod. (2006). V preiskovanih značilnostih semena moških z in brez levkocitospermije in bakteriospermije niso našli statistično značilnih razlik, ne glede na prisotnost znakov okužbe v ejakulatu.

Nastajanje čezmernih količin RKZ je posledica privabljanja levkocitov v reproduktivni sistem, vprašanje pa je, katero je kritično mesto nastanka RKZ: prostata, semenjak ali nadmodek. Privabljanje levkocitov je lahko infektivnega izvora (bakterije, virusi, *Chlamydia*, *Ureaplasma*), lahko pa je posledica vnetnih pogojev, ki se razvijejo zaradi odstranjevanja nenormalnih spermijev ali prisotnosti kemičnih dražljajev (kajenje, alkohol) (Vicari, 1999). Tudi trajanje stikov med spermiji in levkociti se močno razlikuje v posameznih predelih genitalnega trakta. Wolff (1995) navaja, da so spermiji lahko zelo bežno izpostavljeni levkocitom, ki izvirajo iz prostate in semenjaka, medtem ko so v nadmodku stiki med spermiji, makrofagi in limfociti močnejši.

Klinični pomen povečanega števila levkocitov v semenu ostaja predmet razprav in raziskovanj. Kakor koli, najpogostejši vzrok za povišan delež fagocitnih celic v ejakulatu je genitourinarna okužba ali vnetje (Fraczek in Kurpisz, 2007). Prisotnost levkocitov v semenu kot taka ni patološka, saj vsak ejakulat vsebuje nekaj levkocitov. Večina avtorjev se strinja, da je določanje števila levkocitov v semenu pomembno, vendar pa ni kritično za odkrivanje okužbe ali vnetja v reproduktivnem traktu. Bolj kot samo število levkocitov v semenu je njihova aktivnost tista, ki določa učinke oksidativnega stresa na spermije (Sanocka in sod., 2003). Polega tega lahko aktivirani levkociti po odstranitvi mikrobov zavirajo obnovitev normalnega oksidativnega ravnotežja v semenu (Sanocka in sod., 2003). Ne glede na različna mnenja o izvoru in številu levkocitov v semenu se večina avtorjev strinja tudi v tem, da levkociti zmanjšujejo oploditveni potencial spermijev, v glavnem s sproščanjem dodatnih RKZ in z izločanjem številnih aktivnih bioloških snovi, kot so proteaze in vnetni citokini, ki nato stopnjujejo vnetni proces (Fraczek in Kurpisz, 2007).

2.5 VPLIVI RKZ NA SPERMIJE

2.5.1 Fiziološki pomen RKZ

Zelo nizke in nadzorovane koncentracije RKZ imajo pomembno vlogo v fiziologiji spermijev, še posebej pri pripravi spermija na oploditev. Fiziološke učinke RKZ na spermije so povzeli de Lamirande in sod. (1997). Kapacitacija in akrosomska reakcija spermijev sta oksidativna procesa; nizke koncentracije RKZ, dodane od zunaj, ali neznatne količine, ki jih tvorijo spermiji, so potrebne za sprožitev teh procesov *in vitro*. Spermiji v svojem osnovnem stanju proizvajajo zelo majhne količine RKZ. Med inkubacijo v pogojih, ki omogočajo kapacitacijo, se stimulira nastanek superoksida prek delovanja oksidaze, ki še ni povsem raziskana. Superoksid in vodikov peroksid lahko v odvisnosti od eksperimentalnih pogojev sprožita kapacitacijo. Pospeši jo tudi dušikov oksid, čeprav aktivnost sintaze dušikovega oksida v teh celicah ni bila zaznana, kar nakazuje, da te dušikove zvrsti izvirajo iz tkiv v ženskem genitalnem traktu. Akrosomska reakcija v kapacitiranih spermijih dalje stimulira nastanek superoksidnega iona, ki povzroči sproščanje prostih maščobnih kislin iz plazemske membrane spermijev in na ta način poveča njeno fluidnost. Majhne količine RKZ so potrebne tudi za vezavo spermijev na zono pelucido jajčne celice. Med nastajanjem in odstranjevanjem RKZ se mora vzdrževati natančno ravnotežje, obenem morajo biti RKZ zagotovljene ob pravem času, drugače so normalne spermalne funkcije oslABLJENE.

2.5.2 Patološki vplivi RKZ

Čezmerne količine RKZ, ki premagajo antioksidativne obrambne mehanizme spermijev in semenske plazme, povzročajo oksidativni stres. Ta lahko deluje na vse celične komponente, kot so lipidi, proteini, nukleinske kisline in sladkorji, posledica pa je nastanek celičnih poškodb in okvar v delovanju spermijev. Obseg oksidativnih poškodb ni odvisen samo od vrste in količine vpletenih RKZ, ampak tudi od tega, kako dolgo so celice izpostavljene RKZ in kakšni so zunajcelični dejavniki (temperatura, koncentracije ionov, proteinov, antioksidantov) (Agarwal in sod., 2003).

2.5.2.1 Peroksidacija lipidov

Membrana spermijev je bogata s polinenasičenimi maščobnimi kislinami in je zato zelo občutljiva za delovanje RKZ, kar vpliva na zmanjšanje gibljivosti spermijev, domnevno preko hitre izgube znotrajceličnega adenzin-tri-fosfata (ATP), to pa vodi v poškodbe aksoneme, zmanjšano viabilnost in pogostejše poškodbe srednjega dela s škodljivimi vplivi na kapacitacijo in akrosomsko reakcijo (Sikka, 1996). Peroksidacija lipidov v membrani spermijev je ključni mehanizem delovanja RKZ in nastanka oksidativnih poškodb, ki lahko vodijo v neplodnost.

Močan sprožitelj lipidne peroksidacije je hidroksilni radikal. Večina membranskih polinenasičenih maščobnih kislin ima nekonjugirane dvojne vezi, ki so ločene z metilenskimi skupinami. Prisotnost dvojne vezi poleg metilenske skupine naredi vez med metilenskim ogljikom in vodikom šibkejšo, zato je vodik bolj dovzeten za odstranitev. Ko je vodik odstranjen, se nastali radikal stabilizira s prerazporeditvijo dvojnih vezi, pri čemer nastane konjugiran dienski radikal, ki se lahko oksidira. Konjugirani dieni hitro reagirajo s kisikom in tvorijo lipidne peroksilne radikale (ROO[•]), ki izrinejo vodikove atome iz drugih lipidnih molekul in tvorijo lipidne hidroperoksidge (ROOH). Ti so stabilni pod fiziološkimi pogoji, dokler ne reagirajo s kovinami, kot so železove in bakrove soli. Te kovine ali njihovi kompleksi povzročijo nastanek alkoksilnih in peroksilnih radikalov, ki nato nadaljujejo verižno reakcijo znotraj membrane in razširijo poškodbe po celici. Širjenje

lipidne peroksidacije je odvisno od antioksidativne obrambe spermijev (Agarwal in sod., 2003).

2.5.2.2 Poslabšanje gibljivosti spermijev

Neposredno delovanje RKZ poškoduje mitohondrije in s tem zmanjša energetski status celic. Gibljivost spermijev je od adenzin-tri-fosfata (ATP) odvisen proces, tega pa zagotavljajo neokrnjeni mitohondriji z oksidativno fosforilacijo. Zaradi zmanjšane fosforilacije proteinov aksoneme se poslabša gibljivost.

Armstrong in sod. (1999) so v svoji raziskavi potrdili aktivnost oksidaze NADPH levkocitov v semenu, ki lahko proizvaja zadostne količine RKZ za inhibicijo gibanja spermijev. Na spermije je najbolj toksično deloval vodikov peroksid. Čeprav se po delovanju RKZ na spermije ni povečala lipidna peroksidacija, avtorji predvidevajo, da akutni učinki razmeroma velikih količin RKZ povzročijo neposredno škodo bodisi sistemom za pridobivanje celične energije ali pa sami aksonemi spermijev, medtem ko v primeru levkocitospermije neprestano tvorjenje RKZ s strani levkocitov vodi v povečano peroksidacijo lipidov v membranah in posledično v zmanjšanje gibljivosti in oploditvenega potenciala. Učinki superoksidnega iona na gibanje spermijev niso bili značilni. Da superoksid nima tako pomembnega vpliva na inhibicijo gibanja in tvorbo ATP, je posledica dejstva, da so biološke membrane slabo prepustne za ione, poleg tega notranja mitohondrijska membrana vsebuje tudi velike količine kardiolipina, ki predstavlja še dodatno oviro za prehajanje ionov.

2.5.2.3 Poškodbe DNK

Jedrni kromatin spermijev je močno zgoščen. K temu največ prispevata nadomestitev histonov s protamini in povečana tvorba disulfidnih vezi. Zaradi tega je DNK spermijev dobro odporna proti fizikalni ali kemični denaturaciji. Spermiji v semenu slabše kakovosti nimajo samo sposobnosti za tvorbo velikih količin RKZ, ampak so tudi bolj dovzetni za poškodbe DNK, povzročene z oksidativnim stresom. RKZ povečajo pogostnost enojno in

dvojno verižnih razpok v DNK. Poškodbe se odražajo v obliki spremenjenih baz, delecij in kromosomskih preureditev (Lopes in sod., 1998).

Mesto nastanka RKZ, ali znotraj spermijev samih ali zunajcelično s strani levkocitov, ima pomembno vlogo za spermalne funkcije. RKZ znotrajceličnega izvora imajo večji vpliv na neokrnjenost DNK, medtem ko RKZ iz levkocitov delujejo na gibljivost. Med RKZ, ki jih proizvajajo levkociti, lahko prek citoplazemske membrane prehaja vodikov peroksid, superoksid in hidroksilni radikal pa te zmožnosti nimata. Zato zunajcelične RKZ, ki ne prehajajo prek membran, oksidirajo fosfolipide in povzročijo lipidno peroksidacijo, ki vpliva na delovanje spermijev in njihovo morfologijo. RKZ različnega izvora imajo drugačen mehanizem delovanja (Henkel in sod., 2005).

2.6 APOPTOZA SPERMIJEV

Celična smrt je sposobnost celic, da se same uničijo, ko za to nastopijo določene okoliščine. Apoptozo opisujejo kot samomor celice, za katerega je značilna vrsta morfoloških in biokemičnih sprememb. Smrt celice je lahko posledica fizioloških procesov v razvoju osebka ali pa nastopi kot odziv na različne škodljivosti, povzročene z nefiziološkimi procesi. Apoptoza služi v večceličnih organizmih kot čist in zadosten mehanizem za odstranjevanje nezaželenih celic, ki so ali nastale kot višek, ali so bile poškodovane, ali pa njihove naloge niso več potrebne. Apoptoza je dejaven, postopen in genetsko nadzorovan proces z vnaprej določenim potekom dogodkov. Prav tako je apoptoza genetsko nadzorovan odziv celice na specifične dražljaje v času razvoja. V procesu apoptoze sodelujejo številni geni. Družina genov Bcl-2 deluje prek skupine produktov, ki zavrejo apoptozo, in skupine produktov, ki pospešujejo apoptozo. Zaviralca apoptoze sta gena Bcl-2 in Bcl-w, pospeševalca pa Bax in Bad. Gen Bcl-2 zavira apoptozo, ki jo povzročajo različni fiziološki in patološki dražljaji. Geni Bcl-2 se kažejo v mnogih embrionalnih tkivih, v celicah odraslih osebkov pa tam, kjer se celice hitro delijo in diferencirajo, npr. v modih. Gen p53 neposredno učinkuje na apoptozo tako, da uravnava delovanje genov Bcl-2 in Bax. Fas je celični površinski receptor in je odgovoren za prenos apoptotskih signalov (Štiblar-Martinčič, 2002).

Morfološke spremembe v apoptotski celici so naslednje: celica se skrči, kromatin se zgosti ob robu jedrne membrane, kar povzroči fragmentacijo DNK, na citoplazemski membrani se oblikujejo brstiči in v končni fazi celica razpade v apoptotska telesca, obdana z membrano, ki vsebujejo citoplazmo, jedrne fragmente in organele. Apoptotska telesca fagocitirajo makrofagi in jih odstranijo, ne da bi pri tem prišlo do vnetne reakcije. Fagocitoza je posredovana prek fosfatidilserina v citoplazemski membrani, ki se veže z receptorji na makrofagih. Spremembe v lipidnem dvosloju citoplazemske mebrane se pojavijo že zelo zgodaj v procesu apoptoze. Fosfatidilserin je normalno na notranji strani membrane žive celice. Sprememba položaja iz notranje na zunanjo stran membrane omogoča prepoznavo celic, ki so v zgodnji fazi apoptoze. *In vitro* lahko takšne celice določimo z uporabo aneksina V, označenega s fluoresceinom izotiocianatom (FITC). V kombinaciji z vitalnim barvilom propidijevim jodidom (PI) lahko med seboj razločimo žive, apoptotične in nekrotične populacije celic.

Eden izmed zgodnejših dogodkov v procesu apoptoze je tudi upadanje mitohondrijskega transmembranskega potenciala, ki se *in vitro* odraža z izgubo celične sposobnosti za kopičenje fluorokromov v mitohondrijih. Visoke koncentracije RKZ poškodujejo notranjo in zunanjo mitohondrijsko membrano. Posledica je sprostitvev citokroma c iz mitohondrijev, ki aktivira kaspaze in sproži apoptozo.

Ricci in sod. (2002) so raziskovali korelacijo med prisotnostjo levkocitov v semenu in apoptozo spermijev. Korelacije med koncentracijo levkocitov na ml semenske tekočine in odstotkom apoptotičnih celic niso našli. Značilno korelacijo so ugotovili med razmerjem levkociti : spermiji in odstotkom apoptotičnih celic. To naj bi pomenilo tesno povezavo med levkociti v semenu in apoptozo spermijev. Avtorji razlagajo to povezavo na dva načina: da so levkociti odgovorni za apoptozo spermijev ali pa apoptotični spermiji delujejo kemotaktično na levkocite. Prvo hipotezo podpirajo različni viri. Levkociti so glavni vir RKZ v semenu (Aitken in sod., 1994), RKZ pa povzročajo povečano fragmentacijo DNK spermijev (Lopes in sod., 1998) in so tudi znani sprožitelji apoptoze zrelih spermijev (Ramos in Wetzels, 2001). V prid druge hipoteze je dejstvo, da spermiji, ki vstopajo v apoptozo, na zunanji strani citoplazemske membrane izpostavijo fosfatidilserin, ki je kemotaktičen dejavnik za levkocite in ga prepoznajo fosfatidilserinski

receptorji na površini fagocita. Tej hipotezi so bolj naklonjeni tudi avtorji sami, ki so našli značilno korelacijo med razmerjem levkociti : spermiji in apoptotičnim indeksom (apoptotični : živi spermiji) tako pri neplodnih kot tudi pri plodnih moških. Našli so tudi dobro korelacijo med razmerjem levkociti : spermiji in apoptotičnim indeksom pri posameznikih z normalnimi vrednostmi koncentracije, gibljivosti in morfologije spermijev, kar nakazuje na fiziološko vlogo levkocitov v semenu. Avtorji menijo, da levkociti v primeru odsotnosti genitourinarne okužbe lahko z odstranjevanjem apoptotičnih spermijev nadzorujejo število nenormalnih ali odmirajočih spermijev. Koncentracije levkocitov korelirajo s koncentracijami spermijev, in ko se poveča hitrost odmiranja zaradi apoptoze, sorazmerno naraste tudi razmerje levkociti : spermiji.

Apoptoza je pomemben proces v reproduktivnih organih, kjer nastaja veliko več zarodnih celic, kot jih organizem potrebuje. Ključno vlogo ima v uravnavanju spermatogeneze, še posebej v primerih, ko se pojavijo nepravilnosti in je motena tvorba spermijev. Kakšen je biološki pomen apoptoze v ejakulirani spermi, še ni pojasnjeno. Ni še namreč znano, ali je apoptoza spermijev posledica abortivnega apoptotskega mehanizma, ki se lahko pojavi tekom spermatogeneze, ali pa se sproži po ejakulaciji (Agarwal in sod., 2003; Lachaud in sod., 2004). Po abortivnem mehanizmu apoptotski proces ni do konca zaključen in ne odstrani zarodnih celic, čeprav se je apoptotski program v teh celicah že sprožil. Takšne celice nadaljujejo spermatogenezo in spermiogenezo, posledica pa je, da imajo zreli spermiji apoptotske značilnosti, kar je pogost pojav v semenu neplodnih pacientov. Lachaud in sod. (2004) so prišli do ugotovitve, da so znaki apoptoze v ejakuliranih spermijih posledica procesov, začelih pred ejakulacijo, in da pride do propada zdravih ejakuliranih spermijev prej zaradi nekroze kot apoptoze. Ejakulirani spermiji naj ne bi imeli sposobnosti aktivacije apoptotske signalne kaskade.

Natančen pomen levkocitov v semenu še ni popolnoma pojasnjen, prav tako tudi ne odnos med levkociti, RKZ, ki jih tvorijo, in apoptozo spermijev. Ni še namreč jasno, ali so spermiji v ejakulatu sposobni sprožiti proces apoptoze kot odziv na zunanje spodbujevalce, kot so visoke koncentracije RKZ (Villegas in sod., 2005a).

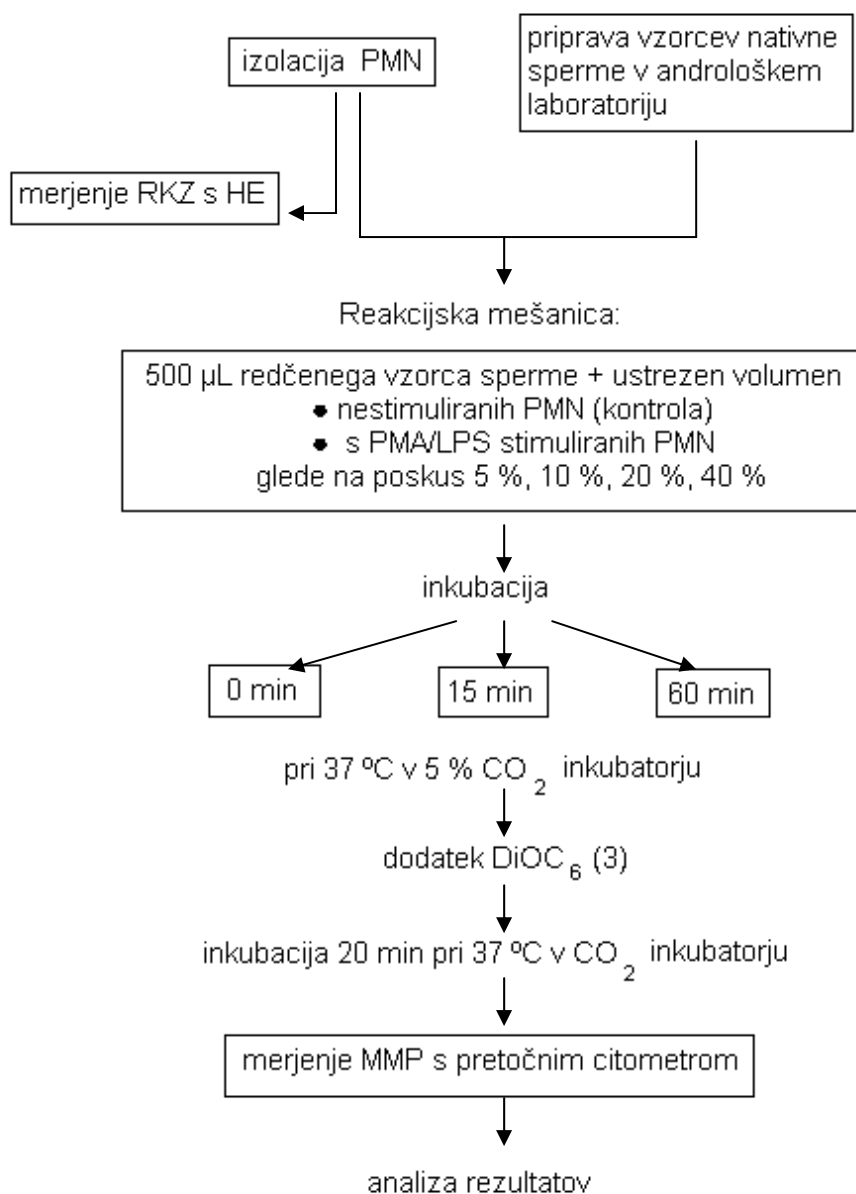
Villegasova in sod. (2005a) so ovrednotili vpliv RKZ, izvirajočih iz polimorfonuklearnih levkocitov (PMN), aktiviranih z bakterijami in forbol-12-miristat-13-acetatom (PMA), na raven aneksin V-pozitivnih spermijev v ejakulatu. Inkubacija spermijev z levkociti je sprožila premestitev fosfatidilserina v spermijih po dodatku PMA. Odstotek aneksin V-pozitivnih spermijev v primerjavi s kontrolo je bil značilno povišan po dodatku *Escherichie coli*. Ta porast je bil večji od porasta, opaženega pri inkubaciji spermijev s PMA aktiviranimi PMN. Po inkubaciji spermijev in levkocitov z *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* in *Staphylococcus aureus* je bil odstotek aneksin V-pozitivnih spermijev nižji v primerjavi s tistim po inkubaciji s PMA aktiviranimi PMN. *In vitro* poskus v tej raziskavi posnema situacijo *in vivo*, kadar so spermiji izpostavljeni vnetnim pogojem v prostati in materničnem vratu. Avtorji so dokazali značilen porast aneksin V-pozitivnih spermijev, kadar so bili ti inkubirani s PMN, ki so tvorili največ RKZ. Pri analizi odstotka aneksin V-pozitivnih spermijev v vzorcih, inkubiranih z visokimi koncentracijami RKZ, so našli značilno povečan odstotek v primerjavi s spermiji, inkubiranimi brez PMN ali z neaktiviranimi PMN. V tem poskusu so jasno prikazali, da RKZ, ki jih tvorijo aktivirani levkociti, ne vplivajo samo na funkcije spermijev, ampak so tudi zmožni povečati izražanje zgodnjega apoptotskega označevalca, ki je lahko škodljiv za spermije in v končni fazi privede do celične smrti. Prikazali so tudi, da je porast apoptotskega označevalca odziv na aktivacijo levkocitov z *E. coli*, ne pa tudi na aktivacijo z drugimi testiranimi bakterijami. Samo v primeru *E. coli* so bile koncentracije RKZ primerljive s tistimi, ki so jih tvorili s PMA aktivirani PMN. Takšni *in vitro* rezultati so v skladu z urogenitalnimi okužbami, kjer je *E. coli* glavni razlog za slabšo plodnost ali celo neplodnost. V večini primerov moških genitalnih okužb je *E. coli* povezana z oslabljenimi spermalnimi funkcijami (Köhn in sod., 1998, cit. po Villegas in sod., 2005a).

Med vnetimi dogajanji v moškem genitalnem traktu lahko levkociti zaradi izpostavitve bakterijam tvorijo večje koncentracije RKZ. S tem je lahko povezano povečano število spermijev, ki vstopajo v apoptozo. Dejavnik, ki stimulira apoptozo, je lahko tudi neposreden stik med spermiji, bakterijami ali njihovimi produkti, celo v odsotnosti RKZ. Villegasova in sod. (2005b) so raziskali, ali bakterije lahko sprožijo apoptozo spermijev neposredno ali samo posredno s stimulacijo levkocitov in povečano tvorbo RKZ. Kot prvim jim je uspelo prikazati, da inkubacija z bakterijami lahko sproži apoptozo spermijev.

Dokazali so, da apoptoza ni aktivirana izključno samo z RKZ, ampak se lahko začne tudi zaradi bakterij brez prisotnih RKZ. Neposredno delovanje mikroorganizmov ali njihovih metabolnih produktov lahko pojasni škodljive učinke genitalnih okužb na spermalne funkcije. *E. coli* je najpogosteje izoliran mikroorganizem pri pacientih z genitalno okužbo. Pomembno je dejstvo, da skoraj 75 % bakterij te vrste, izoliranih iz semena neplodnih pacientov, ustreza urinarnim serotipom, večinoma tistim z bički. Ti imajo veliko zmožnost neposredne pritrditve na spermije, posledica pa je njihovo zlepljanje in zmanjšanje gibljivosti.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SHEMA POTEKA DELA



Slika 6: Shema poteka dela.

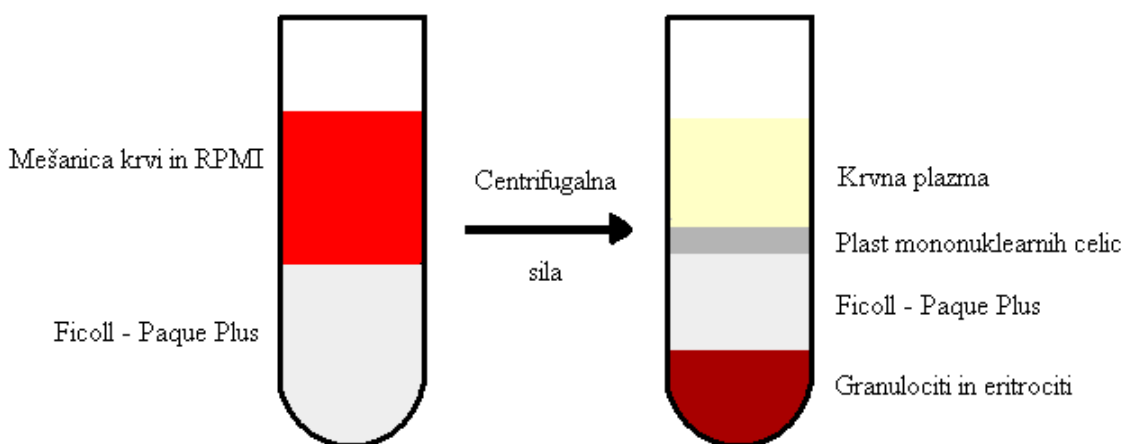
3.1.1 Potek dela

Poskus smo priredili po Villegasovi in sod. (2005a).

Po izolaciji PMN in pripravi vzorcev native sperme smo pripravili reakcijske mešanice. Poskus smo izvedli na štiri različne načine, glede na odstotek PMN v reakcijski mešanici (5 %, 10 %, 20 % in 40 %). Za vsako posamezno različico poskusa smo pripravili serijo treh epruvt z vzorcem sperme in dodatkom stimuliranih PMN ter serijo treh epruvt z vzorcem in dodatkom nestimuliranih PMN (kontrola). Iz vsake serije smo eno epruveto inkubirali 0 minut, drugo 15 minut in tretjo 60 minut. Po inkubaciji smo z dodatkom potenciometričnega barvila DiOC₆(3) merili mitohondrijski membranski potencial spermijev. Za stimulacijo PMN smo uporabili PMA in LPS. Oksidativni izbruh PMN smo preverjali s fluorescentnim barvilom hidroetidinom (HE).

3.2 IZOLACIJA POLIMORFONUKLEARNIH CELIC (PMN)

Polimorfonuklearne celice (PMN) smo izolirali iz sveže odvzete venozne krvi zdravih prostovoljnih darovalcev. Kri je bila odvzeta v epruvete z dodanim antikoagulansom heparinom. Volumen odvzete krvi je bil od 5 do 10 ml. Izolacijo smo izvedli po metodi Ficoll-Paque Plus (Sigma), ki temelji na ločevanju krvnih celic v gostotnem gradientu po izpostavitvi centrifugalni sili (slika 6).



Slika 7: Shematični prikaz ločevanja krvnih celic z metodo Ficoll-Paque Plus.

Vzorci krvi smo redčili z gojiščem RPMI v razmerju 1:1. V 12-mililitrskih centrifugirkah smo pripravili po 2 ml raztopine Ficoll-Paque Plus, na katero smo naplastili po 2 ml redčene krvi in centrifugirali 20 minut pri 1.800 obratih/min. Med centrifugiranjem so se različni tipi krvnih celic glede na svojo gostoto razporedili v ločene plasti. Ker so eritrociti gostejši od gradientnega materiala Ficolla, je na dnu centrifugirke nastala eritrocitna usedlina in takoj nad njo tanka plast granulocitov oz. PMN. Mononuklearne celice (MNC) so se zbrale na interfazi med plazmo in Ficollom. S Pasteurjevo pipeto smo previdno odstranili zgornji dve plasti do Ficolla: plazmo in trombocite ter plast MNC (limfociti in monociti). Dodali smo pufer HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; Sigma) do končnega volumna 8 ml, premešali in centrifugirali 10 minut. Odstranili smo supernatant do plasti nad eritrociti, premešali in dodali 2 ml pufera HEPES (Sigma) in 2 ml dekstrana za sedimentacijo eritrocitov. Centrifugirke smo postavili v stojalo za 1 uro pri sobni temperaturi. Po končani sedimentaciji smo previdno odvzeli supernatant s celicami PMN in ga prenesli v nove centrifugirke, pri čemer smo supernatant iz dveh centrifugirk združili v eno. Dodali smo HEPES do volumna 10 ml in centrifugirali 10 minut. Supernatant smo zavrgli, pelet s PMN smo pretresli na mešalu. Preostale sedimentirane eritrocite smo za 30 sekund izpostavili hemolizi z dodatkom 2 ml 1,6-odstotne raztopine NaCl in nato 5 minut centrifugirali. Previdno smo odlili supernatant, pretresli in spirali 30 sekund s 6 ml 0,2-odstotne raztopine NaCl za popolno odstranitev eritrocitov ter ponovno centrifugirali 5 minut. Odstranili smo supernatant, premešali in dodali vsaj 2 ml pufera HEPES ter še enkrat centrifugirali. Supernatant smo zavrgli in dodali 0,4 ml pufera HEPES ter izolat iz dveh centrifugirk združili v eno.

3.2.1 Določanje števila PMN

Izolirane PMN smo prešteli v števeni komori oz. hemocitometru po predhodnem barvanju s tripanskim modrilom. Izolat smo redčili s tripanskim modrilom v razmerju 1:10. V epruvetko smo odpipetirali 0,9 ml tripanskega modrila, pripravljenega v fiziološki raztopini, in dodali 0,1 ml dobro premešane suspenzije PMN. Pripravljeno mešanico smo pretresli in je 10 μ l nanesli na hemocitometer. Celice smo prešteli s svetlobnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi in izračunali število izoliranih PMN. Z dodatkom

ustreznega volumna gojišča RPMI smo pridobili celično suspenzijo s končno koncentracijo 1×10^6 PMN/ml.

3.3 PRIPRAVA VZORCEV NATIVNE SPERME

Za izvedbo poskusa smo uporabili vzorce nativne sperme naključno izbranih moških, ki so jim v androloškem laboratoriju na Ginekološki kliniki v Ljubljani opravili preiskavo kakovosti semenskega izliva – spermioogram. Vzorci so bili odvzeti v sterilno posodico z masturbacijo po nekajdnevem spolnem postu in analizirani najpozneje v eni uri od odvzema.

Rutinska analiza semena se izvaja po metodah in merilih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO). Vključuje oceno volumna semenskega izliva, koncentracijo in število spermijev, njihovo gibljivost, vitalnost in morfologijo. Ocenijo se še vrednost pH, barvo in viskoznost semenske tekočine ter prisotnost levkocitov. Koncentracijo spermijev so določili z uporabo Neubauerjeve števne komore pri 400-kratni povečavi. Rezultat so podali kot število spermijev v milijonih na ml ejakulata. Morfološke analize so izvedli po barvanju razmazov nativne sperme po Papanicolaou, delež spermijev z normalno in nenormalno morfologijo pa so določili pri 1000-kratni povečavi. Za določanje koncentracije levkocitov so uporabili reagent benzidin cianozin; po merilih WHO je normalna vrednost manj kot 1×10^6 levkocitov/ml. Delež živih spermijev so ocenili z uporabo barvila eozin/negrozin; normalna vrednost po WHO je večja od 0,75.

Izvid spermioograma je po merilih Svetovne zdravstvene organizacije normalen, če je koncentracija spermijev v ejakulatu 20×10^6 ali več spermijev/ml, če je delež v smeri hitro gibljivih spermijev nad 0,25 in če je v ejakulatu 30 % ali več spermijev z normalno morfologijo.

V androloškem laboratoriju so nam za vsak posamezen vzorec sperme posredovali vrednosti za koncentracijo spermijev, gibljivost, morfologijo in koncentracijo levkocitov.

Vzorci nativne sperme smo pred začetkom meritev RKZ in MMP redčili z ustreznim volumnom gojišča RPMI. Tako smo pridobili celično suspenzijo s končno koncentracijo 1×10^6 spermijev/ml. Meritve smo opravili najpozneje v dveh urah.

3.4 MERJENJE REAKTIVNIH KISI KOVIH ZVRSTI (RKZ) IN DODATNA STIMULACIJA S PMA IN LPS

Oksidativni izbruh PMN smo spodbudili z dodatno stimulacijo s PMA (forbol-12-miristat-13-acetat, Sigma) in lipopolisaharidom *E. coli* serotip O111:B4 (LPS) (Sigma). Za meritve RKZ smo uporabili fluorescentno barvilo hidroetidin (HE) (Molecular Probes).

3.4.1 Stimulacija PMN celic s PMA in LPS

3.4.1.1 Lastnosti PMA in LPS

PMA je forbolni ester, ki deluje kot aktivator proteinske kinaze C (PKC). Ta fosforilira določene citosolne komponente NADPH oksidaze v PMN. Fosforilacija je potrebna za aktivacijo oksidaze NADPH, rezultat njenega delovanja pa je redukcija molekularnega kisika v superoksidni anion.

LPS, komponenta celične stene po Gramu negativnih bakterij, se veže z LPS-vezavnim proteinom. Nastali proteinski kompleks se nato veže na receptor CD14 na površini PMN in sproži njihovo aktivacijo, s čimer se poveča oksidativni izbruh.

3.4.1.2 Priprava delovne raztopine PMA in LPS

Delovno raztopino PMA smo pripravili iz štok I raztopine PMA, shranjene pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki je bila pripravljena po navodilih proizvajalca (Sigma). V fijo lo z $2\text{ }\mu\text{l}$ štok I raztopine PMA smo tik pred uporabo dodali $998\text{ }\mu\text{l}$ medija RPMI in tako dobili delovno raztopino PMA s koncentracijo $3,24\text{ }\mu\text{M}$. Za stimulacijo smo v 1 ml celične suspenzije PMN s koncentracijo

1×10^6 celic/ml dodali 100 μ l delovne raztopine PMA. Končna koncentracija PMA v epruveti je bila 0,324 μ M.

Delovna raztopina LPS je bila pripravljena po navodilih proizvajalca (Sigma). Uporabili smo fujolo s 100 μ l raztopine LPS z delovno koncentracijo 5.000 ng/ml. Za stimulacijo smo v 1 ml celične suspenzije PMN s koncentracijo 1×10^6 celic/ml dodali 20 μ l delovne raztopine LPS. Končna koncentracija LPS v epruveti je bila 100 ng/ml.

Epruvete s stimuliranimi in nestimuliranimi PMN smo inkubirali 15 minut pri 37 °C v 5 % CO₂ inkubatorju.

3.4.2 Merjenje RKZ s hidroetidinom (HE)

3.4.2.1 Lastnosti HE

Hidroetidin je nenabita lipofilna spojina, ki ne fluorescira in prosto prehaja prek membran živih celic. V prisotnosti superoksidnega aniona, ki nastaja po stimulaciji PMN, oksidira v etidijev bromid. Ta je kationskega značaja in ne prehaja prek membrane, zato ostane ujet v celici. Vgradi se v DNK v jedru in fluorescira z rdečo barvo pri 590 nm valovne dolžine. Mehanizem fotokemične oksidacije HE v etidijev bromid še ni znan. Kot poročajo Zhao in sod. (2005), med reakcijo HE in superoksida nastane specifičen produkt 2-hidroksietidij z maksimumom fluorescence pri 567 nm. Ker se spektra fluorescence etidijevega bromida in 2-hidroksietidija prekrivata, se s filtri, ki so običajno v uporabi in ki merijo izsevano svetlobo valovne dolžine 580-610 nm, primarno zazna fluorescenco etidijevega bromida. Za zaznavo 2-hidroksietidija je optimalna emisijska valovna dolžina 560–570 nm (Zhao in sod., 2005).

3.4.2.2 Priprava delovne raztopine HE in postopek merjenja RKZ

Delovno raztopino HE smo pripravili iz štok I raztopine HE, shranjene v temi pri 4 °C, ki je bila pripravljena po navodilih proizvajalca (Molecular Probes). Delovno raztopino HE smo zaradi nestabilnosti pripravljali sproti. V 1 ml fosfatnega pufra (PBS) smo odpipetirali

2 μl štok I raztopine HE in premešali. Tako smo dobili delovno raztopino HE s koncentracijo 44,4 μM .

Za meritve RKZ smo v označenih epruveh pripravili reakcijsko mešanico s skupnim volumnom 155 μl in koncentracijo 1×10^6 celic/ml. Vzorcju sperme smo dodali ustrezen volumen PMN glede na odstotek PMN v mešanici (5 %, 10 %, 20 %, 40 %), pri čemer smo za vsak vzorec pripravili dve epruveti; v eno smo dodali stimulirane, v drugo nestimulirane PMN. V vsako epruveto smo odpipetirali še 45 μl 44,4 μM delovne raztopine HE in premešali. Končna koncentracija HE v epruveti je bila 10 μM . Pripravljene epruvete smo inkubirali 15 minut pri 37 °C v 5 % CO₂ inkubatorju. Po inkubaciji smo izmerili intenziteto svetilnosti posameznih vzorcev s pretočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson).

3.5 DOLOČANJE APOPTOZE SPERMIJEV

Apoptozo spermijev smo določili z uporabo potenciometričnega barvila DiOC₆(3) (3, 3-diheksiloksakarbocianin jodid), s katerim smo merili mitohondrijski membranski potencial (MMP) spermijev.

3.5.1 Lastnosti DiOC₆(3)

Karbocianinski fluorokrom DiOC₆(3) je eno izmed potenciometričnih barvil, ki se uporablja za določanje sprememb MMP spermijev in obenem tudi za oceno kakovosti sperme. Zaradi kationskega in lipofilnega značaja se kopiči v mitohondrijih odvisno od njihovega transmembranskega potenciala. Intenziteta fluorescence nakopičenega fluorokroma ustreza velikosti mitohondrijskega potenciala. Zmanjšano obarvanje celic z DiOC₆(3) kaže na upadanje MMP spermijev in motnje v neokrnjenosti organelov (Armstrong in sod., 1999). Barvanje celic z DiOC₆(3) je odvisno tako od potenciala mitohondrijske membrane kot od potenciala plazemske membrane (Salvioli in sod., 1997).

3.5.2 Merjenje MMP spermijev

V šest označenih epruvet smo odpipetirali 500 μl vzorca native sperme s koncentracijo 1×10^6 spermijev/ml. V tri epruvete smo dodali ustrezen volumen stimuliranih PMN glede na različico (5 %, 10 %, 20 %, 40 %), v preostale tri pa ustrezen volumen nestimuliranih PMN (kontrola). Od treh epruvet smo eno inkubirali 0 minut, drugo 15 minut in tretjo 60 minut pri 37 °C v 5 % CO_2 inkubatorju. Po inkubaciji smo dodali 5 μl 0,05 μM DiOC₆(3) in inkubirali še dodatnih 20 minut pri 37 °C v 5 % CO_2 inkubatorju. Nato smo izmerili intenziteto svetilnosti vzorcev s pretočnim citometrom FACSCalibur (Becton Dickinson). Meritve smo analizirali s programom CellQuest.

3.6 STATISTIČNA ANALIZA

V računalniškem programu Excel smo izračunali povprečne svetilnosti celičnih populacij v vzorcih, standardne odklone in intervale zaupanja. Za primerjavo smo izračunali povprečne indekse stimulacije in indekse svetilnosti. Primerjavo smo potrdili s parnim t-testom. Vrednosti $p < 0,05$ smo obravnavali kot statistično značilne.

4 REZULTATI

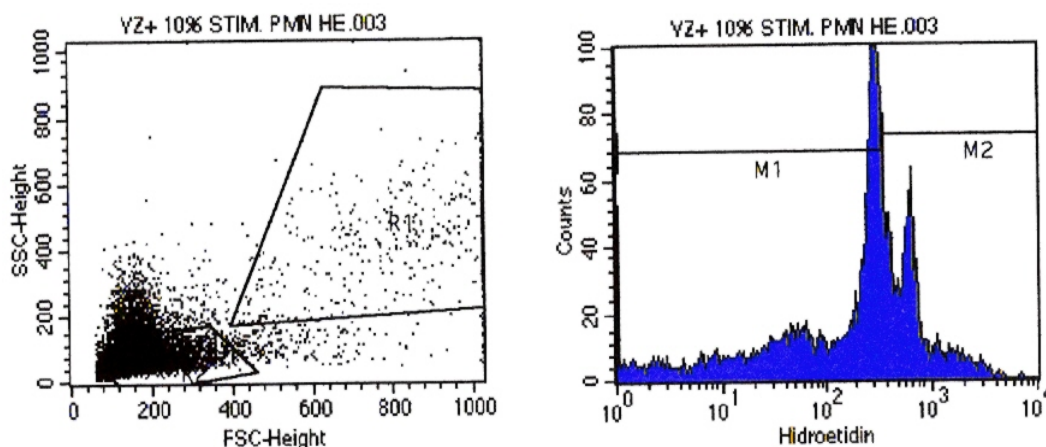
4.1 CITOFLUOROMETRIČNE ANALIZE

Meritve, ki smo jih opravili s pretočnim citometrom, smo obdelali z računalniškim programom CellQuest. Program poda rezultate v obliki točkovnega diagrama. Vsaka točka na diagramu predstavlja analizirano celico. V vzorcu, ki vsebuje mešano populacijo celic, se posamezna populacija na točkovnem diagramu razvrsti glede na velikost in granularnost. Če želimo analizirati specifično populacijo celic v vzorcu, jo na diagramu označimo s postavitvijo meje oziroma označimo regijo za nadaljno analizo. Za dogodke oziroma celice v izbrani regiji program izriše histogram glede na izbrani parameter (fluorescenca) in izpiše pripadajočo statistiko.

S točkovnimi diagrami in histogrami smo v tej nalogi prikazali nekaj posameznih primerov. Preostale rezultate smo uredili v tabele in jih statistično obdelali.

4.1.1 Merjenje oksidativnega izbruha PMN

Z uporabo barvila HE smo preverili delovanje oksidativnega izbruha PMN in nastanek RKZ v mešanici spermijev in PMN. Rezultate pretočne citometrije smo analizirali tako, da smo na točkovnem diagramu FSC/SSC z regijama R1 in R2 označili ločeni populaciji PMN in spermijev v posameznem vzorcu. Izbrani regiji R1 in R2 smo uporabili kot vrata analize (ang. gate) za izris histogramov svetilnosti. Na ta način smo določili skupno povprečno svetilnost posameznega vzorca (brez vrat analize, ang. no gate), povprečno svetilnost ločene populacije PMN (vrata G1) in povprečno svetilnost ločene populacije spermijev (vrata G2). S histogramov je bilo razvidno, da znotraj posamezne analizirane populacije celic obstajajo subpopulacije celic s šibkejšim ali močnejšim oksidativnim izbruhom. Zato smo se pri analizi osredotočili na subpopulacijo z večjo povprečno svetilnostjo, ki smo jo na histogramu označili z intervalom M2. Intenzivnejša svetilnost pomeni večjo količino nastalih RKZ.



Slika 8: Prikaz rezultatov merjenja RKZ s pretočnim citometrom. Levo je točkovni diagram z regijama R1 in R2, ki prikazujeta ločeni populaciji PMN in spermijev v vzorcu. Desno je histogram svetilnosti barvila HE. Intervala M1 in M2 označujeta celice z manjšo in večjo svetilnostjo.

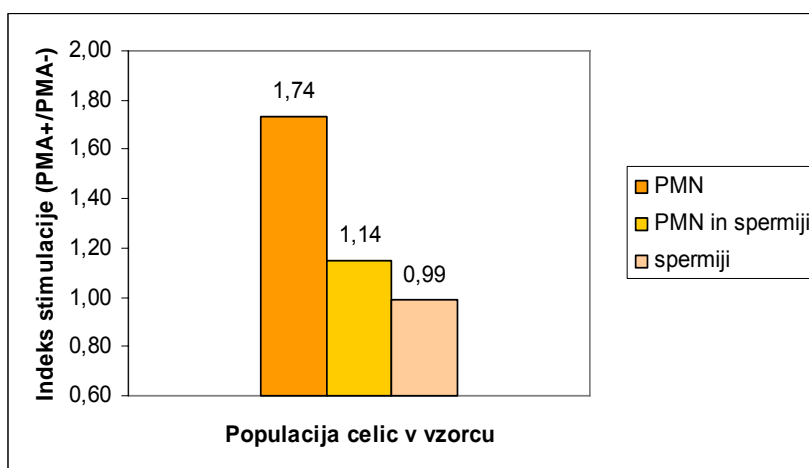
Oksidativni izbruh stimuliranih vzorcev smo primerjali z oksidativnim izbruhom nestimuliranih vzorcev. S tem smo želeli preveriti, ali dodatek PMA in LPS aktivira PMN in poveča tvorbo RKZ tako pri samih PMN kot tudi v mešanici spermijev in PMN. V preglednici 1 je prikazana analiza povprečnih svetilnosti ločenih populacij PMN in spermijev ter skupnih povprečnih svetilnosti vzorcev. Oksidativni izbruh smo izmerili v 8 vzorcih sperme, vendar smo nekatere vzorce vzporedno inkubirali z različnim deležem PMN. Tako smo dejansko opravili 20 meritev oksidativnega izbruha in jih analizirali skupaj ne glede na odstotek dodanih PMN. S parnim t-testom smo prikazali primerjavo med povprečnimi svetilnostmi nestimuliranih in stimuliranih vzorcev sperme. Pri izračunu indeksov stimulacije (PMA+/PMA-) smo kot osnovo uporabili povprečno svetilnost nestimuliranih vzorcev. Povprečni indeks stimulacije za posamezno populacijo celic v vzorcih smo grafično prikazali na sliki 9.

Opazili smo statistično značilno povečanje oksidativnega izbruha po stimulaciji vzorcev s PMA in LPS tako v ločeni populaciji PMN ($p=0,002$) kot v mešanici PMN in spermijev ($p = 0,012$). V primeru populacije PMN se je povprečna svetilnost povečala za 74%, skupna povprečna svetilnost vzorcev pa le za 14 %. V ločeni populaciji spermijev po stimulaciji ni prišlo do oksidativnega izbruha ($p = 0,222$), povprečni indeks stimulacije je bil manjši od 1.

Preglednica 1: Rezultati analize svetilnosti ločenih populacij celic v nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) vzorcih nativne sperme (N = 20; št. meritev oksidativnega izbruha).

	PMN			PMN in spermiji			spermiji		
	PMA–	PMA+	I stim.	PMA–	PMA+	I stim.	PMA–	PMA+	I stim.
povp. vred.	1.179,02	1.550,62	1,74	671,77	795,95	1,14	528,60	519,13	0,99
st. odklon	915,76	1.091,75	1,01	637,42	842,70	0,19	453,31	429,75	0,10
int. zaup.	401,34	478,47	0,44	279,35	369,32	0,08	198,67	188,34	0,04
parni t-test	0,002			0,012			0,222		

(I stim. = indeks stimulacije (PMA+/PMA–); povp. vred. = povprečna svetilnost; st. odklon = standardni odklon; int. zaup. = interval zaupanja)



Slika 9: Povprečni indeks stimulacije za ločeni populaciji PMN in spermijev ter mešanico PMN in spermijev v vzorcih.

V preglednici 2 smo primerjali povprečno svetilnost PMN in spermijev v nestimuliranih in stimuliranih vzorcih. S primerjavo smo pokazali, da je svetilnost PMN večja od svetilnosti samih spermijev oziroma, da PMN tvorijo več RKZ. Po stimulaciji se je količina RKZ še povečala, v primerjavi s spermiji skoraj za trikrat. S parnim t-testom smo prikazali statistično značilno razliko v nastanku RKZ med ločenima populacijama celic v vzorcih ($p < 0,05$ tako za nestimulirane kot stimulirane vzorce).

Preglednica 2: Primerjava povprečnih svetilnosti ločenih populacij PMN in spermijev v nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) vzorcih nativne sperme (N = 20; št. meritev oksidativnega izbruha).

	PMA–		PMA+	
	PMN	spermiji	PMN	spermiji
povp. vred.	1.179,02	528,60	1.550,62	519,13
st. odklon	915,76	453,31	1.091,75	429,75
int. zaup.	401,34	198,67	478,47	188,34
parni t-test	0,000011		0,000002	

(povp. vred. = povprečna svetilnost; st. odklon = standardni odklon; int. zaup. = interval zaupanja)

Oksidativni izbruh pri različnem deležu PMN v reakcijski mešanici smo prikazali v preglednici 3. Za vsako različico poskusa posebej smo izračunali povprečni indeks stimulacije. Največji indeks stimulacije smo opazili v reakcijski mešanici s 5 % dodanih PMN, v kateri je za ločeno populacijo PMN znašal kar 2,48, za ločeno populacijo spermijev pa samo 1,04. Pričakovali smo, da se bo z naraščajočim odstotkom dodanih PMN k vzorcem povečal tudi indeks stimulacije, vendar ni bilo tako. V primeru 10 % dodanih PMN je indeks za PMN znašal 1,84, pri poskusu z 20 % PMN 1,26 in pri poskusu s 40 % celo 0,82. Pri ločeni populaciji spermijev je bil indeks pri vseh štirih različicah približno enak, to je okrog 1. Tudi v mešanici spermijev in PMN ni bilo velikih razlik med posameznimi izvedbami poskusa, indeksi so se v povprečju razlikovali le za 13 %. Količina RKZ v vzorcih se zaradi večjega odstotka dodanih PMN ni povečala.

Preglednica 3: Primerjava povprečnih svetilnosti in indeksov stimulacije ločenih populacij celic v nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) vzorcih nativne sperme.

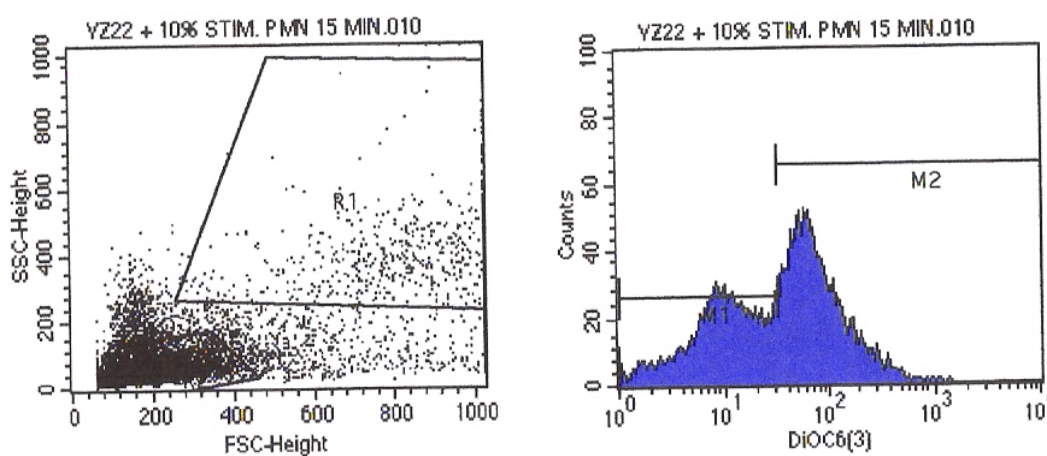
% PMN	N	PMN			PMN in spermiji			spermiji		
		PMA–	PMA+	I stim.	PMA–	PMA+	I stim.	PMA–	PMA+	I stim.
5	6	839,10	1.477,49	2,48	543,49	649,95	1,22	467,05	478,50	1,04
10	6	1.081,27	1.616,40	1,84	655,56	755,79	1,10	519,58	492,93	0,96
20	5	1.552,31	1.788,92	1,26	804,14	1025,84	1,15	601,76	577,20	0,95
40	3	1.432,18	1.168,16	0,82	740,14	785,09	1,08	547,83	556,00	1,00

(% PMN = delež dodanih PMN v reakcijski mešanici; N = št. meritev oksidativnega izbruha; I stim. = indeks stimulacije)

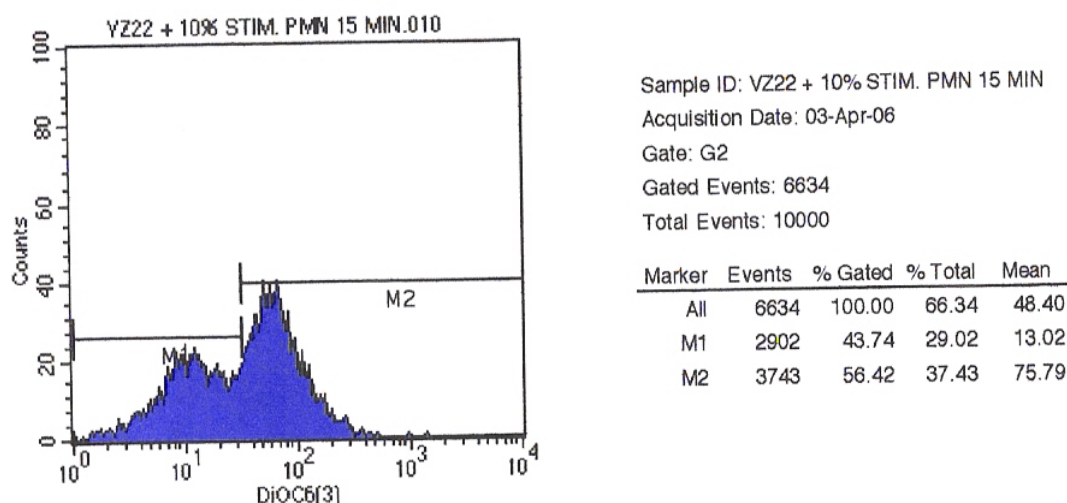
4.1.2 Merjenje MMP spermijev in določanje apoptoze

Po inkubaciji z barvilom DiOC₆(3) smo izmerili MMP v mešanici spermijev in PMN. Rezultate pretočne citometrije smo analizirali podobno kot rezultate oksidativnega izbruha

PMN. S postavitvijo regij R1 in R2 na točkovnem diagramu FSC/SSC smo označili ločeni populaciji spermijev in PMN v vzorcu. Za vsako populacijo celic smo izrisali histograme svetilnosti. Z intervaloma M1 in M2 smo označili subpopulaciji neaktivnih celic z nižjim MMP in aktivnih celic z višjim MMP. Tako smo določili odstotek aktivnih in neaktivnih spermijev ter pripadajočo povprečno svetilnost zajete populacije spermijev. Upadanje MMP oziroma zmanjšanje svetilnosti kaže na zmanjšano funkcionalnost mitohondrijev in lahko pomeni začetek apoptotičnega procesa.



Slika 10: Prikaz rezultatov merjenja MMP spermijev s pretočnim citometrom. Levo je točkovni diagram z regijama R1 in R2, ki prikazujeta ločeni populaciji PMN in spermijev v vzorcu. Desno je histogram svetilnosti barvila DiOC₆(3) v vzorcu (brez vrat analize). Intervala M1 in M2 označujeta celice z nižjim in višjim MMP.



Slika 11: Histogram svetilnosti barvila DiOC₆(3) v ločeni populaciji spermijev v vzorcu. Intervala M1 in M2 ločujeta subpopulaciji neaktivnih spermijev z nižjim MMP in aktivnih spermijev z višjim MMP.

Pri izračunavanju statističnih vrednosti smo se osredotočili na zajeto populacijo spermijev. Zanimal nas je vpliv oksidativnega izbruha PMN na mitohondrijsko aktivnost spermijev pri različnem deležu PMN v vzorcu in po različnih časih inkubacije. V preglednicah 4, 6, 8 in 10 smo zbrali povprečne svetilnosti subpopulacij aktivnih in neaktivnih spermijev v vzorcih glede na dolžino inkubacije (0, 15, 60 minut) in stimuliranost/nestimuliranost dodanih PMN. Vrednosti za posamezno različico glede na odstotek dodanih PMN smo prikazali v ločenih preglednicah. Dodali smo še povprečne svetilnosti populacij spermijev v vzorcih brez PMN. S parnim t-testom smo primerjali povprečne svetilnosti aktivnih spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih s stimuliranimi oziroma nestimuliranimi PMN po različnih časih inkubacije. Vrednosti parnega t-testa smo prikazali v preglednicah 5, 7, 9 in 11.

V poskusu s 5 % dodanih PMN (preglednica 4) ni bilo statistično značilnih razlik med svetilnostmi zajetih populacij spermijev. Mejna vrednost p (0,05) se je pokazala le v primeru 60-minutne inkubacije stimuliranih vzorcev. Tudi v poskusu z 10 % dodanih PMN (preglednica 6) ni bilo statistično značilnih razlik, z izjemo mejne vrednosti p (0,05) v primeru 15-minutne inkubacije nestimuliranih vzorcev. Razlika povprečnih svetilnosti spermijev v vzorcih brez PMN in vzorcih po 60-minutni inkubaciji je bila večja v poskusu z 10 % PMN; svetilnost je bila po inkubaciji nižja za okrog 30 %, v poskusu s 5 % PMN pa za 20 %. V poskusu z 20 % dodanih PMN (preglednica 8) smo dobili statistično značilno razliko ($p = 0,01$) v primeru 15-minutne inkubacije stimuliranih in nestimuliranih vzorcev ter v primeru 60-minutne inkubacije stimuliranih vzorcev ($p = 0,03$). Povprečna svetilnost aktivnih spermijev se je po 60-minutni inkubaciji znižala za približno 38 %. V poskusu s 40 % dodanih PMN (preglednica 10) so se svetilnosti značilno razlikovale samo v primeru 15-minutne inkubacije nestimuliranih vzorcev ($p = 0,02$), mejne vrednosti p (0,05) pa so se pokazale po 0-minutni inkubaciji in po 15-minutni inkubaciji stimuliranih vzorcev. Razlika povprečnih svetilnosti je bila kar za 60 % nižja od svetilnosti populacije spermijev v vzorcih brez PMN. Statistično značilno zmanjševanje povprečnih svetilnosti aktivnih spermijev s časom inkubacije smo ugotovili samo v štirih izvedbah poskusa. Glede na velike vrednosti parnega t-testa ne moremo trditi, da je dodatek PMN k vzorcu spermijev vplival na mitohondrijsko aktivnost spermijev.

Preglednica 4: Rezultati analize svetilnosti zajete populacije spermijev v vzorcih nativne sperme z dodanimi 5 % nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije (N = 8; št. vzorcev nativne sperme).

5 % PMN		čas (min)					
		0		15		60	
		povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.
PMA–	DiOC ₆ (3)–	8,25	6,35	7,49	5,17	6,76	4,28
	DiOC ₆ (3)+	52,56	26,22	49,07	22,52	43,35	19,47
PMA+	DiOC ₆ (3)–	8,99	5,89	8,12	7,12	7,26	5,51
	DiOC ₆ (3)+	59,63	27,63	48,80	23,77	42,46	24,85
brez PMN	DiOC ₆ (3)–	6,50	3,87				
	DiOC ₆ (3)+	54,13	23,01				

(DiOC₆(3)– = svetilnost neaktivnih spermijev; DiOC₆(3)+ = svetilnost aktivnih spermijev; brez PMN = vzorci nativne sperme brez dodanih PMN; povp. = povprečna svetilnost; int. zaup. = interval zaupanja)

Preglednica 5: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC₆(3)+) subpopulacij spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih z dodanimi 5 % nestimuliranih (PMA–) oziroma stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije (N = 8; št. vzorcev nativne sperme).

čas (min)	5 % PMN	PMA–	brez PMN	PMA+
0	DiOC ₆ (3)+	52,56	54,13	59,63
	parni t-test	0,40		
15	DiOC ₆ (3)+	49,07	54,13	48,80
	parni t-test	0,27		
60	DiOC ₆ (3)+	43,35	54,13	42,46
	parni t-test	0,06		
		0,05		

Preglednica 6: Rezultati analize svetilnosti zajete populacije spermijev v vzorcih nativne sperme z dodanimi 10 % nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije (N = 5; št. vzorcev nativne sperme).

10 % PMN		čas (min)					
		0		15		60	
		povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.
PMA–	DiOC ₆ (3)–	12,33	5,49	11,43	5,91	10,19	8,64
	DiOC ₆ (3)+	82,17	22,58	69,84	28,81	58,83	38,30
PMA+	DiOC ₆ (3)–	12,70	7,05	12,10	6,96	9,14	6,84
	DiOC ₆ (3)+	78,43	29,33	69,50	27,72	54,70	30,90
brez PMN	DiOC ₆ (3)–	11,13	5,18				
	DiOC ₆ (3)+	86,37	30,95				

(DiOC₆(3)– = svetilnost neaktivnih spermijev; DiOC₆(3)+ = svetilnost aktivnih spermijev; brez PMN = vzorci nativne sperme brez dodanih PMN; povp. = povprečna svetilnost; int. zaup. = interval zaupanja)

Preglednica 7: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC₆(3)+) subpopulacij spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih z dodanimi 10 % nestimuliranih (PMA–) oziroma stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije (N = 5; št. vzorcev nativne sperme).

čas (min)	10 % PMN	PMA–	brez PMN	PMA+
0	DiOC ₆ (3)+	82,17	86,37	78,43
	parni t-test	0,38		
			0,26	
15	DiOC ₆ (3)+	69,84	86,37	69,50
	parni t-test	0,05		
			0,13	
60	DiOC ₆ (3)+	58,83	86,37	54,70
	parni t-test	0,14		
			0,10	

Preglednica 8: Rezultati analize svetilnosti zajete populacije spermijev v vzorcih nativne sperme z dodanimi 20 % nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije (N = 6; št. vzorcev nativne sperme).

20 % PMN		čas (min)					
		0		15		60	
		povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.
PMA–	DiOC ₆ (3)–	8,36	3,25	8,24	2,95	8,02	4,59
	DiOC ₆ (3)+	61,44	18,83	55,99	18,36	57,16	26,34
PMA+	DiOC ₆ (3)–	9,59	3,63	9,19	3,83	8,16	3,73
	DiOC ₆ (3)+	71,48	19,41	59,66	18,76	55,23	19,88
brez PMN	DiOC ₆ (3)–	11,26	4,33				
	DiOC ₆ (3)+	91,54	27,40				

(DiOC₆(3)– = svetilnost neaktivnih spermijev; DiOC₆(3)+ = svetilnost aktivnih spermijev; brez PMN = vzorci nativne sperme brez dodanih PMN; povp. = povprečna svetilnost; int. zaup. = interval zaupanja)

Preglednica 9: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC₆(3)+) subpopulacij spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih z dodanimi 20 % nestimuliranih (PMA–) oziroma stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije (N = 6; št. vzorcev nativne sperme).

čas (min)	20 % PMN	PMA–	brez PMN	PMA+
0	DiOC ₆ (3)+	61,44	91,54	71,48
	parni t-test	0,06		
15	DiOC ₆ (3)+	55,99	91,54	59,66
	parni t-test	0,01		
60	DiOC ₆ (3)+	57,16	91,54	55,23
	parni t-test	0,05		
			0,03	

Preglednica 10: Rezultati analize svetilnosti zajete populacije spermijev v vzorcih nativne sperme z dodanimi 40 % nestimuliranih (PMA–) in stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije (N = 3; št. vzorcev nativne sperme).

40 % PMN		čas (min)					
		0		15		60	
		povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.
PMA–	DiOC ₆ (3)–	7,51	4,34	6,79	3,76	4,53	2,49
	DiOC ₆ (3)+	57,16	17,30	55,05	12,29	40,74	19,88
PMA+	DiOC ₆ (3)–	7,08	3,29	6,96	3,42	5,39	3,26
	DiOC ₆ (3)+	61,96	13,70	59,02	10,17	42,75	27,43
brez PMN	DiOC ₆ (3)–	12,23	3,08				
	DiOC ₆ (3)+	105,25	26,28				

(DiOC₆(3)– = svetilnost neaktivnih spermijev; DiOC₆(3)+ = svetilnost aktivnih spermijev; brez PMN = vzorci nativne sperme brez dodanih celic PMN; povp. = povprečna svetilnost; int. zaup. = interval zaupanja)

Preglednica 11: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC₆(3)+) subpopulacij spermijev v vzorcih brez PMN in v vzorcih z dodanimi 40 % nestimuliranih (PMA–) oziroma stimuliranih (PMA+) PMN po različnih časih inkubacije (N = 3; št. vzorcev nativne sperme).

čas (min)	40 % PMN	PMA–	brez PMN	PMA+
0	DiOC ₆ (3)+	57,16	105,25	61,96
	parni t-test	0,05		
15	DiOC ₆ (3)+	55,05	105,25	59,02
	parni t-test	0,02		
60	DiOC ₆ (3)+	40,74	105,25	42,75
	parni t-test	0,07		
			0,10	

V preglednici 12 smo prikazali vrednosti parnega t-testa, s katerim smo primerjali svetilnosti aktivnih in neaktivnih subpopulacij spermijev v nestimuliranih in stimuliranih vzorcih. S statistično značilnimi vrednostmi smo potrdili pričakovano večjo povprečno svetilnost aktivnih subpopulacij v primerjavi z neaktivnimi subpopulacijami spermijev v vzorcih. Večina vrednosti p je bila celo manjša od 0,01.

Preglednica 12: Primerjava med povprečnimi svetilnostmi aktivnih (DiOC₆(3)+) in neaktivnih (DiOC₆(3)-) subpopulacij spermijev v nestimuliranih (PMA-) in stimuliranih (PMA+) vzorcih nativne sperme po različnih časih inkubacije.

čas (min)		5 % PMN		10 % PMN		20 % PMN		40 % PMN	
		PMA-	PMA+	PMA-	PMA+	PMA-	PMA+	PMA-	PMA+
0	DiOC ₆ (3)-	8,25	8,99	12,33	12,70	8,36	9,59	7,51	7,08
	DiOC ₆ (3)+	52,56	59,63	82,17	78,43	61,44	71,48	57,16	61,96
	parni t-test	0,003	0,002	0,001	0,004	0,0009	0,0005	0,01	0,007
15	DiOC ₆ (3)-	7,49	8,12	11,43	12,10	8,24	9,19	6,79	6,96
	DiOC ₆ (3)+	49,07	48,80	69,84	69,50	55,99	59,66	55,05	59,02
	parni t-test	0,002	0,002	0,006	0,004	0,001	0,001	0,007	0,003
60	DiOC ₆ (3)-	6,76	7,26	10,19	9,14	8,02	8,16	4,53	5,39
	DiOC ₆ (3)+	43,35	42,46	58,83	54,70	57,16	55,23	40,74	42,75
	parni t-test	0,002	0,007	0,02	0,02	0,005	0,002	0,04	0,07

Povprečno svetilnost aktivnih spermijev po 15- in 60-minutni inkubaciji smo primerjali s povprečno svetilnostjo aktivnih spermijev, ki smo jo izmerili takoj po dodatku PMN k vzorcu nativne sperme, torej v času 0 minut. Izračunani indeksi svetilnosti so prikazani v preglednici 13. Indeksi, manjši od 1, nakazujejo, da so bile povprečne svetilnosti spermijev po inkubaciji s PMN manjše v primerjavi s tistimi v času 0 minut. Svetilnost stimuliranih vzorcev je bila le za okrog 6 % manjša od svetilnosti nestimuliranih vzorcev.

Preglednica 13: Indeks svetilnosti aktivne (DiOC₆(3)+) subpopulacije spermijev v nestimuliranih (PMA-) in stimuliranih (PMA+) vzorcih nativne sperme po 15- in 60-minutni inkubaciji vzorcev.

5 %	PMA-		PMA+	
	povp.	int. zaup.	povp.	int. zaup.
I svetil.				
15/0 min	1,21	0,59	1,09	0,53
60/0 min	0,88	0,15	0,80	0,22
10 %				
I svetil.				
15/0 min	0,82	0,18	0,90	0,09
60/0 min	0,68	0,30	0,72	0,29
20 %				
I svetil.				
15/0 min	0,98	0,30	0,86	0,18
60/0 min	1,01	0,38	0,84	0,31
40 %				
I svetil.				
15/0 min	1,00	0,25	0,96	0,06
60/0 min	0,81	0,46	0,75	0,51

(I svetil. = indeks svetilnosti; 15/0 min = indeks svetilnosti po 15-minutni inkubaciji; 60/0 min = indeks svetilnosti po 60-minutni inkubaciji; povp. = povprečje indeksov svetilnosti; int. zaup. = interval zaupanja)

Za vsako različico poskusa posebej, torej glede na odstotek dodanih stimuliranih/nestimuliranih PMN v vzorcu, smo primerjali povprečno svetilnost aktivnih spermijev po 0- in 15-minutni inkubaciji ter po 0- in 60-minutni inkubaciji. Za potrditev primerjave smo uporabili parni t-test. Izračunane vrednosti so prikazane v preglednicah 14 in 15. Pričakovali smo, da se bo z naraščajočo koncentracijo PMN v vzorcih zmanjšala povprečna svetilnost aktivnih spermijev. Povprečne svetilnosti so se z naraščajočim odstotkom PMN sicer zmanjšale, vendar ne statistično značilno. Zato ne moremo z gotovostjo trditi, da koncentracija PMN vpliva na mitohondrijsko aktivnost spermijev.

Preglednica 14: Povprečna svetilnost aktivne (DiOC₆(3)+) subpopulacije spermijev pri različnem deležu dodanih nestimuliranih (PMA-) in stimuliranih (PMA+) PMN v vzorcu nativne sperme po 0- in 15-minutni inkubaciji (N = 4; št. vzorcev nativne sperme).

	PMA-			PMA+		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
0 min						
povp.	77,99	78,35	65,26	81,34	72,71	71,02
int. zaup.	34,12	26,95	18,94	28,26	34,46	22,41
15 min						
povp.	68,46	62,83	53,17	69,37	67,93	58,25
int. zaup.	34,77	32,57	23,91	36,21	34,48	27,44
parni t-test	0,05	0,07	0,08	0,18	0,12	0,12

(povp. = povprečna svetilnost; int. zaup. = interval zaupanja)

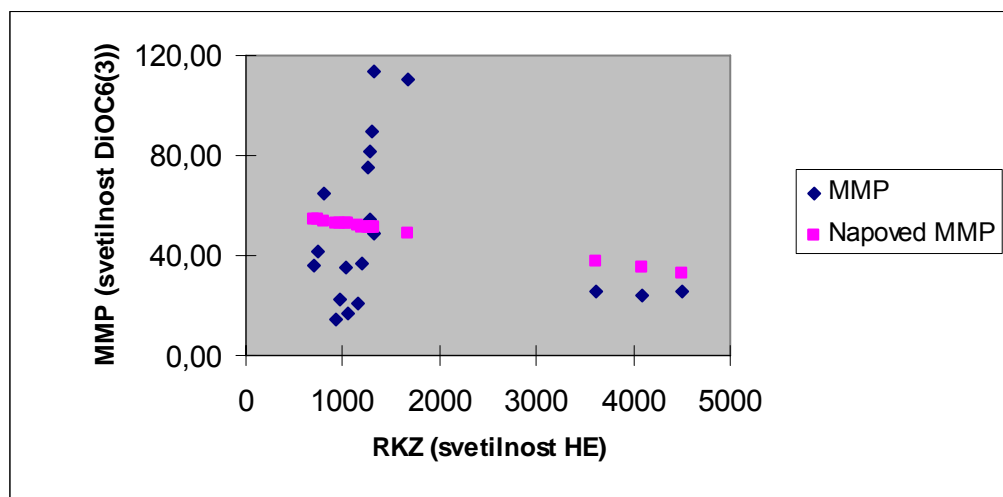
Preglednica 15: Povprečna svetilnost aktivne (DiOC₆(3)+) subpopulacije spermijev pri različnem deležu dodanih nestimuliranih (PMA-) in stimuliranih (PMA+) PMN v vzorcu nativne sperme po 0- in 60-minutni inkubaciji (N = 4; št. vzorcev nativne sperme).

	PMA-			PMA+		
	5 %	10 %	20 %	5 %	10 %	20 %
0 min						
povp.	77,99	78,35	65,26	81,34	72,71	71,02
int. zaup.	34,12	26,95	18,94	28,26	34,46	22,41
60 min						
povp.	65,60	67,52	67,59	67,57	63,14	62,03
int. zaup.	21,75	43,92	34,82	35,04	33,91	27,08
parni t-test	0,11	0,22	0,42	0,21	0,15	0,27

(povp. = povprečna svetilnost; int. zaup. = interval zaupanja)

4.1.3 Povezava med oksidativnim izbruhom levkocitov in apoptozo spermijev

S korelacijo med količino RKZ in izmerjenim MMP spermijev smo želeli preveriti, ali sta povečan oksidativni izbruh levkocitov in upadanje MMP povezana. Regresijsko analizo smo izvedli z rezultati meritev oksidativnega izbruha stimuliranih PMN in rezultati meritev MMP aktivnih spermijev v stimuliranih vzorcih po 60-minutni inkubaciji. Pričakovali smo upadanje MMP spermijev ob povečanih količinah RKZ, torej negativno korelacijo. Rezultati regresijske analize so pokazali naslednje vrednosti: koeficient korelacije $-0,21$; koeficient determinacije $0,04$; statistična značilnost regresije $0,39$. Vrednost koeficienta korelacije sicer nakazuje zelo šibko negativno korelacijo, ker pa je vrednost zelo blizu 0 , gre v našem primeru bolj za naključno, nelinearno razmerje med vrednostmi RKZ in MMP. Tudi vrednost koeficienta determinacije je zelo nizka, kar pomeni, da lahko samo 4 % sprememb MMP pojasnimo z linearnim razmerjem med količino RKZ in MMP, nepojasnjenih pa ostane kar 96 % vrednosti. Na podlagi teh vrednosti ne moremo potrditi povezave med oksidativnim izbruhom levkocitov in apoptozo spermijev.



Slika 12: Grafični prikaz odnosa med količino RKZ in MMP aktivnih spermijev v stimuliranih vzorcih (N = 19; št. meritev RKZ in MMP).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 UVOD

Levkociti so ves čas prisotni v moškem reproduktivnem traktu in so najdeni v skoraj vsakem ejakulatu. Klinični pomen povečane infiltracije levkocitov v semenu, to je levkocitospermije, je še vedno predmet razprav. Po eni strani je ta povezana s slabo kakovostjo semena, zmanjšano hiperaktivacijo in pomanjkljivimi funkcijami spermijev, po drugi strani pa še ni potrjene korelacije med levkocitnimi koncentracijami in poslabšano kakovostjo semena (Agarwal in sod., 2003).

Levkociti so glavni vir visokih koncentracij RKZ v semenu. Aktivirani levkociti lahko v primerjavi z neaktiviranimi levkociti tvorijo tudi do 100-krat večje količine RKZ. Aktivacija je odziv na različne signale, vključno z vnetjem in okužbo. Oksidativni izbruh je zgodnji in učinkovit mehanizem za uničenje mikrobov v primerih okužbe. Poškodbe spermijev, povzročene z RKZ, ki jih tvorijo levkociti, nastanejo zaradi nenormalno visokih levkocitnih koncentracij v semenu (Agarwal in sod., 2003).

S povečanimi količinami RKZ v semenu je lahko povezano tudi povečano število spermijev z izraženimi apoptotskimi značilnostmi. RKZ niso samo del obrambnih mehanizmov vnetnih celic, ampak tudi povzročitelji tkivnih poškodb, okrnjenih membran in poškodb DNK spermijev (Villegas in sod., 2005).

5.2 ANALIZA REZULTATOV

Oksidativne razmere v našem eksperimentalnem modelu smo ustvarili s stimulacijo levkocitov. Na začetku poskusa smo najprej stimulirali monocite, vendar je bil oksidativni izbruh teh po stimulaciji prešibek, zato smo v nadaljevanju uporabili PMN. Oksidativni izbruh je bil po stimulaciji vzorcev s PMA in LPS pričakovano povečan, kar smo potrdili s statistično razliko med nestimuliranimi (kontrolne) in stimuliranimi vzorci. Največjo količino RKZ smo po pričakovanjih izmerili v populaciji PMN.

Bakterijski LPS lahko izzove številne odzive pri PMN. Čeprav ne aktivira oksidaze NADPH neposredno, naredi PMN bolj odzivne na druge spodbujevalce. Tako lahko LPS, ki se sprostijo iz vdiralnih patogenov na mestu okužbe, naredi lokalne fagocitne celice bolj občutljive in bolj odzivne ter s tem okrepi vnetni odziv. Znano je, da PMN, izpostavljeni majhnim količinam LPS *in vitro*, razvijejo stanje predaktivacije in po odzivu na spodbujevalec (PMA) sprostijo povečane količine superoksida. Predinkubacija z LPS vpliva tudi na sam začetek in hitrost sproščanja RKZ; oksidativni izbruh se začne prej in poteka hitreje (Guthrie in sod., 1984). LPS doseže svoj učinek po 15–60-minutni predinkubaciji. Spodbujevalec PMA aktivira PMN na podoben način kot fagocitoza. Deluje stimulatивно na oksidazo in poveča oksidativni metabolizem celic. Objave o tem, za koliko se količina nastalih RKZ poveča po stimulaciji, so različne. Nekateri avtorji (Guthrie in sod., 1984; DeLeo in sod., 1998) navajajo od 8- do 10-krat povečan nastanek RKZ, medtem ko drugi (Villegas in sod., 2005a) poročajo tudi o 100-kratnem povečanju. V našem primeru povprečni oksidativni izbruh PMN po stimulaciji ni bil povečan v taki meri, povečal se je skoraj za 2-krat v primerjavi s kontrolnimi, nestimuliranimi vzorci. Vzrok za slabši izbruh bi lahko bil v kratki, samo 15-minutni inkubaciji PMN z LPS in PMA, poleg tega se tudi PMN, ki smo jih izolirali iz krvi različnih krvodajalcev, lahko drugače odzivajo na stimulacijo. Pri 10 % meritev je bil oksidativni izbruh skoraj od 4- do 5-krat večji v primerjavi s kontrolnimi vzorci, pri 35 % meritev 2-krat večji in pri 25 % celo manjši kot pred stimulacijo. Že Guthrie in sod. (1984) so opazili, da je bil učinek LPS na PMN spremenljiv od darovalca do darovalca. Zaradi same izolacije PMN iz polne krvi se lahko spremenijo tudi njihove funkcionalne lastnosti (Rothe in Valet, 1990). Ista avtorja tudi menita, da je magnituda respiratornega izbruha z uporabo postopkov, ki merijo zunajcelično sproščanje superoksida in vodikovega peroksida, podcenjena. Določen delež RKZ, ki nastanejo med oksidativnim izbruhom, se znotrajcelično pretvori v molekularni kisik prek SOD ali katalaze. Ta delež RKZ se v postopku merjenja ne zazna, ker ne vodi niti v zunajcelično sproščanje superoksida in vodikovega peroksida niti v zunajcelično porabo kisika.

Dejansko je vsak ejakulat kontaminiran s potencialnimi viri RKZ. Iz tega sledi, da bodo v vsakem ejakulatu nekateri spermiji izpostavljeni oksidativnim poškodbam in hkrati tudi

izgubi svojih funkcij (Agarwal in sod., 2003). Visoke koncentracije RKZ v ejakulatu lahko izvirajo iz morfološko nenormalnih spermijev in/ali levkocitov v semenu (Agarwal in sod., 2003). Spermiji v ejakulatu predstavljajo samo manjši vir RKZ, približno eno tretjino vseh RKZ v semenu, medtem ko so prevladujoč vir levkociti, ki tvorijo tudi do 1.000-krat več RKZ od samih spermijev v okviru svoje normalne fiziološke funkcije (Plante in sod., 1994; Henkel, in sod., 2005). Villegasova in sod. (2005a) pa navajajo, da aktivirani levkociti tvorijo 100-krat večje količine RKZ kot pa sami spermiji. Naši rezultati meritev oksidativnega izbruha v ločenih populacijah PMN in spermijev niso ravno v skladu s temi objavami, čeprav smo dokazali statistično značilno razliko med količino RKZ pri obeh populacijah celic, tako za stimulirane kot tudi za nestimulirane vzorce. V populaciji PMN smo namreč izmerili samo 2-krat večjo količino RKZ, v primeru stimuliranih vzorcev pa 3-krat večjo (preglednica 2). Količina RKZ v ločeni populaciji spermijev se po stimulaciji ni spremenila. Za bolj natančno primerjavo oksidativnega izbruha med populacijama PMN in spermijev bi morali izmeriti še količino RKZ v samem vzorcu spermijev brez dodanih PMN. Na ta način bi lahko ugotovili, kakšna je bila dejanska sprememba v nastanku RKZ po dodatku nestimuliranih in stimuliranih PMN.

Vpliv oksidativnih razmer na spermije v reakcijski mešanici smo želeli potrditi z merjenjem MMP. Spremembe mitohondrijske aktivnosti so dober pokazatelj viabilnosti celic, zato se merjenje MMP uporablja kot učinkovit test za oceno kakovosti semena. Spremembe MMP so značilne za zgodnjo, uvodno fazo apoptoze tako v somatskih kot v spolnih celicah. Te spremembe nastopijo še pred začetno fazo, v kateri se iz mitohondrijev sprosti citokrom c in sproži aktivacijo kaspaz. Da so povečane količine RKZ, ki jih proizvedejo spermiji, povezane z okvarjenimi mitohondriji in značilnim upadanjem MMP, so prvi dokazali Wang in sod. (2003). V naši nalogi pa smo želeli preveriti vpliv RKZ, nastalih med stimulacijo PMN. Pričakovali smo upadanje MMP spermijev v reakcijski mešanici, pričakovali pa smo tudi večje razlike v MMP spermijev v primeru stimuliranih vzorcev in po daljšem času inkubacije. Upadanje MMP smo potrdili s statistično značilno razliko samo v štirih izvedbah poskusa. MMP spermijev se je najbolj značilno zmanjšal v primeru z 20 % dodanih PMN po 15-minutni inkubaciji stimuliranih in nestimuliranih vzorcev in po 60-minutni inkubaciji stimuliranih vzorcev. V primeru inkubacije vzorcev s 40 % dodanih PMN smo dobili značilno razliko le po 15-minutni inkubaciji nestimuliranih

vzorcev. Mejne vrednosti p bi se ob večjem številu analiziranih vzorcev morda zmanjšale. Svetilnost stimuliranih vzorcev ni bila manjša od svetilnosti nestimuliranih vzorcev. Primerjava svetilnosti med posameznimi inkubacijskimi časi pa je pokazala, da večji odstotek PMN v reakcijski mešanici ni vplival na zmanjšanje svetilnosti spermijev (preglednici 14 in 15).

Za odstopanje rezultatov od pričakovanj in odsotnost statistično značilnih razlik je lahko več razlogov. Čeprav smo dokazali, da oksidativni izbruh PMN deluje, je bil ta v mešanici PMN in spermijev očitno prešibek, da bi lahko povzročil zaznavne spremembe v spermijih, torej upadanje MMP. Razlike v MMP so se pokazale po 60-minutni inkubaciji, po 15- in 0-minutni pa so bile minimalne. Mogoče bi bile razlike večje, če bi v poskusu uporabili vzorce kapacitirane sperme. S postopkom kapacitacije spermijev se odstrani semenska plazma, negiblivi spermiji in ostale celice v ejakulatu. Semenska plazma pa vsebuje antioksidante, ki pomagajo minimizirati oksidativni stres v ejakulirani spermi. Poleg tega smo spermijem dodali nižje koncentracije PMN (5, 10, 20, 40 %) v primerjavi s podobnimi študijami (Villegas in sod., 2005a; Villegas in sod., 2005b), kjer so spermije inkubirali 60 minut s 50 % PMN. Za boljše statistične rezultate bi morali analizirati večje število vzorcev in namesto naključno izbranih uporabiti bolj specifično izbrane vzorce kapacitirane sperme, in sicer iz skupine zdravih moških z normalnim izvidom spermiograma po kriterijih WHO. V kakšni meri se je v analiziranih vzorcih dejansko sprožila apoptoza spermijev, bi lahko preverili še s kakšno drugo metodo, npr. z uporabo aneksina V in propidijevega jodida (PI). Barvanje celic s kombinacijo aneksina V in PI omogoča razlikovanje živih, apoptotičnih in nekrotičnih subpopulacij spermijev v vzorcu. Predvsem z uporabo PI bi lahko iz analize izločili nekrotične spermije in tiste v poznih fazah apoptoze.

Razmere v našem eksperimentalnem modelu so bile zgolj približek takšnih, kakršne so v situacijah *in vivo*. Fiziološki pogoji v genitalnem traktu so najbrž popolnoma drugačni, razmerja med koncentracijami celic in količinami njihovih presnovkov pa se bistveno razlikujejo od teh, ki smo jih uporabili in izmerili *in vitro*. V situaciji *in vivo* so ta razmerja najverjetneje manjša, upoštevati je treba tudi prisotnost številnih drugih celic in molekul, ki

vplivajo na interakcije in povečujejo njihovo kompleksnost, kot so npr. različni vnetni mediatorji in antioksidativne obrambne spojine.

5.3 SKLEPI

Stimulacija levkocitov (PMN) s PMA in LPS sproži oksidativni izbruh in nastanek povečanih količin RKZ.

Oksidativni izbruh deluje tudi v reakcijski mešanici spermijev in PMN.

Mitohondrijska aktivnost spermijev se značilno zmanjša v primeru z 20 % dodanih PMN po 15-minutni inkubaciji stimuliranih in nestimuliranih vzorcev, po 60-minutni inkubaciji stimuliranih vzorcev in v primeru s 40 % dodanih PMN po 15-minutni inkubaciji nestimuliranih vzorcev. V preostalih izvedbah poskusa oksidativni izbruh PMN ne vpliva na mitohondrijsko aktivnost spermijev.

Povečan odstotek PMN v reakcijski mešanici ne vpliva na mitohondrijsko aktivnost spermijev.

6 POVZETEK

Natančna vloga genitalne okužbe, izvornega mesta levkocitov, njihovih načinov delovanja in učinkov, ki jih imajo na spermije, še ni popolnoma pojasnjena. Povečane koncentracije levkocitov sproščajo različne vnetne citokine in številne reaktivne kisikove zvrsti, ki lahko povzročijo peroksidativne poškodbe spermijev. S porušenim ravnotežjem med oksidanti in antioksidanti nastopijo pogoji oksidativnega stresa, v katerem toksične kisikove zvrsti reagirajo s celičnimi makromolekulami in posledično vplivajo na oploditveni potencial spermijev.

V eksperimentalnem modelu smo s stimulacijo levkocitov ustvarili oksidativne razmere, z merjenjem mitohondrijske aktivnosti spermijev pa smo želeli preveriti vpliv reaktivnih kisikovih zvrsti na začetek apoptotskega procesa v spermijih. Gre za ponazoritev situacije *in vivo*, v kateri so spermiji izpostavljeni vnetnim pogojem ob okužbi prostate ali nadmodka. S pretočnim citometrom smo izmerili oksidativni izbruh levkocitov in mitohondrijski membranski potencial spermijev. Upoštevali smo, da je svetilnost barvila hidroetidina sorazmerna količini sproščenega superoksida, svetilnost DiOC₆(3) pa višini membranskega potenciala.

V nalogi smo potrdili delovanje oksidativnega izbruha levkocitov, ki je bil po stimulaciji s PMA in LPS značilno povečan v primerjavi z nestimuliranimi vzorci. Prisotnost aktiviranih levkocitov v reakcijski mešanici v večini primerov ni vplivala na mitohondrijsko aktivnost spermijev. Mitohondrijska aktivnost se ni zmanjšala kljub povečanemu odstotku levkocitov v reakcijski mešanici. Zaradi premalo statistično značilnih razlik nismo potrdili povezave med oksidativnim izbruhom PMN in začetno fazo apoptoze spermijev.

7 VIRI

- Agarwal A., Saleh R.A., Bedaiwy M.A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, 79, 4: 829–843
- Aitken R.J., West K., Buckingham D. 1994. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. *Journal of Andrology*, 15, 4: 343–352
- Albrich J.M., Gilbaugh J.H. 3rd, Callahan K.B., Hurst J.K. 1986. Effects of the putative neutrophil-generated toxin, hypochlorous acid, on membrane permeability and transport systems of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, 78, 1: 177–184
- Armstrong J.S., Rajasekaran M., Chamulitrat W., Gatti P., Hellstrom W.J., Sikka S.C. 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 869–880
- Assari T. 2006. Chronic granulomatous disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Medical Immunology*, 5, 4.
<http://www.medimmunol.com/content/pdf/1476-9433-5-4.pdf> (december 2007): 8 str.
- Babior B.M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93, 5: 1464–1476
- Borregaard N., Kjeldsen L., Lollike K., Sengeløv H. 1995. Granules and secretory vesicles of the human neutrophil. *Clinical and Experimental Immunology*, 101, 1: 6–9
- de Lamirande E., Jiang H., Zini A., Kodama H., Gagnon C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, 2: 48–54

-
- DeLeo F.R., Renee J., McCormick S., Nakamura M., Apicella M., Weiss J.P., Nauseef W.M. 1998. Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 2: 455–463
- Drobnič S. 2002. Moška spolovila. V: Od nastanka gamet do rojstva. Virant-Klun I., Meden-Vrtovec H., Tomaževič T. (ur.). Radovljica, Didakta: 39–41
- Eley A., Pacey A.A., Galdiero M., Galdiero M., Galdiero F. 2005. Can *Chlamydia trachomatis* directly damage your sperm? *Lancet Infectious Diseases*, 5, 1: 53–57
- Fraczek M., Kurpisz M. 2007. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 28, 2: 325–333
- Gil-Guzman E., Ollero M., Lopez M.C., Sharma R.K., Alvarez J.G., Thomas A.J. Jr, Agarwal A. 2001. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction*, 16, 9: 1922–1930
- Guthrie L.A., McPhail L.C., Henson P.M., Johnston R.B. 1984. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*, 160: 1656–1671
- Henkel R., Kierspel E., Stalf T., Mehnert C., Menkveld R., Tinneberg H.R., Schill W.B., Kruger T.F. 2005. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertility and Sterility*, 83, 3: 635–642
- Keck C., Gerber-Schäfer C., Clad A., Wilhelm C., Breckwoldt M. 1998. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Human Reproduction Update*, 4, 6: 891–903

Kiessling A.A., Lamparelli N., Yin H.Z., Seibel M.M., Eyre R.C. 1995. Seminal leukocytes: friends or foes? *Fertility and Sterility*, 64, 1: 196–198

Köhn F.M., Erdmann I., Oeda T., el Mulla K.F., Schiefer H.G., Schill W.B. 1998. Influence of urogenital infections on sperm functions. *Andrologia*, 30: 73– 80. Cit. po: Villegas J., Schulz M., Soto L., Iglesias T., Miska W., Sanchez R. 2005a. Influence of reactive oxygen species produced by activated leukocytes at the level of apoptosis in mature human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 83, 3: 808–810

Lachaud C., Tesarik J., Cañadas M.L., Mendoza C. 2004. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Human Reproduction*, 19, 3: 607–610

Lackner J.E., Herwig R., Schmidbauer J., Schatzl G., Kratzik C., Marberger M. 2006. Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflammatory treatment on semen quality. *Fertility and Sterility*, 86, 3: 601–605

Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Dondero F. 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, 2, 3: 246–256

Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G., Casper R.F. 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13, 4: 896–900

Ochsendorf F.R. 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, 5, 5: 399–420

Ollero M., Powers R.D., Alvarez J.G. 2000. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Molecular Reproduction and Development*, 55, 3: 326–334

Pasqualotto F.F., Sharma R.K., Potts J.M., Nelson D.R., Thomas Jr. A.J., Agarwal A. 2000. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology*, 55: 881–885

Plante M., de Lamirande E., Gagnon C. 1994. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertility and Sterility*, 62, 2: 387–93

Quinn M.T., Gauss K.A. 2004. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology*, 76: 760–781

Ramos L., Wetzels A.M.M. 2001. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Human Reproduction*, 16, 8: 1703–1707

Rakita R.M., Michael B.R., Rosen H. 1989. Myeloperoxidase mediated inhibition of microbial respiration: damage to *Escherichia coli* ubiquinol oxidase. *Biochemistry*, 28, 7: 3031–3036. Cit. po: Rosen G.M., Pou S., Ramos C.L., Cohen M.S., Britigan B.E. 1995. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB Journal*, 9: 200–209

Rakita R.M., Rosen H. 1991. Penicillin-binding protein inactivation by human neutrophil myeloperoxidase. *Journal of Clinical Investigation*, 88, 3: 750–754

Ricci G., Perticarari S., Fragonas E., Giolo E., Canova S., Pozzobon C., Guaschino S., Presani G. 2002. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human Reproduction*, 17, 10: 2665–2672

Roos D. 1991. The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages. *Klinische Wochenschrift*, 69: 975–980

Rosen G.M., Pou S., Ramos C.L., Cohen M.S., Britigan B.E. 1995. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB Journal*, 9: 200–209

-
- Rothe G., Valet G. 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*, 47: 440–448
- Salvioli S., Ardizzoni A., Franceschi C., Cossarizza A. 1997. JC-1, but not DiOC₆(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters*, 411, 1: 77–82
- Sanocka D., Fraczek M., Jedrzejczak P., Szumala-Kakol A., Kurpisz M. 2004. Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. *Journal of Reproductive Immunology*, 62: 111–124
- Sanocka D., Jedrzejczak P., Szumala-Kakol A., Fraczek M., Kurpisz M. 2003. Male genital tract inflammation: the role of selected interleukins in regulation of pro-oxidant and antioxidant enzymatic substances in seminal plasma. *Journal of Andrology*, 24, 3: 448–455
- Sanocka D., Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 12: 1–7
- Schaeffer A.J., Wendel E.F., Dunn J.K. 1981. Prevalence and significance of prostatic inflammation. *Journal of Urology*, 125, 2: 215–220. Cit. po: Ochsendorf F.R. 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, 5, 5: 399–420
- Segal A.W. 2005. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology*, 23: 197–223
- Sharma R.K., Pasqualotto F.F., Nelson D.R., Thomas Jr A.J., Agarwal A. 2001. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology*, 22, 4: 575–583

Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J.D., Banerjee A., Silliman C.C. 2005. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 78: 1025–1042

Sikka S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1: 78–86

Silliman C.C., Ambruso D.R., Boshkov L.K. 2005. Transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 105, 6: 2266–2273

Smith J.A. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of Leukocyte Biology*, 56: 672–686

Štiblar-Martinčič D. 2002. Programirana celična smrt v reproduktivnih organih. V: Od nastanka gamet do rojstva. Virant-Klun I., Meden-Vrtovec H., Tomaževič T. (ur.). Radovljica, Didakta: 74–78

Vicari E. 1999. Seminal leukocyte concentration and related specific reactive oxygen species production in patients with male accessory gland infections. *Human Reproduction*, 14, 8: 2025–2030

Villegas J., Schulz M., Soto L., Iglesias T., Miska W., Sanchez R. 2005a. Influence of reactive oxygen species produced by activated leukocytes at the level of apoptosis in mature human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 83, 3: 808–810

Villegas J., Schulz M., Soto L., Sanchez R. 2005b. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. *Apoptosis*, 10, 1: 105–110

Virant-Klun I. 2002. Seme. V: Od nastanka gamet do rojstva. Virant-Klun I., Meden-Vrtovec H., Tomaževič T. (ur.). Radovljica, Didakta: 73–74

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS: 552 str.

Wang X., Sharma R.K., Gupta A., George V., Thomas A.J., Falcone T., Agarwal A. 2003. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertility and Sterility*, 80, 2: 844–850

Wheeler M.A., Smith S.D., Garcia-Cardena G., Nathan C.F., Weiss R.M., Sessa W.C. 1997. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 1: 110–116

Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha B., Lesavre P., Halbwachs-Mecarelli L. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation*, 80, 5: 617–653

Wolff H. 1995. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 63, 6: 1143–1157

Zhao H.T., Joseph J., Fales H.M., Sokoloski E.A., Levine R.L., Vasquez-Vivar J., Kalyanaraman B. 2005. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16: 5727–5732

ZAHVALA

Hvala prof. dr. Alojzu Ihanu za mentorstvo pri diplomskem delu in prof. dr. Vladimirju Kotniku za recenzijo diplomskega dela.

Hvala Andreji Nataši Kopitar in gospe Boži Trampuž za pomoč pri laboratorijskem delu in prijetno delovno vzdušje. Še posebej sem hvaležna Andreji, da si je vzela čas za moje meritve in mi pomagala z nasveti in optimizmom. Hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo za prijaznost in pomoč.

Hvala vodji Androloškega laboratorija na Ginekološki kliniki v Ljubljani, gospe Mojci Kolbezen Simoniti, za pomoč pri izbiri vzorcev, vse posredovane podatke in prijaznost.

Hvala vsem prostovoljcem, ki so darovali kri za potrebe te naloge.

Največja zahvala gre mami in očetu, ki sta mi omogočila študij, me skozi vsa leta podpirala, vzpodbujala in verjela vame. Hvala tudi bratu Andreju za vzpodbudo in pomoč.