

**TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOL**

**Toiduainete Instituut**

**Oksüdatiivne stress, mehepoolne viljatus  
ja toitumisharjumuste võimalik mõju**

Gerly Kilusk

Tallinn 2005

Olen koostanud magistritöö iseseisvalt.  
Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite  
tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja  
mujalt pärinevad andmed on viidatud.

Autor Gerly Kilusk .....

Üliõpilase kood	970604KATM
Õpperühm	KATM

Töö vastab kehtivatele nõuetele:

Juhendaja  
Andres Salumets, PhD.....

Kaasjuhendaja  
Dotsent Margus Friedenthal .....

Kaitsmisele lubatud “.....” ..... 2005.a.

Toiduainete Instituudi direktor  
Professor Raivo Vokk .....

## ANNOTATSIOON

Magistritöö on kirjutatud eesti keeles 73 leheküljel ja sisaldab 11 tabelit, 34 joonist, 1 lisa ning 82 kirjandusviidet.

Töö esimeses osas on kirjeldatud oksüdatiivse stressi olemust ning erinevaid anti- ja pro-oksüdante. Peatutud on toitumise osal oksüdatiivse stressi tekkimises. Lisaks on käsitletud meeste viljakust mõjutavaid tegureid ning reaktiivsete hapniku osakeste osa meeste viljatuse tekkimises.

Töö teises osas on antud ülevaade kasutatud materjalidest ja meetoditest, sealhulgas seemnevedeliku kvaliteedi hindamisest, reaktiivsete hapniku osakeste ja põletikumarkerite määramisest ning toitumisuuringu läbiviimisest.

## I SISSEJUHATUS

Oksüdatiivse stressi temaatika on hetkel väga aktuaalne, kuna tänapäeval puutub inimene sageli kokku seda puudutavate faktoritega. Oksüdatiivse stressi tõttu kahjustuvad lipiidide, valkude, süsivesikute ning nukleiinhapete struktuur ja funktsioon.

Ülemäärane oksüdatiivne stress omab rolli mitmete haiguste tekkes. Uuringud on näidanud, et viimase 50 aasta jooksul on oluliselt halvenenud meeste viljakus. Üheks oluliseks seemnerakkude viljastamisvõimelisuse mõjutajaks peetakse hapniku reaktiivseid osakesi ning oksüdatiivset stressi. Seemnerakud on tundlikud reaktiivsete hapniku osakeste põhjustatud kahjustustele, kuna nende membraanis on palju polüküllastamata rasvhappeid.

Eluviisid võivad väga oluliselt mõjutada inimese tervislikku seisundit. Oksüdatiivse stressi teket soodustavad mitmesugused kemikaalid ja füüsilised faktorid (näiteks mikrolained, radioaktiivne kiirgus), ebaterved eluviisid (näiteks suitsetamine, rohke alkoholi tarbimine, toitumisvead) ning mitmed ravimid. Antioksidantide enamik tagatakse normaalse segatoiduga, seega on üks abinõu oksüdatiivse stressi ennetamiseks tervislik toitumine.

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida seemnevedeliku kvaliteeti ning reaktiivsete hapniku osakeste mõju seemnevedeliku kvaliteedinäitajatele.

Töö ülesandeks oli:

1. määrata viljatute meeste seemnerakkude reaktiivsete hapniku osakeste hulk ja seemnevedeliku kvaliteet ning leida nende vastastikuseid seoseid,
2. uurida põletiku osa reaktiivsete hapniku osakeste tekkes,
3. hinnata eluviisi - eelkõige toitumise, alkoholi tarbimise ja suitsetamise osatähtsust seemnerakkude reaktiivsete hapniku osakeste ning seeläbi ka meeste viljatuse tekkes.

## SISUKORD

I SISSEJUHATUS.....	4
KASUTATUD LÜHENDID.....	7
II KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1. Oksüdatiivne stress.....	8
1.1 Pro-oksüdandid.....	8
1.1.1 Vabad radikaalid ja reaktiivsed osakesed.....	8
1.1.1.1 Reaktiivsed hapniku osakesed (RHO-d).....	9
1.1.1.2 Reaktiivsed lämmastiku osakesed.....	10
1.1.2 Pro-oksüdantsed faktorid.....	11
1.2 Antioksüdandid.....	12
1.2.1 Antioksüdantne regulatsioonisüsteem organismis.....	12
1.2.2 Erinevad antioksüdandid.....	13
1.2.2.1 Vitamiinid ja mineraalained.....	13
1.2.2.2 Tioolühendid.....	15
1.2.2.3 Ensüümid.....	15
1.3 Oksüdatiivne stress.....	17
1.3.1 Oksüdatiivne stress normaalsetes füsioloogilistes protsessides.....	17
1.3.2 Oksüdatiivse stressi roll haiguste tekkes.....	18
1.4 Oksüdatiivne stress ja toitumine.....	19
1.4.1 Tervislik toitumine.....	19
1.4.2 Oksüdatiivne stress ja toitumine.....	20
1.5 Oksüdatiivse stressi määramise võimalused.....	21
2. Mehepoolne viljakus.....	24
2.1 Spermatogenees.....	24
2.1.1 Spermatoosid.....	24
2.1.2 Spermatogenees.....	24
2.2 Mehepoolse viljatuse mõiste, põhjused ja levik.....	25
2.2.1 Geneetilised põhjused.....	25
2.2.2 Põletikud.....	26
2.2.3 Muud põhjused.....	27
2.3 Mehepoolse viljatuse analüüsi laboratoorsed võimalused.....	27
2.3.1 Seemnerakkude liikuvus.....	28

2.3.2	Seemnerakkude kontsentratsioon.....	28
2.3.3	Seemnerakkude morfoloogia.....	28
2.3.4	Leukotsüütide määramine seemnevedelikus.....	29
2.4	Reaktiivsed hapniku osakesed ja spermatoosidide füsioloogia.....	30
2.5	Reaktiivsed hapniku osakesed ja mehepoolne viljatus.....	32
2.6	Toitumine ja mehepoolne viljatus.....	34
III EKSPERIMENTAALNE OSA.....		37
3.1	Materjalid ja meetodid.....	37
3.1.1	Materjalid.....	37
3.1.2	Meetodid.....	38
3.1.2.1	Seemnevedeliku kvaliteedi hindamine.....	38
3.1.2.2	Leukotsüütide ja ebaküpsete seemnerakkude värvimine Giemsa ja Bryan-Leishman'i meetodil ning leukotsüütide kontsentratsiooni määramine.....	40
3.1.2.3	RHO-de määramine seemnerakkude suspensioonis .....	41
3.1.2.4	Interleukiin-6 määramine IMMULITE automaatanalüsaatoril.....	42
3.1.2.5	Küsimustiku koostamine ja analüüs.....	42
3.1.2.6	Andmete statistiline töötlus.....	42
3.2	Tulemused ja arutelu.....	44
3.2.1	Tulemused.....	44
3.2.1.1	Seemnevedelike kvaliteedinäitajad.....	44
3.2.1.2	Seemnerakkude kvaliteet ja RHO-de produktsioon.....	45
3.2.1.3	Leukotsüütide esinemine spermas ning RHO-de produktsioon.....	49
3.2.1.4	Interleukiin-6 taseme seosed seemnerakkude kvaliteedi, leukotsüütide kontsentratsiooni ning sperma RHO-de produktsiooniga.....	51
3.2.1.5	Küsimustike vastuste analüüs .....	53
3.2.2	Arutelu.....	57
IV JÄRELDUSED.....		62
V KOKKUVÕTE.....		63
VI SUMMARY.....		64
VII KASUTATUD KIRJANDUS.....		65
VIII LISA .....		74

## KASUTATUD LÜHENDID

ATP	- adensiintrifosfaat (adenosine triphosphate)
cAMP	- 3',5'-tsükliiline adensiinmonofosfaat (3',5' cyclic adenosine monophosphate)
DNA	- desoksüribonukleiinhape (deoxyribonucleic acid)
G6PD	- glükoos 6-fosfaat dehüdrogenaas (glucose-6-phosphate dehydrogenase)
GSH	- glutatioon (glutathione)
GSHPX	- glutatiooni peroksüdaas (glutathione peroxidase)
GSSG	- oksüdeeritud glutatioon (oxidized glutathione)
IL-6	- interleukiin-6 (interleukin-6)
IL-8	- interleukiin-8 (interleukin-8)
KMI	- kehamassi indeks (body mass index)
LO <sup>·</sup>	- rasvhappe alkoksüradikaal (fatty acid alkoxyl radical)
LOOH	- rasvhappe hüdroperoksiid (fatty acid hydroperoxide)
LP	- lipiidide peroksüdatsioon (lipid peroxidation)
NADP	- nikotiinamiid adeniin dinukleotiid fosfaat (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NADPH	- nikotiinamiid adeniin dinukleotiid fosfaadi redutseeritud vorm (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form)
NO <sup>·</sup>	- nitrikoksiid radikaal (nitric oxide radical)
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	- superoksiid anioon radikaal (superoxide anion radical)
OH <sup>·</sup>	- hüdroksüül radikaal (hydroxyl radical)
ONOO <sup>-</sup>	- peroksünitrit anioon (peroxynitrite)
OS	- oksüdatiivne stress (oxidative stress)
PUFA	- polüküllastamata rasvhape (polyunsaturated fatty acid)
RHO	- reaktiivsed hapniku osakesed (reactive oxygen species)
RLO	- reaktiivsed lämmastiku osakesed (reactive nitrogen species)
ROO <sup>·</sup> (HOO <sup>·</sup> )	- peroksüül radikaal (peroxyl radical)
RS <sup>·</sup>	- tiüül radikaal (thiyl radical)
SD	- standardhälve (standard deviation)
SEM	- keskmise väärtuse viga (standard error of the mean)
SOD	- superoksiidi dismutaas (superoxide dismutase)
TZI	- morfoloogiliselt defektsete seemnerakkude indeks (teratozoospermia index)
WHO	- Maailma Tervishoiuorganisatsioon (World Health Organisation)

## II KIRJANDUSE ÜLEVAADE

### 1. Oksüdatiivne stress

#### 1.1 Pro-oksüdandid

##### 1.1.1 Vabad radikaalid ja reaktiivsed osakesed

Vaba radikaal on iga osake, mis sisaldab ühte või enam paardumata elektroni. Vaba radikaal on ülireaktiivne, mistõttu eksisteerib lühikest aega. Vabale radikaalile on iseloomulik ahelreaktsioon. Mingi faktori poolt tekitatud vaba radikaal atakeerib molekuli, võttes sellelt vesinikuaatomi. Atakeeritud molekul muuutub vabaks radikaaliks, mis atakeerib teisi ühendeid. Tulemuseks on ahelreaktsioon, mis kulgeb suure kiirusega (Zilmer et al., 1994).

Reaktiivsete osakeste mõiste hõlmab nii vabu radikaale kui ka reaktiivseid mitteradikaalilisi osakesi. Eristatakse:

- Reaktiivseid hapniku osakesi
- Reaktiivseid lämmastiku osakesi (Zilmer et al., 1999).

Olulisemad reaktiivsed hapniku ja lämmastiku osakesed on toodud tabelis 1.

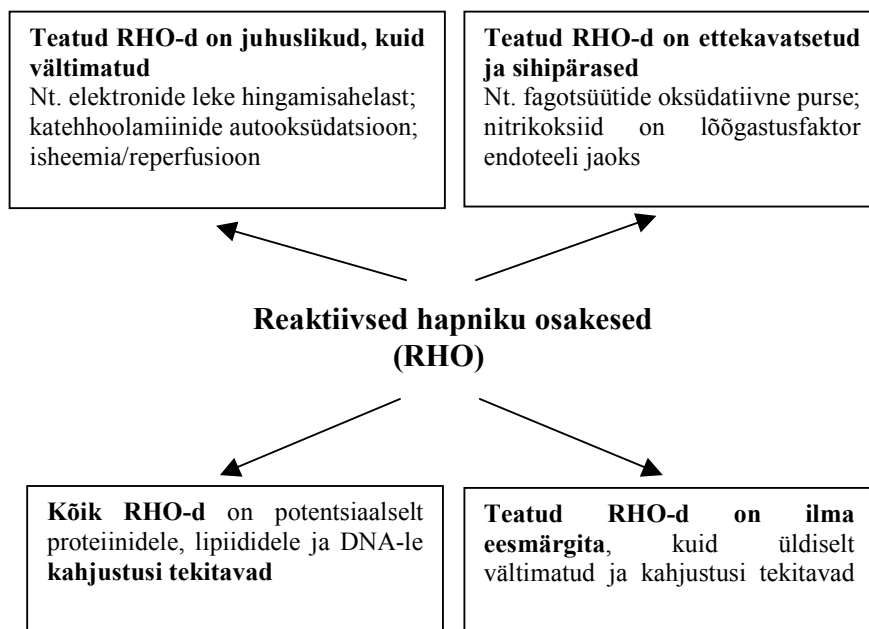
**Tabel 1.** Tuntumad reaktiivsed osakesed.

Triviaalnimetused	Tähistus
<b>Vabad radikaalid</b>	
Superoksiid anioon radikaal	$O_2^{\cdot -}$
Hüdroksüül radikaal	$OH^{\cdot}$
Nitrikoksiid radikaal	$NO^{\cdot}$
Peroksüül radikaal	$ROO^{\cdot}$ ( $HOO^{\cdot}$ )
Tiüül radikaal	$RS^{\cdot}$
<b>Mitteradikaalilised reaktiivsed osakesed</b>	
Vesinikperoksiid	$H_2O_2$



### 1.1.1.1 Reaktiivsed hapniku osakesed (RHO)

RHO-d moodustuvad organismis erinevate biokeemiliste protsesside tulemusena. Nende iseloomu kirjeldab joonis 1.



**Joonis 1.** Hapniku reaktiivsete osakeste iseloom (Benzie , 2003).

Hapnik ( $O_2$ ) on oluline aeroobsetele organismidele, aga tema redutseerimise produktid võivad käituda vabade radikaalidena. Hapniku molekuli ühe elektronilise redutseerimise tagajärjel tekib **superoksiid aniooni radikaal** ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Gate et al., 1999). Superoksiid anioon radikaali peamised tekkekohad on mitokondrid, fagotsütaarsete rakkude membraanid, endogeensete ja eksogeensete substraatide metabolism endoplasmaatilises retiikulumis ning ksantiini oksüdaasi osalusel toimuv puriinide metabolism (Shils et al., 1994).

**Vesinikperoksiid** on hästi difundeeruv molekul, ta võib kergesti läbida membraane ja ta on vähem reaktiivne võrreldes superoksiid anioon radikaaliga. Vesinikperoksiid tekib superoksiid aniooni radikaali dismuteerumisel superoksiidi dismutaasi toimel (joonis 2). Samuti võib vesinikperoksiid tekkida aminohapete oksüdaasi ja ksantiini oksüdaasi poolt katalüüsivate ensüümreaktsioonide käigus (Gate et al., 1999).

SOD

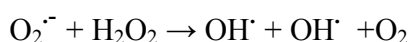


**Joonis 2.** Superoksiid dismutaasi poolt katalüüsitud vesinikperoksiidi tekkimine superoksiid aniooni radikaalist.

**Hüdroksüülradikaal** on reaktiivsem vaba hapniku radikaal, mille tekkimine omab võtmerolli koekahjustuste kujunemises. Hüdroksüülradikaali tekkimise põhiteed on järgmised:

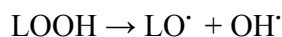
1. Rauda ning vase ionide poolt katalüüsitud superoksiid anioon radikaali ning vesinikperoksiidi omavaheline reaktsioon - Haber-Weissi'i reaktsioon (joonis 3)

(Halliwell et al., 1989).



**Joonis 3.** Haber-Weissi'i reaktsioon.

2. Veemolekuli homolüüs
3. Rasvhappe hüdroperoksiidi (LOOH) lõhustumine, mille käigus tekib rasvhappe alkoksüüradikaal (LO<sup>•</sup>) ja hüdroksüülradikaal.



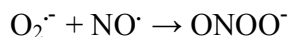
**Joonis 4.** Rasvhappe hüdroperoksiidi lõhustumine.

4. Ksenobiootikumi redoksringluses tekkiva hemikinooni reageerimine vesinikperoksiidiga (Zilmer et al., 1994).

### 1.1.1.2 Reaktiivsed lämmastiku osakesed

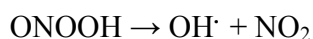
Reaktiivsed lämmastiku osakesed on **nitrikoksiid** (NO<sup>•</sup>) ja **peroksünitritanioon** (ONOO<sup>•</sup>). **Nitrikoksiid** on laenguta molekul, ta sisaldab üksikut paardumata elektroni (NO<sup>•</sup>), mis on põhjuseks reaktsioonidele hapniku, glutatiooni ja superoksiidi radikaaliga. Nitrikoksiid tekib enüümi nitrikoksiid süntaasi toimel L-arginiini guanidiinigrupist L-arginiini muutumisel L-tsirulliiniks. Eristatakse kolme produtseerijat: veresoonte endoteelirakud, neutrofiilid ja neuronid (Drew et al., 2002).

Superoksiid aniooni radikaali ja NO<sup>•</sup> reageerimisel tekib peroksünitrit anioon (joonis 5) (Saran et al., 1989).



**Joonis 5.** Peroksünitrit aniooni protoneerumine.

Peroksünitrit aniooni protoneerunud vorm võib lõhustuda  $\text{OH}^-$ -ks ja  $\text{NO}_2^-$ -ks (joonis 6) (Saran et al., 1989).



**Joonis 6.** Peroksünitrit aniooni lõhustumine.

### 1.1.2 Pro-oksüdantsed faktorid

Pro-oksüdant ehk oksüdatiivne stressor on osake/faktor, mis on võimeline esile kutsuma või süvendama oksüdatiivset stressi (OS). See mõiste haarab reaktiivseid hapniku ja lämmastiku osakesi, metalliioone, ravimeid ja füüsikalisi faktoreid. Vabade radikaalide ja reaktiivsete osakeste peamised tekkepõhjused on (Zilmer et al., 1999):

#### Endogeensed ehk organismisisesed

- Mitokondriaalne hingamisahel – produtseerib raku hingamise käigus superoksiidi radikaale
- Fagotsüüdid – produtseerivad superoksiidi radikaale, hüdroksüülradikaale ja vesinikperoksiidi
- Ksantiini oksüdaas – produtseerib superoksiidi radikaale puriinide katabolismi käigus
- Vaba raud ja vask – katalüüsivad hüdroksüülradikaalide teket, kuna nad käituvad inimorganismis stabiilsete, varieeruva oksüdatsiooniastmega metalliioonidena
- Arahhidonaadi metabolism – produtseerib rasvhapete peroksiide
- Peroksüsoomid – produtseerib RHO-d biomolekulide ja rasvhapete lõhustumisel
- Põletik – produtseerib RHO-d fagotsüütide üliaktiivsuse tõttu
- Pidev emotsionaalne tugev stress – närvikude on reaktiivsete osakeste poolt kergemini kahjustatav kui teised koed, kuna ajukoe biomembraanide fosfolipiidid on polüküllastamata rasvhapete rikkad ning oksüdatiivne metabolism on ajukoes väga intensiivne (Raps et al., 1989).

#### Eksogeensed

- Kurnav füüsiline pingutus – lihaskudedes on homeostaasi tagamiseks vajalik täpne koordineeritus hapniku rohke tarbimise ja energia intensiivse kulutamise vahel. Olulise potentsiaalse kahjustajana lisandub lihaskoe puhul müoglobiin, mille rauda sisaldavad laguproduktid on efektiivsed pro-oksüdandid (Jackson et al., 1993)
- Raua ja vase liig toidus

- Raskmetallid
- Radioaktiivne kiirgus, ultraviolett kiirgus, ultraheli, vibratsioon
- Ksenobiootikumide redoksringlus
- Ravimid, mis langetavad antioksidantide taset
- Anesteetikumid, pestitsiidid, orgaanilised lahustid, keskkonnamürgid, osoon, suitsetamine (Zilmer et al., 1999).

## **1.2 Antioksidandid**

Antioksidant on substants, mis aeglustab või inhibeerib substraadi oksüdeerumist, olles ise väga madalas kontsentratsioonis võrrelduna oksüdeeruva substraadiga. Oksüdeeruva substraadi mõiste hõlmab lipiide, valke, nukleiinhappeid ja süsivesikuid või mistahes teisi molekule (Zilmer, 1994).

### **1.2.1 Antioksidantne regulatsioonisüsteem organismis**

Vabade radikaalide ja teiste reaktiivsete osakeste hulga reguleerimiseks funktsioneerib organismis antioksidantne regulatsioonisüsteem, mille kõikide komponentide olemasolu vajalikus hulgas on hädavajalik. See koosneb antioksidantidest, mille koordineeritud ühistegevus reguleerib oksüdatiivsete stressorite toimet. Inimorganismi seisukohalt on otstarbekas antioksidante liigitada arvestades nende lokalisatsiooni veres ja rakkudes. Kasutusel on järgnev jaotus (Zilmer et al., 1999):

1. Vereplasma peamised antioksidandid
  - Veelahustuvad molekulid - askorbiinhape, kusihape, albumiin, tseruloplasmiin, apotransferriin, laktotransferriin
  - Lipiidlahustuvad molekulid - vitamiin E, ubikinoon, vitamiin A, karotenoidid
2. Rakusisesed peamised antioksidandid
  - Veelahustuvad molekulid - glutatioon ja askorbiinhape
  - Ensümaatilised - superoksiidi dismutaas, katalaas, glutatiooni peroksüdaas
3. Biomembraanide peamised antioksidandid
  - Lipiidlahustuvad molekulid - vitamiin E, ubikinoon, karotenoidid

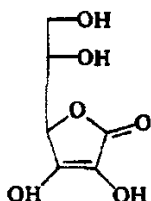
Lisaks organismis sünteesitavatele ja kehavedelikes leiduvatele antioksidantidele saab inimorganism neid ka toiduga. Olulisemad on tokoferool, askorbiinhape, retinool, karotenoidid, antioksidantsed mikroelemendid (näiteks seleen). Inimorganismi antioksidantne kaitsesüsteem on efektiivne aga mitte eksimatu, kahjustuste hulk suureneb vanusega (Zilmer et al., 1995).

## 1.2.2 Erinevad antioksidandid

### 1.2.2.1 Vitamiinid ja mineraalained

#### Vitamiin C

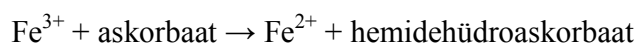
Vitamiin C ehk L-askorbiinhape on kuue süsinikuga hape. Oksüdeerumisel tekib askorbiinhapest semihüdroaskorbiinhape ning edasisel oksüdatsioonil dehüdroaskorbiinhape. Askorbiinhape loovutab kergesti elektrone, ta on elektronide doonoriks keemilistele ühenditele reaktsioonides, mis leiavad aset nii rakus kui ka väljaspool. Askorbaat redutseerib superoksiidi, hüdroksüülradikaali ja teisi reaktiivseid hapniku radikaale (Papas, 1999). Joonisel 7 on toodud askorbiinhappe keemiline struktuur.



**Joonis 7.** Askorbiinhape

Askorbiinhappel kui vitamiinil on selge otsene antioksidatiivne efekt: ta kõrvaldab veekeskkonnas vabu radikaale (Niki, 1987). Lisaks on askorbiinhape ka kaudne antioksidant, mis toetab ja abistab vitamiin E osalusel toimuvaid antioksidatiivseid protsesse lipiidises keskkonnas. Askorbiinhape taastab vitamiin E esialgse lähevormi pärast seda, kui vitamiin E on vaba radikaali kõrvaldamise protsessis ise muundunud.

Vitamiin C võib käituda ka pro-oksüdandina. Kui vitamiin C kohtub vaba rauaga, redutseerib ta kolmevalentse raua  $Fe^{3+}$ -ks (joonis 8):

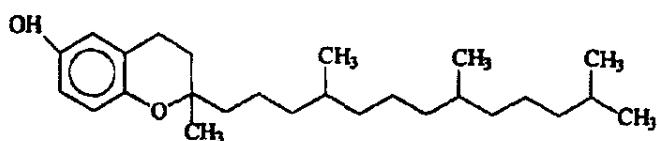


**Joonis 8.** Vitamiin C ja kolmevalentse raua reaktsioon.

Fe<sup>2+</sup> keskse rolli tõttu hüdroksüülradikaali genereerimises muutub vitamiin C koostöös rauaioonidega väga tugevaks pro-oksüdandiks (Zilmer et al., 1994).

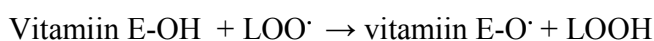
### Vitamiin E

Vitamiin E esineb looduses vähemalt kaheksa erineva teisendina, millede antioksidantne kaitsevõime on erinev. Bioloogiliselt aktiivseim ja kõige edukam radikaaliliste ahelprotsesside tõkestaja on vitamiin E üks erivormidest –  $\alpha$ -tokoferool (Hsu et al., 2002). Joonisel 9 on toodud  $\alpha$ -tokoferooli keemiline struktuur.



Joonis 9.  $\alpha$ -tokoferool

Vitamiin E kõrvaldab LOO<sup>•</sup> ja blokeerib sellega lipiidide peroksüdatsiooni ahelprotsessi (Niki, 1987).

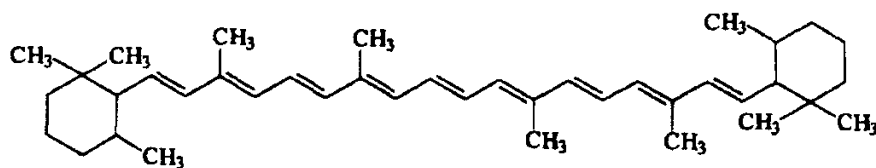


\* antud ühend metaboliseerub

Joonis 10. Vitamiin E blokeerib lipiidide peroksüdatsiooni ahelprotsessi.

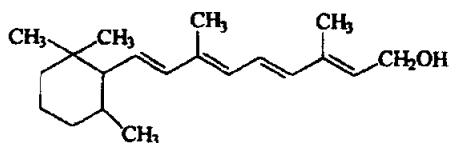
### Karotenoidid ja vitamiin A

Karotenoidid on värvilised taimepigmentid, mille hulka kuuluvad karoteenid ning ksantofüllid. Karotenoidide pere liikmete arv on aukartust äratavalt suur – kokku tuntakse nüüdisajal üle 600 erineva karotenoidi. Nende ühendite põhifunktsioon tuleneb nende keemilise ehituse eripärast. Pikkade süsinikuaatomitest moodustunud ahelate olemasolu, kus üksiksidemed vahelduvad kaksiksidametega, võimaldabki neil kõrvaldada ergastatud hapniku ühendeid ja käituda antioksidandina (Zilmer et al., 1995). Joonisel 11 on toodud  $\beta$ -karoteeni keemiline struktuur.



Joonis 11.  $\beta$ -karoteen

Karotenoididest tekib soole mikrofloora karoteeni oksügenaasi toimele vitamiin A - retinool. Peamine karotenoid, millest vitamiin A tekib on  $\beta$ -karoteen, tema molekul lõhustub võrdseteks osadeks (Zilmer et al., 1996). Joonisel 12 on retinooli keemiline struktuur.



**Joonis 12.** Retinool

### **Seleen**

Seleen ise ei ole antioksidant, küll aga on teda vaja antioksidantsete ensüümide ehituses ja funktsioneerimises. Seleen toimib mitmetes ensüümides kofaktorina. Inimorganismile on seleen asendamatu mikroelement.

Seleeni sisaldavatel ensüümidel on oluline roll vesinikperoksiidi ja lipiidide hüdroperoksiidide kõrvaldamises (Hsu et al., 2002). Seleen on glutatiooni peroksüdaasi kofaktor, suurendades seeläbi glutatiooni kättesaadavust. Lisaks eeltoodule võib seleen toimida ka kaudse antioksidandina sidudes elavhõbeda ioone (Zilmer et al., 1995).

#### **1.2.2.2 Tioolühendid**

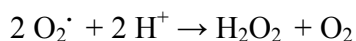
### **Glutatioon**

Glutatioon (GSH) on tripeptiid, mis esindab organismis mittevalgulist tioli. Seda molekuli leidub organites, millel on kokkupuude toksiinidega nagu neerud, maks, kopsud ja soolestik. Kehavedelikes leidub teda vähe - mikromolaarsetes kontsentratsioonides. Rakus osaleb GSH valkude sünteesis, aminohapete transpordil ning DNA sünteesil. Glutatioon osaleb vesinikperoksiidi konversioonil veeks ja ka  $O_2^-$ ,  $OH^-$  kõrvaldajana. Glutatiooni sünteesitakse L-glutamiinist, L-tsüsteiinist, L-glütsiinist (Gate et al., 1999).

#### **1.2.2.3 Ensüümid**

### **Superoksiidi dismutaas**

Superoksiidi dismutaas (SOD) on ensüüm, mis konverteerib kaks superoksiid anioon radikaali vähem toksilisteks produktideks -  $H_2O_2$ -ks ja  $O_2$ -ks (joonis 13).

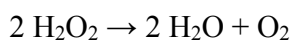


**Joonis 13.** Superoksiid anioon radikaali konverteerimine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ks ja  $\text{O}_2$ -ks superoksiidi dismutaasi katalüüsil.

Superoksiidi dismutaas esineb kahes vormis: mangaani sisaldav (esineb mitokondris) ning rauda ja vaske sisaldav SOD (tsütosoolis). Mõlemad ensüümid on peamised raku kaitsjad oksüdatiivse stressi eest (McCord, 2000).

### **Katalaas**

Katalaas katalüüsib  $\text{H}_2\text{O}_2$  lõhustumist (joonis 14).

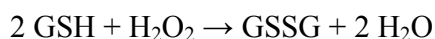


**Joonis 14.** Katalaasi poolt katalüüsitud  $\text{H}_2\text{O}_2$  lõhustumine.

Katalaasi leidub rohkesti maksarakkudes ja erütrotsüütides. Rakus lokaliseerub ta peroksüsoomides (80%) ja tsütoplasmas (20%) (Sun, 1990).

### **Glutatiooni peroksüdaas**

Seleen-sõltuv glutatiooni peroksüdaas (GSHPX) katalüüsib redutseeritud glutatiooni (GSH) reaktsiooni vesinikperoksiidiga, mille käigus tekib oksüdeeritud glutatioon (GSSG) ning vesi (joonis 15).



**Joonis 15.** Glutatiooni peroksüdaasi poolt katalüüsitud glutatiooni reaktsioon vesinikperoksiidiga.

Lisaks esineb glutaatiooni ainevahetuses ensüüm glutaatiooni reduktaas. See on flavoproteiin, mis katalüüsib GSSG muundamist GSH-ks ( $\text{NADPH} \rightarrow \text{NADP}^+$ ) (Gate et al., 1999).



### 1.3 Oksüdatiivne stress

Oksüdatiivne stress (OS) on häire pro-oksüdantide ja antioksüdantide tasakaalus pro-oksüdantide kasuks, mis viib potentsiaalsetele kahjustustele. OS'i tõttu kahjustuvad biomolekulide (lipiidid, valgud, süsivesikud, nukleiinhapped) struktuur ja funktsioon (Södergren, 2000).

#### 1.3.1 Oksüdatiivne stress normaalsetes füsioloogilistes protsessides

Reaktiivseid osakesi seostatakse tavaliselt bioloogiliste protsesside häiretega. Tegelikult on reaktiivsed osakesed teatud tasemel ja hulgal hädavajalikud organismi elutalituse protsessides. Reaktiivsete osakeste tekkimine on tähtis järgmistes protsessides (Zilmer et al., 1994):

1. Prostaglandiinide ja leukotrieenide süntees  
Prostaglandiinid ja leukotrieenid on 20-süsinikuliste polüküllastamata rasvhapete oksüderivaadid, mis toimivad reguleerivate signaalmolekulidena. Nende biosüntees toimub arahhidoonhapest vastavate ensüümide toimetel. Arahhidonaat oksüdeerub rasvhappe peroksüülradikaali kaudu (Zilmer et al., 1999).
2. Biomembraanide fosfolipiidide uuening  
Membraanide fosfolipiidide uuening on soodustatud fosfolipaas A<sub>2</sub> poolt.
3. Reguleerivus  
Reaktiivsed osakesed (RHO-d, NO<sup>•</sup>) on keemilised info ülekandjad. Rasvhappe hüdroperoksiid on proteiini kinaas C aktiveeriks. Hapniku vabad radikaalid on sekundaarseteks vahendajateks interleukiinide, forboolestrite ja mõnede teiste signaalmolekulide jaoks. Sekundaarsete ülekandajatena töötab ka nitrikoksiid, mis toimib endoteeli lõõgastusfaktorina (Saran et al., 1989).
4. Biofunktsioonid, mis on seotud oksüdatiivse plahvatusega, bioloogilise hävitamisega  
Nende hulka kuuluvad: fagotsütoos, metallioonide sidumine kui kaitse, ka spermatoosoidi ja munaraku kontakteerumise mõningad momendid. Näiteks neutrofiilid kasutavad "oksüdatiivset purset" võõrkehade hävitamiseks (Nauseef et al., 1991).
5. Ksenobiootikumide biotransformatsioon  
Ksenobiootikumide biotransformatsiooni põhikoht on endoplasmaatiline retiikulum, kus toimuvad oksüdatsiooni- ja konjugatsioonireaktsioonid, mille puhul on teatud roll ka reaktiivsetel osakestel (Kehrer, 1993).

### 1.3.2 Oksüdatiivse stressi roll haiguste tekkes

Mida kestvam ja sügavam on OS, seda tõsisemalt häirub biomolekulide, rakkude ning kudede talitus, mis omakorda viib haiguste tekkeni. Biomolekulide struktuuris ja funktsioneerimises kaasnevad järgmised häired:

1. Polüküllastamata rasvhapped alluvad peroksüdatsioonile. Seda nimetatakse lipiidide peroksüdatsiooniks (LP) ja selle lõpp-produktiks on maloondialdehüüd ja ka teised aldehüüdid (Ferrari, 2003). Kõrvalekalded ja haigused, mis on seotud LP-ga on toodud tabelis 2.

**Tabel 2.** Lipiidide peroksüdatsioonist põhjustatud haigused (Ferrari, 2003).

<b>Kõrvalekalle või haigus</b>	<b>Oksüdatiivne mehhanism</b>
Ateroskleroos	Madala tihedusega lipoproteiinide modifitseerumine viib oksüdeeritud lipoproteiinide tekkeni
Katarakt	Lipiidide rikas dieet ja antioksidantide puudus
Vananemine	Lipiidide rikas dieet ja antioksidantide puudus
Hemolüüs ja aneemia	Polüküllastamata rasvhapete rikas dieet teeb erütrotsüüdid vastuvõtlikuks rakumembraani lõhenemisele
Vitamiinide puudus	Peroksiidid ja lipiidide peroksüdatsiooni lõpp-produktid blokeerivad mitmete toitainete imendumise (tiamiin, vitamiinid C, A, E)
Vähk	Peroksiidid, maloondialdehüüd kahjustavad geneetilist materjali ja suurendades vähi riski

2. Valgud (ensüümid, transporterid, retseptorid jne.) alluvad oksüdatsioonile karbonüülumise teel. Toimub valkude agregatsioon, denaturatsioon, fragmentatsioon ning kiireneb nende lõhustumine. Valkude (kristalliin) oksüdeerumisega on seotud näiteks silmade kahjustused.
3. Nukleiinhapete puhul tekivad nukleotiidijääkide oksukahjustused ja fragmenteerumised. Tekivad häired nukleiinhapete ja valkude biosünteesis. DNA modifikatsioonid vastutavad peamiselt vananemisprotsessi ja vähi tekke eest (Gate et al., 1999).
4. Süsivesikud alluvad oksüdatsioonile ja abnormaalsetele modifikatsioonidele. Näiteks on reumatoidartriit põhjustatud hüaluroonhappe degradatsioonist (Zilmer et al., 1999).

## 1.4 Oksüdatiivne stress ja toitumine

### 1.4.1 Tervislik toitumine

Toidust saadav energiahulk peab katma organismi põhiainevahetuseks, soojustekkeks ja kehaliseks ning vaimseks tegevuseks vajaliku energiahulga. Energiavajadus sõltub soost, east, kehamassist, ainevahetuse eripärast, kliimast ja muudest tingimustest (Eesti toitumissoovitused, 1995). Kuna käesolev töö puudutab teatud eas meeste toitumist, siis on tabelis 3 toodud energiasoovitused neile erineva kehalise koormuse puhul.

**Tabel 3.** Päevane energiasoovitus meestele kcal-tes erineva kehalise koormuse puhul.

Vanus, aasta	Kehakaal, kg	Väga vähene koormus	Vähene koormus	Keskmine koormus	Kõrge koormus	Väga kõrge koormus
18-30	70 ± 10	2450 (± 200)	2800 (± 250)	3150 (± 300)	3500 (± 350)	3850 (± 400)
30-60	70 ± 10	2350 (± 200)	2700 (± 200)	3050 (± 250)	3400 (± 300)	3700 (±300)

Põhiosa energiast – 52-60% peaksid katma süsivesikud. Valgud peaksid katma 10-14% päevasest toiduenergiast ning toidurasvade hulk ei tohiks ületada 30-32%, kusjuures küllastunud rasvhapete kogus ei tohiks ületada 10-12% ning mono- ja polüküllastamata rasvhapped kumbki mitte üle 10% toiduenergiast. 25% toidukogusest peaksid moodustama piimatooted, 19% köögiviljad, 16% kartul, 15% teraviljatooted, 11% puuviljad, 9% liha-kala-muna, 3% suhkur, maiustused ja muud toiduained ning 2% lisatavad toidurasvad (Liebert et al., 1999). Vitamiine ja mineraalaineid vajab inimene väga väikestes kogustes. Tabelites 4 ja 5 on toodud soovitusel vanusest (Eesti toitumissoovitused, 1995).

**Tabel 4.** Soovitusel vitamiinide tarbimise kohta olenevalt vanusest.

Vanus, a.	Retinool µg-ekv	Vit D µg	Vit E mg	Tiamiin mg	Riboflaviin mg	Niatsiin µg-ekv	Vit B <sub>6</sub> mg	Folaadid µg	Vit B <sub>12</sub> µg	Vit C mg
19-30	1000	5	10	1,4	1,7	18	2,1	200	3,0	60
31-60	1000	5	10	1,4	1,6	18	2,0	200	3,0	60

**Tabel 5.** Soovitusel mineraalainete tarbimise kohta päevas olenevalt vanusest.

Vanus, a.	Ca, mg	K, mg	Mg, mg	Fe, mg	Zn, mg	I, µg	Se, mg
19-30	1000	1900	400	10	15	150	30-60
31-60	1000	1900	400	10	15	150	30-60

## 1.4.2 Oksüdatiivne stress ja toitumine

Viimastel aastakümnetel on paljud uuringud ajendatud mõttest dieedi olulisusest oksüdatiivse stressi tekkes. Mineraalained (raud, seleen), vitamiinid (vitamiin A, vitamiin C ja vitamiin E) ja küllastamata rasvhapped etendavad suurt rolli pro-oksüdantide ja antioksüdantide tasakaalus inimorganismis (Shils et al., 1994).

Polüküllastamata rasvhapped (PUFA) oksüdeeritakse kergesti vabade radikaalide abiga. Kõrge PUFA-de tase toidus teeb organismi vastuvõtlikumaks lipiidide peroksüdatsioonile, mida saab ära hoida manustades antioksüdante nagu vitamiin C, vitamiin E ja karotenoidid (Fang et al., 2002). Muutused antioksüdantide ja polüküllastamata rasvhapete tasemes võivad muuta DNA oksüdatiivse kahjustuse määra. Näiteks kõrge PUFA sisaldusega dieet, mida kasutati rottide toitmisel, põhjustas DNA oksükahjustuse markeri 8-OHdG (8-hüdrosü-2'-deoksüguanosiin) tõusu (Chen et al., 1999).

Mõned aminohapped (näiteks arginiin, tauriin, histidiin), peptiidid (näiteks karnosiin) ja nitrogeensed metaboliidid (näiteks kreatiniin ja kusihape) elimineerivad hapniku vabad radikaalid. Valguvaegus kahjustab antioksüdatiivsete ensüümide sünteesi ja vähendab kudede antioksüdantide kontsentratsiooni. Loomadel (rottidel) tehtud uuringud on näidanud, et mittepiisav valgu hulk viib tsiingi (Cu,Zn-SOD kofaktor) vaeguseni, mõjutades kaudselt superoksiidi eemaldamist. Valgurikas dieet (pärit loomsest allikast) võib viia organismi oksüdatiivse stressini. Esiteks, homotsüsteiin (riskifaktor kardiovaskulaarsete haiguste puhul) suurendab endoteelse superoksiidi produktsiooni. Teiseks on hiljutised uuringud näidanud, et suur valgutarbimine stimuleerib H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-de produktsiooni ja lipiidide peroksüdatsiooni inimese polümorfonukleaarsetes leukotsüütides (Fang et al., 2002).

Igapäevaselt tarbitav toit peaks sisaldama minimaalselt peroksiide, oksüsteroole jt. kehavõõraid ühendeid ning samuti palju antioksüdantseid faktoreid. Kõikvõimalikud sünteetilised toiduvärvid, toidu emulgaatorid, toidutahkestajad, toidukonservandid on kehavõõrad ained, mis liia korral soodustavad OS-i kujunemist. Kaaluka osa organismis toimivatest antioksüdantsetest faktoritest saame väliskeskkonnast toiduga. Neid peab ka organismis alati varuks olema. Seetõttu on neid kindlasti kasulikum saada pidevalt ja piisavalt (Zilmer et al., 1995).

Alkoholi toksiline toime on samuti hea näide oksüdatiivse stressi tekitajast. Etanool laguneb maksas ensüümide toimel atseetaldehüüdiks ning sellest omakorda moodustub äädikhape (Shils et al., 1994). Viimane aktiveeritakse ja lõhustatakse mitokondris süsihappegaasi ja veeni. Oksüdatiivse stressi seisukohalt võetuna on alkoholi metabolismis kriitilisteks momentideks atseetaldehüüdi, etanooli vabade radikaalide ning hapniku reaktiivsete osakeste moodustumine maksa ensüümide kaasabil. Kõigi nende ühendite teke raiskab maksas väärtuslikku antioksidantset kaitsepotsiaali, mis avaldub eeskätt rasvlahustuvate vitamiinide ja glutatiooni sisalduse vähenemises (Tanner et al., 1986).

Normaalseks inimtoiduks on võimalikult puhas, riknemata normaalne segatoit, milles on nii toortoitu kui ka mõõdukalt õlisid. Vanemaealistel või muul näidustusel võiks sellele lisanduda arstlikult kontrollitud ja argumenteeritud, ennetav mikrotoitainete (sealhulgas ka antioksidantsete) mõningane lisamanustamine (Zilmer et al, 1995).

### **1.5 Oksüdatiivse stressi määramise võimalused**

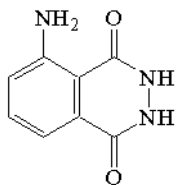
Kaasajal oletatakse, et OS on umbes 50 haiguse patogeneesi oluliseks komponendiks. Seetõttu on OS-i parameetrite määramine diagnostiliselt olulise väärtusega (Zilmer et al, 1994). Oksüdatiivseid kahjustusi on võimalik hinnata vabade hapniku radikaalide produktsiooni, lipiidide peroksüdatsiooni, DNA ja valkude oksüdatsiooni lõpp-produktide määramise kaudu, samuti määrates antioksidantide hulga vähenemist (Södergren, 2000).

RHO-de määramisel on kasutusel järgmised meetodeid:

1. reaktsioonid, millest võtab osa tsütokroom c kompleks, mis määravad RHO-de produktsiooni rakumembraani pinnal
2. reaktsioonid, mis määravad, nii raku sees kui ka väljas produtseeritud RHO-d. Määramisel kasutatakse luminooli poolt esile kutsutud kemoluminestsentsi
3. elektron spin resonants meetod, mis on kõige tundlikum ja võimaldab identifitseerida raku sees produtseeritud RHO-d. Viimati nimetatud meetod nõuab kalleid seadmeid ning on keeruline (Sikka et al., 1995).

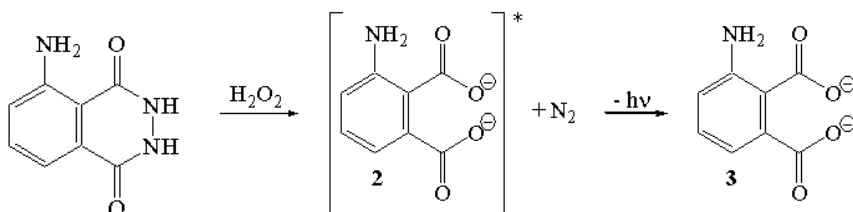
Vabade radikaalide määramiseks on enim leidnud kasutamist luminooli poolt esile kutsutud kemoluminestsentsi määramine (Sikka et al., 1995). Luminool e. 5-amino-2,3-dihüdro-1,4-phtalaziin-dioon või 3-amino-phtalaatiline-hüdraziid on kemoluminestseeruv ühend, mis

emiteerib keemilisel reaktsioonil valgust lainepikkusel 424 nm. Luminooli struktuurvalem on toodud joonisel 16.



**Joonis 16.** Luminooli struktuurvalem.

Reageerimisel vesinikperoksiidi või peroksünitritiga, luminool oksüdeerub. Luminool muundatakse dianiooniks ja kaks lämmastiku aatomit asendatakse kahe hapniku aatomiga. Sellel reaktsioonil eraldub lämmastik gaasina, jättes luminooli ergastatud olekusse. Ergastatud olek tähendab lisaenergiat, mis eraldub valgusvoona. Kirjeldatud reaktsioon on toodud joonisel 17.



**Joonis 17.** Luminooli oksüdeerumine.

Lipiidide peroksüdatsiooni hindamisel kasutatakse põhiliselt peroksüdatsiooni lõpp-produktide mõõtmist, aga ka polüküllastamata rasvhapete taseme languse hindamist. Tabelis 6 on toodud lipiidide peroksüdatsiooni mõõtmise meetodid (Södergren, 2000).

**Tabel 6.** Lipiidide peroksüdatsiooni määramise meetodid.

Mõõtmisobjekt	Meetod
Polüküllastamata rasvhapete taseme langus	Gaaskromatograafia ja kõrgsurve vedelikkromatograafia
Dieenkonjugaadid	Kõrgsurve vedelikkromatograafia ja spektrofotomeetria
Maloondialdehüüd	Tiobarbituurhappe test ja kõrgsurve vedelikkromatograafia, spektrofotomeetria
Aldehüüdid	Gaaskromatograafia-mass-spektroskoopia ja antikehad
F <sub>2</sub> - isoprostaan	Gaaskromatograafia-mass-spektroskoopia

Lipiidiide peroksüdatsiooni hindamisel on enim leidnud kasutust maloondialdehüüdi määramine tiobarbituurhappe testiga. Tiobarbituurhappe annab reaktsiooni maloondialdehüüdiga ja mõnede teiste aldehüüdidega. Kuna tiobarbituurhappe reageerib ka mõnede teiste lipiidide peroksüdatsiooni lõpp-produktidega, siis on täpsem öelda, et lipiidide peroksüdatsioon määratakse tiobarbituurhappe reaktiivsete substantside kaudu (Zilmer et al, 1994).

Valkude oksüdatsiooni hindamine põhineb valkude karboksüülrühma derivaatide reageerimisel 2,4-dinitrofenüülhüdrasiiniga, mõõtes seejärel lahuse neelduvust 370 nm juures. Hiljuti on aga hakatud enam kasutama antikehade määramist, kuna siis on võimalik määrata kindla valgu oksüdatsiooni. Kasutatavad anti kehad tunnevad ära spetsiifilise valgu oksüdeerunud osa (Bokov et al., 2004).

Enimkasutatav marker DNA oksukahjustuse määramiseks on 8-hüdroksü-2-deoksüguanosiin. 8-hüdroksü-2-deoksüguanosiin on peamine saadus puriini ja pürimidiini oksüdeerumisel (Chen et al., 1999). Teda on võimalik mõõta erinevate kudede ja rakkude DNA ekstraktsioonist. Mõõtmiseks kasutatakse kõrgsurve vedelikkromatograafia elektrokeemilist määramissüsteemi (Bokov et al., 2004).

Antioksidantse kaitse hindamiseks inimorganismis on võimalik määrata antioksidantsete ensüümide ja teiste antioksidantide hulka organismis. Kuna glutatioon on antioksidant, mis kiiresti oksüdeerub ja viiakse rakust välja, kasutatakse tihti glutatiooni määramist (Fang et al., 2002). On kasutatud ka glutatiooni ja oksüdeeritud glutatiooni suhte muutumise mõõtmist oksüdatiivse stressi tingimustes. GSH-d ja GSSG mõõtmisel kasutatakse kõrgsurve vedelikkromatograafiat ja spektrofotomeetria (Urso et al., 2003).

Lisaks on oluliseks näitajaks summaarne antioksidantne võime. See on parameeter, mis võtab kokku antioksidantide ja antioksidantsete ensüümide aktiivsuse. Määramisel kasutatakse standardina Trolox'it. Trolox (6-hüdroksü-2,5,7,8-tetrametüülkromaan-2-karboksüülhappe) on vitamiin E analoog. Põhiliselt kasutatakse kemoluminestsentsi määramise meetodit, kus reaktsiooni annab luminool ja reaktsiooni katalüsaatoriks lisatakse peroksüdaasi (Pasqualotto et al., 2000).

## **2. Mehepoolne viljakus**

### **2.1 Spermatogeneees**

#### **2.1.1 Spermatoosid**

Spermatoosid koosneb peast, kaelast, keskosast ja sabast. Peaosas võtab tuum enda alla üle 60% ning tuuma ees paikneb akrosoom. Akrosoom on glükoproteiine sisaldav struktuur, mis katab spermatoosidi pead. Pea pikkus on 4,5-5,0 µm ja laius 2,5-3,5 µm (WHO, 1999). Peaosas asetseb samuti tsentriool, mis on vajalik viburi funktsioneerimiseks ning embrüo rakkude jagunemiseks. Spermatoosidi saba pikkus on 45 µm ning seda läbib viburi toes ehk aksoneem. Aksoneem koosneb kahest tsentraalsest paaritust mikrotoobulist ja nende ümber asuvast üheksa mikrotoobuli dupletist. Paarilistele mikrotoobuletele kinnituvad haaradena valk düneiini molekulid. Düneiin hüdrolyüsib ATP molekuli ja konverteerib saadud energia spermi saba mehhaaniliseks liikumiseks. Spermatoosidide keskosas on ümber aksoneemi mitokondrid, kust tekib vajalik ATP (Kärner, 1997). Seemnerakud väljuvad mehe seemnejuhast koos seminaalplasmaga, moodustades seemnevedeliku. Seminaalplasma koosneb eesnäärme, põisnäärme ja munandimanuse eritisest. Seemnevedelikus on palju fruktoosi, on ka prostaglandiini, L-karnitiini, α-glükosidaasi, sidrunhapet ja happelist fosfataasi (Nieschlag, 2000).

#### **2.1.2 Spermatogeneees**

Spermatogeneees on spermatoosidi arenemine. Seemneraku arenguprotsess võtab aega vähemalt 64 päeva. Spermatogeneees jaguneb kolmeks perioodiks: paljunemine, küpsemine ja transformatsioon. Paljunemisperioodil jagunevad tüvirakkudest pärinevad spermatoogoonid mitootiliselt ning osa spermatoogoonidest diferentseerub primaarseteks spermatootsüütideks. Küpsemise käigus jagunevad primaarsed spermatootsüüdid meiotiliselt. Meioosi esimeses jagunemises tekivad primaarsetest spermatootsüütidest sekundaarsed spermatootsüüdid ning meioosi teises jagunemises tekivad sekundaarsetest spermatootsüütidest spermatiidid. Seega tekivad meioosi tagajärjel diploidsetest rakkudest haploidsed rakud. Spermatiididest arenevad edasi spermatoosidid ning antud protsessi nimetatakse transformatsiooniks ehk spermogeneesiks (Nieschlag, 2000). Transformatsiooni varastes astmetes moodustub akrosoom. Edasi toimub rakutuuma kondenseerumine ja tsütoplasma reorganiseerumine spermi keskosaks ja sabaks.



Spermiogeneesi viimases osas tõugatakse ära liigne tsütoplasma. Spermide vabanemist seemnetorukese valendikku nimetatakse spermiatsiooniks. Spermiatsioonil jääb spermi keskosaga seotuks veel väike tsütoplasma tilgake, mille sperm kaotab lõplikult alles munandimanusejuha läbides (Kärner, 1997). Spermatogeneesi häirete korral võivad spermas esineda seemnerakkude eellasrakud.

## **2.2 Mehepoolse viljatuse mõiste, levik ja põhjused**

Ligikaudu 15% paaridest seisavad silmitsi viljatuse probleemiga. Viljatuks nimetatakse paari, kellel ei ole õnnestunud rasestuda ühe aasta jooksul. Primaarne viljatus defineerib olukorda, kus varem ei ole rasedust saavutatud. Sekundaarne viljatus tähendab aga olukorda, kus eelnevatele rasedustele ei ole uusi rasedusi järgnenud (Nieschlag et al., 2001). Viljakust mõjutavad partnerite vanus ja tervislik seisund ning ennekõike suguelundite normaalne funktsioneerimine (Sharpe, 2002). Viljakust mõjutavad ka mitmed keskkonnast tulenevad faktorid. Keskkond esindab füüsiliste (temperatuur), keemiliste (tehisained), bioloogiliste (bakterid), käitumuslike (stress) ja sotsioökonomiliste (toitumine ja elukoht) mõjurite kogumit (Negro-Vilar, 1993).

Viljatuse põhjused on umbes 40% juhtudel naisepoolsed; 40% mehepoolsed ning ligikaudu 20% juhtudel jääb viljatuse põhjus selgusetuks (Jeyendran, 2000). Mehe viljatuse diagnoos pannakse, kui uuritud on mõlemat partnerit ja on leitud mehepoolne probleem (Kretser, 2001). Meeste viljakust mõjutavad väga mitmed haigused. Viljatus võib olla põhjustatud geneetilistest kõrvalekalletest, põletikest, traumast ning endokriinsetest, erektsiooni või ejakulatsiooni häiretest (Immarrone et al., 2003). Mõned mehe viljakust mõjutavad haigused põetakse läbi (mumpsorhiit), omandatakse (traumad, põletikud) või nad kujunevad välja puberteedieas (varikotseele) ja sellele järgneval perioodil. Osal juhtudest võib viljakuse vähenemise põhjuseks olla täiskasvanueas omandatud ning aja jooksul progresseeruv haigus (Punab et al., 2003).

### **2.2.1 Geneetilised põhjused**

7% mehepoolse viljatuse juhtudest on põhjustatud geneetilistest põhjustest: kromosoomide arvu või struktuuri defektidest või Y-kromosoomi mikrodeletsioonidest (Vicdan et al., 2004). Kõige enam esineb Klienefelter'i sündroomi. Nimetatud sündroomiga meestel esineb sugukromosoomide arvu kõrvalekalle - 47,XXY. Samuti põhjustavad rasket mehepoolset viljatust

Y-kromosoomi mikrodeletsioonid, mis võivad kehavälise viljastamise meetodi kasutamisel edasi kanduda järgnevasse põlvkonda (Weidner et al., 2002).

### 2.2.2 Põletikud

Akuutsed ja kroonilised põletikud võivad olla viljatuse põhjuseks. Põletik võib olla põhjustatud mehe suguteede infektsioonist või aktiveeritud immunoloogiliselt (Eggert-Kruse et al., 2001). Seemnevedelikus võib lisaks seemnerakkudele olla ka leukotsüüte. Leukotsüüdid on organismi kaitsefunktsiooni tagavad vererakud, mis jaotatakse kolme klassi: granulotsüüdid (neutrofiilid, basofiilid, eosinofiilid), monotsüüdid ning lümfotsüüdid. Leukotsüütidest esinevad seemnevedelikus põhiliselt neutrofiilid, monotsüüdid ja lümfotsüüdid. Lümfotsüüdid on pärit põhiliselt munandist ja munandimanusest, neutrofiilid ja monotsüüdid aga eesnäärrest. Neutrofiilid ja monotsüüdid on fagotsütoosivõimelised rakud, mis samuti võivad osaleda ka anormaalsete spermatoosidide kõrvaldamisel (Sharma et al., 2001). Kõrge leukotsüütide hulk on põletikunäitajaks ning üldiselt peetakse lubatud piiriks  $1 \times 10^6/\text{ml}$ . Leukotsüütide kontsentratsioon  $>1 \times 10^6/\text{ml}$  vajab ravi (WHO, 2000). Samas on teiste uuringutes leitud, et juba leukotsüütide kontsentratsiooni  $0,2 \times 10^6/\text{ml}$  juures on suurenenud mikroorganismide esinemissagedus. Seetõttu võiks  $\geq 0,2 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüütide kontsentratsiooni korral pöörata suuremat tähelepanu võimalikule põletikule (Punab et al., 2003). Samuti on oluline, et kõrge leukotsüütide kontsentratsiooni seostatakse seemnevedeliku madala kvaliteediga (WHO, 1999). Leukotsüütide kontsentratsioon seemnevedelikus  $>2$  miljonit ml-s vähendab seemnerakkude liikuvust (Sharma et al., 2001). Samuti näitavad uuringud kehavälise viljastamise vähenenud tulemuslikkust seemnevedelikuga, milles oli leukotsüüte  $>6$  miljonit ml-s (Sharma et al., 2001).

Leukotsüüte aktiveerivad erinevad stiimulid, kuid peamiseks aktiveerijaks on siiski sugulisel teel levivad haigused (Agarwal, 2003). Aktiveeritud leukotsüüdid toodavad erinevaid tsütokiine, näiteks interleukiin-8 (IL-8) ja interleukiin-6 (IL-6). Tsütokiinid on polüpeptiidid, mida vabastatakse erinevate aktiveeritud immuunrakkude või mitte-immuunrakkude poolt, mis reguleerivad kaitsereaktsioone. Tsütokiinide määramine on heaks põletikumarkeriks (Eggert-Kruse et al., 2001). Tsütokiinidel on vahendaja roll mitmetes füsioloogilistes ja patoloogilistes protsessides, mõjutades seemnevedeliku kvaliteeti ja seemnerakkude funktsiooni (Eggert-Kruse et al., 2001). Tsütokiinid ja RHO-d on vahendajaks põletiku toksilisele mõjule (Depuydt et al., 1996). Uuringute tulemustena on leitud kõrge leukotsüütide hulgaga seemnevedelikes ka

kõrgemat tsütokiinide taset (Eggert-Kruse et al., 2001). Samuti on tuvastatud näiteks suurenenud IL-8 ja IL-6 kontsentratsiooni negatiivset mõju seemnerakkude liikuvusele (Eggert-Kruse et al., 2001).

### **2.2.3 Muud põhjused**

Lisaks eelpool käsitletud teguritele võib viljatus olla põhjustatud mitmetest suguelundite ja sugunäärmete häiretest. Nendeks võivad olla näiteks krüptorhism (munandite laskumatus), hüpogonadism (gonadotropiini vabastajahormooni defitsiit) või varikotseele (munandikoti veenilaiend) (Nieschlag et al., 2001). Eesti meeste seas on levinumateks viljatuse riskiteguriteks osutunud varikotseele, sugutraktipõletikud ning krüptorhism (Punab et al., 2003).

Siiski jääb ligikaudu 20%-il viljatutel meestel lastetuse põhjus selgusetuks (Immarrone, 2003). Meeste viljakuse uuringutes on viimase 10 aasta jooksul keskendutud globaalsete, arvatavalt keskkonna ja eluviiside muutustest tulenevate sperma kvaliteedi halvenemise põhjuste väljaselgitamisele (Punab et al., 2003). Teatud keskkondlikud, tegevusalased ja elustiili mõjurid võivad tõenäoliselt normaalsel spermatogeneesi protsessi häirida. Liigselt kuum keskkond pärsib spermatogeneesi. Kaua kestnud kokkupuude raskmetallidega (plii, kaadmium, elavhõbe) või teiste ainetega (pestitsiidid, herbitsiidid) võib vähendada viljakust. Samuti on tõestatud liigse alkoholi tarbimise ning suitsetamise negatiivne mõju mehe viljakusele (WHO, 2000).

### **2.3 Mehepoolse viljatuse analüüsi laboratoorsed võimalused**

Mehepoolse viljatuse diagnoosimiseks on vajalik teha haiguse eellugu ehk anamnees, läbi viia mehe füüsiline läbivaatus ja laboratoorsed uuringud. Laboratoorsed uuringud hõlmavad vere, uriini, eesnäärme sekreedi ja seemnevedeliku analüüsi ning geneetilisi uuringuid. Eriti suur tähtsus viljatuse diagnoosimisel on seemnevedeliku analüüsil (WHO, 2000). Seemnevedeliku kvaliteedi hindamine toimub tavaliselt vastavalt Maailma Tervishoiuorganisatsiooni (WHO) juhenditele. Hinnatakse ejakulaadi mahtu, seemnerakkude liikuvust ning nende kontsentratsiooni ja morfoloogiat. Samuti uuritakse põletikurakke ning spermatoosoidide vastaste antikehade olemasolu (WHO, 1999).

### 2.3.1 Seemnerakkude liikuvus

Seemnerakkude liikuvuse hindamisel jagatakse seemnerakud nelja klassi vastavalt seemnerakkude liikumiskiirusele (WHO, 1999) :

- A - kiiresti ja progresseeruvalt liikuvad seemnerakud  $\geq 25 \mu\text{m/s}$
- B - aeglaselt ja progresseeruvalt liikuvad seemnerakud  $< 25 \mu\text{m/s}$
- C - kohapeal liikuvad seemnerakud
- D - liikumatud seemnerakud

Hea seemnerakkude kvaliteediga prooviks loetakse analüüsi, kus A liikuvaid seemnerakke on  $\geq 25\%$  või A + B liikuvaid on  $\geq 50\%$ . Anormaalne spermatoosoid ei ole hea liikuvusega, mistõttu on spermatoosoidide liikuvus üks tähtsamaid näitajaid raseduse saavutamiseks (Jeyendran, 2000). Olukorda, kus seemnerakud on madala liikuvusega nimetatakse asthenozoospermiaks (WHO, 1999).

### 2.3.2 Seemnerakkude kontsentratsioon

Spermatoosoidide kontsentratsiooni lugemisel antakse seemnerakkude arv miljonites ühes ml-s. Kontsentratsiooni hindamiseks on kasutusel mitmeid erinevaid gradueeritud klaase, enim on leidnud kasutamist Makleri ja Neubaueri klaasid (Mortimer, 1994). Uuringud on näidanud, et mehe viljakus (mõõdetuna ajana kuudes, mis kulub raseduse saavutamiseks) väheneb märgatavalt, kui spermatoosoidide on  $< 40 \text{ mln/ml}$  spermas. Järgnev mehe viljakuse hüppeline vähenemine toimub umbes  $20 \text{ mln/ml}$  ja viimane  $10 \text{ mln/ml}$  juures, millest allapoole on loomulikult teel raseduse saavutamine väga vähetõenäoline. Spermatoosoidide  $\leq 5 \text{ mln/ml}$  on piir, kus spermatoosidoloogia olulisteks põhjusteks muutuvad teadaolevad geneetilised häired (Punab et al., 2003).

### 2.3.3 Seemnerakkude morfoloogia

Kõige vastuolulisem analüüsi osa on seemnerakkude kuju ehk morfoloogia hindamine (Eliasson, 2003). Morfoloogia hindamisel jagatakse spermatoosoid kolmeks osaks: peaosa, keskosa ning sabaosa. Seejärel määratakse missuguses seemneraku osas esineb morfoloogiline defekt. Vea puudumisel hinnatakse spermatoosoid normaalseks (Nieschlag, 2000).

Põhilised hindamismeetodid on WHO meetod ja „strict criteria“ meetod. Viimast on nimetatud ka Tygerberg'i või Kruger'i meetodiks (Eliasson, 2003). „Strict criteria“ meetodi erinevus teistest meetoditest seisneb väikeste morfoloogiliste vigadega seemnerakkude hindamist anormaalseteks. Vastavalt kasutatud meetodile tuleneb ka tulemuste tõlgendamine. WHO meetodi kasutamise puhul loetakse heaks proovitulemust, kus on üle 30% normaalseid spermatooside (Jeyendran, 2000). Viljakatel meestel on normaalseid spermatooside „Strict criteria“ meetodi puhul >14% (Mortimer, 1994). Uuringute kohaselt on rasedus saavutatud ka selliste seemnevedelikega, kus on 0% normaalseid seemnerakke (Eliasson, 2003).

#### **2.3.4 Leukotsüütide määramine seemnevedelikus**

Peale seemnerakkude kvaliteedi on oluline leukotsüütide olemasolu seemnevedelikus. Seemnevedelikus on tähtis eristada leukotsüüte ebaküpssetest spermatoosididest. Leukotsüütide ja ebaküpssete spermatoosidide eristamiseks on kaks meetodit, mis põhinevad rakkude peroksüdaasi aktiivsuse määramisel. Peroksüdaas-positiivsed leukotsüüdid värvuvad orto-toluidiini või bensidiiniga pruuniks, samas kui peroksüdaas-negatiivsed ebaküpsed spermatoosidid jäävad värvituks (Mortimer, 1994). Samuti on üheks võimaluseks kasutada leukotsüütide eristamiseks nende omadust teatud värvidega värvuda erinevalt. Sellisel juhul kasutatakse sperma diferentsiaalvärvimisel Giemza ja Bryan-Leishman'i meetodit (Williams et al., 1996).

Kõik eelpool nimetatud näitajad kuuluvad traditsioonilise seemnevedeliku analüüsi juurde. Juurde saab teha palju analüüse ja teste, mis annavad lisainfomatsiooni seemnevedeliku kohta. Näiteks on võimalik uurida seemnerakkude vitaalsust ja akrosoomi reaktsiooni, määrata seemnevedeliku biokeemilist koostist, mikrobioloogiat, põletikumarkereid ja hapniku reaktiivseid osakesi (WHO, 1999). Üha enam on hakatud tähelepanu pöörama seemnevedeliku oksüdatiivse staatuse, reaktiivsete hapniku osakeste ja antioksidantide määramisele. Antud näitajad on abiks viljatuse põhjuste selgitamisel.

Spermatoosidide kontsentratsiooni, liikuvuse ning morfoloogia põhjal seemnevedelikud klassifitseeritakse ning klassifikatsioon on toodud tabelis 7 (WHO,1999).

**Tabel 7.** Terminoloogia seemnevedelike klassifitseerimiseks.

Diagnoos	Väärtus
Normozoospermia	Kontsentratsioon- $\geq 20 \times 10^6$ /ml Liikuvus- $A \geq 25\%$ ja/või $A+B \geq 50\%$ Morfoloogia- normaalseid spermatooside $>5\%$
Oligozoospermia	Kontsentratsioon- $< 20 \times 10^6$ /ml
Asthenozoospermia	Liikuvus- $A < 25\%$ ja/või $A+B < 50\%$
Teratozoospermia	Morfoloogia- WHO meetod-normaalseid spermatooside $< 30\%$ „Strict criteria“ meetod $< 5\%$
Oligoasthenoteratozoospermia	Kontsentratsioon- $< 20 \times 10^6$ /ml Liikuvus- $A < 25\%$ ja/või $A+B < 50\%$ Morfoloogia- normaalseid spermatooside $< 5\%$
Azoospermia	Seemnerakke ejakulaadis ei leidu
Aspermia	Puudub ejakulaat
Leukotsütoospermia	Leukotsüüdid- $\geq 1 \times 10^6$ /ml

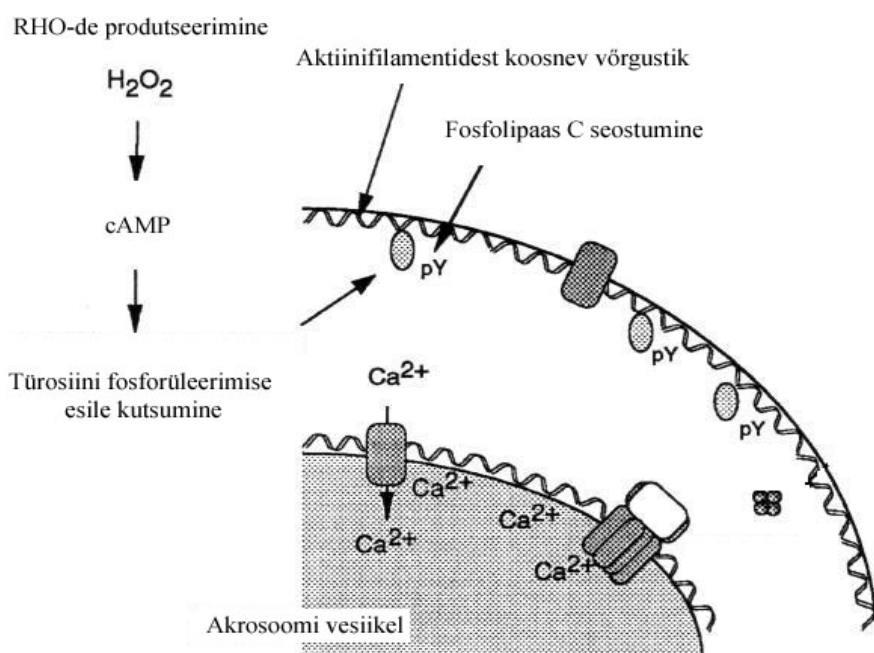
## 2.4 Reaktiivsed hapniku osakesed ja spermatooside füsioloogia

Väljudes mehe seemnejuhast ei ole seemnerakk viljastamisvõimeline. Viljastumisvõime saavad spermid emassuguteede läbimisel protsessiga, mille käigus spermid kaotavad ensüüme inhibeerivad ja membraane stabiliseerivad valgud ja süsivesikud. Antud protsessi nimetatakse kapatsitatsiooniks (Taylor, 2001). Munaraku viljastumine toimub munajuhades ning viljastumisel kinnitub seemnerakk munarakku ümbritsevale kestale (*zona pellucida*), mis vallandab spermatooside akrosoomi reaktsiooni. Akrosoomi reaktsioon on protsess, mille käigus spermatoosid vabastab akrosoomist hüdrolüütilisi ensüüme munaraku kestade lammutamiseks (Bedford, 1983).

RHO-de produktsioon seemnerakus on normaalne füsioloogiline protsess (Pasqualotto et al., 2000). RHO-de tekkimiseks seemnerakkudes on järgnevad võimalused:

1. nikotiinamiid adeniin dinukleotiid fosfaat (NADPH) oksüdaas süsteem spermatooside membraanis
2. spermatooside NADH-sõltuv oksüdüreduktaas, mis asetseb spermi keskosas ja on integreeritud mitokondriaalsesse respiratoorsesse süsteemi (Sharma et al., 1999).

Reaktiivsed hapniku osakesed, eriti  $O_2\cdot$  ja  $H_2O_2$ , käituvad signaalmolekulidena, kapatsitatsiooni esilekutsujana ja vahendajana (Suzuki et al., 1997). Kapatsitatsiooniga on seotud türosiini fosforüleerumine ja on vajalik kaltsiumi olemasolu millimolaarses kontsentratsioonis, mis soodustab RHO-de teket (De Lamirande et al., 1997). Kapatsitatsioon algab rakusisesest kaltsiumi ja cAMP hulga tõusust, millele järgneb türosiini fosforüleerumine. Kui nimetatud protsess peatatakse türosiin kinaasi inhibiitoritega, siis kapatsitatsiooni ei toimu. Vesinikperoksiidil on türosiini fosforüleerumisel oluline osa (Aitken, 1997).  $H_2O_2$  osa seisneb türosiin fosfataasi aktiivsuse supressioonis. Türosiin fosfataas on sõltuv tsüsteiinijäägi tiolgrupi redutseeritud olekust, viimane oksüdeeritakse vesinikperoksiidi poolt (Aitken, 1997). Akrosoomi välisel membraanil on aktiinifilamentidest koosnev võrgustik, mis stabiliseerib sisemist ja välimist membraani. Nimetatud võrgustik takistab membraanide enneaegset kokkusulamist ning sinna seostub fosfolipaas C. Fosfolipaas C osaleb akrosoomi reaktsiooni esilekutsumisel (Aitken, 1997). Biokeemiliste protsesside toimumist kapatsitatsioonil illustreerib joonis 18.



**Joonis 18.** Biokeemiliste protsesside toimumine kapatsitatsioonil (Aitken, 1997).

RHO poolt loodud mõõdukad oksüdatiivsed tingimused ergutavad seemnerakke ka akrosoomi reaktsioonil ja kinnitumisel munaraku väliskestale (Aitken et al., 1989).

## **2.5 Reaktiivsed hapniku osakesed ja meeste viljatuse**

Kontrollimatu ja üleliigne reaktiivsete hapniku osakeste tekkimine on oluline faktor meeste viljatuse põhjuste seas. Uuringud on näidanud, et viljatutel meestel on kõrgem RHO-de tase seemnevedelikus kui viljakatel meestel (Pasqualotto et al., 2000). Üleliigne reaktiivsete hapniku osakeste olemasolu seemnevedelikus võib olla produtseeritud seemnerakkude poolt, seostatakse jääksütöplasmaga spermatoosidi keskosas, või leukotsüütide poolt – eriti granulotsüütide poolt (Sikka, 1996).

### **RHO-de produtseerimine seemnerakkude poolt.**

Uuringutes on leitud tsütöplasma biokeemilise markeri, kreatiini kinaasi, tõusu vastavust peroksüdatiivsete kahjustustega. Samuti esineb hüpotees, et jääksütöplasmaga rakkude kontrollimatu RHO-de produktsioon on põhjustatud teise tsütöplasma ensüümi (glükoos-6-fosfaat dehüdrogenaasi) poolt katalüüsitud reaktsioonidest (Aitken et al, 1997). Nimetatud ensüüm katalüüsib NADPH-i teket, mis stimuleerib RHO-de tekkimist. Jääksütöplasma olemasolul glükoos-6-fosfaat dehüdrogenaasi sisaldus on seemnerakus suurenenud ja see omakorda põhjustab suurenenud NADPH-i kättesaadavust (Storey, 1997).

### **RHO-de produtseerimine leukotsüütide poolt.**

Leukotsüütide kahjustav mõju oleneb nende hulgast, nende aktiveeritusest ning võimest toota vabu radikaale (Pasqualotto et al., 2000). Aktiveeritud leukotsüüdid võivad produtseerida 100 korda enam RHO-sid kui aktiveerimata. Aktiveeritud leukotsüüdid suurendavad NADPH tekkimist. Makrofaagide aktiveeritus ja kõrge RHO-de tootmine viib oksüdatiivse purskeni st. leukotsüütide poolt toodetud reaktiivsed hapniku osakesed aitavad kaasa fagotsütoosile (Agarwal et al., 2003).

Imetajate spermatoosidid on tundlikud RHO põhjustatud kahjustustele, kuna nende membraanis on palju polüküllastamata rasvhappeid ja tsütöplasma sisaldab madalas kontsentratsioonis RHO-sid kõrvaldavaid ensüüme. (Agarwal et al., 2003). Lipiidide peroksüdatsiooni seemneraku membraanis loetakse võtmemehhanismiks RHO-de poolt põhjustatud spermatoosidi kahjustuse tekkimisel (Sikka, 1996). RHO-d muudavad spermatoosidi fosfolipiidide rasvhappelise koostist ja põhjustavad seeläbi oksüdatiivseid kahjustusi DNA-le.



Uuringute andmetel on membraani muutlikkus vastavuses vähenenud polüküllastamata rasvhapete hulga ja suurenenud keskmise sulamispunktiga (Comhaire et al., 2000).

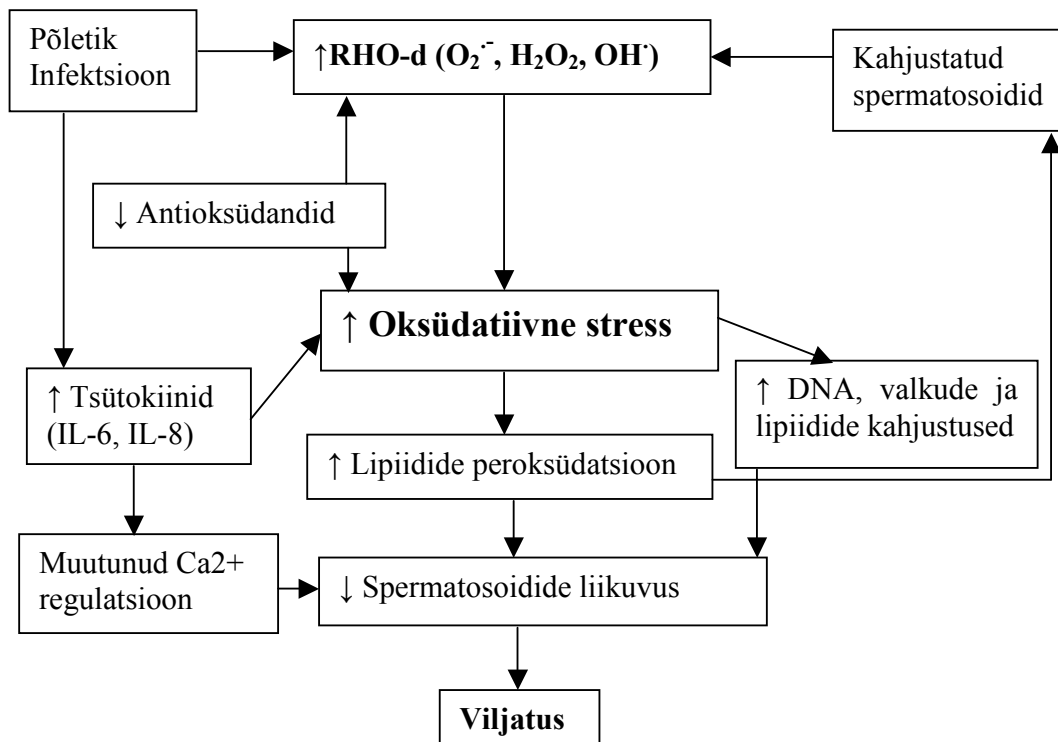
Lipiidide peroksüdatsiooni tähtsus seisnebki membraanstruktuuri ja funktsioonide, nagu transpordi protsesside, ionide ja ainevahetuslike produktide gradientide säilitamise ja signaaliülekannete, häirituses. Madal NADH-i ja glutatiooni tase, mis on lipiidide peroksüdatsiooni metaboliitide eemaldamise käigus suurenenud glutatiooni peroksüdaasi aktiivsuse tulemus, mõjutab rakusisest  $\text{Ca}^{2+}$  hulga muutust (Sikka, 1996).

Peale membraani võib lipiidide peroksüdatsioon kahjustada ka DNA-d ja valke. Oksüdeeruvad DNA aluspaarid, põhiliselt guaniin lipiidide peroksüül või alkoksüül radikaalide toimel. Võib toimuda ristsidumine ja kromosomaalsed ümberpaiknemised. RHO-d vahendavad ka DNA fragmenteerumist. Viljatutel meestel on täheldatud rohkem DNA fragmenteerumist kui viljakatel (Agarwal et al., 2003). Reaktiivsed hapniku osakesed soodustavad valkude -SH rühma oksüdeerumist, mille läbi muutub spermatoosid vastuvõtlikumaks makrofaagide rünnakutele (Aitken, 1994).

Reaktiivsete hapniku osakeste kahjuliku mõju vähendamiseks on seminaalplasmas ja seemnerakkudes suur hulk antioksüdante ( $\alpha$ -tokoferool, askorbiinhape, kusihape, albumiin) ning antioksüdatiivseid ensüüme (superoksiidi dismutaas, glutatioon peroksüdaas, katalaas) (Raijmakers et al., 2003). Askorbiinhapet on seminaalplasmas 364  $\mu\text{mol}$ , võrreldes vereplasmaga (40  $\mu\text{mol}$ ) on seda arvestataval määral. Ka seemnerakus on askorbiinhapet  $\sim 1 \mu\text{mol}/10^{10}$  raku kohta. Vähenenud askorbiinhappe sisaldus ja ülemäärane RHO-de hulk võib viia spermatoosidide kahjustusteni (Lewis et al., 1997). Tokoferooli sisaldus seminaalplasmas on tagasihoidlik 0,32-0,52  $\mu\text{mol}/\text{l}$ . Vitamiin E roll seisneb koostöös vitamiin C-ga, seetõttu pole kõrgema kontsentratsiooni olemasolu vajalik. Glutatioon on oluline kaitsemehhanism seemnerakus vesinikperoksiidi vastu. Lisaks käitub glutatioon valkude SH-rühma kaitsjana (Lewis et al., 1997). Uuringutes on leitud viljatutel meestel madalam glutatiooni kontsentratsioon seminaalplasmas. Kõrget glutatiooni taset on aga seostatud kõrgema seemnerakkude liikuvusega (Raijmakers et al., 2003). Normaalses tingimustes suudavad seemnevedeliku antioksüdandid seemnerakke RHO-de eest kaitsta (Sikka, 1996).

Reaktiivsete hapniku osakeste ülemäärase tekke või seemnevedeliku antioksüdantide vähenemise tõttu võib kujuneda seemnevedelikus oksüdatiivne stress, mis viib seemnerakkude kahjustusteni.

Joonisel 19 on toodud oksüdatiivse stressi ja antioksidantide osa viljatuse tekkimise mehhanismis (Sikka et al., 1995).



**Joonis 19.** Oksüdatiivse stressi ja antioksidantide osa seemnerakkude funktsioonis ja meeste viljatuse tekkimises (Sikka et al., 1995).

Oksüdatiivne stress viib spermatooside elujõulisuse, rakusisese ATP hulga ja liikuvuse languseni, põhjustades seeläbi viljatust. Seos seemnerakkude liikuvuse ja RHO-de vahel arvatakse seisnevat ensüümi glükoos-6-fosfaat dehüdrogenaasi (G6PD) aktiivsuse vähenemises.  $H_2O_2$  difundeerub läbi membraani rakku vähendades G6PD aktiivsust. Antud ensüüm kontrollib seemneraku glükoosi voolu (Agarwal et al., 2003). Lisaks on üleliigsel RHO-de hulgal kahjulik mõju kapatsitatsioonile ja akrosoomi reaktsioonile (Alvarez et al., 1987).

## 2.6 Toitumine ja mehepoolne viljatus

Viljatust mõjutavad mitmed elustiili faktorid, nende seas suitsetamine, rohke alkoholi tarbimine ja toitumise puudujäägid (De Celis et al., 1996). Viljatuse seisukohalt on olulised järgmised toitained: karnitiin, arginiin, tsink, seleen, askorbiinhape,  $\alpha$ -tokoferool ja karotenoidid (Sinclair, 2000).

## **Karnitiin**

Karnitiin ehk vitamiin B<sub>T</sub> omab vitamiinset aktiivsust ning sellel ühendil on tähtis roll rasvhapete metabolismis (Zilmer, 1996). Karnitiini ülesanne munandimanuses on pakkuda seemnerakkudele energeetilist substraati, toetades sellega seemnerakkude liikuvust ja edukat küpsemist. Karnitiini olulisus seisneb tema rollis transportida pikaahelalisi rasvhappejääke mitokondrisse, kus need oksüdeeritakse energia tootmise eesmärgil. Madal karnitiini tase vähendab rasvhapete kontsentratsiooni mitokondris, viies alla energia tootmise ning vähendades seemnerakkude liikuvust (Sinclair, 2000). Mitmed erinevad uuringud on jõudnud samale järeldusele - karnitiini kasutamine toidulisandina (3 g päevas) mõjub positiivselt seemnerakkude liikuvusele ning kontsentratsioonile (Sinclair, 2000).

## **Arginiin**

Aminohape arginiin on biokeemiline prekursor putrestsiini, spermidiini ja spermiini sünteesis. Nimetatud polüamiinid on olulised spermatoosoidide liikuvuse tagamiseks. Uuringus, kus 178 meest said kolme kuu jooksul toidule lisaks 4 g arginiini päevas, tuvastati spermatoosoidide arvus ja liikuvuses paranemist 74 %-dil uuringus osalejatel (Sinclair, 1973). Teises sarnases uuringus anti asthenozoospermsetele patsientidele 10%-list arginiini preparaati, mis samuti viis seemnerakkude kvaliteedi paranemisele (Scibona et al., 1994).

## **Tsink**

Tsink on mineraalne, mis on vajalik mehe reproduktiivsüsteemi normaalseks funktsioneerimiseks. Tsinki on rohkesti spermatoosoidides ning ta on vajalik eesnäärme talitluseks. Mitmed biokeemilised protsessid on tsingist sõltuvad ning samuti on ta enam kui 200 ensüümi kofaktoriks (Henkel et al., 1999). Tsingi puudust seostatakse madala testosterooni tasemega ja madala seemnerakkude arvuga. Madalat tsingi taset on leitud viljatutel vähenenud seemnerakkude arvuga meestel (Sinclair, 2000).

## **Seleen ja glutatioon**

Seleen on hädavajalik mehe viljakuseks ning seda vajatakse testosterooni biosünteesiks ja spermatoosoidi normaalseks arenguks (Rayman, 2000). Seleen on glutatiooni peroksüdaasi kofaktor, suurendades seeläbi glutatiooni kättesaadavust. Glutatioon peroksüdaasi leidub spermatoosoidides, spermatoosoidi küpsedes ja spermatoosoidi transformatsioonil jääb glutatioon peroksüdaas küpse spermatoosoidi keskossa (Ursini et al., 1999). Glutatiooni või seleeni puuduse tulemuseks võib olla spermide liikuvuse langus (Ursini et al., 1999).

## **Vitamiin C**

Uuringud on näidanud seminaalplasma askorbiinhappe hulga sõltuvust toiduga saadud askorbiinhappe kogusest. Ühes uuringus vähendati askorbiinhappe kogust 250 mg-ilt kuni 5 mg-ni päevas. Seminaalplasma askorbiinhape vähenes 50% ja seemnerakkude DNA kahjustuste hulk tõusis. Suitsetajatel on väga oluline jälgida piisava koguse C-vitamiini saamist toiduga. (Fraga et al., 1991). Suitsetavate viljatute meestega tehtud uuringus jagati osalejad kolme rühma. Esimene grupp sai platseebot, teine 200 mg ja kolmas rühm 1000 mg askorbiinhapet päevas. Platseebo grupi meeste seemnevedeliku kvaliteet ei paranenud ning suurim paranemine esines 1000 mg saanud meestel (Dawson et al., 1992).

## **Vitamiin E**

Vitamiin E soodustab sugunäärmete normaalset arengut ja reguleerib suguhormoonide talitlust. Vitamiin E mõjust meeste viljatusele on tehtud palju uuringuid (Suleiman et al., 1996). Vitamiin E manustamisel 3 korda päevas 100 mg korruga kuue kuu vältel, täheldati uuringuosalejate seemnerakkude liikuvuse paranemist ja seemnevedeliku maloondialdehüüdi kontsentratsiooni vähenemist. Uuringus osalenud meeste naistest 21% (11/52-st) jäi rasedaks (Suleiman et al., 1996).

## **Karotenoidid**

Karotenoididest on erilist tähelepanu leidnud lükopeen. Lükopeeni defitsiiti seostatakse immunoloogilise viljatusega. Uuringus, kus võrreldi immunoloogilise viljatusega mehi viljakatega, leiti viljatute meeste madalam seminaalplasma lükopeeni sisaldus (Palan et al., 1996). Teises uuringus, milles osales 30 teadmata põhjusega viljatut meest, anti osalejatele päevas 2000 mg lükopeeni kolme kuu jooksul. Paranesid seemnerakkude kontsentratsioon ja liikuvus ning rasedus 6 naist (20%) (Gupta et al., 2002).

Eelpool nimetatud toitainete vajadus kaetakse normaalse segatoitlusega (Zilmer, 1996). Uuringute tulemusel on leitud seos ka seemnerakkude arvu ja kehamassi indeksi vahel (KMI = keha mass kilogrammides/keha pikkuse ruut meetrites). Soovitavaks loetakse KMI vahemik 20-25. Ülekaalulistel (KMI>25) ja alakaalulistel (KMI<20) meestel leiti madalam seemnerakkude kontsentratsioon võrreldes normaalkaalus olevate meestega (Jensen et al., 2004). Edasist uuringut vajab küsimus, kas viimastel aastakümnetel läänemaailmas halvenenud seemnevedelike kvaliteet on seotud samuti suurenenud keskmise KMI-ga (Jensen et al., 2004).

### III EKSPERIMENTAALNE OSA

#### 3.1 Materjalid ja meetodid

##### 3.1.1 Materjalid

Uurimistöö teostati AS Lääne-Tallinna Keskhaigla Pelgulinna Naistekliiniku Naistenõuandla patsientide (n = 95) baasil, ajavahemikus detsember 2003 - detsember 2004. Eksperimentaalne osa viidi läbi sama haigla Diagnostikakliiniku androloogia laboris. Viljatus oli peamine põhjus androloogia kabinetti pöördumiseks. Uuringus osalejate keskmine vanus oli 31 aastat (vahemikus 21 - 44 aastat). Kõiki uuringu patsiente teavitati uuringu eesmärkidest ning nad allkirjastasid teadliku nõusolekulehe. Lisaks täitsid osad patsiendid (n = 50) toitumisharjumuste ankeedi.

Antud uuringu läbiviimiseks oli väljastatud Tervise Arengu Instituudi Tallinna Meditsiiniuuringute eetikakomitee luba nr. 411, 27. august 2003.

Uuringu eksperimentaalses osas kasutati järgnevaid reaktiive:

1. Luminool (79378, Fluka, Šveits)
2. Dimetüülsulfoksiid e. DMSO (41639, Fluka, Šveits)
3. Fosfaat puhverdatud soolalahus e. PBS (79378, Fluka, Šveits)
4. IL-6 määramise diagnostiline komplekt (LK6PZ,1; EURO/DPC Ltd., Ühendkuningriigid)
5. Spermacer seemnerakkude värvilahused (FP01S05, FertiPro N.V., Belgia)
6. Giemsa värvilahus Gurr (OB338926, VWR International Ltd., Ühendkuningriigid)
7. Leishman'i värvilahus Gurr (OB332003, VWR International Ltd., Ühendkuningriigid)
8. Fosfaat puhver; pH=7,0 ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$ )
9. 10%-line NaCl
10. Destilleeritud vesi

Uuringu eksperimentaalses osas kasutati järgnevaid seadmeid:

1. Luminomeeter (Wallac LKB 1251, Soome)
2. Immunaanalüüsi automaatanalüsaator (IMMULITE, Ühendkuningriigid)

3. Mikroskoop (Olympus CH-40, Saksamaa)
4. Termostaat (WTC Binder, Saksamaa)
5. Tsentrifuug/segaja (Micro-Spin FV 2400, Venemaa)
6. Tsentrifuug (CM-6.03, Läti)

### 3.1.2. Meetodid

Eksperimentaalne töö sisaldas järgmiseid etappe:

1. Seemnevedeliku kvaliteedi hindamine - seemnerakkude kontsentratsiooni, liikuvuse ja morfoloogia määramine
2. Seemnevedeliku leukotsüütide määramine
3. HRO-de määramine seemnerakkude suspensioonis
4. Põletikumarkeri interleukiin-6 taseme määramine seminaalplasmas
5. Patsiendi toitumisharjumusi kirjeldavate ankeetide täitmine ning analüüs

#### 3.1.2.1 Seemnevedeliku kvaliteedi hindamine

Seemnevedeliku proovid anti patsientide poolt Naistenõuandlas kohapeal selleks ettenähtud ruumis. Viimasest seemnepurskest oli möödunud vähemalt kaks, aga mitte rohkem kui 7 päeva. Peale proovi andmist termostateeriti need koheselt 37°C juures 30 minutiks. Nimetatud aeg on vajalik seemnevedeliku veeldumiseks. Seejärel viidi läbi seemnerakkude kontsentratsiooni ja liikuvuse määramine ning morfoloogia hindamine.

#### Seemnerakkude kontsentratsiooni määramine

1. Spermast tehti lahjendus 10% NaCl-iga vastavalt seemnerakkude arvule vaateväljas (tabel 8).

**Tabel 8.** Lahjendused vastavalt seemnerakkude arvule vaateväljas.

Seemnerakkude arv vaateväljas	Lahjendus (seemnevedelik + 10%-line NaCl)
< 15	1:5 (1+4)
15 - 40	1:10 (1+9)
40 - 200	1:20 (1+19)
> 200	1:50 (1+49)

2. Lahjendatud seemnerakkude suspensioon segati Vortex segajal.

3. Neubauer'i kambrile asetati katteklaas, mille ääri oli eelnevalt niisutatud. Seejärel suruti katteklaas Neubaueri kambrile kuni Newtoni rõngaste tekkimiseni.
4. Neubauer'i kambrisse asetati 10 µl seemnerakkude suspensiooni.
5. Neubauer'i kambrit lasti seista niiskuskambris 5 minutit spermide sadenemiseks ühele tasapinnale.
6. Mikroskopeerimisel kasutati 400x suurendust.
7. Kontsentratsiooni lugemisel loendati kõik terved spermid mõlemalt ruudustikult.
8. Mõlemalt ruudustikult loetud spermiosoidide arv liideti ja jagati lahjendusfaktoriga (tabel 9). Seemnerakkude kontsentratsioon väljendati miljonites seemnerakkudes 1 ml seemnevedeliku kohta.
9. Kontsentratsiooni määramise usaldusväärsus sõltub loendatud seemnerakkude arvust. Määramise usaldusväärsus oli ± 10% (WHO, 1999).

**Tabel 9.** Lahjendusfaktorid Neubauer'i kambi jaoks.

Lahjendus (seemnevedelik + 10%-line NaCl)	Lahjendusfaktorid		
	Leotud ruutude arv		
	25	10	5
1:5 (1+4)	20	8	4
1:10 (1+9)	10	4	2
1:20 (1+19)	5	2	1
1:50 (1+49)	2	0,8	0,4

### Seemnerakkude liikuvuse määramine

1. Mikroskoobi alusklaasile pipeteeriti 10 µl spermat ning selle peale asetati katteklaas (22 x 22 mm).
2. Preparaat asetati mikroskoobi esemelauale ning mikroskopeeriti 400x suurendust kasutades.
3. Loeti 100 seemnerakku vähemalt viies vaateväljas. Mikroskopeeritud seemnerakud jaotati liikumiskiiruse alusel A, B, C, D klassidesse vastavalt WHO (1999) klassifikatsioonile.
4. Liikuvuse määramisel tehakse kordumääramised ning 10%-st suurema erinevuse korral korratakse liikuvuse hindamist. Sellest lähtuvalt jäi hindamise viga <10% (WHO, 1999).

### Seemnerakkude morfoloogia hindamine

1. Seemnerakkude morfoloogia preparaatide valmistamiseks pipeteeriti 10 µl spermat alusklaasile ja tõmmati see laiali katteklaasi või teise alusklaasiga. Preparaat kuivatati õhu käes toatemperatuuril ning fikseeriti 15 minutit Spermac fiksaatoris. Preparaat värviti Spermaci värvidega järgnevalt: 1 minut värvilahuses A, 1 minut värvilahuses B ja 1 minut värvilahuses C. Preparaat loputati destilleeritud veega peale igat värvilahust.
2. Mikroskopeerimisel hinnati vähemalt 100 spermatoosoidi morfoloogiat. Mikroskopeerimisel kasutati 1000x suurendust ning õli-immersioon objektiivivi. Igat spermatoosoidi hinnati eraldi, defektse spermi korral dokumenteeriti defektne piirkond (peaosa/kaelaosa/sabaosa) ning eraldi märgiti tsütoplasmatilga esinemine (WHO, 1999).
3. Morfoloogia tulemuste põhjal arvutati välja TZI (teratozoospermia index) indeks, mis näitab defektide arvu ühe seemneraku kohta:

Defektide kogusumma

TZI = \_\_\_\_\_

Defektsete spermatoosoidide arv

#### 3.1.2.2 Leukotsüütide ja ebaküsete seemnerakkude värvimine Giemsa ja Bryan-Leishman'i meetodil ja ning leukotsüütide kontsentratsiooni määramine.

1. Preparaatide valmistamine. Preparaadi valmistamisel pipeteeriti 10 µl spermat alusklaasile ja tõmmati see laiali katteklaasi või teise alusklaasiga. Preparaadid kuivatati õhu käes toatemperatuuril kuivaks ning värviti järgnevalt: 1 minut Giemsa värvilahuses, 1 minut Leishman'i värvilahuses ja 1 minut puhvris. Seejärel loputati preparaadid destilleeritud veega.
2. Mikroskopeeriti vähemalt 100 spermatoosoidiga samale vaateväljale jäävat leukotsüüti ning ebaküset seemnerakku. Mikroskopeerimisel kasutati 1000x suurendust ning õli-immersioon objektiivivi). Tabelis 10 on toodud leukotsüütide ja ebaküsete seemnerakkude värvumise erinevused.



**Tabel 10.** Leukotsüütide ja ebaküpsete seemnerakkude värvumise erinevused Giemsa ja Bryan-Leishman'i meetodil.

Rakk	Neutrofiil	Lümfotsüüt	Monotsüüt	Spermatotsüüt	Spermatiid
Suurus	10-16 µm	8-15 µm	12-20 µm	12-20 µm	10 µm
Tuum 1. Morfoloogia 2. Värvus	1. Segmenteeritud 2. Tumelilla	1. Suur ja ümmargune, võtab enda alla suurema osa rakust 2. Lilla	1. Neerukujuline, harvem ümmargune 2. Lilla	1. Üks keskel asetsev tuum, 2. Roosakas-lilla	1. 1-2 ümarat tuuma, asetsevad perifeerselt 2. Roosakas – lilla
Tsütoplasma	Roosakas, võib olla granuleeritud	Helesinine	Sinakas-hall, võib esineda vakuole	Lilla	Sinakas-lilla

Leukotsüütide ja ebaküpsete seemnerakkude hulka arvutati järgmise valemiga (WHO, 1999):

$$N \times S$$

$C = \frac{N \times S}{100}$  kus C - loetavate rakkude kontsentratsioon (miljonit rakku ml kohta)

100 N - rakkude arv, mis loeti 100 seemnerakuga samades vaateväljades

S - seemnerakkude kontsentratsioon (miljonit seemnerakku ml kohta)

### 3.1.2.3 Reaktiivsete hapniku osakeste määramine seemnerakkude suspensioonis

RHO-de mõõtmisel kemoluminestsentsi detekteerimise meetodil kasutati kirjanduses publitseeritud meetodit (Wang et al., 2003) modifitseeritud kujul.

1. RHO-de määramine teostati tunni möödumisel proovi andmisest
2. Veeldunud seemnevedelikku tsentrifugeeriti (7 minutit, 2400 rpm).
3. Eemaldatakse seminaalplasma (supernatant) ja spermatooside pesti kaks korda PBS-iga (7 minutit, 2400 rpm).
4. Pestud spermatoosidid suspendeeriti PBS'is kontsentratsioonini  $20 \times 10^6$  spermatoosidi/ml.
5. Valmistati 5 mM luminooli lahus DMSO-s.
6. 10 µl-le reaktsioonisegule lisati 400 µl pestud spermatoosidide suspensiooni
7. Reaktsiooni kemoluminestsentsi intensiivsust mõõdeti integreeritult 15 minuti jooksul 37°C juures luminomeeter Wallac LKB 1251-ga.

8. Reaktsiooni kemoluminestsentsi intensiivsust väljendati mV-des seemnerakkude kontsentratsiooni  $20 \times 10^6$  spermi kohta.

Lisaks viidi korduvalt läbi negatiivseid kontrollkatseid, mille korral reaktsioonisegu komponendid olid järgnevad: i) PBS ja luminool ning ii) seemnerakkude suspensioon.

#### **3.1.2.4 Interleukiin-6 määramine IMMULITE automaatanalüsaatoril**

IMMULITE IL-6 baseerub ensüümidega markeeritud tahkefaas kemoluminestsents-immunomeetrilisel meetodil.

1. IL-6 määramiseks eraldati seminaalplasma seemnerakkudest tsentrifuugimise teel (7 minutit, 3000 rpm).
2. 100 µl seminaalplasmad asetati analüsaatorisse.
3. Proov ja reagent pipeteeriti automaatselt katseplokki, mille siseseinad on kaetud antikehadega. Katseplokk, mille temperatuuri hoitakse 37°C juures, pandi pöörlema suurel kiirusel, mis põhjustas IL-6 seotumise katseploki siseseintele. Järgnevate pesudega eemaldati materjal, mis ei seostunud antikehadega. Lisati kemoluminestsentne reagent ning mõõdeti tekkinud valgusvoo intensiivsus.
4. Tulemus väljendati IL-6 pg-des ml kohta (DPC, 2004).
5. Automaatanalüsaator IMMULITE kalibreeriti iga kahe nädala tagant kontrollproovidega - kõrge ja madala IL-6 väärtustega proovidega. Analüüsi tundlikkus oli 2 pg/ml-s. Proovid, mille väärtus jäi nimetatud väärtusele alla, võrdsustati 2 pg/ml-ga.

#### **3.1.2.5 Küsimustiku koostamine ja analüüs**

Küsimustik (LISA, lehekülj 73) koosnes küsimustest, mis uurisid inimese toitumistavasid, füüsilist aktiivsust, töötingimusi ning lisaks suitsetamise ja alkoholi tarbimise harjumusi. Vastamisel paluti arvestada viimase kolme kuu tavasid. Uuringus osalejad täitsid ankeedi iseseisvalt.

Toitumisharjumuste uurimiseks kasutati sagedusmeetodi küsimustikku, mis sisaldas tabelleid selle kohta, kui sageli mingit toiduainet söödi. Nimetatud meetod iseloomustab toitumistavasid kvalitatiivselt ning annab andmeid tavalise toitumise kohta üldistatud kujul. Toitumistavade küsimustik koosnes toiduainete nimistust ja küsitleva vastustest (kui sageli?). Uuriti söögikordade arvu päevas, hommiku ja lõunasöögi tavasid ning tarbitavate jookide ja valiku

toiduainete tarbimise sagedust. Lisaks uuriti toidulisandite (vitamiini/mineraalainete drazeed) kasutamist. Registreeriti ka osalejate pikkus ja kehakaal kehamassi indeksi määramiseks. Alkoholi tarbimise ja suitsetamise korral paluti täpsustada päevas tarbitav kogus.

Küsimustiku koostamisel kasutati küsimusi, mida varem oli kasutatud toitumis - (Alma, 2001) ja reproduktiivtervise uuringutes (Punab, 2003). Küsimustiku analüüsil toodi välja põhilised trendid osalejate elustiilis ning neid võrreldi laboris teostatud uuringute tulemustega.

### **3.1.2.6 Andmete statistiline töötlus**

Andmete töötlemisel kasutati Mann-Whitney, Kruskal-Wallis ning  $\chi^2$  teste ning samuti lineaarset regressioonanalüüsi. Analüüsid teostati SPSS programmi kasutades. Tulemused esitati - keskmine väärtus  $\pm$  standardhälve (SD). Statistilise olulisuse hindamisel kasutati kriteeriumit -  $P < 0,05$ .

## 3.2 Tulemused ja arutelu

### 3.2.1 Tulemused

#### 3.2.1.1 Seemnevedelike kvaliteedinäitajad

Määrati 95 mehe seemnerakkude kvaliteedinäitajad ning leukotsüütide esinemine seemnevedelikus. Seemnevedelike seemnerakkude kontsentratsioonid jäid vahemikku 1 kuni  $164 \times 10^6/\text{ml}$  ning keskmiseks väärtus oli  $41,5 \pm 34,3$  miljonit seemnerakku ml-s. Seemnerakkude liikuvus (A+B) jäi piiridesse 0-78% ning keskmine liikuvus oli  $45,2 \pm 20,8$  %. Seemnerakkude morfoloogia hindamisel saadi tulemused 0-st kuni 16%-ni. Keskmine normaalse morfoloogiaga seemnerakkude arv oli  $6 \pm 3,7$  %. Keskmine leukotsüütide kontsentratsioon spermas oli  $0,17 \pm 0,5 \times 10^6/\text{ml}$  (vahemik 0 kuni  $3 \times 10^6/\text{ml}$ ). Seemnevedelike jaotus seemnerakkude kvaliteedinäitajate järgi on toodud tabelis 11.

**Tabel 11. Seemnevedelike jaotus diagnooside järgi.**

Diagnoos	Proovide arv (n)
1. Normozoospermia	31
2. Oligozoospermia	5
3. Asthenozoospermia	13
4. Teratoospermia	9
5. Oligoasthenoteratoospermia	16
6. Oligoasthenozoospermia	9
7. Oligoteratoospermia	2
8. Asthenoteratoospermia	10
9. Leukotsütoospermia (>0,2 mln/ml)	20
10. Leukotsütoospermia (>1 mln/ml)	2

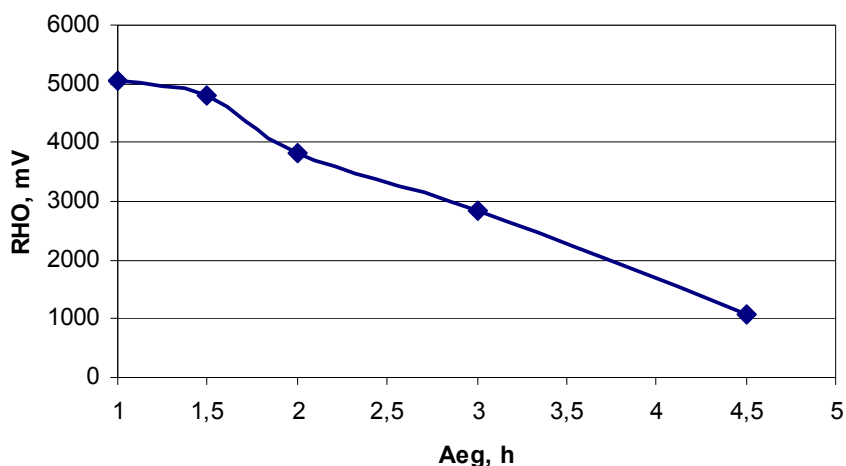
Tabelist 11 on näha, et traditsiooniliste seemnerakkude kvaliteedi näitajate (seemnerakkude kontsentratsioon ning nende liikuvus ja morfoloogia) alusel jagunesid patsiendid järgnevalt - normaalse seemnerakkude kvaliteediga patsiente (N) oli 31 (32,6%) ning seemnerakkude kvaliteedi probleemidega patsiente (AN) oli 64 (67,4%).

### 3.2.1.2 Seemnerakkude kvaliteet ja RHO-de produktsioon

#### Sperma RHO-de produktsiooni sõltuvus ajast.

Sperma RHO-de produktsioon ei ole ajas muutumatu. Eelnevate uuringute alusel tuleks RHO-de produktsiooni määrata ühe tunni jooksul pärast sperma analüüsi andmist (Kobayashi et al., 2001).

Joonisel 20 on ära toodud ühe sperma RHO-de produktsiooni muutus ajas.

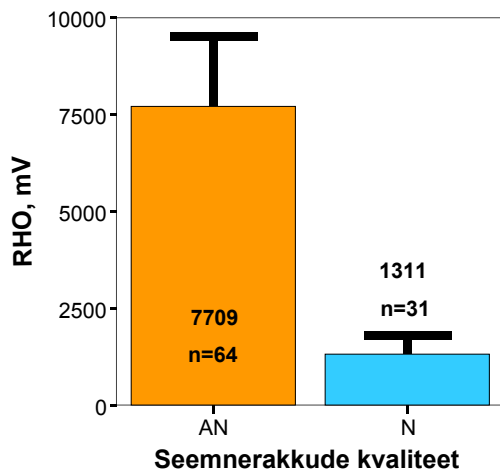


**Joonis 20.** Sperma RHO-de produktsiooni muutumine ajas.

Sperma RHO-de produktsioon püsib suhteliselt muutumatuna esimesed 1,5 tundi, misjärel hakkab väga kiiresti langema. Antud uuring näitas, et sperma RHO-de produktsiooni tuleb mõõta hiljemalt 1,5 tunni möödudes sperma analüüsi andmisest. Seetõttu mõõdeti käesolevas töös kõikide patsientide spermade RHO-de produktsioon hiljemalt 1 tunni möödudes sperma analüüsi andmisest.

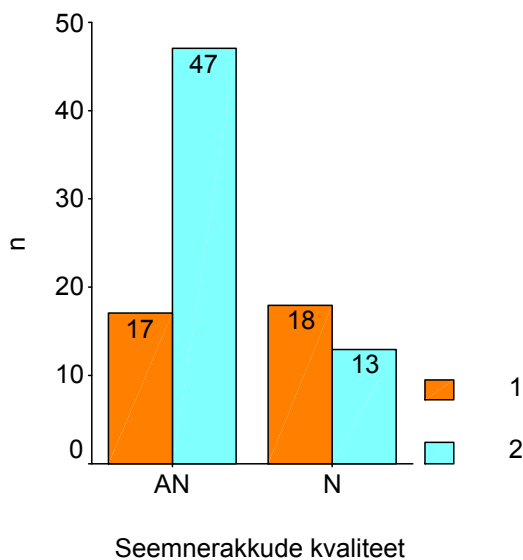
#### Seemnerakkude kvaliteet ning sperma RHO-de produktsioon

Patsiendid jaotati traditsiooniliste seemnerakkude kvaliteedi näitajate (seemnerakkude kontsentratsioon, liikuvus ning morfoloogia) alusel normaalse kvaliteediga spermaga patsientideks (N; n=31; 32,6%) ning abnormaalse kvaliteediga spermaga patsientideks (AN; n=64; 67,4%). Joonisel 21 on toodud RHO-de produktsioon normaalse ja abnormaalse kvaliteediga spermaga patsientidel. Normaalse kvaliteediga seemnerakkudega patsientide sperma produtseeris oluliselt vähem RHO-sid (keskmine  $1311,4 \pm 2685,3$  mV; 420,1-14950 mV) kui abnormaalse kvaliteediga seemnerakkudega patsientide sperma (keskmine  $7708,9 \pm 14447$  mV; 411,3-68870 mV) (P=0,000; Mann-Whitney Test).



**Joonis 21.** Normaalse (N) ja abnormaalse (AN) kvaliteediga seemnerakkudega patsientide sperma RHO-de produktsioon. Tulemused on esitatud – keskmine väärtus ± SEM.

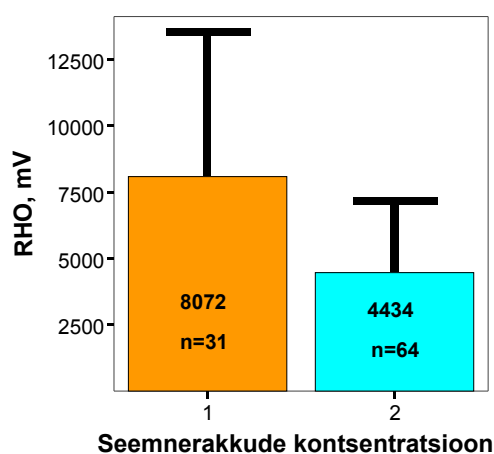
Vastavalt spermade RHO-de produktsioonile jaotasime patsiendid kõrgenenud (>600 mV) ning normaalse ( $\leq 600$  mV) RHO-de produktsiooniga spermadeks. Analüüs näitas, et normaalse kvaliteediga spermade seas oli märgatavalt vähem neid proove, millede RHO-de produktsioon oli suurenenud. Joonisel 22 on välja toodud normaalsete ja abnormaalsete proovide jaotus RHO-de produktsiooni suhtes.



**Joonis 22.** Normaalse (N) ning abnormaalse (AN) kvaliteediga seemnerakkudega patsientide sperma RHO-de produktsioon. 1- RHO-de produktsioon  $\leq 600$  mV ja 2 – RHO-de produktsioon >600 mV.

Normaalse seemnerakkude kvaliteediga meeste (n=31) spermadest produtseerisid 18 (58,1%) vähe ( $\leq 600$  mV) ning 13 (41,9%) palju ( $>600$  mV) RHO-sid. Samas abnormaalse seemnerakkude kvaliteediga meeste (n=64) spermadest produtseerisid vähem RHO-sid ainult 17 (26,6%) spermat ning palju RHO-sid produtseerisid 47 (73,4%) spermat. Antud erinevus N- ning AN-patsientide vahel oli statistiliselt oluline (P=0,003;  $\chi^2$  Test).

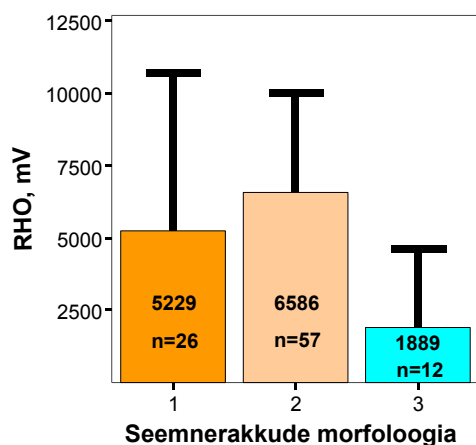
Uuringute käigus võrreldi samuti erinevate seemnerakkude patoloogiate mõju RHO-de produktsioonile. Joonisel 23 on kujutatud seemnerakkude kontsentratsiooni mõju sperma RHO-de produktsioonile. Kuigi madalama seemnerakkude kontsentratsiooniga ( $<20 \times 10^6$  seemnerakku/ml) spermad (n = 31) produtseerisid rohkem RHO-sid (keskmine väärtus  $8072,1 \pm 14846,3$  mV; minimaalne väärtus 436 mV ning maksimaalne väärtus 65230 mV), kui normaalse seemnerakkude kontsentratsiooniga ( $\geq 20 \times 10^6$  seemnerakku/ml) spermad (n = 64; keskmine väärtus  $4434,2 \pm 10787,7$  mV; minimaalne väärtus 411,3 mV ning maksimaalne väärtus 68870 mV), siis antud erinevus ei olnud statistiliselt oluline (P=0,097; Mann-Whitney Test).



**Joonis 23.** Madala seemnerakkude kontsentratsiooniga ( $<20 \times 10^6$  seemnerakku/ml) spermade (1) ning normaalse seemnerakkude kontsentratsiooniga ( $\geq 20 \times 10^6$  seemnerakku/ml) spermade (2) RHO-de produktsioon. Tulemused esitatud – keskmine väärtus  $\pm$  SEM.

Seemnerakkude morfoloogia mõju sperma RHO-de produktsioonile on kujutatud joonisel 24. Spermad jaotati vastavalt seemnerakkude morfoloogiale kolme klassi: 0-3% normaalse morfoloogiaga seemnerakke (n=26); 4-10% normaalse morfoloogiaga seemnerakke (n=57) ning  $>10\%$  normaalse morfoloogiaga seemnerakke (n=12). Vaatamata sellele, et patsiendid, kellel oli  $>10\%$  normaalseid seemnerakke produtseerisid vähem RHO-sid (keskmine väärtus  $1889,3 \pm$

4314 mV; minimaalne väärtus 434,2 mV ning maksimaalne väärtus 15570 mV) kui patsiendid, kellel oli normaalseid seemnerakke 0-3% (keskmine väärtus  $5229,3 \pm 13565,2$  mV; minimaalne väärtus 436,0 mV ning maksimaalne väärtus 65230 mV) või 4-10% (keskmine väärtus  $6585,7 \pm 12811,1$  mV; minimaalne väärtus 411,3 mV ning maksimaalne väärtus 68870 mV), antud erinevus ei olnud statistiliselt oluline ( $P = 0,208$ ; Kruskal-Wallis Test).

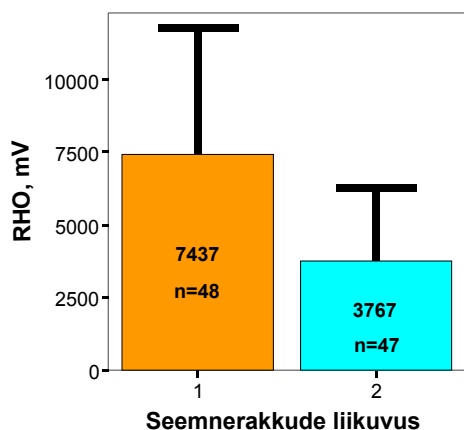


**Joonis 24.** Seemnerakkude morfoloogia mõju sperma RHO-de produktsioonile. 0-3% normaalse morfoloogiaga seemnerakke (1); 4-10% normaalse morfoloogiaga seemnerakke (2) ning >10% normaalse morfoloogiaga seemnerakke (3). Tulemused on esitatud – keskmine väärtus  $\pm$  SEM.

Seemnerakkude liikuvuse ning sperma RHO-de produktsiooni vahelisi seoseid on analüüsitud joonisel 25. Patsiendid jaotati vastavalt nende seemnerakkude liikumiskiirusele kahte klassi: A + B liikuvaid seemnerakke 0-49% (n=48) ning  $\geq 50\%$  (n=47) (WHO, 1999).

Asthenozoospermsed patsiendid (A+B – 0-49%) produtseerisid rohkem RHO-sid (keskmine väärtus  $7436,7 \pm 15008$  mV; minimaalne väärtus 411,3 mV ning maksimaalne väärtus 68870 mV), kui normaalse liikuvusega (A+B –  $\geq 50\%$ ) seemnerakkudega patsientide spermad (keskmine väärtus  $3767,3 \pm 8488,3$  mV; minimaalne väärtus 420,1 mV ning maksimaalne väärtus 41220 mV), kuid antud erinevus ei olnud statistiliselt oluline ( $P=0,074$ ; Mann-Whitney Test).

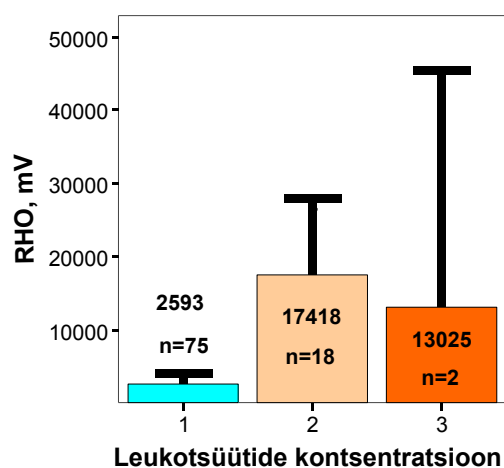




**Joonis 25.** Seemnerakkude liikuvuse mõju sperma RHO-de produktsioonile. Seemnerakkude liikuvus (A + B) – 0-49% (1) ning seemnerakkude liikuvus (A + B) –  $\geq 50\%$  (2). Tulemused on esitatud – keskmine väärtus  $\pm$  SEM.

### 3.2.1.3 Leukotsüütide esinemine spermas ning RHO-de produktsioon

Vastavalt sperma leukotsüütide kontsentratsioonile, jaotati patsiendid kolme klassi - 1. rühmas oli spermas  $0-0,2 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti (n = 75); 2. rühmas oli spermas  $>0,2-1,0 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti (n = 18) ning 3. rühmas oli  $>1 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti (n = 2). Erinevate sperma klasside RHO-de produktsioon on kujutatud joonisel 26.

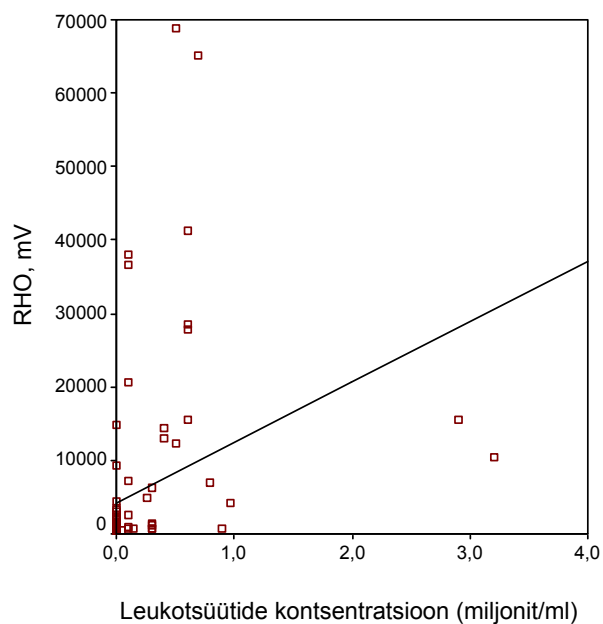


**Joonis 26.** Sperma leukotsüütide kontsentratsioon ning RHO-de produktsioon. Spermad jaotati kolme klassi vastavalt leukotsüütide kontsentratsioonile - spermas  $0-0,2 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti (1); spermas  $>0,2-1,0 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti (2) ning spermas  $>1 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti (3). Tulemused on esitatud – keskmine väärtus  $\pm$  SEM.

Spermad, kus leidus kõige vähem leukotsüüte ( $0-0,2 \times 10^6/\text{ml}$ ), produtseerisid vähem RHO-sid (keskmine väärtus  $2592,6 \pm 6562,5$  mV; minimaalne väärtus 411,3 mV ning maksimaalne väärtus 37950 mV), kui spermad, kus oli  $>0,2-1,0 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti (keskmine väärtus  $17418 \pm 21307,1$  mV; minimaalne väärtus 605 mV ning maksimaalne väärtus 68870 mV) ning  $>1 \times 10^6/\text{ml}$  (keskmine väärtus  $13025 \pm 3599,1$  mV; minimaalne väärtus 10480 mV ning maksimaalne väärtus 15570 mV) ( $P = 0,000$ ; Kruskal-Wallis Test).

Leukotsüütide kontsentratsiooni ning RHO-de produktsiooni omavaheliste seoste lineaarse regressioonanalüüsi tulemused on kujutatud joonisel 27. Leukotsüütide kontsentratsiooni ning sperma RHO-de produktsiooni vahel esines positiivne assotsiatsioon:

RHO-de produktsioon (mV) =  $4212,2 + 8207,3 \times$  Leukotsüütide kontsentratsioon (miljonit/ml)  
 Pearsoni korrelatsioonikordaja ( $r$ ) = 0,32;  $P = 0,002$ .



**Joonis 27.** Leukotsüütide kontsentratsioon ning RHO-de produktsioon. Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused:

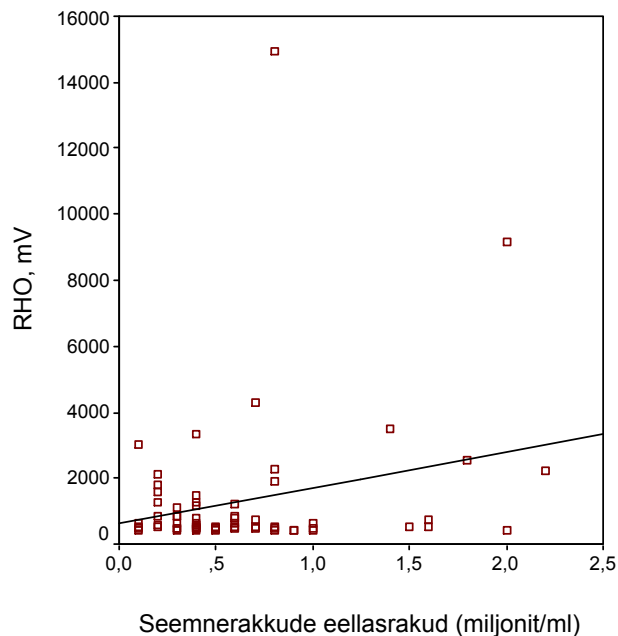
RHO-de produktsioon (mV) =  $4212,2 + 8207,3 \times$  Leukotsüütide kontsentratsioon (miljonit/ml)  
 Pearsoni korrelatsioonikordaja ( $r$ ) = 0,32;  $P = 0,002$ .

Selleks, et edasi uurida seemnerakkude kvaliteedi mõju sperma RHO-de produktsioonile, analüüsiti spermasid, kus ei esinenud leukotsüüte ( $n = 66$ ). Analüüs näitas, et seemnerakkude kvaliteedi näitajad (kontsentratsioon, liikuvus ning morfoloogia) ja IL-6 kontsentratsioon ei

mõjuta RHO-de produktsiooni antud rühmas. Samas leiti positiivne korrelatsioon seemnerakkude eellasrakkude kontsentratsiooni ning RHO-de produktsiooni vahel (joonis 28):

RHO-de produktsioon (mV) = 626 + 1083,1 x Seemnerakkude eellasrakkude kontsentratsioon (miljonit/ml)

Pearsoni korrelatsioonikordaja (r) = 0,25; P = 0,044.



**Joonis 28.** Seemnerakkude eellasrakkude kontsentratsioon ning RHO-de produktsioon. Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused:

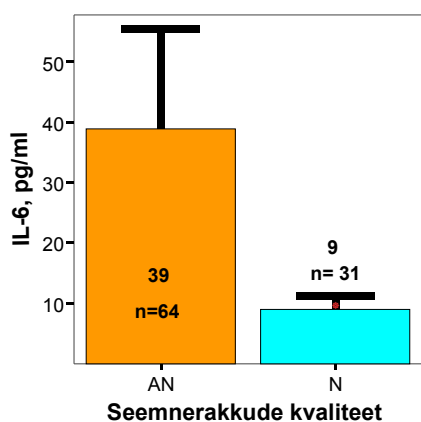
RHO-de produktsioon (mV) = 626 + 1083,1 x Seemnerakkude eellasrakkude kontsentratsioon (miljonit/ml)

Pearsoni korrelatsioonikordaja (r) = 0,25; P = 0,044.

### 3.2.1.4 Interleukiin-6 taseme seosed seemnerakkude kvaliteedi, leukotsüütide kontsentratsiooni ning sperma RHO-de produktsiooniga

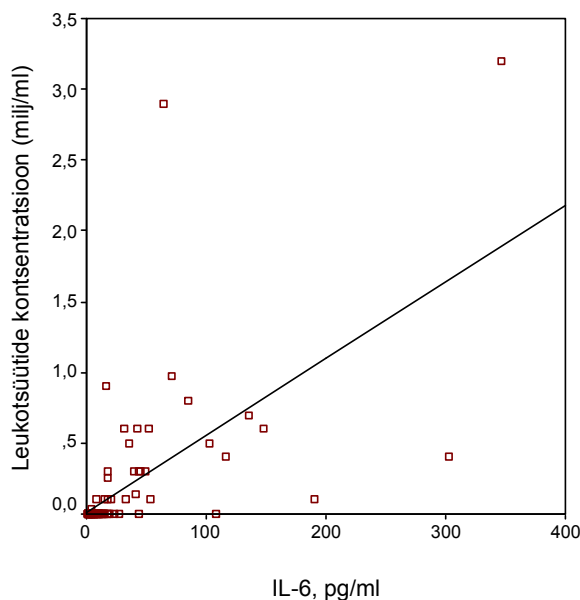
Lisaks traditsioonilisele põletiku näitajale - leukotsüütide kontsentratsioonile, määrati seminaalplasmast IL-6 kontsentratsiooni. Joonisel 29 on kujutatud seemnerakkude traditsiooniliste kvaliteedinäitajate (seemnerakkude kontsentratsioon, liikuvus ning morfoloogia) alusel normaalseteks (N) (n = 31) ning abnormaalseteks (AN) (n = 64) klassifitseeritud spermade IL-6 kontsentratsioonid. Normaalse kvaliteediga (N) spermade keskmine IL-6 kontsentratsioon oli  $9 \pm 6,2$  pg/ml (minimaalne väärtus 2 ning maksimaalne väärtus 23,6 pg/ml). Abnormaalse kvaliteediga (AN) spermade keskmine IL-6 kontsentratsioon oli  $39 \pm 65,4$  pg/ml (minimaalne

väärtus 1,9 ning maksimaalne väärtus 347 pg/ml). N ning AN spermade IL-6 kontsentratsiooni erinevus oli statistiliselt oluline ( $P = 0,041$ ; Mann-Whitney Test).



**Joonis 29.** Seemnerakkude kvaliteet ja IL-6 kontsentratsioon. Spermad klassifitseeriti vastavalt seemnerakkude kvaliteedile normaalseteks (N) ning abnormaalseteks (AN). Tulemused on esitatud – keskmine väärtus  $\pm$  SEM.

Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused näitasid, et sperma IL-6 ning leukotsüütide kontsentratsiooni vahel esineb assotsiatsioon (joonis 30): Leukotsüütide kontsentratsioon (miljonit/ml) =  $0,01 + 0,005 \times$  IL-6 kontsentratsioon (pg/ml). Pearsoni korrelatsioonikordaja ( $r$ ) =  $0,63$ ;  $P = 0,000$

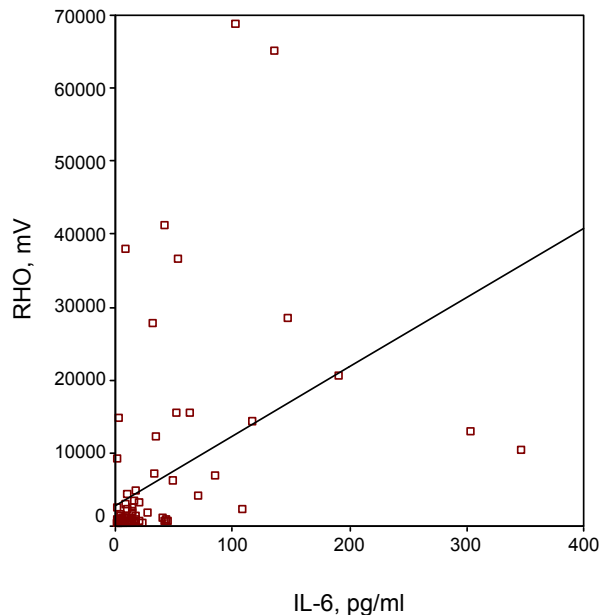


**Joonis 30.** Sperma IL-6 ning leukotsüütide kontsentratsioon. Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused: Leukotsüütide kontsentratsioon (miljonit/ml) =  $0,01 + 0,005 \times$  IL-6 kontsentratsioon (pg/ml). Pearsoni korrelatsioonikordaja ( $r$ ) =  $0,63$ ;  $P = 0,000$ .

Sperma IL-6 kontsentratsiooni ning RHO-de produktsiooni vahelise seose lineaarse regressioonanalüüsi tulemused on kujutatud joonisel 31. Sperma IL-6 kontsentratsiooni ning RHO-de produktsiooni vahel esines positiivne assotsiatsioon:

$$\text{RHO-de produktsioon (mV)} = 2842,3 + 95,1 \times \text{IL-6 kontsentratsioon (pg/ml)}$$

Pearsoni korrelatsioonikordaja ( $r$ ) = 0,43;  $P$  = 0,000.



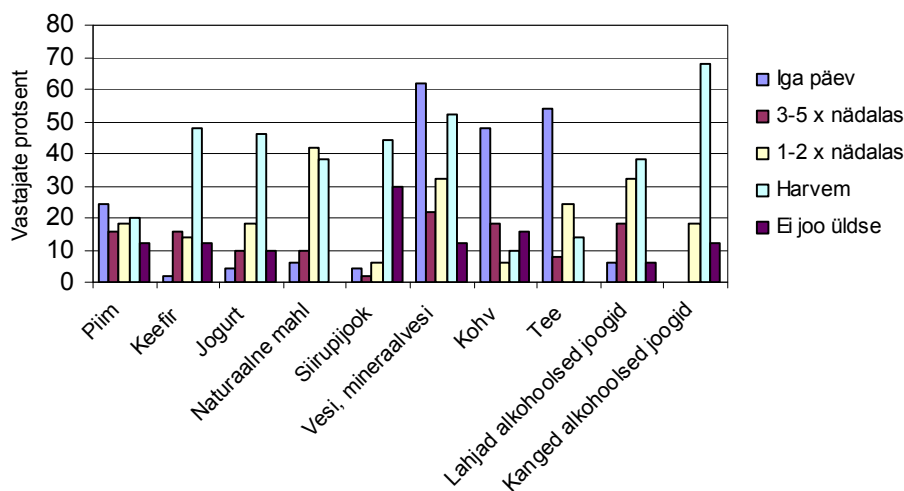
**Joonis 31.** Sperma IL-6 kontsentratsioon ning RHO-de produktsioon. Lineaarse regressioonanalüüsi tulemused:  $\text{RHO-de produktsioon (mV)} = 2842,3 + 95,1 \times \text{IL-6 kontsentratsioon (pg/ml)}$ . Pearsoni korrelatsioonikordaja ( $r$ ) = 0,43;  $P$  = 0,000.

### 3.2.1.5 Küsimustike vastuste analüüs

Toitumisharjumuste ankeedile vastas 95-st patsiendist 50 (52,6 %). Vastajate keskmine vanus oli 30 aastat (minimaalne vanus 21 ja maksimaalne vanus 44). Uuringus osalejate keskmine kehamassi indeks e. KMI oli 24,5 (minimaalne KMI oli 19,9 ja maksimaalne KMI oli 32,0) ning ülekaalulisi (KMI – 25-29,9) oli 20% ja rasvunuid (KMI  $\geq$ 30) oli 12 %.

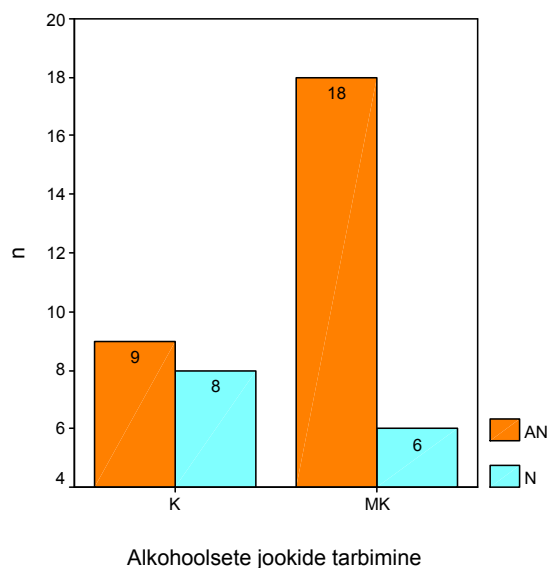
## Jookide tarbimise harjumused

Androloogia labori patsientide jookide tarbimise harjumused on kujutatud joonisel 32. Vähemalt pooltele patsientidest olid igapäevasteks jookideks vesi, kohv ja tee. Samuti oli iseloomulikuks vähene piimatoodete (piim, keefir ning jogurt) tarbimine. Ankeedile vastanutest tarbis piima iga päev ainult 24% patsientidest, samas kui keefiri ning jogurti igapäevane tarbimine olid veelgi väiksemad (vastavalt 2% ja 4% patsientidest).



**Joonis 32.** Androloogia labori patsientide erinevate jookide tarbimise sagedus.

Alkoholsete jookide tarbimisel eelistati lahjasid jooke (õlu, vein) ning keskmine korraga tarbitav kogus oli 0,9 liitrit. Kangeid alkoholseid jooke (viin, rumm) tarbiti korraga keskmiselt 0,3 liitrit. Alkoholsete jookide tarbimise alusel jaotati patsiendid kahte rühma. Esimeses rühmas (K) ei tarbinud patsiendid alkoholi või tarbimissagedus oli harvem kui kord nädalas ( $n = 17$ ; 41,5%). Teises rühmas (MK) tarbisid patsiendid alkoholseid jooke vähemalt üks kord nädalas ( $n = 24$ ; 58,5%). Joonisel 33 on kujutatud alkoholsete jookide tarbimise alusel moodustatud patsientide rühmade seemnerakkude kvaliteeti. Patsiendid jaotati seemnerakkude kvaliteedi (seemnerakkude kontsentratsioon, liikuvus ning morfoloogia) alusel normaalse kvaliteediga spermaga patsientideks (N) ning abnormaalse kvaliteediga spermaga patsientideks (AN). K-rühmas, mis koosnes patsientidest, kes ei tarbinud või tarbisid väga vähe alkoholi oli normaalse kvaliteediga spermasid ( $n = 8$ ; 47,1 %) rohkem kui MK-rühma patsientide hulgas ( $n = 6$ ; 25%). Antud erinevus ei olnud aga statistiliselt oluline ( $P = 0,14$ ;  $\chi^2$  Test).



**Joonis 33.** Alkoholsete jookide tarbimine ning seemnerakkude kvaliteet. Patsiendid jaotati vastavalt alkoholsete jookide tarbimisele kahte rühma. K-rühm – patsiendid ei tarbinud alkoholseid jooke või tarbimise sagedus oli madal ning MK-rühm – patsiendid tarbisid alkoholseid jooke vähemalt korra nädalas. Seemnerakkude kvaliteedi (seemnerakkude kontsentratsioon, liikuvus ning morfoloogia) alusel jaotati patsiendid normaalse (N) ning abnormaalse (AN) kvaliteediga spermaga patsientideks.

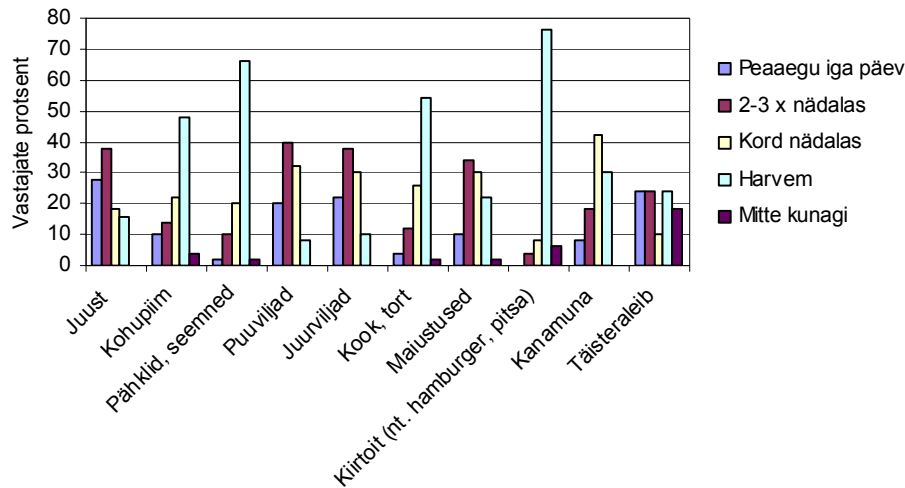
Alkoholsete jookide tarbimise ning sperma RHO-de produktsiooni vaheliste seoste uurimisel analüüsisime ainult patsiente ( $n = 36$ ), kelle spermas ei leidunud leukotsüüte. K-rühma patsientide spermade RHO-de produktsioon oli madalam (keskmine väärtus  $786,2 \pm 508,3$  mV; minimaalne väärtus 420,1 mV ja maksimaalne väärtus 2111 mV), kui MK-rühma patsientidel (keskmine väärtus  $2332,4 \pm 3533,5$  mV; minimaalne väärtus 411,3 mV ja maksimaalne väärtus 14950 mV). Antud erinevus ei olnud aga statistiliselt oluline ( $P = 0,06$ ; Mann-Whitney Test).

### Toitumisharjumused

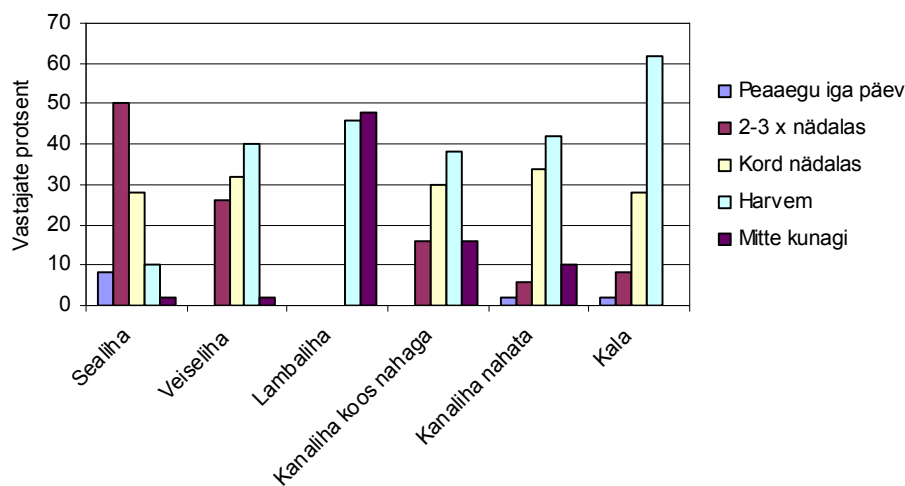
Toidukordade arv päevas oli kaks 14%-dil vastajatest, kolm 78%-dil, neli 4%-dil ning enam kui neli 4%-dil. Ankeetide põhjal saab öelda, et igapäevaselt eelistatakse hommikuti süüa võileibu (56% vastanutest), järgnesid soe toit (24%), puder (2%) või muu (10%). Muu hommikusöögi eelistuseks oli nimetatud kohupiima, jogurtit, puuvilja, muna ning kama. 8% vastanutest ei söö hommikuti. Ankeetide analüüsil oli positiivseks tulemuseks suhteliselt suur (70% patsientidest) sooja lõunasöögi sööjate hulk. Teised patsiendid söövad igapäevaselt lõunaks salateid või võileibu (10%), kondiitritooteid (16%) või ei söö üldse lõunat (4%).

Erinevate toiduainete kasutamine androloogia labori patsientide hulgas on esitatud joonisel 34 A. Analüüsist võib välja tuua madala puu- ja juurvilja ning pähklite tarbimisharjumuse ning suhteliselt kõrge maiustuste tarbimise. Erinevate lihasortide tarbimise analüüs on kujutatud joonisel 34 B. Patsientide seas oli kõrge sealiha tarbimine - 58% vastanutest sööb sealiha 2-3 korda nädalas (nendest 8% teeb seda iga päev). Samas oli aga väga madal kala söömine - 62% meestest sööb kala harvem kui kord nädalas.

**A.**



**B.**



**Joonis 34.** Androloogia labori patsientide toiduainete (A) ning erinevate lihasortide (B) tarbimissagedused.



## Suitsetamisharjumused

Uuringus osalejatest 44% olid suitsetajad ning keskmine tarbitud sigarettide arv päevas oli 10-15. Suitsetajate hulgas ei leidunud rohkem abnormaalse kvaliteediga spermaga patsiente kui mitesuitsetajate hulgas ( $P = 0,3$ ;  $\chi^2$  Test). Suitsetamise ning sperma RHO-de produktsiooni vaheliste seoste uurimisel analüüsisime ainult patsiente ( $n = 36$ ), kelle spermas ei leidunud leukotsüüte. Suitsetajate rühma patsientide spermade RHO-de produktsioon oli kõrgem (keskmine väärtus  $2332,6 \pm 3794,3$  mV; minimaalne väärtus 411,3 mV ja maksimaalne väärtus 14950 mV), kui mitesuitsetajate rühma patsientide spermade RHO-de produktsioon (keskmine väärtus  $1043,7 \pm 925,5$  mV; minimaalne väärtus 420,1 mV ja maksimaalne väärtus 4296 mV). Antud erinevus ei olnud aga statistiliselt oluline ( $P = 0,43$ ; Mann-Whitney Test).

### 3.2.2 Arutelu

Viimaste aastate uuringud on näidanud meeste viljakuse olulist vähenemist arenenud riikides. Lastetus on paljudes riikides kasvavaks probleemiks ning juba enam kui 50%-l juhtudest on lastetuse üheks põhjuseks meeste madal viljakus (Punab et al., 2003). Kliinilises praktikas kasutatakse seemnerakkude hindamiseks enim traditsioonilist mikroskopeerimist, kuid saadud tulemused ei ole alati piisavad, et anda hinnangut seemneraku viljastamisvõimelisuse kohta (Saleh et al., 2003). Ka muud näitajad, nagu tsütokiinid ja RHO-d on seotud viljatuse tekkimisega, mistõttu on hakatud neid viimastel aastatel kasutama viljatuse diagnoosimisel (Pasqualotto et al., 2001). Käesolevas töös olid 31 (32,6%) patsienti normaalsete seemnerakkudega ning 64 analüüsi näitasid probleemi mingi seemneraku kvaliteedi näitaja osas. Seemnevedeliku madala kvaliteedi (madal liikuvus, kontsentratsioon ja normaalse morfoloogiaga seemnerakkude hulk) üheks võimalikuks põhjuseks peetakse seemnerakkude oksüdatiivset stressi - kas kõrget RHO taset või antioksidantide vähesust (Pasqualotto et al., 2000).

Käesoleva uuringu tulemusena võib kindlalt väita, et RHO-de hulk mõjutab seemnerakkude kvaliteeti. Normaalse kvaliteediga seemnerakkudega patsientide sperma produtseeris oluliselt vähem RHO-sid (1311,4 mV) kui abnormaalse kvaliteediga seemnerakkudega patsientide sperma (7708,9 mV). Nimetatud seost on leitud ka mitmetes teistes uuringutes (Pasqualotto et al., 2000; Sharma et al., 1999). Seemnerakke mõjutab lipiidide peroksüdatsioon ja seeläbi muutunud membraan (Sharma et al., 1999).

Võrreldes viljakaid ja viljatuid mehi on leitud viimastel kõrgem RHO-de tase (Pasqualotto et al., 2000). Uuringud näitavad ka erinevate diagnoosidega viljatute meeste kõrget seemnevedeliku oksüdatiivse stressi taset. Kõrget RHO produktsiooni on leitud meestel, kellel on diagnoositud oligozoospermia, asthenozoospermia või teratozoospermia (Pasqualotto et al., 2001). Ühe uuringu tulemusena näidati statistiliselt oluliselt suuremat RHO väärtust teadmata põhjusega viljatusega patsientide grupis (Pasqualotto et al., 2001). Siiski ei ole välja kujunenud ühtset arusaama, missugune seemnerakkude kvaliteedi näitaja kahjustub kõige rohkem OS-i tõttu. Mõne uuringu kohaselt korreleerub RHO väärtusega kõige enam seemnerakkude kontsentratsioon, samas teiste uuringute kohaselt liikuvus (Keskes-Ammar et al., 2003). Käesolevas uuringus täheldasime sarnast trendi. Oligozoospermsete meeste spermad produtseerisid rohkem RHO-sid (8072,1 mV) kui normozoospermsete meeste spermad (4434,2 mV). Samuti täheldasime seemnerakkude liikumiskiiruse ning RHO-de produktsiooni omvahelisi seoseid, kuna asthenozoospermised mehed produtseerisid rohkem RHO-sid (7436,7 mV) kui normozoospermised mehed (3767,3 mV). Kuigi seemnerakkude kontsentratsiooni ning liikuvuse mõju ei olnud statistiliselt oluline, võib siiski oletada tähtsa seose esinemist juhul, kui uuritavate arvud oleksid olnud suuremad. Sarnaselt eelnevate uuringutega, puudub ka antud uuringus oluline seos seemnerakkude morfoloogia ning sperma RHO-de produktsiooni vahel. RHO-de produktsiooni taseme määramine seemnevedelikus võimaldab välja selgitada need patsiendid, kelle viljatus võib olla seotud oksüdatiivse stressiga ning vajadusel saab kasutusele võtta strateegiad OS-i vähendamiseks. RHO-de poolt põhjustatud viljatuse ravi üheks komponendiks võib olla antioksüdantide manustamine (Pasqualotto et al., 2000).

Oluline RHO-de allikas seemnevedelikus on leukotsüüdid ning nende mõju on seotud nende arvu ning aktiveeritusega (Sharma et al., 2001). Korrelatsioon RHO-de produktsiooni ja leukotsüütide vahel on leitud leukotsüütide kontsentratsioonivahemikus 0-st kuni  $1 \times 10^6$ , kusjuures suurim korrelatsioon esines patsientidel, kelle leukotsüütide hulk oli  $>1 \times 10^6$  (Sharma et al., 2001). Nimetatud seos leidis kinnitust ka käesolevas uuringus. Leiti positiivne korrelatsioon leukotsüütide ja RHO-de produktsiooni vahel. Kõrgeim RHO-de produktsioon antud töös oli seemnevedelikes leukotsüütide kontsentratsiooniga  $0,2-1,0 \times 10^6/\text{ml}$ . WHO juhendi järgi vajab patsient ravi alles leukotsüütide kontsentratsiooni  $>1 \times 10^6/\text{ml}$  korral (WHO, 1999). Uuringu tulemused kinnitavad aga töid, mis näitavad, et põletike ravi on näidustatud juba sperma leukotsüütide  $>0,2 \times 10^6/\text{ml}$  kontsentratsiooni korral (Punab et al., 2003).

Teine oluline RHO-de allikas seemnevedelikus on seemnerakud (Pasqualotto et al., 2000). Töö andmete analüüs näitas, et leukotsüütideta seemnevedelikes (n = 66) seemnerakkude kvaliteedi näitajad (kontsentratsioon, liikuvus ning morfoloogia) ja IL-6 kontsentratsioon ei mõjuta RHO-de produktsiooni. Samasuguse tulemuseni jõuti uuringus, kus võrreldi põletikega ja põletiketa patsientide tsütokiinide ja RHO-de vahelisi seoseid (Depuydt et al., 1996). Käesoleva töötulemuste edasine analüüs näitas aga positiivse korrelatsiooni esinemist seemnerakkude eellasrakkude kontsentratsiooni ning RHO-de produktsiooni vahel. Seda saab selgitada eellasrakkude suurema tsütoplasma hulgaga, kuna seal võib suurenenud RHO-de produktsioon olla põhjustatud tsütoplasma ensüümi glükoos-6-fosfaat dehüdrogenaasi poolt (Aitken et al., 1997).

Samuti sõltub leukotsüütide hulgast IL-6 tase. Kirjanduse andmetel korreleerub RHO-de hulk nii leukotsüütide kui IL-6 tasemega (Depuydt et al., 1996). Eelnevate uuringute kohaselt on IL-6 seemnevedeliku interleukiinide seas kõige tundlikum marker, mis eristab suguteede infektsiooniga patsiente tervetest ning on seetõttu sobiv marker põletike väljaselgitamiseks (Depuydt et al., 1996). Käesolevas töös korreleerus IL-6 kontsentratsioon positiivselt leukotsüütide kontsentratsiooniga ning RHO-de produktsiooniga. Ühes eelnevas uuringus toodud IL-6 väärtused olid järgnevad: leukotsütoospermiaga patsientide keskmine IL-6 väärtus oli 255,4 pg/ml ning normozoospermiaga patsientidel 25,7 pg/ml-s (Depuydt et al., 1996). Käesolevas töös olid vastavad väärtused sarnased - 205,4 pg/ml-s ja 24,9 pg/ml-s. IL-6 seos RHO-de produktsiooniga ning korrelatsioon leukotsüütide ja RHO produktsiooni vahel näitab põletiku olulist osa oksüdatiivse stressi tekkimises.

Käesoleva töö ning mitmete eelnevate tööde põhjal on selgesti näha oksüdatiivse stressi tähtsus mehepoolse viljatuse tekkes. Organismi oksüdatiivset seisundit mõjutavad oluliselt keskkonna saastatus ning eluviisid, eelkõige toitumine (Gate et al., 1999). Seetõttu püüti antud töös samuti uurida androloogia labori patsientide toitumisharjumuste mõju sperma oksüdatiivse stressile.

Toitumisharjumuste mõju mehepoolsele viljatusele on vähe uuritud. On aga teada, et mõningate toitainete puudus (tsink, seleen, karnitiin, vitamiin E) võib oluliselt mõjutada mehe reproduktiivset funktsiooni (Wong et al., 2000). Toitainete puudust ei teki tervislikul toitumisel, sest tasakaalustatud toit sisaldab piisaval määral ja optimaalses vahekorras toitaineid. Samuti on oluline toitainete, eelkõige antioksidandi omadustega vitamiinide ja mineraalainete, osa organismi oksüdatiivse tasakaalu säilitamises (Zilmer et al., 1995). Mitte ükski toiduaine ei ole

täielikult vaba ebasoovitatavatest ainetest – pestitsiididest, raskemetallidest jne. Mida rohkem varieerida toiduainetega, seda suurem on võimalus saada kõiki vajalikke toitaineid ja seda väiksem on oht saada ebasoovitavaid saasteaineid suures koguses (Liebert et al., 1999). Teatud juhtudel (organismi haiguslik seisund, kokkupuude pro-oksüdandiga) on vajalik mõningate vitamiinide ja mineraalainete lisatarbimine. Nende võtmist ei tohiks aga teostada ilma arsti nõuanneteta. Arst selgitab eelnevalt organismi tervisliku seisundi, biokeemilise omapära ning võtab arvesse pro-oksüdantidega kokkupuute määra (Zilmer et al., 1995). Eesmärk peaks siiski olema tervislik toitumine ning seeläbi haigusliku seisundi ennetamine.

Analüüsides küsimustike tulemuste üldiseid trende võib välja tuua mõned puudused toitumisharjumustes. Jookide tarbimise analüüsil selgus vähene piimatoodete (piim, keefir, jogurt) tarbimine. Eelistatud peaks olema madala rasvasisaldusega piim ja piimatooted, mis tagavad vajaliku kaltsiumi saamise. Samuti võiks eelistada enam naturaalseid mahlu, eelkõige mahlu koos viljalihaga (WHO, 2000).

Analüüsides alkoholi tarbimist selgus alkoholi tarvitajate spermade kõrgem RHO-de produktsioon (2332,4 mV) võrreldes vähe või mitte tarvitajatega (786,2 mV). Alkoholi tarvitajate hulgas oli seemnerakkude probleemidega patsiente rohkem kui mitte tarvitajate seas. Nimetatud erinevused ei olnud aga statistiliselt olulised. Paljud eelnevad uuringud on näidanud alkoholi negatiivset mõju seemnevedeliku kvaliteedinäitajatele. Tulemused võivad olla mõjutatud ka sellest, missugust alkoholi kasutatakse, kuna mõned alkohoolsed joogid sisaldavad märkimisväärselt antioksüdante (Marinelli et al., 2004). Mõeldes oksüdatiivsele staatusele organismis tuleks siiski loobuda alkoholi tarvitamisest või tarvitada mõõdukalt. Alkohol võib põhjustada ka toitainete defitsiiti, kaasa arvatud foolhappe, C-vitamiini ning tsingi ja magneesiumi puudujääke. Tarvitamisel peaks piirduma päevas kahe alkohoolse joogiga (jook ei peaks sisaldama rohkem kui 10 g absoluutset alkoholi) (WHO, 2000).

Vähene oli küsimustikele vastajate puu- ja juurvilja tarbimine. Organismi antioksüdantse kaitse suurendamiseks peaks kindlasti suurendama nende tarbimist, eelkõige nende kõrge C ja E vitamiinde, karotenoidide ning mineraalainete rikkuse pärast. Soovitatakse tarbida vähemalt 400 g köögivilju (kartulitele lisaks) ja puuvilju päevas, mis tähendab umbes 5–6 portsjonit päevas. Kehaliselt aktiivne mees vajab enamgi - päevas umbes 600 g. Üks portsjon võrdub ühe puuviljaga nagu õun või pirn, või ühe köögivilja portsjoniga, mis kaalub ligikaudu 80 g.

Soovitatakse tarbida ka külmutatud ja kuivatatud ning samuti konserveeritud puu- ja köögivilju (WHO, 2000).

Toidu küllastunud rasvhapete kõrge hulga annab põhiliselt loomne toit (Zilmer et al., 1995), seetõttu vajab märkimist kõrge sealihaga tarbimise harjumus meie poolt analüüsitud patsientide toitumisharjumustes. Sealihale tuleks aga eelistada kana- ja kalaliha, eelkõige nende väiksema rasvasisalduse ning tsingi ja seleeni rikkuse poolest. Samuti sisaldab kala  $\omega$ -3-rasvhappeid, mis on inimese jaoks asendamatud rasvhapped, kuna inimorganism ei suuda neid ise sünteesida. Kala võiks tarbida kaks-kolm korda nädalas (WHO, 2000).

Käesolevas töös võrreldi suitsetajate ja mittedsuitsetajate seemnevedelike RHO-de produktsiooni. Suitsetajate rühma patsientide spermade RHO-de produktsioon oli kõrgem (2332,6 mV), kui mittedsuitsetajate rühma patsientide spermade RHO-de produktsioon (1043,7 mV). Nimetatud erinevus ei olnud aga statistiliselt oluline. Kirjanduses on toodud väga palju andmeid suitsetamise kahjulikust mõjust nii organismi oksüdatiivsele staatusele kui ka meeste viljakusele (Marinelli et al., 2004; Zilmer et al., 1994). Tuginedes nendele andmetele tuleb soovitada mehepoolse viljatusega patsientidele suitsetamisest loobumist.

#### IV JÄRELDUSED

1. Traditsiooniliste seemnerakkude kvaliteedinäitajate (seemnerakkude kontsentratsioon ning nende liikuvus ja morfoloogia) alusel jagunesid patsiendid järgnevalt - normaalse seemnerakkude kvaliteediga patsiente oli 31 (32,6%) ning seemnerakkude kvaliteedi probleemidega patsiente oli 64 (67,4%).
2. Normaalse kvaliteediga seemnerakkudega patsientide spermad produtseerisid oluliselt vähem ( $P = 0,000$ ) RHO-sid ( $1311,4 \pm 2685,3$  mV) kui abnormaalse kvaliteediga seemnerakkudega patsientide spermad ( $7708,9 \pm 14447$  mV).
3. Oligozoospermsete ning asthenozoospermsete patsientide spermad produtseerisid rohkem RHO-sid kui normozoospermsete patsientide spermad. Antud erinevused ei olnud aga statistiliselt olulised.
4. Spermad, kus leidis vähem leukotsüüte ( $0-0,2 \times 10^6/\text{ml}$ ), produtseerisid vähem RHO-sid ( $2592,6 \pm 6562,5$  mV), kui spermad, kus oli  $>0,2-1,0 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti ( $17418 \pm 21307,1$  mV) ning  $>1 \times 10^6/\text{ml}$  leukotsüüti ( $13025 \pm 3599,1$  mV) ( $P = 0,000$ ).
5. Normaalse kvaliteediga spermade keskmine IL-6 kontsentratsioon oli madalam ( $9 \pm 6,2$  pg/ml) kui abnormaalse kvaliteediga spermadel IL-6 kontsentratsioon ( $39 \pm 65,4$  pg/ml) ( $P = 0,041$ ).
6. Lineaarne regressioonanalüüs näitas mitmete oluliste positiivsete assotsiatsioonide esinemist: leukotsüütide kontsentratsiooni ning sperma RHO-de produktsiooni vahel ( $r = 0,32$ ;  $P = 0,002$ ); seemnerakkude eelleasakkude kontsentratsiooni ning RHO-de produktsiooni vahel ( $r = 0,25$ ;  $P = 0,044$ ); IL-6 kontsentratsiooni ning leukotsüütide kontsentratsiooni vahel ( $r = 0,63$ ;  $P = 0,000$ ) ning IL-6 kontsentratsiooni ning RHO-de produktsiooni vahel ( $r = 0,43$ ;  $P = 0,000$ ).
7. Toitumisuuringu tulemustest selgus androloogia labori patsientide madal puu- ja juurvilja ning kõrge sealiha tarbimisharjumus. Olgugi, et ei selgunud otseseid seoseid toitumisharjumuste ja seemnevedeliku kvaliteedinäitajate vahel, on tähtis rõhutada toitumisharjumuste osa organismi üldise oksüdatiivse tasakaalu säilitamises.
8. Lisaks selgusid seosed patsientide alkoholi tarbimise ja suitsetamise ning sperma kõrgeenenud RHO-de produktsiooni vahel. Alkoholi tarvitajate sperma RHO-de produktsioon oli kõrgem ( $2332,4 \pm 3533,5$  mV) kui vähe või mitte tarvitajatel ( $786,2 \pm 508,3$  mV) ja kõrgem suitsetajatel ( $2332,6 \pm 3794,3$  mV) kui mittesuitsetajatel ( $1043,7 \pm 925,5$  mV), antud erinevused ei olnud aga statistiliselt olulised.

## V KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida seemnevedeliku kvaliteeti ning reaktiivsete hapniku osakeste (RHO) mõju seemnevedeliku kvaliteedinäitajatele. Samuti oli töö ülesandeks hinnata põletiku ja toitumise osa sperma poolt produtseeritavate RHO-de tekkes.

Uuriti 95 viljatu mehe seemnevedeliku kvaliteeti, hinnates seemnerakkude kontsentratsiooni, liikuvust ja morfoloogiat ning mõõdeti seemnerakkude reaktiivsete hapniku osakeste produktsiooni. Lisaks määrati seemnevedeliku leukotsüütide hulk ja interleukiin-6 tase. Uuritavatest 50 täitsid küsimustiku eluviisi kohta, mis andis lisainformatsiooni toitumise, alkoholitarbimise ja suitsetamise kohta.

Reaktiivsete hapniku osakeste hulga mõõtmisel kasutati kemoluminestsentsi detekteerimise meetodit, mille korral luminesceeruvaks ühendiks oli luminool. Seemnevedeliku seemnerakkude kontsentratsiooni, liikuvuse ning morfoloogia hindamisel lähtuti Maailma Tervishoiuorganisatsiooni poolt välja antud juhenditest. Leukotsüütide värvimisel kasutati Giemsa ja Bryan-Leishman'i meetodit ning interleukiin-6 taseme määramine baseerus kemoluminestsents - immunomeetrilisel meetodil.

Magistritöö tulemusena selgus, et RHO-de hulk mõjutab seemnerakkude kvaliteeti. Seemnerakkude kvaliteedi probleemidega patsientide spermas leiti statistiliselt oluliselt kõrgem RHO-de produktsioon kui normaalse kvaliteediga seemnerakkudega spermas. RHO-de hulga määramine võib tulevikus olla diagnostilise väärtusega seemnerakkude viljastamisvõimelisuse määramisel.

Kahe põletikumarkeri (leukotsüütide kontsentratsioon ning interleukiin-6 tase) ja RHO produktsiooni vahel leiti vastastikused seosed. Kõrge leukotsüütide ja interleukiin-6 kontsentratsiooniga seemnevedelikes leiti ka kõrgem RHO produktsioon.

Toitumisharjumuste ja seemnevedelikke iseloomustavate näitajate vahel ei leitud otseseid seoseid, küll aga sai välja tuua põhilised trendid androloogia labori patsientide toitumisharjumustes. Toitumisharjumused vajavad mõningaid korrektiive puu- ja juurviljade tarbimise suurendamise ja küllastunud rasvhapete osakaalu vähendamise suunas.

## VI SUMMARY

### **Oxidative stress, male factor infertility and the possible impact of nutrition habits**

The purpose of the present Master's thesis was to examine the relationship between reactive oxygen species (ROS) and semen quality among infertile Estonian men. Additionally, there was an aim to evaluate the effects of infection and life style factors (nutrition and alcohol and cigarette consumption) on sperm quality and production of ROS.

The 95 participants of the study were enrolled through the andrology clinic at the West-Tallinn Central Hospital. Semen samples were analysed for sperm concentration, motility and morphology. Also, the measurements of white blood cell count, IL-6 level and ROS production from semen sample were performed. Fifty participants completed a questionnaire that included information on different aspects of lifestyle.

Level of ROS was measured using by a chemiluminescence assay using luminol as a probe. Standard semen analysis was made according to World Health Organization guidelines. The number of leucocytes was determined using the Giemsa and Bryan-Leishman's staining method. The concentration of IL-6 was determined with an immuno-chemiluminescence assay.

Patients with normal standard semen parameters had significantly lower ROS level compared with patients with abnormal semen. Measuring ROS levels in semen samples is useful to distinguish the fertile men from the infertile men. The current study also indicated that in majority of the cases the high production of ROS was associated with the elevated concentrations of both leucocytes and interleukin-6.

Considering male infertility cases, environmental and life style factors must be evaluated. The analysis of questionnaires did not show any direct relationships between semen quality, ROS level and nutritional habits. Still, the present study shows some characteristics of dietetic habits of infertile men. For the oxidative stress point of view, it is important to mention that large proportion of the subjects do not consume enough fruits and vegetables and have high percentage of saturated fat in their diet.



## VII KASUTATUD KIRJANDUS

1. Agarval A., Saleh R.A., Bedaiwy M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, vol 79, No 4, 2003, lk 829- 843.
2. Aitken R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Molecular Human Reproduction*. Vol 3, 1997, lk 169-173.
3. Aitken K.J., Clarkson J.S., Fishel S. Generation of reactive oxygen species lipid peroxidation and human sperm function. *Biology of Reproduction*. 41, 1989, lk 183.
4. Algma E. Õpilaste toitumisharjumuste uurimine. Bakalaureuse töö, 2001.
5. Alvarez J.G., Touchtone J.C., Blasco L., Storey B.T., Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *Journal of Andrology*. Vol 8, 1987, 338-348.
6. Bedford J.M., Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biology of Reproduction*. 28, 1983, lk 108-120.
7. Benzie I.F.F. Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part A, 136, 2003, lk 113-126.
8. Bokov A., Chaudhurib A., Richardsonc A. The role of oxidative damage and stress in aging. *Mechanisms of Aging and Development*, 125, 2004, lk 811–826.
9. Buettner G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 300, 1993, 535-543.
10. Chen L., Bowen P.E., Berzy D., Aryee F. Diet modifications affects DNA oxidative damage in healthy humans. *Free radical biology & medicine*, vol 26, nr 5/6, 1999, lk 695-703.

11. Comhaire F.H., Christophe A.B., Zalata A.A., Dhooge W.S. Mahmoud A.M.A. Depudt. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids*. 63, 2000, lk 159-165.
12. Curtin J.F., Donovan M., Cotter T.G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *Journal of Immunological Methods*. 265, 2002, lk 49– 72.
13. Davenport J. Enlightened by Luminol, <http://members.aol.com/profchm/luminol.html>
14. Dawson E.B., Harris W.A., Teter M.C., Powell L.C. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertility and Sterility*. 58, 1992, 1034-1039.
15. De Lamirande E., Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 3, 1997, lk 175-193.
16. De Celis R. Pedron-Nuevo N., Feria-Velasco A. Toxicology of male reproduction in animals and humans. *Archives of Andrology*. 37, 1996, 201-218.
17. Drew B., Leeuwenburgh C. Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species. *New York Academy of Sciences*, 959, 2002, lk 66-81.
18. Drew B., Leeuvenvugh C. Aging and the role of reactive nitrogen species. *New York Academy of Sciences* , 959, 2002, lk 66-81.
19. Eesti toitumissoovitused. Sotsiaalministri 14. detsembri 1995. a. määrus nr. 62
20. Eggert-Kruse W., Boit R., Rohr G., Aufenanger J., Hund M., Strowitzki T. Relationship of seminal plasma interleukin (IL)-8 and IL-6 with semen quality. *Human Reproduction*. Vol 18, 2001, lk 517-528.

21. Eliasson R. Basic Semen Analysis. Andrology Laboratory at Sophiahemmet Hospital, Sweden, 2003.
22. Fang Y-Z.; Yang S.; Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, vol 18, nr 10, 2002, lk 872-879.
23. Favier A. Current aspects about the role of zinc in nutrition. *Rev. Prat.* 43.1993.146-151.
24. Ferrari C.K.B. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, nr 57, 2003, lk 251-260.
25. Fraga C.G., Motchnik P.A., Shigenaga M.K. Ascorbic acid protects endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88, 1991, 11003-11006.
26. Gate L., Paul J., Nguyen Ba G., Tew K.D., Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 53, 1999, lk 169-180.
27. Gupta N.P., Kumar R. Lycopene therapy in idiopathic male infertility- a preliminary report. *International Urology and Nephrology*. 34, 2002, lk 369-372.
28. Halliwell B., Gutteridge J., *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, Clarendon Press, 1989.
29. Henkel R., Bittner J., Weber R., Hüther F., Miska W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. *Fertility and Sterility*. Vol. 71, 1999, 1138-1143.
30. Hsu P-C., Gyo Y.L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, 180, 2002, lk 33-44.
31. Jackson M.J., Ofarell S., *British Medical Bulletin*. 49, 1993, 630-641.

32. Jensen T.K., Andersson A-M., Jorgensen N., Andersen A-G., Carlsen E., Petersen J.H., Skakkebaek N.E. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1558 Danish men. *Fertility and Sterility*, vol 82, no 4, 2004, lk 863-870.
33. Jeyendran R.S. Interpretation of semen analysis results. A practical guide. Cambridge University Press. 2000.
34. Kehrer J.P. *Critical Reviews in Toxicology* 23, 1993, lk 21-48.
35. Keskes-Ammar L., Feki-Chakroun N., Revai T. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Archives of Andrology*, 49, 2003, 83-94.
36. Kobayashi H., Gil-Guzman E., Mahran A.M., Rakesh, Nelson D.R., Thomas A.J. Jr., Agarwal A. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *Journal of Andrology*, 22 (4), 2001, lk 568-574.
37. Lewis E.M.S., Sterling E.S.L., Young S.I., Thampson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*. Vol 67, 1997, lk 142-147.
38. Liebert T., Pappel K., Vokk R. Toitumisest. Abimaterjal tervisliku toitumise alal. Tallinn, 1999.
39. Madding C.I., Jacob M., Ramsay VP., Sokol R.Z. Serum and semen zinc levels in normozoospermic and oligozoospermic men. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 30, 1986, 213-218.
40. Marinelli D., Gaspari L., Pedotti P., Taioli E. Mini-review of studies on the effect of smoking and drinking habits on semen parameters. *International Journal Hygiene Environmental Health*, 207, 2004, lk 185-192.

41. McCord J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine*, vol 108, nr 6, 2000, lk 652-659.
42. Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology*. Oxford University Press, 1994.
43. Nauseef WM., Volpp B.D., McCormic S., Leidal K.G., Clarc R.A. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 1991, 5911-5917.
44. Negro-Vilar A. Stress and Other Environmental Factors Affecting Fertility in Men and Women: Overview. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101, 1993, lk 59-64.
45. Nieschlag E., Behre H.M. *Andrology. Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag, Germany, 2000.
46. Niki E. *Chemistry and Physics of Lipids*. 44, 1987, 227-253.
47. Palan P., Naz R. Changes in various antioxidant levels in human seminal plasma related to immunoinfertility. *Archives of Andrology*. 36, 1999, lk 139-143.
48. Papas A.M. *Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health*. Florida, 1998.
49. Pasqualotto F.F., Sharma R.K., Nelson D.R., Thomas A.J., Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen charecteristics, and clinical diagnosis in men undregoin infertility investigation. *Fertility and Sterility*. Vol 73, 3, 2000, lk 459-464.
50. Pasqualotto F.F., Sharma R.K., Kobayashi H., Nelson D.R., Thomas A.J., Agarwal A. Oxidative Stress in Normaspermic Men Undergoing Infertility Evaluation. *Journal of Andrology*, vol 22, 2, 2001, lk 1-9.
51. Punab M., Loivukene K., Kermes K., Mandar R. The limit of leucocytospermia from the microbiological view. *Andrologia*. 35(5), 2003, 271-278.

52. Rajmakers M.T.M., Roelofs H.M.J., Steegers E.A.P., Steegers-Theunissen P.M., Mulder T.P.J., Knapen F.C.M., Wong W.Y., Peters W.H.M. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 79, 2003, lk 169-172.
53. Raps S.P., Lai J.C.K., Hertz L. Cooper A.J.L. *Brain Research*, 493, 1989, 398-401.
54. Saleh R.A., Agarwal A., Nada E.A., El-Tonsy M., Sharma R., Meyer A., Nelson D.R., Thomas A.J. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility*, vol 79, 2003, lk 1597-1605.
55. Saran M., Michel C., Bors W. *Free Radical Res Commun.* 10, 1989, 221-226.
56. Saran M., Michel C., Bors W. *Free Rad Res Commun.* 7, 1989, 213-220.
57. Scibona M., Meschini P., Capparelli S. et al. L-arginine and male infertility. *Mnerva Urol. Nefrol.* 46, 1994, 251-253.
58. Sharma R. K., Pasqualotto F.F., Nelson D.R., Thomas A.J. Jr., Agarwal A. The reactive oxygen species – total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Human Reproduction*, vol 14, 1999, lk 2801-2807.
59. Shils M.E., Olson A.J.; Shine M. *Modern nutrition in health and disease I*. Williams & Wilkins, USA, 1994.
60. Sikka S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*. 1996, no 8, lk 78-86.
61. Sikka S.C.; Rajasejaram M.; Hellstrom W.J.G. Role of Oxidative stress and Antioxidants in Male Infertility. *Journal of Andrology*. vol. 16, no 6, nov/det 1995, lk 464-468.
62. Sinclair S. *Male Infertility: Nutritional and Environmental Considerations*. *Alternative Medicine Review*. Vol 5, 2000, lk 28-38.

63. Storey B.T., Biochemistry of induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*. Vol 3, 1997.
64. Suleiman S.A.; Ali M.E.; Zaki Z.M.S.; El-Malik E.M.A.; Nasr M.A. Lipid Peroxidation and Human Sperm Motility: Protective Role of Vitamin E. *Journal of Andrology*. vol.17, no.5, 1996, lk 530-537.
65. Sun Y. *Free Radical in Biology and Medicine*, 8, 1990, 583-599.
66. Södergren E. *Lipid Peroxidation in vivo. Evaluation and Application of Methods for Measurement*. Uppsala, 2000.
67. Zalata A.A., Christophe A.B., Depuydt C.E., Schoonjans F., Comhaire F.H. White blood cell cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 21, 1998, lk 154-162.
68. Zilmer M., Karelson E., Vihalemm T. *Meditsiiniline biokeemia I. Biomolekulid: biokeemilised ja meditsiinilised aspektid*. Tartu Ülikool, 1996.
69. Zilmer M., Karelson E., Vihalemm T. *Meditsiiniline biokeemia II. Inimorganismi metabolism: biokeemilised ja meditsiinilised aspektid*. Tartu Ülikool, 1999.
70. Zilmer M., Zilmer K. *Oksüdatiivne stress ja antioksidantravi*. Tartu Ülikool, 1994.
71. Zilmer M., Vihalemm T., Kokassar U. *Toit - antioksidantsus, oksüdatiivne stress, ennetuslik tervisekaitse*. Tartu, 1995.
72. Tanner AR, Bantock I, Hinks L, Lloyd B, Turner NR, Wright R. Depressed selenium and vitamin E levels in an alcoholic population. Possible relationship to hepatic injury through increased lipid peroxidation. *Digestive Disease Science*. 31(12),1986, 1307-12.

73. Tarin J.J., Brines J, Cano A. Debate: Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction. Antioxidants may protect against infertility. *Human Reproduction*, vol 13, no 6, 1998, lk 1415-1416.
74. Taylor C.T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 10, 2001, lk. 189-198.
75. Urso M.L., Clarkson P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189, 2003, lk 41-54.
76. Wang X., Sharma R.K., Sikka S.C., Thomas A.J., Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertility and sterility* 2003, september, 531- 535
77. WHO - CINDI Dietary Guide, 2000 - <http://www.who.dk/Nutrition/pdf/CINDIdietaryguideENG.pdf>
78. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. World Health Organization, 1999.
79. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. World Health Organization, 2000.
80. Williams M.A., Wick A., Smith D.C. The influence of staining procedure on differential round cell analysis in stained smears of human semen. *Biotechnic and Histochemistry*, 71(3), 1996, 118-122.
81. Wong W.Y., Merkus H.M.W.M., Thomas C.M.G., Menkveld R., Zielhuis G.A., Steegers-Theunissen P.M. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility*, vol 77, no 3, 2003, lk 491-498.
82. Wong W.Y., Thomas C.M.G., Merkus J.M.W.M., Zielhuis G.A., Steegers-Theunissen P.M. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertility and Sterility*, vol 73, 2000, lk 435-442.



## VIII LISA