



## FERTİL VE İNFERTİL ERKEKLERİN SEMİNAL PLAZMASINDAKİ IL-2 DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Demet ÖDEMİŞ<sup>1</sup>, Baysal KARACA<sup>1</sup>, Derya KAVAKLI<sup>1</sup>, Ayşen LALE, Alpay ARI<sup>2</sup>,  
Sibel TAŞKENT<sup>1</sup>

### COMPARISON OF IL-2 LEVELS IN SEMINAL PLASMA OF FERTILE AND INFERTILE MEN

**Summary:** IL-2 is a cytokine, structurally a protein consisting of 133 aminoacids and has a molecular weight of 15400 Da. It is synthesized and released from activated T cells and has a key role in cell mediated immune response. It was found out that IL-2 increases lymphokine release from T, B and naturel killer cells has many immunological affects. Many studies have been made in order to show the immunological role of IL-2 in the pathogenesis of male infertility. Sixty subjects entered the study, 30 with proven fertility and normal semen quality (fertile group) and 30 with male infertility of at least one year and poor semen quality (infertile group). IL-2 levels of seminal plasma in infertile subjects were significantly higher than those in fertile subjects ( $p<0.025$ ). Consequently, IL-2 concentration in seminal plasma may therefore be considered as a marker in male infertility.

**Key Words:** IL-2, Infertility, Seminal plasma

**Özet:** İnterlökin-2 (IL-2), molekül ağırlığı 15400 Da olan, 133 amino asitten oluşmuş protein yapısında bir sitokindir. Uyarılmış T hücrelerinden sentezlenip salınır ve hücre aracılı immun yanıtta anahtar rol oynar. IL-2'nin T, B ve Natural Killer (NK) hücrelerinden lenfokin salınımını artırdığı ve immunolojik bir çok etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Erkek infertilitesi patogeneğinde IL-2'nin immunolojik rolünü ortaya koymak amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Çalışmamıza 60 erkek birey dahil edildi. Fertilitesi kanıtlanmış ve normal semen kalitesine sahip 30 kişi fertil gruba, en az bir yıldır infertil olan ve zayıf semen kalitesine sahip 30 kişi de infertil gruba oluşturdu. İnfertil bireylerin seminal plazmasındaki IL-2 düzeyleri, fertil bireylere göre anlamlı yüksek bulundu ( $p<0.025$ ). Bu sonuç, seminal plazmasındaki IL-2 konsantrasyonunun erkek infertilitesinde potansiyel bir marker olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler :** IL-2, İnfertilite, Seminal plazma

### GİRİŞ

Yapılan bütün araştırmalara rağmen, erkek infertilitesinin bilinen nedenleri dışında hala % 25 lik idiyopatik bir kısım bulunmaktadır. İmmunolojik faktörlerin, infertilitenin hem bilinen nedenlerinde, hem de bu idiyopatik kısımda etkili olabileceği düşünülmüştür. Vücutta bir çok patolojinin kaynağı olan immünolojik olaylar, hassas bir yapıda olan semeni ve fer-

til fonksiyonları etkileyebilmektedir. İnfertilite araştırmalarında erkeğe ait nedenlerin önem kazanmasıyla, birçok faktör ortaya konmuş; bu arada immunopatolojik olayların önemi de vurgulanmaya başlamıştır.

1980'li yıllarda araştırmacılar özellikle antisperm antikoları üzerinde durmuşlardır. 1982 yılında Seki M. ve arkadaşları (1) in vitro antiserumlarla karşılaştırılan spermatozoanın yumurta penetrasyon yetene-

ğinde azalma olduğunu göstermişlerdir. Tung ve Yanagimachi (2, 3) yaptıkları çalışmalarda, otoantikörlerin domuzlarda spermin akrozom reaksiyonunu bozduğunu ve bu yolla zona penetrasyonunu engellediğini göstermişlerdir.

Hem humoral hem de hücrel immünitede anahtar rol oynayan IL-2 bir çok diğer sitokinin salınımını da etkilenmektedir. IL-2, geçici salınım özelliği ile kontrol edici yeteneğe sahip bir sitokindir (4,5). Bu nedenler göz önüne alınarak araştırmamızda IL-2 çalışılmıştır.

IL-2'nin molekül ağırlığı 15400 Da olup 133 amino asitten meydana gelmiştir. Dört  $\alpha$  heliksinin disülfid bağlarıyla birleşmesiyle oluşan globüler bir yapısı vardır (6).

IL-2, klonal T hücre proliferasyonu için çok önemli olan ve aktive T hücrelerinden salgılanan otokrin ve parakrin bir büyüme faktörüdür (7). Aktif olmayan T hücreleri IL-2 yapamaz. Çeşitli uyarılar varlığında IL-2 salınmaya başlar (4). Salınan IL-2, reseptörü ile birleşir, hücre içinde sinyal iletimi tamamlanınca protein kinaz gibi enzimler aktifleşir, hücre S fazına girer, pH değişir ve lenfokin yapımı artar. Yani hücre immunolojik aktivite kazanır (8,9, 10,11,12). IL-2 ile aktive T lenfositler, sitotoksik özelliklerini artırır (4). IFN $\gamma$ , TNF $\beta$  gibi lenfokinleri, IL-4, IL-5 gibi B hücre büyüme faktörlerini ve GM-CSF, IL-3, IL-5 gibi hematopoetik büyüme faktörlerini salgılamaya başlarlar. Böylece IL-2, immunolojik kaskadı başlatmış olur (13,14).

Çalışmamızın amacı testis üzerinde bir çok etkiye sahip olduğu bilinen IL-2'nin insan seminal plazmadaki etkisini göstermek, fertil ve infertil örneklerde IL-2 konsantrasyonları arasındaki farkı ve spermiyogram parametreleri ile semendeki IL-2 miktarı arasındaki potansiyel ilişkiyi göstermektir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma SSK İzmir Eğitim Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma grubu bir yıldır korunmasız çocuk sahibi

olmadığı bilinen, düşük semen kalitesine sahip 30 bireyden oluşuyordu. Bu grupta bireylerin hormonal ve obstrüktif bir hastalığa sahip olmamasına özellikle dikkat edilmiştir. Kontrol grubu ise fertilitesi kanıtlanmış ve iyi semen kalitesine sahip 30 bireyden meydana geliyordu. Yaş ortalamaları fertil grup için 27, infertil grup için ise 30'dı. Gerek hasta grubu, gerekse kontrol grubunun semen kalitesi belirlenirken standart spermiyogram kriterleri dikkate alınmıştır. Tablo 1.

Tablo 1: Standart spermiyogram kriterleri.

Post koitus süresi	3-6 gün
Miktar	2-6 ml
Koku	Özel
Görünüm	Opelesan
Visko	Normal
Likefalsiyon süresi	< 20 dak.
PH	7.2- 7.8
Spontan aglütinasyon	Yok
Sperm sayısı	> 20 milyon
Hareket	> %50 ileri hızlı hareket
Canlılık	> % 75
Morfoloji	
Normal	> % 30
Baş anomalisi	
Kuyruk anomalisi	

Materyaller, bireylerin üç günlük cinsel perhizden sonra masturbasyon yolu ile, geniş ağızlı steril kaplara alınarak elde edildi. Semen öncelikle renk, koku, hareket, miktar, sperm sayısı, pH, morfoloji, lökosit sayısı açısından değerlendirmeleri yapıldı. Daha sonra örnekler 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek seminal plazma, hücrel elemanlarından ayrıldı ve ölçümler yapılmaya kadar -70 C de saklandı.

IL-2 değerlendirmeleri için çalışma günü çözülen örnekler Genzyme firmasına ait ticari kitler kullanılarak ELISA yöntemi ile çalışıldı. Yöntemin esası: antikor-antijen kompleksine enzimle işaretlenmiş antikor ilavesiyle meydana gelen antikor-antijen-enzim işaretli antikor oluşumuna substrat ilave edilmesi ve enzim işaretli antikor kompleksi ile doğru orantılı oluşan rengin kolorimetrik olarak ölçümüdür (15)



İstatistiksel incelemelerde, gruplar arası farkın anlamlılık kontrolünde student t testi uygulandı.

### BULGULAR

Fertil ve infertil bireylerden elde edilen IL-2 (pg/ml) değerlerinin istatistiksel verileri aşağıda Tablo-2 de gösterilmiştir.

Tablo 2.

	Ortalama	Standart Sapma	Standart Sapma	% CV
Fertil (n=30)	34,16	8,5	1,5	24,88
İnfertil(n=30)	52,16	12,8	2,3	24,53

$P < 0,025$

Seminal plazma IL-2 konsantrasyonları infertil grupta, fertil gruba göre belirgin yüksek bulundu ( $p < 0,025$ ). Spermilerin motilite değerleri fertil grupta daha yüksekti ( $p < 0,025$ ). Semen volümü ve pH için anlamlı fark yoktu ( $p > 0,025$ ).

Sperm sayısı ve lokosit değerleri her iki grupta da çok geniş dağılım gösterdiğinden, ortalama değer yerine ortanca değer (median) saptandı. Tablo-3

Tablo 3. Fertil ve infertil gruplarda sperm ve lokosit sayılarının istatistiksel verileri.

	Fertil Grup (n=30)		İnfertil Grup (n=30)	
	Sperm sayısı*	Lokosit sayısı*	Sperm sayısı*	Lokosit sayısı*
Minimum	43	0	0	0
Maksimum	500	24	24	20
Ortanca	65	0	1.5	0

\*  $\times 10^5 / mm^3$

Morfolojik değerlendirme, infertil grupta 10 bireyin azospermik oluşu nedeniyle yapılmadı.

Her iki gruptaki IL-2 değerleri ile semen parametreleri regresyon analizi ile ilişkilendirildi. IL-2 ile sperm sayısı arasında negatif yönde zayıf derecede ilişki ( $r=0,31$ ,  $p < 0,025$ ), IL-2 ile sperm motilitesi arasında ise negatif yönde orta derecede ilişki saptandı. ( $r=0,50$ ,  $p < 0,025$ ). IL-2 ile lökosit ve sperm anomali arasında ilişki saptanmadı ( $r=0,020$ ,  $p > 0,05$ ;  $r=0,06$ ,  $p > 0,05$ ). Tablo-4

Tablo 4: Fertil ve infertil gruplarda IL-2 ile sperm sayısı, sperm motilitesi ve sperm anomali nin ortalama değerleri.

	Fertil grup ortalama değer	İnfertil grup ortalama değer
sperm sayısı*	65	1.5
sperm motilitesi**	77.16	21.5
sperm anomali**	22.1	34.2
IL-2***	34.16	52.16

\*  $\times 10^5 / mm^3$

\*\* %

\*\*\* pg/ml

### TARTIŞMA

1990'lı yıllara gelinceye kadar yalnızca antisperma antikorları değil aynı zamanda semende lökositlerin varlığı da infertilite araştırmalarında önemli bir yer tutmuştur. Ancak semende mevcut lökositlerin fertiliteye olan etkileriyle ilgili değişik görüşler öne sürülmüştür. Vazektomi ve infeksiyon gibi çeşitli nedenler sonucu lökositler semende yer alabilmektedir. Hans Wolf ve ark. (16) lökositopeninin düşük semen kalitesine yol açtığını göstermişlerdir. Buna karşın 1986'da El Demiry MIM ve ark. (17) ise ejakulattaki lökositlerin fertil fonksiyonu etkilemediğini öne sürmüşlerdir.

1993 yılında James M. ve ark. (18) semende lökosit bulunmasının infertilite ile ilgili çok az tanısal veri sağladığını iddia ederek, immunolojik erkek infertilitesi teriminin lökositten bağımsız bir şekilde tekrar tanımlanmasını önermişlerdir.

Biz çalışmamızda bu iddiayı destekler şekilde sonuçlar elde ettik. Fertil ve infertil bireylerin semende lökosit miktarları arasındaki fark anlamlı değildi ( $r = -0,020$ ,  $p > 0,025$ ).

Lökositler ve antisperma antikorları erkek infertilitesinde immunolojik faktörlerin ortaya konmasında yetersiz kalınca bu kez dikkat 1990'lı yıllardan itibaren sitokinlerin üzerine çekilmiştir. Hill J ve ark. (19) özellikle IFN  $\gamma$  ve TNF'nin subfertil duruma neden olduğunu öne sürmüşlerdir. Yine aynı araştırmacı, 1989 da yaptığı çalışmada (20) ise reproduktif dokudaki aktive makrofaj ve lenfositlerin ürünü olan sitokinlerin, immunolojik infertilitenin belirleyici mediatörleri olduğunu ifade etmiştir.

Erkek infertilitesinde üzerinde önemle durulan bir sitokinde IL-6 dır. 1996 da Huleil M ve ark. (21) yaptıkları çalışmada IL-1 $\beta$ , TNF  $\alpha$  ve IL-6 nin fertilitiyi etkilediğini ortaya koymuşlardır. Yine 1994 de Naz RK. Ve ark. (22), 1997 de Paradisi ve ark. (23), IL-6 nin fertilitiyle ilgili olduğunu göstermişlerdir.

Ancak bütün bu çalışmalara rağmen, 1997 de Doussset ve ark. (24) IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-2 R ve IL-6 R üzerinde, 1998 de ise Matalliotakis ve ark. (25) IL-6 üzerinde yaptıkları çalışmalarda, bu mediatörlerin rutin infertilite araştırmalarında kullanılmayacağı sonucuna varmışlardır.

IL-2 de, erkek infertilitesi araştırmalarında ilgi çeken, farklı görüşler öne sürülen bir sitokindir. Nitekim Matalliotakis ve ark. (26) m daha sonra yapmış oldukları " seminal plazmada sitokin seviyeleri" başlıklı çalışmalarında IL-2 seviyelerini oligospermi ve azosperimli kişilerde normal kişilere göre daha yüksek bulduklarını bildirmişlerdir.

1990 da Hong Guo ve ark. (27,28,29), IL-2 nin leydig hücre steroidogenezini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Söz konusu çalışmada, inhibisyon mekanizmasının TNF  $\alpha$ , IFN  $\beta$  ve IL-1 ile düzenlendiği ve bu üç sitokinin birbirini etkileyerek, farklı basamaklarda leydig hücre steroidegenezini engellediği öne sürülmektedir.

1993 de Shimoya K. Ve ark. (30) yaptıkları çalışmada PMN elastazın eriyebilir IL-2 reseptör sayısı ile arttığını ve sperm motilitesini negatif yönde etkilemekte olduğunu göstermişlerdir.

Shimonowitz ve ark. 1994 de yaptıkları çalışmada (31), IL-2 reseptörlerinin düşük sperm motilitesiyle ilişkisini göstermişler ve sitokinlerin kaynağını tespit edemediklerini vurgulayarak infeksiyöz ve immunolojik nedenli olabileceğini ifade etmişlerdir.

1995 de Paradisi ve ark. (23) semendeki yüksek IL-2 miktarının, ana spermiyogram parametreleri ile negatif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Görüldüğü gibi semendeki IL-2 miktarı ve infertilite arasındaki ilişkiyi gösteren bulgular birbiriyle çelişkilidir.

Biz bu çalışmamızda IL-2 nin fertil fonksiyonları etkileyebileceği yönünde bulgular elde ettik. İnfertil bireylerin semen IL-2 konsantrasyonlarını, anlamlı fark oluşturacak şekilde fertil bireylerin semen IL-2 konsantrasyonlarından yüksek bulduk. Buna ek olarak IL-2 konsantrasyonlarının ana spermiyogram parametrelerini etkilediğini tespit ettik. Çalışmamızda IL-2 ile sperm motilitesi arasında orta derecede negatif yönde bir ilişki saptadık ( $r=0,5$ ,  $p<0,025$ ). IL-2 konsantrasyonları ile sperm sayısı arasında da zayıf derecede negatif yönde bir ilişki bulduk.

Sonuçta tam olarak aydınlığa kavuşmamış olsa bile immunolojik süreçlerin ve dolayısıyla sitokinlerin fertil fonksiyonları da etkilediğini, bunda özellikle idiyopatik infertilite tanımına giren vakalarda önem kazandığını söyleyebiliriz.

Bu bulgular seminal plazmadaki IL-2 konsantrasyonunun erkek infertilitesinde potansiyel bir marker olabileceğini de düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Seki M., Letter L. (1982). Influence of spermatozoal antibodies in the reproduction of mice. Am. J.Reprod. Immun.2: 225.
2. Tung K.S.K.(1978).Allergic orchitis lesions are adoptively transferred from vasoligated guine pigs to syngeneic recipients. Science. 201: 283.
3. Yanagimachi R. Et al. (1981). Sperm auto-antigens and fertilization II.Effect of antiguine pig serum antibodies on sperm-ovum interactions. Biol.Reprod.24: 512
4. Smith K.A. (1988).IL-2:Inception, impact and implications. Science., 240:1169-1176.
5. -Greene W.C.et al. (1985). Growth of human T lymphocytes. An analysis of IL-2 and IL-2 receptor.Prog.Hemat., 14:283.
6. Tadatsugu T., Hiroshi M. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human IL-2. Nature. Vol.302,24 March :305-310.
7. Farrar W.L. et al. (1981). Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by IL-2. Immun. Rev.56: 98.
8. David J., Douglas P.C. (1984). Cloning, sequence and expression of human IL-2 receptor. Nature Vol. 312 Dec. 768-771.
9. Kendazll A.S., Doreen A.C. (1984). IL-2 regulates



- its own receptors. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA*. February. *Immunology*. Vol:82:864-868.
10. Rubin L.A., Jay G. (1986). The released IL-2 receptor binds IL-2 efficiently. *The Journal of Immunology*. Vol:137.No:12.Dec. 3841-44.
  11. Rubin L.A. (1990). The soluble IL-2 receptor. *Biology, function and clinical application*. *Annals of Internal Medicine*. 113: 619-627.
  12. Kua L.M., Rusk C.M. (1986). Structure function relationships for the IL-2 receptor system. *The Journal of Immunology*. Vol:137. 1544-1551.
  13. Farrar J.J.(1982). The biochemistry, biology and role of IL-2 in the induction of cytotoxic T cell and antibody-forming B cell responses. *Immun.Rev*. 63:129.
  14. Tadashi K., Hooks J.J.(1983). IL-2 mediated IFN $\gamma$  production by human T cells and T cell subsets. *The Journal of Immunology*. Vol:130.No:4 Apr. 1784-89.
  15. Burtis C.A., Ashwood E.R. (1999). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Thirt Edition. 602-603.
  16. Wolff H. Et al.(1990). Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertility and Sterility*. Vol:53,No:3.March. 528-36.
  17. El-Demiry M.I.M., Young H. (1986). Leukocytes in the ejaculate from fertile and infertile men. *British Journal of urology*. 58:715-720.
  18. James M. et al. (1993). Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggest they are not a cause of male infertility. *Fertility and Sterility*. Vol:60,No:6,Dec:1069-75.
  19. Hill J.,Haimovici F.(1987). Effect of soluble products of activated lymphocytes and macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parametres. *Fertility and sterility*. 47: 460-465.
  20. Hill J. et al. (1989). The effects of lymphokines and monokines on human sperm fertilizing ability in the zone-free hamster egg penetration test. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 160: 1154-1159
  21. Huleihel m. et al. (1996). Distinct expression levels of cytokines and infertile men. *Fertility and sterility*. Vol:66,No:1,July.135-139.
  22. Naz R.K., Kaplan P.(1994). Increased levels of interleukin-5 in seminal plasma of infertile men. *J Androl*. May 15.3:220-7.
  23. Paradisi R. (1997). T-helper 2 type cytokine and soluble interleukin-2 receptor levels in seminal plasma of infertile men. *Am J Reprod Immun*. Aug.38,2:94-99.
  24. Douset B., Hussenet F. (1997).Seminal cytokine concentration (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, SR IL-2, SR IL-6), Semen parameters and blood hormonal status in male infertility. *Hum.Rep*.July ,12.7:1476-9.
  25. Matalliotakis et al. (1998). Interleukin-6 in seminal plasma of fertile and infertile men. *Arch Androl*.Jul-Aug,41.1:43-50.
  26. Matalliotakis I, Sifakis S, Goumemou A, Neonaki M. (1998). Cytokine levels in seminal plasma. *Clin. Exp Obstet Gynecol*.25 (1-2):58-60.
  27. Clkins J. et al. (1990). Tumor necrosis factor a enhances inhibitory effects of IL-1b on leydig cell steroidogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*., 166: 1313.
  28. Hong G.et al.( 1990). IL-2 is a potent inhibitor of leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology*. Vol.127,No:3:1234-39.
  29. Orava M. et al.(1989). IFN $\gamma$  inhibits steroidogenesis and accumulation of mRNA of steroidogenic enzymes p450scc and p450c17 in cultured porcine Leydig cells. *Mol. Endoc*. 3:887.
  30. Shimoya K. Et al.(1993). Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma of infertile patients with leukospermia. *Fertility and Sterility*. Apr.59.4:885-8.
  31. Shimonovitz S., Barak V. (1994). High concentration of soluble IL-2 receptors in ejaculates with low sperm motility. *Human Rep*. Vol:9.No:4: 653-55.