

165641

T. C.
Harran Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

İDYOPATİK İNFERTİL HASTALARDA
KAN VE SEMİNAL PLAZMA TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE
VE TOPLAM PEROKSİT DÜZEYLERİNİN
SPERM PARAMETRELERİYLE İLİŞKİSİ

Dr. Halil ÇİFTÇİ

Üroloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ercan YENİ

Şanlıurfa 2005

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında yardım ve desteklerini esirgemeyen, her satırında emeği olan çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ercan Yeni'ye; mesleki eğitimimde olduğu gibi tezimin hazırlanmasında da emeği geçen hocalarım Doç. Dr. Doğan Ünal, Doç. Dr. Ayhan Verit ve Uz. Dr. Murat Savaş'a; tüm ekibiyle birlikte bana destek olan, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özcan Erel'e; çalışmalarım süresince destek ve dostluklarını esirgemeyen Üroloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Mehmet Gülüm, Dr. Ömer Faruk Karataş, Dr. Sabri Keser, Dr. Erdal Aktan, Dr. Ufuk Topal ve bölüm sekreteri Mahmut Gazi Şaşmaz'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Üroloji eğitimim boyunca olduğu gibi, tez hazırlanması sürecinde de büyük bir özveri ve sabırla bana destek olan eşime ve oğluma sevgilerimle.

Dr. Halil Çiftçi

1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Erkek İnfertilitesi	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Etyoloji	3
2.1.2.1. Endokrin nedenler (pretestiküler nedenler)	3
2.1.2.2. Spermatogenez bozuklukları (testiküler nedenler)	4
2.1.2.3. Sperm iletim bozuklukları (posttestiküler nedenler)	4
2.1.2.4. Sperm fonksiyon bozuklukları	4
2.1.2.5. İdyopatik infertilite	5
2.1.3. Tanı	5
2.1.3.1. Anamnez	5
2.1.3.2. Fizik muayene	5
2.1.3.3. Laboratuvar	5
2.2. Radikal Kavramı Ve Oksijen Radikalleri	8
2.2.1. Oluşma reaksiyonları	10
2.2.2. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller	10
2.2.3. Serbest radikaller	11
2.2.3.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	11
2.2.3.2. Hidroksil radikaller (OH)	12
2.2.3.3. Süperoksit radikali (O ₂)	12
2.2.3.4. Peroksil radikali (ROO)	13
2.2.4. Serbest radikallerin biyolojik aktiviteleri ve hücre hasarı	13
2.2.5. Reaktif oksijen radikali, sperm fonksiyonu ve infertilite	16
2.2.6. Serbest radikallere karşı savunma mekanizması	18
2.2.6.1. Endojen savunma mekanizmaları	20
2.2.6.2. Eksojen savunma mekanizmaları	22
2.2.7. Serbest radikallerin faydaları	22
2.2.8. Serbest radikallerin tayin yöntemi	23
2.2.8.1. ESR (elektron spin rezonans spektroskopisi)	24
2.2.8.2. İndirek yöntemler	24
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Hasta seçimi	25
3.2. Örneklerin Toplanması Ve Analizi	25
3.2.1. Semen analizi	26
3.2.2. Venöz kan	26
3.2.3. Toplam antioksidan kapasite ölçümü	26
3.2.4. Toplam peroksit ölçümü	26
3.3. İstatistiksel Analiz	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇ	32
7. KAYNAKLAR	39

TABLÖLAR**SAYFA NO**

Tablo I	6
Tablo II	11
Tablo III	13
Tablo IV	17
Tablo V	27
Tablo VI	27
Tablo VII	28
Tablo VIII	28
Tablo IX	28
Tablo X	28



ŒEKİLLER

SAYFA NO

Œekil 1

9

Œekil 2

15

Œekil 3

16

Œekil 4

18



ÖZET

Biyolojik sistemlerde oksidatif denge bozulduğu zaman, yani serbest radikal oluşma hızı savunma mekanizmalarının gücünü aştığında oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. Lökospermi ve varikosel varlığında seminal plazmada oksidanların artışı, bu patolojilerin spermatozoalar üzerine olası zararlarını açıklamada kullanılan argümanlardan biridir. İnfertil olguların yaklaşık %25'ini oluşturan idyopatik infertilite'de ise spermiyogram parametrelerindeki bozulmaları açıklamaya yönelik araştırmalar sürmektedir. Bu çalışmada idyopatik infertil hastalarda kan ve semen plazmasında toplam antioksidan kapasite, toplam peroksit düzeyleri ve bu testlerin sperm parametreleri (sayı, hareket ve morfoloji) ile olan ilişkisini ve bu ilişki üzerinden idyopatik infertiliteyi açıklayabilecek bir mekanizmanın varlığını araştırdık.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nın Androloji ve İnfertilite Polikliniği'ne, infertilite nedeniyle baş vuran hastalar çalışmaya alındı. Varikosel, lökospermi, hormonal ve/veya obstrüktif patolojilerin varlığı gibi bilinen nedenlere bağlı infertilite olguları çalışmadan çıkarıldı. Toplam 135 hastadan idyopatik infertilite kriterlerine uygun 32'sinin sonuçları değerlendirildi. Son 1 yıl içinde çocuğu olan ve semen parametreleri WHO kriterlerine göre normal olan 30 kişi kontrol grubu olarak alındı. Hasta ve kontrollerde kan ve seminal plazma total antioksidan kapasite ve total peroksit düzeyleri ölçüldü ve sperm parametreleri incelendi. İstatistiksel analizlerde bağımlı örnekler için ve bağımsız örnekler için t-testleri kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı fark olarak kabul edildi.

Hasta grubunda sperm sayısı, hareket ve morfoloji ölçümleri kontrol grubundan anlamlı şekilde düşük bulundu. Hem semen hem de plazma oksidatif/antioksidatif parametreler açısından hasta ve kontroller arasında fark belirlenmedi.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, idyopatik infertil hasta grubunda, spermiyogram parametrelerindeki düşüklüğün oksidatif stres ile açıklanamayacağı ve başka faktörlerin olması gerektiği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: erkek infertilitesi, total antioksidan kapasite, total peroksit, sperm parametreleri

SUMMARY

In the biologic systems, when the balance of oxidation impaired that means the rate of the formation of free radicals exceeds the capacity of the defense mechanisms, oxidative stress occurs. The increase of oxidants in the seminal plasma in the presence of varicocele and leukospermia has been used as the one of the explanation modalities of the possible damage of these pathologies on the spermatazoas. On the other hand, the studies have been conducting out to explain the damage on sperm parameters in idiopathic infertility which forms the 25% of total infertile patients. Herein, we studied the total antioxidant capacity and total peroxide levels in the blood and seminal plasma of the idiopathic infertile patients, and the relation between these tests and the sperm parameters (density, motility and morphology) and in addition the presence of a possible mechanism that can explain the idiopathic infertility with this relation.

The infertile patients who were following at the andrology and infertility polyclinic of the department of Urology, Harran University Faculty of Medicine, included the study. Patients who had known causes of infertility such as varicocele, leukospermia, hormonal and/or obstructive pathologies were excluded. The results of 32 patients among 135 who meet the criteria of idiopathic infertility were evaluated. 30 subjects who had achieved a live birth in one year time and normal sperm parameters due to the WHO criteria had been arranged as the control group. The total antioxidant capacity and the total peroxide levels were measured in the blood and the seminal plasma, and the sperm parameters were studied in the patient and the control group. The paired t-test and the independent t-test were used in the statistical analyses. A P-value less than 0.05 was considered statistically significant.

In the study group, sperm parameters (density, motility and morphology) were significantly worse than the control. The total antioxidant capacity and the total peroxide levels of both the blood and the seminal plasma have showed insignificance between the patient and the control group.

Due to the results of this study, we concluded that some other factors should be present in the explanation of the low level of sperm parameters in patients with idiopathic infertility other than the oxidative stress.

Key Words: male infertility, total antioxidant capacity, total peroxide, sperm parameters

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin %15'i infertildir. İnfertilite nedeni olarak, tek başına erkek faktör varlığı %30, erkek ve kadın faktör birlikteliği ise %20 olguda saptanmıştır. Diğer bir ifadeyle erkek faktör, infertil olguların yaklaşık %50'sinden sorumlu tutulmaktadır (57). Erkek faktörün normal olduğunu söyleyebilmek için yeterli sayı, hareketlilik ve morfolojide spermilerin varlığı, spermilerin gerekli akrozom reaksiyonunu gerçekleştirip oositlerin zona pellusida tabakasına bağlanmaları ve zigotun fertilizasyonu gerekmektedir. Bu aşamalarda oluşabilecek herhangi bir bozukluk infertilite nedeni olabilecektir (44, 45). Varikozel, obstrüktif, hormonal ve immünolojik patolojiler gibi infertiliteye neden olabilecek bir çok durum tanımlanmakla beraber, olguların yaklaşık %25'i idyopatik olarak kabul edilmektedir (16, 86).

Sperm fizyolojisi ve gamet etkileşimini anlamaya yönelik önemli gelişmeler sağlanmasına, tedavide intrastoplazmik enjeksiyon (ICSI) gibi ileri yöntemlerin kullanılıyor olmasına rağmen, özellikle idyopatik infertil olgularda patofizyolojiyi ortaya koymak, tanısal ve klinik uygulamalarda sonuç alıcı, düşük maliyetli ve güvenilir modalitelere ulaşmak için hücresel ve moleküler düzeyde çalışmalar sürdürülmektedir (69).

Atom yada moleküllerin dış orbitallerindeki elektronlar genellikle çift oluşturacak şekilde bulunmakta ve kararlı bir yapı oluşturmaktadırlar. Bu kararlı yapı, atom ya da moleküllerin dışardan bir adet elektron alması, vermesi yada homolitik parçalanması ile bozulmaktadır. Dış orbitalindeki elektronların ortaklanmamış olduğu bu yapılara reaktif oksijen radikalleri (ROS) adı verilmiştir. ROS organizmada normal koşullarda üretilen, ama endojen ve eksojen antioksidan mekanizmalarla derhal ortadan kaldırılan, bazen de organizma için yararlı olaylarda görev alan yapılardır (42).

ROS, esas olarak mitokondri ve peroksizomlarda az miktarda da sitozolde olmak üzere spermatozoalar da dahil tüm hücre tiplerinde sentezlenmektedir. Normal fizyolojik süreçte sağlanması gereken sperm aktivasyonu, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonları için belli bir konsantrasyonda ROS'nin gerekli olduğu (44, 45), bununla birlikte, oksijen radikallerinin sperm hücreleri üzerine olumsuz etkilerinin de olabileceği bildirilmiştir (5).

Sperm membranı, fertilizasyon için gerekli füzyon olayları ve akrozom reaksiyonunda oldukça önemli rol oynamaktadır. Bu özellikten dolayı da klinikte sperm membran patolojileri ve infertilite arasında önemli bir korelasyon gözlenmektedir. İnsan sperm hücresi plazma membranında bol miktarda doymamış yağ asitlerinin varlığı ve

ROS'un bu yapılara karşı yüksek afinite göstermesi spermilerin normal fonksiyonlarını sürdürmesinde oksidan ve antioksidan dengeyi çok önemli bir hale getirmektedir (4). Bu dengenin oksidasyon lehine bozulması sperm hücresinde yapısal bozukluklara neden olacak, sperm oosit birleşme kapasitesinde azalma ve fertilizasyon oranında düşmeye yol açabilecektir (22, 47).

Lökospermi ve varikosel varlığında seminal plazmada oksidanların artışı, bu patolojilerin spermatozoalar üzerine olası zararlarını açıklamada kullanılan argümanlardan biridir. Bu çalışmada idyopatik infertil hastalarda kan ve semen plazmasında toplam antioksidan kapasite, toplam peroksit düzeyleri ve bu testlerin sperm parametreleri (sayı, motilite ve morfoloji) ile olan ilişkisini ve bu ilişki üzerinden idyopatik infertiliteyi açıklayabilecek bir mekanizmanın varlığını araştırdık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek İnfertilitesi

2.1.1. Epidemiyoloji

Bir erkeğin fertilité açısından normal bir kadınla evli olduğu halde, 1 yıl sonunda konsepsiyon meydana gelmemesi veya çocuk sahibi olamaması durumunda erkek faktör infertiliteden bahsedilir. Normal bir çiftin gebe kalma şansı 1. ayda %20-25 ve 6. ayda %75 olmak üzere 1 yılda yaklaşık %90'dır. Toplumda infertilite oranı yaklaşık %15 olarak bildirilmiştir. İnfertil çiftlerde tedavisiz izlemde saptanan gebelik oranı ay başına %1-3 olmak üzere yıllık yaklaşık %25-35 düzeyinde bulunmaktadır. Genel olarak infertilitede erkek faktörün payı, tek başına %30, kadın faktörle birlikte düşünüldüğünde %20 olmak üzere toplamda %50 olarak hesaplanmaktadır (57). Fertilité şansı, erkek ve kadında, 24 yaşta en yüksek seviyesine çıkmaktadır. Azoospermik olgular hariç diğer hastalar steril değil subfertil olarak kabul edilmelidir.

2.1.2. Etyoloji

2.1.2.1. Endokrin nedenler (pretestiküler nedenler)

Hipofiz patolojileri; cerrahi, tümör, RT, enfeksiyon ve infarkt gibi nedenler.

İzole hipogonadotropik hipogonadizm; konjenital (Kallmann send) veya idyopatik.

Fertil önük send; izole LH eksikliği

İzole FSH eksikliği; tek sorun oligo – azoospermidir.

Prader-Willi Send; kısa, şişman, hipotonik, mental retarde, el ve ayakları küçük hasta.

Laurence-Moon-Bardet-Biedl Send; Hipo-hipo, Retinitis pigmentosa, polidaktili ve hipomnezi bulunur.

Androjen aşırılığı; intratestiküler testosteronu ve negatif feedback ile FSH'ı düşürür.

Östrojen aşırılığı; ED, testis atrofisi ve jinekomasti yapabilir.

Prolaktin aşırılığı; negatif feedback ile LH ve testosteron düşebilir.

Tiroid anomalileri; hipertiroidide östrojen artmış olabilir.

Glukokortikoid aşırılığı; LH süpresyonu yapabilir.

Androjen aksiyon anomalileri; 5-alfa redüktaz sentezi ve reseptör anomalileri.

2.1.2.2. Spermatogenez bozuklukları (testiküler nedenler)

Kromozom anomalileri; Klinefelter Sendromu (47, XXY), XX Male, XYY Sendromu, Noonan Sendromu, Y kromozom mikrolezyonları, ve diğer kromozomal anomaliler.

Bilateral anorşi, kriptorşidizm,

Torsiyon; bilateral olması definitif testis yetmezliği nedeni iken unilateral olması tartışmalıdır.

Varikozel; Prevelansı normal erkeklerde %15 iken infertillerde %30'dur. %90 solda, %10 bilateraldir. Nedenlerinden bazıları sol gonadal venin doğrudan renal vene açılması, solda valvlerin daha sıklıkla olmaması ve nutcracker fenomeni (renal venin a. mezenterika superior ile aorta arasında sıkışması)'dır. Isı, metabolit reflüksü, hipoksi, apoptozis ve hormonal nedenlerle sperm üretimine zarar veriyor olabilir. Klinikte testis atrofisi (adolesanda daha belirgin), düşük motilite (olguların %90'ında), düşük dansite (olguların %65'inde) ve stres paterni (morfolojide amorf, immatür ve tapered hücre artışı) saptanabilir.

Sertoli Cell Only Sendromu (Del Castillo Sendromu); Y delesyonu ve benzerleri gibi bir çok nedenle oluşmuş olabilir. FSH sıklıkla yüksek, LH ve testosteron normal bulunur. Azoospermiktirler. Ancak TESE'de %50'ye kadar sperm bulunabilmektedir.

Orşit; Puberte sonrası orşitte testiküler atrofi gelişebilir, bilateral olursa %50 infertilite riski.

Myotonik distrofi; Testis atrofisi gelişebilir, kapasitasyon ve akrozom reaksiyon bozukluğu olabilir.

Gonadotoksinler; KT, RT, ısı, çevresel toksinler, ilaçlar ve zararlı alışkanlıklardır

2.1.2.3. Sperm iletim bozuklukları (posttestiküler nedenler)

Duktal obstrüksiyon; obstrüktif azoosperminin (vazektomi dışında) en sık nedenleri vaz agenezisi ve epididimal (%20-30) obstrüksiyondur.

Ejakülasyon problemleri; anejekülasyon ve retrograd ejakülasyon.

Seksüel bozukluklar; erektil disfonksiyon, aşırı cinsel ilişki ve prematür ejakülasyon.

Penis anomalileri; hipospadiyas, epispadiyas ve ciddi kurvatur anomalileri (86).

2.1.2.4. Sperm fonksiyon bozuklukları

İmmünolojik infertilite.

Ultrastrüktürel anomaliler; Defektler dış dens fiberlerde, mikrotubüllerde, mitokondri ve başta olabilir.

2.1.2.5. İdyopatik infertilite

Olguların %25'inde anormal semenle birlikte etyoloji belli değildir. Birden fazla neden ile birlikte olabileceği beklenir. Böyle hastaların semen parametreleri geniş bir aralık içerisinde değişen bozulmalar gösterir. Her ne kadar sıklıkla idyopatik oligospermi olarak söz edilirse de, böyle hastaların büyük kısmında semen parametrelerinin hepsinde de bozulma vardır. İzole bozukluklar çok daha az sıklıkta görülür. Hikaye ve fizik muayene genellikle belirleyici değildir. Hormonal sonuçlar tipik olarak normal bulunur (86).

2.1.3. Tanı

Hasta değerlendirilmesinde altta yatan faktörlerin ortaya çıkarılması hedeflenmektedir. İnfertil erkeğin değerlendirilmesi aşağıdaki başlıklar ile özetlenebilir (86).

2.1.3.1. Anamnez

Koit zamanlaması ve alışkanlıkları, geçirilmiş hastalıklar (kabakulak orşiti, febril hastalıklar, testis kanseri ve lenfoma, vs.), radyo/kemoterapi uygulamaları (sperm üretiminin geri dönmesi 4-5 yıl alabilmekte ve eğer stem cell hasarlanmışsa kalıcı azospermi oluşabilmektedir), alışkanlıklar ve soy geçmiş değerlendirilir.

2.1.3.2. Fizik muayene

Sekonder seks karakterleri, jinekomasti (androjen / östrojen imbalansı veya prolaktin yüksekliğini gösterebilir), varikosel (ancak valsalva ile palpe ediliyorsa grade I, spontane palpe ediliyorsa grade II, gözle görülebiliyorsa grade III), skrotum, testis ve ekleri (atrofi, kriptorşidizm ve kronik epididimal endurasyonlar), penis muayenesi (hipospadiyas, epispadiyas, peyroni, tümöral oluşumlar ve mikropenis gibi anomaliler bulunabilmektedir), parmakla rektal muayene ve görme alanı muayenesi (hipofiz patolojileri yönünden önemli olabilir) yapılır.

2.1.3.3. Laboratuvar

A) Başlangıç değerlendirmeleri

Bu kapsamda semen analizi ve hormonal testler yer alır.

a) semen analizi;

Ejekülasyon sırasında semen, sırasıyla littre, cowper, prostat ve vezikula seminalis (SV) bezlerinden gelen sıvılarla oluşmaktadır. Spermilerin çoğu distal epididimden, geri kalanı ise ampulladan gelmektedir. SV normalde bir sperm rezervuarı değildir. SV yok veya kanalı obstrükte ise semen volümü düşük, asidik ve unkoaguledir. Semen likefaksiyonundan prostat orjinli proteazlar (PSA ve plazminojen aktivatör) sorumludur. Sayı seminal plazmadaki sperm konsantrasyonunu gösterir. Likefiye olmuş semende, Makler kamera gibi özel sayma kameraları ile değerlendirilir. 20 milyon/ml'nin üstü normal kabul edilir.

Motilite ölçümü yapmak için WHO 1999 kriterleri kullanılmaktadır. A – hızlı ve ilerleyici hareket, B – ilerleyici ama uyşuk ve yavaş, C - ilerleyici olmayan (yerinde) hareket, D – hareket yok. Normalde $A \geq \%25$ veya $A+B \geq \%50$ olmalıdır.

Morfoloji en iyi boyalı örnekte incelenmekte ve değerlendirilmesi için üzerinde konsensus sağlanmış bir sistematik bulunmasa da en yaygın olarak Kruger strict kriterleri kullanılmaktadır. Buna göre $>\%14$ normal morfolojili sperm saptanması durumunda daha yüksek fertilizasyon elde edildiği ileri sürülmektedir.

Normal spermiyogram değerleri Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I. Normal spermiyogram değerleri (WHO'99)

Parametre	Normal Değer
Hacim	≥ 2 ml.
Ph	≥ 7.2
Yoğunluk	≥ 20 milyon sperm/ml
Total sayı	≥ 40 milyon sperm
Hareket	$\geq 50\%$ (A+B) veya $\geq 25\%$ (A)
Morfoloji	$\geq 15\%$ (Kruger)
Canlılık	$\geq 75\%$
Beyaz küre	< 1 mil/ml

b) hormonal değerlendirme

Olguların $\%3$ 'ünde primer endokrin bir neden bulunmaktadır. Sperm sayısı <10 mil/ml olduğunda FSH, LH, testosteron ve prolaktin başta olmak üzere hormon profilinin değerlendirilmesi önerilmektedir.

Başlangıç değerlendirmelerinden sonra ortaya çıkacak olası durumlar şunlardır (86):

Ejekülat azlığı veya yokluğu; retrograd ejakülasyon, emisyon yetmezliği, hipogonadizm, duktal obstrüksiyonu, vaz ve SV yokluğu veya hipoplazisi, inkomplet kolleksiyon ve düşük abstinens periyodu v.b. patolojiler neden olabilir.

Azoospermi; semen içinde sperm olmaması, tüm erkeklerin %1'inde, infertillerin ise %15'inde görülmekte olup temel olarak hormonal nedenler ve duktal obstrüksiyonlara bağlı olarak gelişmektedir.

Oligospermi; sperm sayısının normalin altında olması, izole oligospermide varikozel, androjen eksikliği ve idyopatik nedenler düşünülür.

Astenospermi; motilitenin normalin altında olması. Başlıca nedenleri; nekrospermi, ASA, toplama kabında toksik madde, ejakulatin sıcak ve/veya soğuğa maruziyeti, parsiyel duktal obstrüksiyonlar, enfeksiyon, varikozel, aşırı uzun abstinens, ultrastrüktürel defektler (aksonemal patolojiler) ve idyopatik faktörlerdir.

Teratospermi; normal morfolojiye sahip sperm oranının normalin altında olması, spermatogenez üzerinde geçici hasarlar, varikozel ve akrozom yokluğu önemli nedenleri oluşturur.

Oligoastenoteratospermi; başlıca nedenleri, varikozel, dış ısı, iç ısı (ateş gibi), ilaçlar, toksinler, kriptorşidizm, idyopatik ve parsiyel duktal obstrüksiyonlardır.

Aglutinasyon; antisperm antikor göstergesi olabilir.

Fruktoz düşüklüğü veya yokluğu; androjen eksikliği, duktal obstrüksiyonlar, SV yokluğu (bu durumda fruktoz saptanmayacaktır) ve retrograd ejakülasyon düşünülmesi.

B) İleri değerlendirmeler

Antisperm antikor (ASA); Direk olarak immunobead ve MAR, indirek olarak ise serumda ölçülebilir. >%20-50 bağlanma pozitif kabul edilmektedir. Fertillerde %2, infertillerde %10 oranında saptanabilmektedir. Motilite bozukluğu, aglutinasyon, açıklanamayan infertilite ve patolojik PCT varlığında ASA istem endikasyonu vardır.

Lökosit boyama; Görüldüğü düşünülen lökositler 1/3 hastada gerçek pyospermi, geri kalanlarda aslında immatür spermlerdir. Boyama monoklonal Ab ve immunhistokimya kombinasyonu ile yapılabilmektedir. >10-15 round cell / hpf veya >1 milyon / ml ise boyama yapılmalıdır (86).

Ultrastrüktürel inceleme; düşük motilite, yüksek viabilite varsa yapılmalıdır.

Vazografi; temel amaç azospermi ve normal testiküler biyopsi varlığında olası obstrüksiyonu ortaya çıkarmaktır, rekonstrüktif cerrahi ile eşzamanlı yapılmalıdır.

Ultrasonografi (skrotal, transrektal, abdominal): Konjenital veya edinsel yapısal anomaliler ve volüm ölçümlerinde önemli.

Venografi: Tanı ve potansiyel olarak tedavi amaçlı olarak yapılır.

Sperm Fonksiyon Testleri:

Postkoital test (PCT), Sperm-servikal mukus interaksiyonu.

Akrozom reaksiyonu: Akrozom reaksiyon testleri, kapasitasyon sonrasında spontan akrozom reaksiyonuna giden sperm yüzdesi (normali <%5) ve inducing agent sonrası akrozom reaksiyonuna giden sperm yüzdesi (normali %15-40) bakılarak saptanır.

Sperm penetration assay (SPA): Zonası çıkarılmış hamster yumurtasına sperm penetrasyonunu ölçer. Bu yüzden sperm-zona etkileşimi bozukluğunu ölçemez. Sonuçları koit sonrası gebeliklerle iyi koreledir.

Hemizona assay: Herhangi bir zona ikiye ayrılır ve bir parçasına hasta, diğerine fertil donör sperminin bağlanmasına bakılır.

Sperm viability assays: Nonmotil spermilerin canlı-ölü ayırımını yapar. Canlı sperm Eosin Y ve trypan blue boyalarını tutmaz.

ROS analizleri: Süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi ROS'ları ölçer. ROS hem sperm, hem de daha fazla olmak üzere lökosit kaynaklı olabilir. ROS'lar bir yandan yararlı (kapasitasyon / hiperaktivasyon) iken diğer yandan zararlı fonksiyonlara sahiptirler. ROS lipid membranlarda peroksidatif hasarı indükler, ayrıca metabolizma, morfoloji, motilite, fertilizasyon kapasitesine etkir. Çalışılma endikasyonları açık değildir. Ayrıca bunlar infertiliteye yol açabileceği gibi infertilite sonucu da gelişebilir.

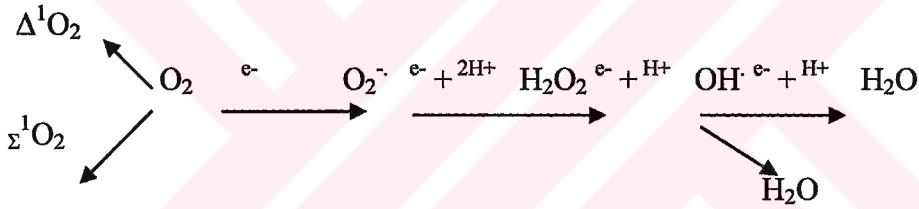
Genetik testler: karyotipik anomaliler, Y mikrodelesyonları ve otozomal mutasyonlar araştırılır.

Testis biyopsisi: tanısal biyopsi testis volümü ve FSH düzeyi normal, vazı olan azospermik olgularda yapılır (86).

2.2. Radikal Kavramı ve Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron taşıyan kimyasal yapılar olarak tanımlanabilir. Bilindiği gibi atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidir. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi yada çıkması ile bozulursa, momentli dengelenmemiş bu tek elektron, atoma (ya da moleküle) büyük bir aktiflik kazandırır. En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan

molekül ya da molekül gruplarına radikal adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgi ile gösterilir (R.,R[•]). Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında olduğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşabilmektedir. Çok kısa yaşam süreli, ancak yapılarındaki dengesizlik nedeniyle oldukça reaktif yapılı olan serbest radikaller, ortaklanmamış elektronu çiftleyebilmek için tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme özelliği göstermektedir (49, 87). Aerob metabolizması olan memelilerde serbest radikaller, başlıca oksijenden türemektedirler. Canlıların yaşaması için mutlak gerekli olan oksijen hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan geçerek su haline dönüşmektedir. Bu sırada hücre kendisi için gerekli olan enerjiyi sağlamaktadır. Fakat bu süreçte oksijenin % 1-3'ü tam olarak suya dönüşmez, süperoksit anyonu ve hidroksil radikali oluşur (şekil 1). Oksijen radikalleri, oksijen molekülüne tek sayıda elektron aktarılan basamaklarla seyreden indirgeme reaksiyonlarında fazla miktarda açığa çıkabilirler. Ayrıca organizmada oksijen türevi dışında karbon ve kükürt merkezli radikaller de oluşmaktadır.



Şekil 1. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu

Tüm dış etkiler yanında organizmanın oksido-redüksiyon olayları sırasında da önemli ölçüde ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, dihidro orotik dehidrogenaz, flavin dehidrogenaz ve peroksidaz katalizli reaksiyonlar gibi serbest radikaller açığa çıkar. Enzimsel olmayan elektron transfer reaksiyonlarında (hidrokinon + O₂ Semikinon + O₂^{•-} + H⁺) ve otooksidasyon reaksiyonlarında da (katekolamin ve flavin oksidasyonu) serbest radikaller oluşabilmektedir. Mikroorganizmalara karşı aktiflenmiş polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar 'respiratuvar burst' olarak bilinen reaksiyonlarında süperoksit anyon (O₂^{•-}) radikali oluştururlar. Mitokondrial elektron transport zincirinden yan ürün olarak açığa çıkmaları da önemli bir kaynaktır (87).

Organizmada, serbest radikallerin oluşumundan hemen sonra etkisizleştirilmelerini sağlayan güçlü savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece, organizma bu bileşiklerden etkilenmemektedir. Buna karşılık savunma azalır veya bu zararlı

bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa bu denge bozulmakta ve serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmaktadır. Aerob organizmalar biyolojik yapıları nedeniyle serbest radikal oluşumuna ve bu bileşiklerin zararlı etkilerine açıktırlar (38, 64).

Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller, süper oksit radikali (O_2), hidroksil (OH) ve hidroperoksil (HO_2) radikalleridir. Reaktif oksijen türevleri (süperoksit, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit) sadece serbest oksijen radikallerini değil, hidrojen peroksit gibi onların üretiminde rol oynayan diğer radikal olmayan türevlerini de içerir.

2.2.1. Serbest radikal oluşma reaksiyonları

Kararlı bir molekül üç yolla serbest radikal halini alabilmektedir.

1. Kovalent bağın, bileşenlerinin her birinde ortaklanmamış elektron kalacak şekilde homolitik parçalanması ($X:Y \rightarrow X\cdot + Y\cdot$)
2. Tek bir elektron kaybetmesi ($A: \rightarrow A\cdot + e$)
3. Tek bir elektron alması ($A + e \rightarrow A\cdot$)

Biyolojik sistemlerde radikal üretimi daha çok elektron transferi ile olmaktadır. Çünkü homolitik füzyon ancak yüksek ısı, ultraviyole ışını veya iyonize radyasyondan sağlanabilecek yüksek enerji gerektirmektedir (18). Bir serbest radikal, radikal olmayan bir yapıyla reaksiyona girerse, başka bir serbest radikal oluşmaktadır. Yani radikaller radikalleri doğurmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle serbest radikaller zincir reaksiyonu gösterebilmektedir. Ancak iki serbest radikal, reaksiyona girerlerse radikal özelliklerini kaybederler (84). Heterolitik füzyonda ise kovalent bağın elektronları, fragmanlardan sadece birinde kalmaktadır. Böylece her iki bileşen de serbest radikal değil, yüklü iyonlar halini almaktadır.

2.2.2. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller

Oksijen sekiz atom numaralı, doğada dioksijen (O_2) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısı ile ilişkilidir. Oksijen aerobik hücrelerde oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretiminde kullanılan zorunlu bir maddedir (35, 51). Ancak normal oranın (%21) üzerindeki bir oksijen konsantrasyonu ile karşılaşmanın toksik etkiler oluşturduğu uzun süredir bilinmektedir. Vücuda giren oksijenin büyük bir kısmı CO_2 olarak uzaklaştırılmaktadır. Sekiz elektronlu olan oksijenin elektronları 1. yörüngede 2 adet, 2. yörüngenin S alt

enerji seviyesinde 2 ve P alt seviyesinde ise 4 adet olmak üzere düzenlenmişlerdir. Normal olarak P orbitalinde 6, d orbitalinde ise 10 elektron bulunmaktadır. Yani oksijenin dış yörüngesini oluşturan p orbitalinde 2 elektron eksik olduğundan 'diradikal' olarak kabul edilmektedir (18, 78). Bu kararsız yapı oksijen atomun diğer bir oksijen atomuyla dış yörüngelerindeki 2 elektronu ortaklaşa kullanmasıyla giderilmekte ve oksijen molekülü oluşmaktadır. Oksijen diradikal durumunda iken radikal olmayan yapılarla yavaş, serbest radikallerle ise kolayca reaksiyona girebilmektedir (18).

Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı orbitalerde farklı yönde döndüğünde singlet oksijen oluşur. Orbitalden birine ters dönüşlü bir elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse oksijen radikali elde edilir. Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdan kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) yada bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Sonuçta nonradikal yapıya dönüşebilirler. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri iki ana başlık altında incelenmektedir, radikaller ve nonradikaller (Tablo II) (35, 51).

Tablo II. Radikaller ve nonradikaller

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksit radikal	(O ₂)	Hidrojen peroksit	(H ₂ O ₂)
Hidroksil radikal	(OH)	Lipit hidroksi peroksit	(LOOH)
Peroksil radikal	(ROO)	Hipohaloz asit	(HOX)
Alkoksil radikal	(RO)	N-Halojenil Aminler	(R-NH-X)
Semikinon radikal	(HQ)	Singlet oksijen	(O ₂)
		Azot Dioksit	(NO ₂)

2.2.3. Serbest radikaller

2.2.3.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Daha çok biyolojik sistemlerde süperoksit radikallerinden oluşmakta ve reaksiyonlarda hem oksidan hem de redüktan olarak etki gösterebilmektedir. Bu reaksiyonun enzimi süperoksit dismutazdır. Dismutasyon asidik PH değerlerinde hızlanır. Hidrojen peroksit

güçlü bir oksidan ajandır ve süperoksit veya demirle reaksiyona girerek hidroksil radikallerin oluşmasına neden olmaktadır (2). Süperoksit ve hidrojen peroksit gerçekten zararsızdırlar ve katalizör metallerin yokluğunda ortamdan derhal uzaklaştırılmaktadır. Hidrojen peroksit normalde glutatyon peroksidaz veya katalaz enzimiyle su ve oksijene dönüşmektedir (21, 90).

2.2.3.2. Hidroksil radikaller (OH)

Canlı organizmada oluşan en reaktif radikal türüdür. Dokular radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorbe edilir ve radyasyon, oksijen - hidrojen arasında kovalent bağa neden olup iki radikal meydana gelir. Radikalden biri hidrojen diğeri ise hidroksil radikaldir. Hidroksil radikal'in difüzyonu kısıtlı, yarı ömrü kısadır. Ancak hücreye çok büyük hasar verebilmektedir. Örneğin membran lipidlerine etki ile membranı ciddi şekilde hasara uğratabilmekte ve DNA'da da hasar yaparak ciddi mutajenik ve onkojenik etki gösterebilmektedir (36).

Hidroksi radikalleri, hidrojen peroksitten demir veya bakır yardımıyla oluşabilir. Hidrojen peroksit'in en iyi bilinen hasarı lipid peroksidasyon olayıdır. Membran fosfolipidlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine saldırırlar. Bu özellikle araşidonik asitler gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinin -C- atomunun birinden H atomu çıkartır ve sonuçta su oluşumuna neden olur. Bu reaksiyon sonunda membranda -C- radikali kalır, bu -C- radikali oksijen ile birlikte peroksil radikali oluşturur. Peroksil radikaller ve sitotoksik aldehitler membran proteinlerinde ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağlı enzimleri ve reseptörleri inaktive edebilirler (21, 51)

2.2.3.3. Süperoksit radikali (O₂)

Radikal olmasına rağmen hasar yapıcı etkisi çok belirgin değildir. Redükten ve orta derecede etkili bir ajandır. Esas önemi hidrojen peroksite kaynaklık etmesi ve geçiş metal iyonlarının redükteni olmasıdır. Uzun bir yarı ömrü vardır ve lipofiliktir. Bu nedenle oluştuğu yerden uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir (3). Süperoksit radikali hidrojen peroksitin su ve oksijene yıkılmasında görevli glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimlerini değişik derecelerde inhibe edebilmektedir. Bu radikal aynı zamanda fagositoz, endotelde NO radikalinin ortadan kaldırılması ve fertilizasyonda da görev almaktadır (36, 63).

2.2.3.4. Peroksil radikali (ROO)

Oksijen radikallerin diğ er atom ve daha büyük moleküllerle kombinasyonunda peroksil radikali oluşabilmektedir. Yarı ömrü çok kısa olup röl atif olarak stabildir. Difüzyon yoluyla uzak bölgelerde radikal fonksiyonunu gösterebilmektedir (23, 84). Membran lipidlerinin organik peroksil radikallerine peroksidasyonu, aktif oksijen türlerinin membran aracılığıyla meydana gelen bir çok etkisini açıklayan zincir reaksiyonlarını başlatmaktadır (24). Organizmadaki temel serbest radikal reaksiyonları Tablo III'de özetlenmiştir.

Tablo III. Organizmadaki temel serbest radikal reaksiyonları

I	$O_2 + e \rightarrow O_2^*$	Süperoksit radikali
II	$2O_2+H_2 \rightarrow 2HO_2$	Perhidroksil radikali
III.	$O_2+2e+2H \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
IV	$O_2^*+1e+2H \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit
V	$O_2^*+2H \rightarrow H_2O_2+O_2$	Hidrojen peroksit
VI	$2H_2O_2+1e+H \rightarrow 2OH+OH+H_2O$	Hidroksil radikali
VII	$H_2O_2+Fe^2 \rightarrow OH+OH+Fe^3$	Hidroksil radikali (Fenton reaksiyonu)
VIII	$H_2O_2+O_2^* \rightarrow ^*OH+OH+O_2$	Hidroksil radikali (Haberweiss reaksiyonu)
IX	$O_2^*+Fe^3 \rightarrow O_2+Fe^2$	
X	$RH+^*OH \rightarrow R^*+H_2O$	Alkil radikali
XI	$R^*+O_2 \rightarrow ROO^*$	Peroksil radikali

2.2.4. Serbest radikallerin biyolojik aktiviteleri ve hücre hasarı

Çeşitli kimyasal maddeler, iskemik dokuların reoksijenasyonu yada akut veya kronik enflamasyonlar ile oluşturulan oksidatif hücre hasarı, hücrese l seviyedeki bazı yapı ve fonksiyon de ğ iş iklikleriyle kendini göstermektedir. Bu de ğ iş iklikler:

- Hücre iç i tioller ve piridin nükleotitlerinin oksidasyonu.
- Sinyal iletimi ve iyon homeostazisinin bozulması.
- Hücre iskelet organizasyonun modifikasyonu.
- Glikolizin inhibüsyonu.
- DNA hasarı ve poli (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonu.
- NAD tükenmesi.
- ATP tükenmesi.

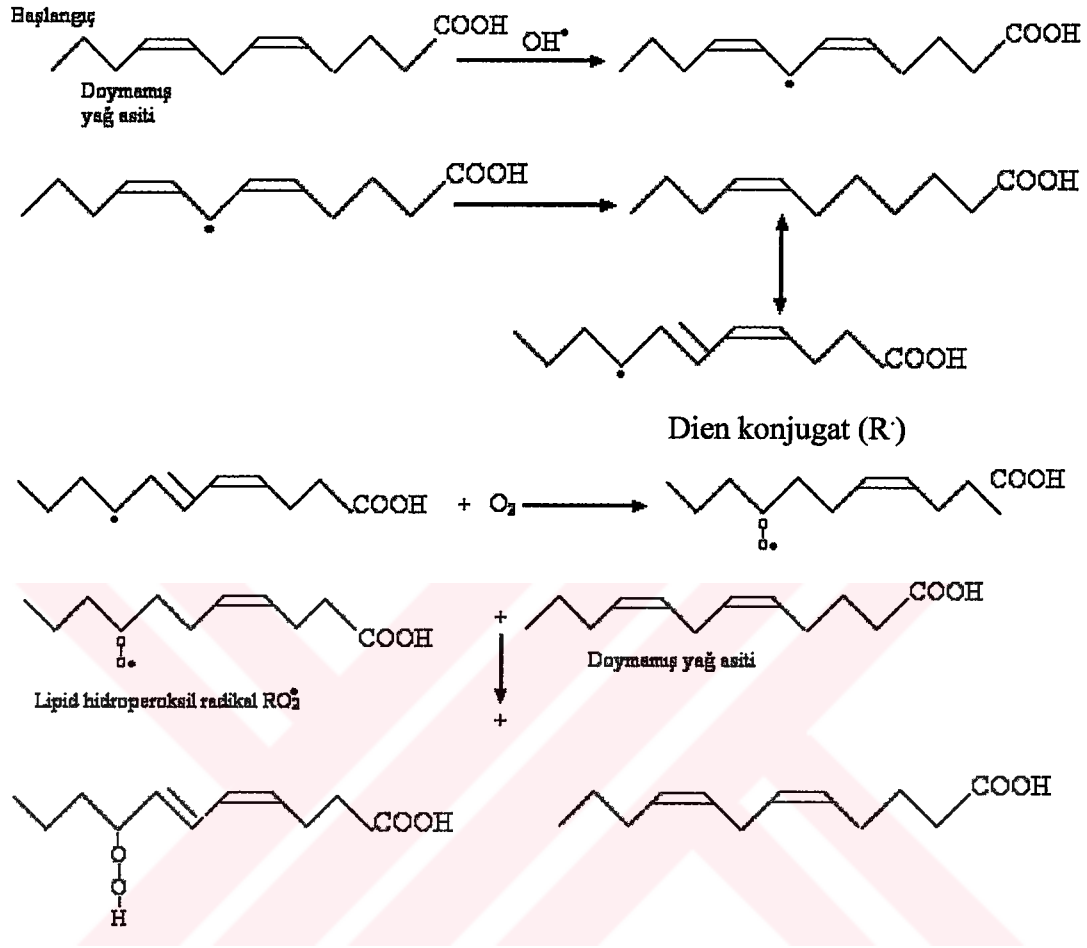
Fizyolojik ve patolojik durumlarda organizma yüksek oranda oksidanlarla ve serbest radikallerle karşılaşabilir. Metabolik hızın ve oksijen basıncının artması ile redoks etkinliği ksenobiyotiklerin alınması ve hücrel antioksidan yetersizliğinin sonucu olarak oksidan baskının artabileceği gösterilmiştir. Bu radikallerin önemli bir kısmı antioksidanlar ve bazı enzimatik savunma sistemi tarafından etkisizleştirilir. Oksidan maddelerin oluşumu ile savunma mekanizmalarının işleyişi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin oksidan baskının artması yönünde bozulması hücrelerin veya organizmanın hasarı ile sonuçlanabilir. Oksidan etki sonucu oluşan hasarın büyüklüğü hasar üretim hızıyla oksidatif harabiyeti önleyen, sınırlayan yada kısmen tamir eden koruyucu mekanizmalar arasındaki dengeye bağlıdır (28, 34, 40, 41).

Tüm biyomoleküller serbest radikallerden etkilenebilmektedir. Bu etkilere en fazla lipidlerin hassas olduğu bilinmektedir. Hücre membranları lipid yönünden zengin oldukları için lipid peroksidasyonu denilen bir reaksiyon zinciriyle radikal saldırısından zarar görmektedir. Lipid proksidasyonu membran yapılarına direkt, diğer hücre yapılarına ise reaktif aldehytlerin üretimi yoluyla indirekt olarak zarar verebilmektedir (38).

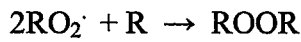
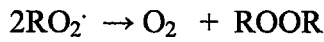
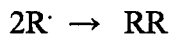
Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılan ve membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal olaylar zinciridir (37, 64). Bu kimyasal olay, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki α - metilen gruplarından hidrojen atomunu uzaklaştırması ile başlamaktadır. Böylece oluşan lipid radikali (L) dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle, molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra lipid peroksit radikali (LOO \cdot) meydana gelmektedir (10, 32). Bu lipid peroksit radikalleri de diğer bir peroksit radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleriyle etkileşebilir. Fakat en önemlisi, peroksit radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonlarını yaymalarıdır. Böylece, lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni bir peroksit (LOO \cdot) radikali oluşmaktadır. Peroksidasyon bir defa başladıktan sonra yüzlerce yağ asidi zincirleri lipid hidroperoksitlerine dönüştürülmektedir (15, 20, 64).

Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleriyle oluşturduğu basit şelatları (Fe⁺²-ADP) hem, hemoglobin ve myoglobini de içeren bazı demir proteinleri, lipid hidroperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadırlar. Bu kompleks

bozulma ürünleri de etan, pentan, aldehit ve diğer karbonil bileşikleridir. Şekil 2’de lipid peroksidasyonunun aşamaları gösterilmiştir.



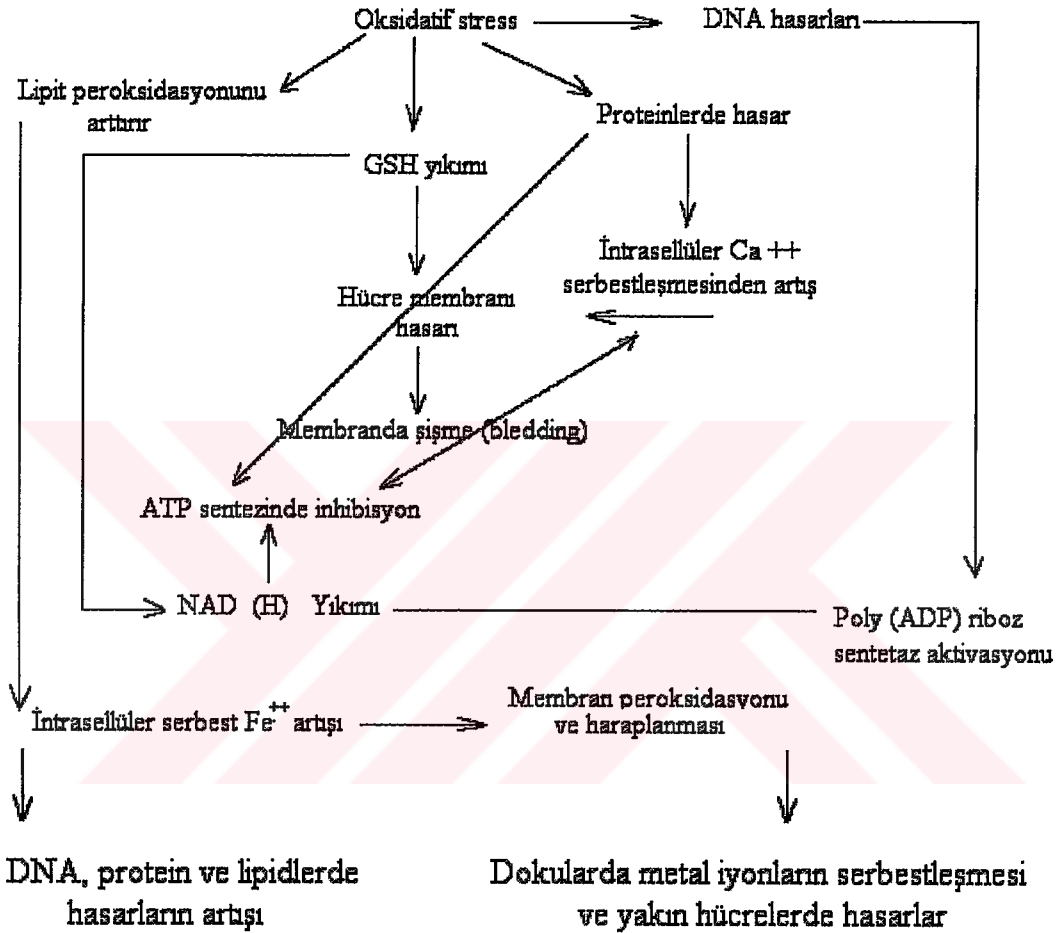
lipid hidroperoksit sonlanma



Şekil 2. Lipid peroksidasyonu aşamaları

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden biri malondialdehit (MDA) dır. MDA miktarının tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile tayin edilmesi lipid peroksid düzeylerinin ölçülmesinde kullanılan yöntemlerden biridir (60, 66, 76). Lipid peroksidlerinin parçalanması ile oluşan etan, bütan ve pentan gibi gazların tayini de son yıllarda lipid peroksidasyon göstergesi olarak kullanılmaktadır (8, 60). Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve

mikroviskozitesini önemli ölçüde etkilemektedirler. Membranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (58). Oksidatif baskı sonucu oluşan doku hasarı şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. Oksidatif baskı sonucu oluşan doku hasarı

Serbest radikallerin biyolojik etkileri genel olarak, DNA hasarı, protein hasarı ve enzim aktivitelerinde değişiklikler, membran lipidleri ve organellerin hasarı, lipofussin pigmentlerinin hasarı ve apoptozisi uyarması olarak özetlenebilir (Tablo IV).

2.2.5. Reaktif oksijen radikali, sperm fonksiyonu ve infertilite

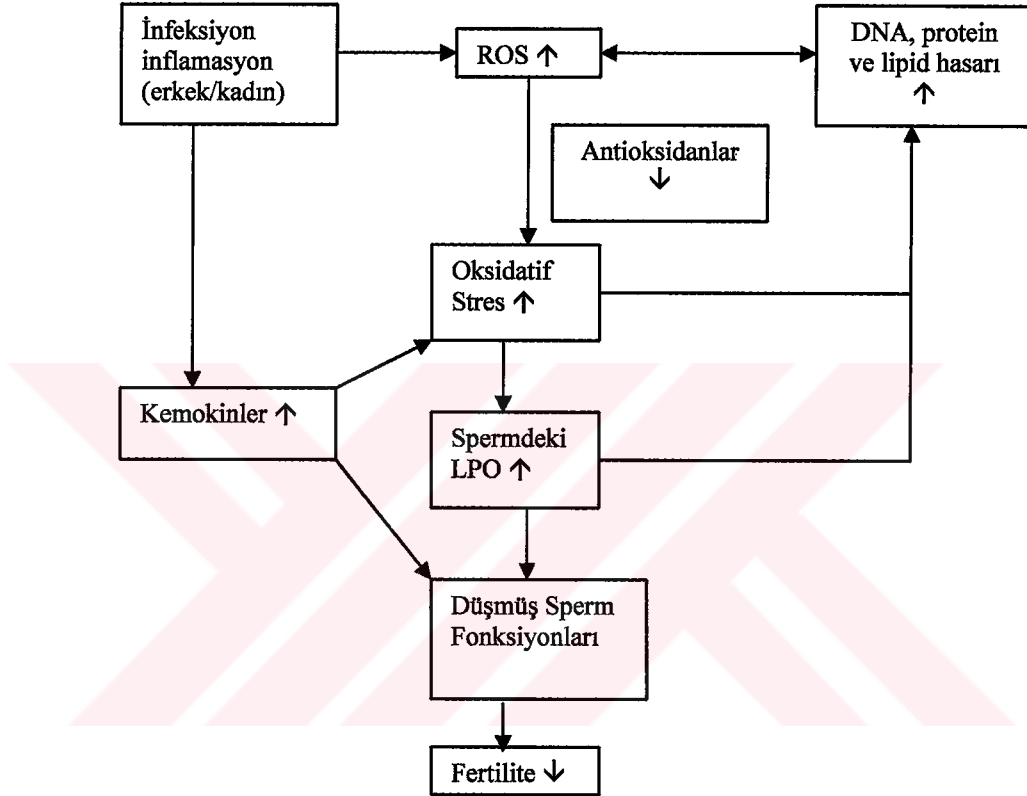
Normal fizyolojik süreçte sağlanması gereken sperm aktivasyonu, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonları için belli bir konsantrasyonda ROS'nin gerekli olduğu kabul edilmektedir (45). Sperm hücrelerin normal fonksiyonlarını sürdürmesinde oksidan ve

Tablo IV. Serbest radikallerin hücresel hedefleri

ROS hedefi	Sonuçları
Doymamış yağ asitleri ve tiol içeren aminoasitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağların oluşumu, enzim inhibisyonu / membran geçirgenliğinde değişiklik
Nükleik asit bazları	Hücre döngüsünde mutasyon
Karbonhidratlar	Hücre membran reseptör duyarlılığında değişiklik
Kofaktörler	Nikotinamid ve filavin içeren kofaktörlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Nörotransmitterler	serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerin miktarında ve aktivitesinde azalma
Antioksidanlar	E vit ve B karoten ile katalaz ve SOD enzimlerin inhibisyon GSH Px aktivitesinde değişiklik
Proteinler	Peptit zincirinde kopmalar, denatürasyon
DNA	Zincir kopması , baz değişikliği
Hyaluronik asid	Sinovial sıvı vizkozitesinde değişiklik

antioksidan denge çok önemlidir. Bu dengenin ROS lehine bozulması sperm hücresinde yapısal bozukluklara neden olacak, sperm oosit birleşme kapasitesinde azalma ve fertilizasyon oranında düşmeye yol açacaktır (şekil 4) (22, 47). İnsan sperm hücresinin ROS'a duyarlı olma nedeni, plazma membranında bol miktarda doymamış yağ asitleri içermesidir (4). Sperm hücresindeki lipid peroksidasyonun ilk basamağını, spermatozoa membranında bulunan NADPH oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit anyonunun, süperoksit dismutaz enzimi tarafından hidrojen peroksite dönüşmesi oluşturur (7). Hidrojen peroksit Fenton reaksiyonuyla hidroksil radikaline dönüşür. Bu nedenle insan sperm hücresinin serbest radikal oluşturma mekanizması fagositik lökositlerin NADPH oksidaz sistemine benzemektedir, ve bu sistem de heksoz-monofosfat şantı yoluyla NADPH sağlanmasına bağımlıdır (4, 6). Hidrojen peroksit sperm hücresindeki komşu karbon atomları arasındaki çift bağları kırarak lipid peroksidasyon zincirini başlatmaktadır. Bu reaksiyonlara demir ve/veya bakır gibi metallerin eklenmesi zincir reaksiyonunu ve lipid peroksitlerin üretimini arttırmaktadır. Lipid peroksidasyonunun başlamasından ve insan sperm hücresine toksisitesinden asıl sorumlu oksijen metaboliti hidrojen peroksittir. Hidrojen peroksite ek olarak peroksidasyon sonucu oluşan diğer lipid peroksitler ve bunların yıkım ürünleri (4-

hidroksi-2-nonenal gibi) de sitotoksik etki göstermektedir. Bu sitotoksik oksijen metabolitleri sperm membran geçirgenliğinde artış ile değişik hormon ve büyüme faktörleri için hücre içi sinyal görevi yapan ve kalsiyum dengesini sağlayan Ca / Mg ATP'az gibi membrana bağlı anahtar enzimlerde bozukluklara neden olur. Aksonem hasarı (geri dönüşümlü) ve intrasellüler ATP'nin tüketilmesi ile spermde hareket kaybı oluşur (Şekil 4).



Şekil 4. ROS, antioksidanlar, sperm fonksiyonu ve infertilite arasındaki ilişki

2.2.6. Serbest radikallere karşı savunma mekanizması

Antioksidanlar, okside olabilen bir substrata karşılık düşük konsantrasyonlarda bile bu substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren yada inhibe edebilen herhangi bir madde olarak, ya da başka bir ifade ile lipid peroksidasyonun inhibitörleri olarak tanımlanabilirler (74). Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Vücudun, oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde kan çok önemlidir. Çünkü kan, antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağılmasını sağlamaktadır.

Total antioksidan kapasiteye en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Albumin, ürik asit ve askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin % 85'inden fazlasını oluşturur. Bu fark kanda bilirubin, GSH, flavinoidler, α -tokoferol ve β -karoten gibi antioksidan komponentlere nazaran albumin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasına bağlıdır. Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek, glutatyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması verilebilir. Total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir. Bu yüzden kanın antioksidatif durumunu saptamada, bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır (31, 75). Hücrede okside edilebilir substratlar; proteinler, lipidler ve DNA'dır. Antioksidanlar, oluşan O_2 , H_2O_2 , OH , $HOCl$ gibi radikalleri biyolojik temizleyici olarak işlev görürler veya oluşan doku hasarını onarmaya çalışırlar.

Biyolojik sistemlerde oksidatif denge bozulduğu zaman, yani serbest radikal oluşma hızı savunma mekanizmaların gücünü aştığı zaman oksidatif stres ortaya çıkmaktadır. organizmada açığa çıkan serbest radikallere karşı normal koşullarda endojen savunma mekanizmalarıyla savunma yapılmaktadır. Ayrıca eksojen antioksidanlarda değişik mekanizmalarla savunmada rol alabilmektedirler (85).

Genel olarak hücrelerin serbest radikallere karşı korunması dört şekilde gerçekleşmektedir.

a) radikal reaksiyonlarının sonlandırılması: E vitamini, lipid peroksidasyon zincirini kırarak reaksiyonu sonlandırmaktadır.

b) radikal oluşumunun sınırlandırılması: Transferrin radikal oluşumuna yol açan demirle, albümin ve seruloplazmin bakırla, haptoglobulin hemoglobinle, hemopeksin hem ile şelasyon yaparak radikal oluşumunu sınırlandırmaktadırlar.

c) oluşan radikallerin detoksifikasyonu: Serbest radikaller, superoksit dizmutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz enzimleriyle detoksifiye edilmektedirler.

d) oksidatif olarak hasarlanmış biyomoleküllerin tamiri ve uzaklaştırılması: Diğer mekanizmalar serbest radikallerin giderilmesinde tamamen yeterli olmadıklarından hasarlanmış maddeler ortamda sürekli birikebilmektedir. Bu nedenle tamir süreçlerine

ihtiyaç vardır. Nitekim, hasarlanmış nükleik asitler spesifik enzimlerle tamir edilirken, hasarlanmış proteinler proteolitik sistemlerle ortamdan uzaklaştırılmaktadır (85).

2.2.6.1. Endojen savunma mekanizmaları

a) Enzimatik antioksidan sistemi: süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz, mitokondriyal sitokrom oksidaz ve glutatyon -S- transferaz enzimlerinden oluşur. Bu enzimler eritrositlerde yüksek oranda bulunmaktadır. Diyetteki bakır, çinko, demir, mangan ve selenyum eksikliği bu enzimlerin aktivitesini düşürmektedir.

i) süperoksit dismutaz (SOD): Bu enzim süperoksit anyon radikalinin dismutasyonunu katalizleyen bir metaloenzim olup, süperoksit radikale karşı ilk aşama savunmadan sorumludur. Bilinen tek substratı O_2 radikalidir. Hidrojen, hidrojen peroksitle birleşerek hidroksil radikalinin oluşmasına neden olan süperoksit radikali ortadan kaldırılmış olmaktadır (24, 77). SOD içerdiği metal iyonlarına göre CuZn, Mn ve Fe olmak üzere üç sınıfa ayrılır (8). Hücrenin oksijenizasyonunun artması, metabolik hızda artma ve redoks-aktif maddelere maruz kalış nedeniyle süperoksit radikal miktarında artış süperoksit dismutaz enziminin sentezinde artışa yol açar (33, 48, 56, 73). Süperoksit dismutaz enzimleri hücreyi özellikle DNA'yı radyasyonun iyonizan etkisine karşı da koruyucu etki göstermektedir.

ii) katalaz: Yapısında protoporfirin IX Fe (hem) grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir. Kan, kemik iliği, karaciğer böbrek ve müköz membranlarda yüksek miktarlarda bulunmaktadır (65). Hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene yıkılmasını katalizlemektedir ($2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$) (39, 3).

iii) glutatyon peroksidaz (GSH Px): En önemli antioksidan enzimdir. Hidrojen peroksitin indirgenerek ortadan kaldırılmasında görev almaktadır. GSHPx'ın insanda dört tipi izole edilmiştir (92). Bu enzimlerin tümü aktif bölgelerinde selenosistein şeklinde selenyum atomu içerirler. GSHPx, süperoksit dismutaz gibi hem sitozol hemde mitokondride bulunduğundan H_2O_2 çıkarılmasında önem taşır.

iv) glutatyon redüktaz (GSH-Rx): Organizmanın GSH deposu sınırlı olduğundan okside formun ileride kullanılmak üzere tekrar redükte GSH'a dönüştürülmesi gerekmektedir. GSH-Rx, NADPH varlığında GSSG'yi tekrar redükte GSH'ya dönüştürür (59, 80).

v) glutatyon-S-transferazlar: Bu enzimler katalitik ve katalitik olmayan çok sayıda fonksiyona sahiptirler. Hem detoksifikasyon yaparlar, hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri vardır. Katalitik olarak; ksenobiyotikleri (yabancı maddeleri) GSH'daki

sisteine ait –SH grubu ile bağlayarak onların suda daha fazla çözünür hale gelmesini sağlarlar. Oluşan bu GSH konjugatları böylece organizmadan atılabilir veya daha ileri metabolize olurlar (8, 71).

Bir çok pigment (bilirubin, hematin, bromostülfoftalein, indosiyanın gren gibi), kolik asitler, steroid hormonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar bu proteinler tarafından bağlanıp taşınabilmektedirler (30, 61).

vi) mitokondrial sitokrom oksidaz: Solunum zincirinin son enzimi, süperoksidi detoksifiye eder, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır (8, 25, 71).

b) Nonenzimatik antioksidan sistemi:

i) E vitamini (tokoferoller): E vitamini yağ ve yağlı gıdalarda bulunmaktadır. Fındık ve badem iyi birer E vitamini kaynağıdır. Tokoferollerin en potent üyesi α tokoferoldür. Plazma ve tüm hücrel membranlarda bulunan bir lipid-faz antioksidandır. Major biyolojik rolü karbon merkezli lipit radikallerinin ortadan kaldırılmasıdır (23). Radikalleri daha az aktif formlara dönüştürerek membranları lipit peroksidasyona karşı korumaktadır. Lipit peroksil radikallerini bozarak etki ettiği için zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinmektedir (9, 18).

Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında daha belirgindir. Bundan dolayı, yüksek oksijen basınçlarına maruz kalan lipit yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir (13).

ii) C vitamini (askorbik asit): Membran dışında görev yapan, sıvısal bir antioksidandır. Temelde iki mekanizmayla antioksidan etki gösterir. Organizmanın sitozol, plazma ve ekstraselüler sıvı gibi suda eriyebilir bölümlerinde serbest radikallerle reaksiyona girerek inaktive etmek ve okside E vit. rejenere etmek (18, 77). Radikallere karşı ilk aşama savunmadan sorumludurlar. Sıvısal antioksidanlardan ürat, sistein, seruloplazmin, transferin ve albumin, direk etkiyle toksik oksijen metabolitleriyle reaksiyona girerek onları daha stabil bileşiklere dönüştürürler. Antioksidan protein ekspresyonunun spesifik regülatör genler yada regulonlarla kontrol edildiği bulunmuştur (77). Böylece regulonların modifikasyonu, oksidatif süreçlerde terapötik bir modalite olarak kullanılabilir. Genel olarak diyabet gibi bazı patolojilerde antioksidan madde desteği gerekli olmaktadır. Normal bireylerde ise sebze ve meyve gibi antioksidanlarca zengin bir diyeti düzenli bir şekilde almanın en iyi

yaklaşım olacağı söylenmiştir. Kolesterolün'de nonenzimatik yollarla oksidanların tutulmasında sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Bu antioksidanların total antioksidan kapasiteye katkıları, α – tokoferol için %5, C vitamini için %15, ürat için %25 ve protein –thiol için %50 olarak bulunmuştur (24).

iii) β Karoten (Vitamin A ön maddesi): β -karoten, yağda çözünen bir vitamin olup antioksidan özelliğe sahiptir. Serbest radikalleri biyolojik hedeflerle interaksiyona girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve/veya zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek peroksit radikalleri oluşumunu önler. Karotenoidler, özel kimyasal yapılarından dolayı singlet oksijeni tutabilirler (14). β -karoten, mükemmel bir antioksidan olmasına karşın bu etkisi vitamin E' nin aksine düşük pO_2 'de etkilidir. Böylece β -karoten dokunun parsiyel oksijen basıncına bağlı olarak vitamin E nin antioksidan etkisini tamamlar (13).

iv) glutatyon (GSH): Bir çok türün hemen hemen tüm hücrelerinde bulunan glutatyon, metabolizmada önemli rol oynayan ve glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir (67, 68). GSH'nın oksidatif hasarı önleme kapasitesi, onun serbest radikallerle direkt reaksiyona girme, disülfitleri direkt olarak indirgeme ve GSH-Px'a kofaktör olma yeteneğine bağlıdır (12).

2.2.6.2. Eksojen savunma mekanizmaları

Endojen mekanizmalara benzer şekilde serbest radikallerin yol açtığı doku hasarlanmasını gidermekte, temel olarak üç yolla etki göstermektedirler; oksijen radikalinin oluşmasını önleme, oluşmuş radikali temizleme ve endojen mekanizmaların etkisini artırma.

2.2.7. Serbest radikallerin faydaları

Organizma normal fizyolojik süreçte de serbest radikallere ihtiyaç gösterebilmektedir. Hidrokarbonların oksidatif metabolizması ile enerji üretiminde, ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonunda, ovulasyonda ve mikroorganizmaların fagositik yolla öldürülmesinde olmak üzere bir çok süreçte görev almaktadırlar (11, 26, 46, 50, 77).

Nötrofil gibi bir fagositik hücre, bir uyararla karşılaştığında fagositite ettiği yabancı cisim solunum patlaması adı verilen bir dizi reaksiyonla etkisiz hale getirmektedir. Bu olayda NADPH oksidaz, aktive olarak stoplazmadan NADPH maddesini almakta, elektronları oksijene geçirmekte ve plazma membranının içinde

veya dış yüzeyinde süperoksit radikalinin oluşmasına yol açmaktadır. Bu olay zarın dış yüzeyinde olsa da fagositik boşluğun iç duvarını bu yüzey oluşturduğu için $2O_2$ yabancı cisme etki yapabilmektedir. Kronik granümatöz hastalıkta, NADPH oksidaz enziminin herediter eksikliği olduğu için super oksit radikali oluşmamakta ve hastanın lökositleri patojenleri öldürememektedir (52). Makrofaj süperoksit üretimi aynı zamanda nötrofil kemotaksisinde de önemlidir.

İyonize radyasyonun serbest radikal üretimine neden olduğu bilinmektedir. Terapotik radyasyonun biyolojik etkisinin %60-70'i radikal türevlerince oluşturulan indirek iyonizasyona bağlı olarak gerçekleşmektedir (62). Ribonukleotid redüktaz gibi bazı enzimler kataliz işlemi sırasında serbest radikalleri kullanabilmektedirler. Ayrıca radikaller prostoglandin biyosentezinde görev alabilmektedirler (50). Serbest radikaller, değişik agonistlere cevap olarak intraselüler sinyallerle regüle edilebilen süreçlerle oluşabilmekte ve hücre fonksiyonlarının kontrolünde haberci olarak işlev görebilmektedir. Bu fonksiyonu bir çok hücre tipinde gösterebilmektedir. Örneğin düz kas hücrelerinde bu tür bir görev üslenmiş olabilirler. Nitekim serbest radikallerin düz kas tonus regülasyonunda görev aldıkları ileri sürülmüştür (11, 17).

Her ne kadar ROS spermatozoa için membran yapısı, proteinler ve DNA üzerinde yıllarca toksik bir ajan olarak bildirilmiş olsa da, fizyolojik reaksiyonlarda sinyal iletiminde rolü olan moleküller olarak gereklidirler. Gerçektende düşük miktarlarda bulunmaları fertilizasyonu desteklemektedir. Semende ROS kaynağı nötrofiller ve spermatozoalardır. Kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, hiperaktif motilite ve fagositozun fizyolojik modülasyonunda görev alırlar. Düşük dozda H_2O_2 'nin eklenmesi kapasitasyonu uyarır. Bir antioksidan olan katalaz ise bu olayı engeller. Kapasitasyon sırasında O_2 'nin oluşumunun ilk reaksiyon olduğu ve 15-20 dk içerisinde pik yaptığı, arkasından düştüğü gösterilmiştir. Bu sırada oluşan ROS'un adenil siklaz ve tirozin kinazın aktivasyonunda direkt rolü bulunmaktadır. Süperoksit anyonunun kapasitasyon ve hiperaktif motiliteyi uyardığı, bir antioksidan olan süperoksit dismutaz enziminin ise bunu önlediği bir çok çalışmada ortaya konmuştur. Bütün bunlar, ROS'un sperm kapasitasyonu ve motilitesi için gerekli moleküller olduğunu göstermektedir (82).

2.2.8. Serbest radikallerin tayin yöntemi

Direk serbest radikal tayini, yüksek reaktiviteleri ve kısa yarı ömürleri nedeniyle çok zordur. Bu nedenle reaksiyon ürünleri ölçülmekte yada inhibitör deneyleri yapılmaktadır. Radikal tayini için hangi yöntem kullanılırsa kullanılsın, örnekleme ve

ölçme işlemleri dikkatle yapılmalıdır. Bütün olumlu gelişmelere rağmen bu işlemler için halen standardizasyon ve kalite kontrol eksikliği söz konusudur (27).

2.2.8.1. ESR (electron spin resonance spectroscopy)

ESR, diğer adıyla EPR (electron paramagnetic resonance) manyetik bir alanda serbest radikallerin eşlenmemiş elektronlarınca oluşturulan mikrodalga absorpsiyonunun ölçümüdür. Yani magnetik momentuma sahip bir yapının manyetik alanda tesbit edilebilmesi esasına dayanmaktadır. ESR, spin tuzakları denilen bileşiklerin kullanımını gerektirmektedir. Spin tuzakları serbest radikallerle reaksiyona girdiklerinde daha stabil serbest radikal ürünleri oluşturmaktadırlar. Tuzaklanmış eşleşmemiş elektronlar yüksek konsantrasyonlarda birikerek, serbest radikalin ESR ile ölçülmesi sağlanmış olmaktadır. ESR, reaktif türlerin tesbit edilmesine imkan veren tek direk yöntemdir. Fakat radikaller, çok kısa olan yarı ömürleri nedeniyle ESR ile saptanamayabilir. Bu gerekçeyle NMR spin tuzaklama, spektrofotometri ve luminol-bağımlı chemiluminescence gibi yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (27, 39, 77).

2.2.8.2. İndirek yöntemler

Oksidatif stres, genellikle hasarlanmış biyolojik ürünlerin saptanmasıyla yapılmaktadır. Bu amaçla bir çok lipid derivesi ölçülebilmektedir. Dokuda lipid peroksidasyonun belirleyicileri olarak aldehitler (malondialdehit veya hidroksinonenal), tiyobarbiturik asit reaktivitesi, konjuge dienler ve küçük miktarlarda oluşan ethane ve pentane (hidrokarbidler), ayrıca hidroperoksitler radikal ölçümünde kullanılabilir. Bunlardan en tartışmalı olduğu halde en çok kullanılan indikatör, malondialdehittir (27).

İdrarda DNA deriveleri ve okside proteinler (karbonil veya tiyol grupları) de diğer okside olmuş biyolojik bileşikler olarak radikal ölçümünde kullanılmıştır. Nükleik asit yıkım ürünleri ve glutasyon aktivitesine de bakılabilmektedir. Ancak bunların indirek teknikler olduğu unutulmamalıdır. Mass Spectrometriyle DNA baz hasarının spesifik ölçümü de yapılabilmektedir. İnhibitör deneylerinden süperoksit dismutaz ve katalaz, spesifik olarak; allopurinol ve deferoksamin, rölatif spesifik olarak; mannitol ve DEMSO ise nonspesifik olarak serbest radikal tayininde kullanılabilir.

Askorbat radikali, oksidatif stresin bir markeri olarak kullanılmıştır. Okside antioksidanların oksidatif stresin varlığını göstermek için kullanılmasına örnek, okside glutasyonun total glutatyona oranının değerlendirilmesidir. Ayrıca Fricke ferrous sulfate dozimetrisinde radikal reaksiyonlarının indirek tayininde kullanılmıştır (12, 27).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmaya, Şubat 2002 ile Aralık 2003 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nın Androloji ve İnfertilite Polikliniği'ne, infertilite nedeniyle baş vuran ardışık 135 hasta alındı. Hastaların fertilitate potansiyellerini etkileyebilecek faktörleri de içeren detaylı öyküleri elde edildi. Genital konjenital ve/veya edinsel malformasyonlar ile sekonder seks karakterlerine yoğunlaşan fizik muayeneleri yapıldı. Detayları aşağıda anlatıldığı şekilde, semenler analiz edildi. FSH, LH, testosteron ve prolaktin'i içeren hormon profili çalışıldı. İlave malformasyonların düşünüldüğü, fizik muayenenin yetersiz veya şüpheli kaldığı olgularda skrotal, transrektal ve/veya abdominal ultrasonografi yapıldı. Varikosel, lökospermi, hormonal ve/veya obstüktif patolojilerin varlığı gibi bilinen nedenlere bağlı infertilite olguları çalışmadan çıkarıldı. Geriye kalan hastalar idyopatik infertilite olarak kabul edildi. Son 1 yıl içinde çocuğu olan ve semen parametreleri WHO 1998 kriterlerine göre normal olan 30 kişi kontrol grubu olarak alındı.

İdyopatik infertilite için çalışmaya alınma kriterleri;

- i. kadın faktörü normal olup, istemesine rağmen en az 1 yıldır çocuk sahibi olamaması
- ii. yaşın 20'nin üstünde veya 45'in altında olması
- iii. klinik varikoselin olmaması
- iv. semen analizinde lökospermi olmaması
- v. hormonal nedenlerin olmaması
- vi. üriner enfeksiyon olmaması

3.2. Örneklerin Toplanması Ve Analizi

3.2.1. Semen analizi

Her hastadan en az 1 en çok 3 hafta ara ile olmak üzere iki kez semen örneği alındı. İki örnek arasında %20 dan fazla fark olduğunda 3'üncü örneğe baş vuruldu. Semen örnekleri en az üç günlük cinsel perhiz sonrası, sabun, krem, tükürük ve benzeri maddeler kullanılmadan masturbasyon ile toplandı. Toplama kabı olarak temiz ve geniş ağızlı cam kaplar kullanıldı. Alınan semen örnekleri 37 C° de likefiye olduktan sonra bir kısmı WHO 1998 kriterlerine göre değerlendirilmek üzere ayrıldı. Sperm morfolojisi Gimsa boyama ile, sayı ve hareket ise makler kamera ile değerlendirildi. Geri kalan semen örnekleri likefaksiyonu takiben, 20 dk 4000 rpm de santrifüje edilerek

supernatan kısmı total antioksidan kapasite ve total peroksid düzeyleri çalışılmak üzere eksi 80 C° de depolandı.

3.2.2. Venöz kan

Çalışmaya katılanlardan antekübital venden saat 08⁰⁰- 10⁰⁰ arasında yaklaşık 5cc periferik venöz kan alındı. Uygun şekilde plazması ayrılarak total antioksidan kapasite ve total peroksid düzeyleri çalışılmak üzere eksi 80 C° de depolandı.

3.2.3. Toplam antioksidan kapasite ölçümü

Depolanan tüm kan ve seminal plazma örneklerinde toplam antioksidan kapasite düzeyleri, EREL'in geliştirdiği full otomatik total antioksidan kapasite kiti ile oto analizörde (Abbott Aeorose, USA) ölçüldü. Bu metoda göre Fenton reaksiyonu ile oluşan OH(Hidroksil) iyonu ortho-Dianisidin ile renk oluşturmaktadır ve oluşan rengin absorbansı otoanalizörde spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Plazma, serum yada diğer vucut sıvılarındaki antioksidan kapasiteye göre rengin şiddeti azalmakta ve test sonuçları mmlol Trolox equiv./L olarak hesaplanmaktadır (25).

3.2.4. Toplam peroksit ölçümü

Kan ve semen plazmalarının toplam peroksit düzeyleri (TP) enzimatik yöntemle ölçüldü (79). Yöntemde, peroksidaz enzimi çeşitli peroksitleri kullanarak dimetilbenzidin molekülünü oksitler ve oluşan renkli ürünün absorbansı ortamdaki TP düzeyini yansıtır. Semen plazma ve standart örneklerinden 10 µL alınıp 200 µL test ayırıcı ile karıştırıldı ve 450 nm de ilk absorbans ölçülüp 20 dakika inkübasyonunun sonunda 50 µL 2N H₂SO₄ ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve son absorbans alındı. Testte kalibratör olarak 5.0 µmol/L dilüsyonda hidrojen peroksit kullanıldı. Testin sonuçları µmol H₂O₂ Equiv./L olarak verildi.

3.3. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi. Gruplar arası farklar bilgisayarda SPSS istatistik programı (version 11.5) kullanılarak değerlendirildi. Hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında bağımsız örnekler için t-testi, grup içi seminal ve kan plazması arası farkı değerlendirmede bağımlı örnekler için t-testi kullanıldı. P<0.05 anlamlı fark olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma döneminde değerlendirilen 135 ardışık infertil hastanın 103'ü çalışmadan çıkarıldı. Bu 103 hastanın dışlanma gerekçeleri Tablo V'da özetlendi. İdyopatik infertil hasta kriterlerine uygun 32 hasta belirlendi. Hasta grubu yaş ortalaması 31.03 ± 4.94 , dağılımı 21-39 yıl, kontrol grubu yaş ortalaması 31.30 ± 3.95 , dağılımı 22-40 yılı. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p= 0.815$).

Tablo V. Yüzüç hastanın çalışmadan dışlanma gerekçeleri

Hasta sayısı n (%)	Dışlanma gerekçesi
47 (45.60)	Varikozel
17 (16.50)	Pyospermi
6 (05.82)	Hormonal nedenler
3 (02.91)	Obstrüktif nedenler
30 (29.12)	Diğer (yaş, kadın faktör,üriner enfeksiyon, vd.)

Hasta ve kontrol grupları seminal parametreleri Tablo VI'de gösterildi. Hasta grubunda sperm yoğunluk, motilite ve canlılık ölçümleri kontrol grubundan anlamlı şekilde düşük bulundu.

Tablo VI. Hasta ve kontrol grupları seminal parametreleri

Sperm parametresi	hasta	kontrol	P
Yoğunluk ($\times 10^6/ml$)	24.59 ± 10.0	51.26 ± 11.86	<0.001
Hareket (%)	35.53 ± 18.76	56.06 ± 7.25	<0.001
Morfoloji (%)	44.75 ± 18.15	57.16 ± 9.65	0.001
Hacim (cc)	2.83 ± 0.51	3.80 ± 0.77	<0.001
Ph	7.43 ± 0.35	7.35 ± 0.32	0.334

Seminal ve venöz kan plazmaları TAK-TP değerleri hastalar için Tablo VII ve kontroller için Tablo VIII de gösterildi. Her iki grupta seminal plazma oksidan ve antioksidanları kan plazması verilerinden anlamlı şekilde farklı bulundu. Her iki grupta da total antioksidan kapasite seminal plazmada kan plazmasından oldukça farklı şekilde (yaklaşık 8-9 kat) yüksek, total peroksit düzeyleri ise seminal plazmada daha düşük bulundu.

Tablo VII. Hastalarda semen - kan plazması TAK-TP değerleri

parametre	semen	kan	p
TAK	13.48±2.03	1.46±0.62	<0.001
TP	7.79±0.38	8.38±0.87	0.001

TAK; Total Antioksidan Kapasite
TP; Total Peroksit

Tablo VIII. Kontrollerde semen - kan plazması TAK-TP değerleri

parametre	semen	kan	p
TAK	14.06±2.30	1.72±1.70	<0.001
TP	7.84±0.51	8.59±1.08	0.003

TAK; Total Antioksidan Kapasite
TP; Total Peroksit

Hasta ve kontrol grupları seminal plazma TAK-TP değerleri Tablo IX, kan plazması değerleri Tablo X'da verildi. Hem semen hem de plazma TAK-TP değerleri açısından hasta ve kontroller arasında fark belirlenmedi.

Tablo IX. Hasta ve kontrollerde seminal plazma TAK-TP değerleri

parametre	hasta	kontrol	p
TAK	13.48±2.03	14.06±2.30	0.303
TP	7.79±0.38	7.84±0.51	0.680

TAK; Total Antioksidan Kapasite
TP; Total Peroksit

Tablo X. Hasta ve kontrollerde kan plazması TAK-TP değerleri

parametre	hasta	kontrol	p
TAK	1.46±0.62	1.72±1.70	0.505
TP	8.38±0.87	8.59±1.08	0.411

TAK; Total Antioksidan Kapasite
TP; Total Peroksit

5. TARTIŞMA

Üreme ve nesli devam ettirme yer yüzünde yaşayan tüm canlıların en önemli ve temel iç güdülerinden biridir. İnsan söz konusu olduğunda bu biyolojik iç güdüye psikososyal bir boyut da eklenerek, üreme ve nesli devam ettirme daha geniş ve derin anlamlar kazanmaktadır. Çocuk sahibi olmak, yalnızca biyolojik bir devamlılık sağlamamakta, çocuklarımızla olan psikososyal etkileşim yoluyla gerek bilinçli gerek bilinç dışı tüm özelliklerimizi onlara aktararak nesiller arası devamlılığı da sağlamaktadır. Tüm bu sosyal ve psikolojik durumlar göz önüne alındığında infertilitenin gerek kişisel gerekse toplumsal bazda ne kadar önemli olduğu apaçık ortadadır.

İnfertilite en az bir yıldır birlikte olan bir çiftin, istemelerine rağmen çocuk sahibi olamamaları olarak tanımlanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde evli çiftlerin yaklaşık %15'inde infertilite sorunu olduğu bildirilmekte, ülkemiz için güvenilir istatistiksel veriler bulunmamakla beraber, infertilite sıklığının benzer olduğu kabul edilmektedir. Geçmişte, özellikle doğu toplumlarında infertiliteden sadece kadınlar sorumlu tutulmakta iken, günümüzde olguların yaklaşık %50'sinde erkek faktör ile ilgili problemlerin varlığı kabul edilmektedir. İnfertil olgularının yaklaşık %75'inde varikozel, proksimal veya distal kanal obstrüksiyonları, hormonal ve immünolojik patolojiler gibi nedenler belirlenebilirken, olguların %25'inde hala herhangi bir neden bulunamamakta ve bu olgular 'idyopatik infertilite' olarak tanımlanmaktadır (86). Kliniğimizde de bu çalışma için izlenen ardışık 135 infertil hastanın 32 (%23.7)'sinde bilinen bir neden belirlenemedi ve bu olgular 'idyopatik infertil' olarak kabul edildi.

İnfertilite ile baş vuran çiftlerin büyük kısmında semen parametrelerinde değişik düzeylerde bozukluklar saptanmakta ancak yukarıda da belirttiğimiz gibi her zaman etyolojiyi ortaya koymak mümkün olmamaktadır. Özellikle idyopatik infertil olgularda patofizyolojiyi ortaya koymak ve tedavi başarısını artırabilmek için hücresel ve moleküler düzeyde çalışmalar sürdürülmektedir (1, 69, 82, 85). Üzerinde çalışılan alanlardan biri de sperm parametre bozuklukları ve reaktif oksijen radikalleri (ROS) arasındaki ilişkilere (3). Özellikle aerob canlı için yaşamsal önemi olan ve biyolojik açıdan hayati bir değere sahip olan oksijenin hücrelere karşı toksik etkilerinin de olabilmesi ilginç bir çelişkidir (88). Sperm hücre membranında doymamış yağ asitlerinin varlığı, ROS'un bu yapıya olan yüksek afinitesi, sperm membranı lipid tabakasıyla oksijen radikallerinin etkileşimi sonrası lipid peroksidasyonunun meydana

gelmesi ve membran lipit yapısının bozulması olasılığı ROS'un infertilite için bir neden olabileceğini düşündürmektedir (35). İnfertil hastalarının semen plazmasında yüksek oranda ROS olduğu ve ROS'un yarattığı oksidatif stres ortamının sperm için toksik olabileceği çeşitli çalışmalarda ileri sürülmüştür. Ivvasaki ve ark., erkek infertilitesi ile artmış ROS üretimi arasında negatif bir korelasyonun olduğunu semen plazmasında artmış ROS varlığının kötü semen kalitesiyle doğru orantılı olduğunu ROS'un amorf baş, akrozomal hasar, stoplazmik artık ve kuyruk defektiyle pozitif korele olduğunu bildirmişlerdir (47). Chen ve ark., varikoselli hastalarda oksidatif stresin artmış olduğunu, bununda sperm fonksiyonlarını olumsuz etkileyen faktör olabileceğini ileri sürdüler (19). Bu çalışmalarla uyumlu olarak Koca ve ark., asthenozoospermik ve asthenoteratozoospermik hastalarda antioksidan kapasitenin anlamlı derecede düşük bulunduğunu rapor etmişlerdir (54). Köksal ve ark. ise ROS'un sperm fonksiyon bozukluğunun yanında infertilite ile ilişkili diğer bir çok patolojiye de neden olabileceğini, artan lipit peroxidasyonu ile birlikte testiküler dokuda patolojik değişikliklerin oluştuğunu ve ROS'un testiküler dejenerasyona da yol açabileceğini bildirmişlerdir (55).

Bu çalışmaların aksine infertilite ve ROS artışı arasında bir ilişki olmadığını yada infertillerde ROS'un kontrollerden farksız olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (29, 43, 53, 70, 91). Yaman ve ark., testiküler dokuda malondialdehit ve ksantin oksidaz konsantrasyonlarını normal spermatogenezi olan kontrol grubu ile sertoli cell only sendromu, maturasyon arresti ve/veya hyospermatogenezisi olan infertil hastalar arasında istatistiksel fark bulunmadığını, spermatogenezi bozan ve açıklanmaya ihtiyaç duyulan ROS dışı bir takım başka faktörlerin olması gerektiğini öne sürdüler (91). Kobayashi, Hsieh ve Öner-İyidoğan fertil ve infertil hastalarda seminal plazma SOD aktiviteleri arasında anlamlı fark bulamamışlar ve seminal plazma antioksidan statusu ile sperm sayı ve hareketliliği arasında bir bağlantı olmadığını öne sürmüşlerdir (43, 53, 70).

Bizim çalışmamızda da ROS (TP) ve TAK ölçümleri infertil hasta grubumuz ve kontroller arasında anlamlı bir farklılık göstermedi. Hastalarımızın idyopatik infertillerden oluşması, pyospermi ve varikosel gibi artmış ROS üretiminin sıklıkla eşlik ettiği hastalıkların dışlanmış olması hasta ve kontrol gruplarımız arasında fark olmamasını açıklayabilir. Bu bulgular, özellikle idyopatik infertil hasta grubunda, spermiyogram parametrelerindeki düşüklüğün oksidatif stres ile açıklanamayacağını ve başka faktörlerin olması gerektiğini düşündürmektedir.

Gerek hücre içi gerek hücre dışı kaynaklı oluşan oksidatif radikallerin önemli bir kısmı, antioksidan sistem tarafından etkisizleştirilir. Bundan dolayı, oksidatif maddelerin oluşumu ile antioksidan savunma mekanizmalarının işleyişi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin oksidatif baskının artışı yönünde bozulması, hücrelerin veya organizmanın hasarı ile sonuçlanabilir. Gerek endojen gerekse eksojen yollarla oluşan oksidatif radikallerin protein, lipid, nükleik asit gibi hücre elemanları ile reaksiyona girmeleri sonucunda hücre fonksiyonlarında önemli değişiklikler meydana gelir. Kaynağı ne olursa olsun bu ürünlerin sperm hücreleri için toksik olduğu ve bir takım antioksidan sistemler tarafından bu toksik etkinin dengede tutulduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda hem hasta hem de kontrollerde seminal plazma TAK düzeyleri kan plazması ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 8-9 kat daha yüksek olarak belirlendi. Aynı karşılaştırma TP düzeyleri açısından yapıldığında, antioksidanların aksine, semen plazmasında anlamlı düzeyde düşük bulundu. Seminal plazmadaki bu yüksek antioksidan kapasite, değişik etkenlere bağlı oluşabilecek ROS artışını ve buna sekonder spermatozoa hasarını önleyebilecek güçte görünmektedir.

6. SONUÇ

Artmış ROS üretimi ve/veya ROS'un antioksidanlarca dengelenmesindeki yetmezliğe bağlı olarak seminal plazmada oksidatif stres nedeni olarak infertiliteye yol açabileceği bilinmekle beraber bu çalışmanın sonuçları, bizde, idyopatik infertilitede spermiyogram parametrelerindeki bozulmaların oksidatif stresle açıklanamayacağı kanaatini uyandırmıştır.



7. KAYNAKLAR

1. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril** 2003; 79(4):829-43.
2. Aidici A, Levine RL; Tsai L; Stadtman ER. Nonenzymatic metal ion-catalyzed oxidaiton system. **J Biol Chem** 1989; 264:3341-46.
3. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. **J Reprod Fertil** 2004;16(5):581-588.
4. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **J Reprod Fertil** 1993; 97(2):441-450.
5. Aitken RJ, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. **Bioassays** 1994; 16: 259-267.
6. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship Between iron-Catalysed Lipid Peroxidation Potential and Human Sperm Function. **J Reprod Fertil** 1993; 98:257-265
7. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of Lipid Peroxidation Mechanisms in Human Spermatozoa. **Mol Reprod Dev** 1993; 35:302-315.
8. Akkuş I. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. **Mimoza Yayınları**, Konya. 1995;75-87.
9. Anderson ME, Meister A; Glutathione moesters. **Anal Biochem** 1989;183:16-20.
10. Barber DA, Haris SR. Oxygen free radicals and antioxidant: a review. **Am Pharm** 1994; NS 34(9):26-35.
11. Barrowcliffe TW, Gutteridge JMC. Oxygen radicals, lipid peroxidation and the coagulation system. **Agents Actions** 1987; 22: 347-348.
12. Bast A, Haenen GR, Delman CJ. Oxidants and antioxidant :state of the art. **Am J Med** 1991;91(3c):2s-13s.
13. Buettner DR, Jurkiewicz BA. catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. **Radiat Res** 1996;145(5):532-541.
14. Burton G, Traber M. Antioxidants action of carotenoids. **J Nutr** 1989;119:109-111.
15. Cadanas E; Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu Rev Biochem** 1989;58:79-110.

16. Campbell AJ, Irvine DS. Male infertility and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Br Med Bull** 2000;56(3):616-29.
17. Carison JC, Sawada M. Generation of free radicals and Messenger function. **Can J Appl Physiol** 1995; 20(3):280-288.
18. Cheeseman KH; Slater TF. An introduction to free radical. **Biochemistry** 1993;49(3):481-493.
19. Chen SS, Huang WJ, Chang LS, Wei YH. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in leukocyte DNA of spermatic vein as a biomarker of oxidative stress in patients with varicocele. **J Urol** 2004;172 (4 Pt 1):1418-1421.
20. Clemens MR. Free radicals in chemical carcinogenesis. **Klin Wochenschr** 1991; 69:1123-34.
21. Cros CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human disease. **Annals. Int Med** 1987;107:526-45.
22. D'Agata R, Vicari E, Moncada ML, et al: Generation of reactive oxygen species in subgroups of infertile men. **Int J Androl** 1990; 13: 344.
23. Diplock AT. The role of antioxidant in clinical practice. **Br J Clin pract** 1990; 44(7):257-258.
24. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur J Cancer** 1996; 32A(1):30-38.
25. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clinical Biochemistry** 2004; (37).112-119.
26. Erenel G, Erbas D, Aricioglu A. Free radicals and antioxidant systems. **Matter Med Pol** 1993; 25(1):37-43.
27. Favier A. Oxidative stress: value of its demonstration in medical biology and problems posed by the choice of a marker. **Ann Biol Clin** 1997; 55(1):9-16.
28. Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury **Lab Invest** 1982; 47: 412-415.
29. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian J Androl** 2004; 6(1): 59-65.
30. Gerber M, Richardson S, Salked R. Antioxidant in female breast cancer patients. **Cancer Invest** 1991; 9(4):421-428.
31. Ghiselli A, Serafini M, Natella F and et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data **Free Radical Biology & Medicine** 2000; 29(11) 1106-1114.

32. Guttridge JMC, Hallwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends Biochem Sci** 1990; 15: 129-135.
33. Güven M, Öztürk B, Soyol A and et.al. Lipid peroxidation and antioxidant system in the Blood of patients with Hodgkins disease **Clin Biochem** 2000; 33(3):209-212.
34. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, menagege and antioxidant therapy. **The Lancet** 1984; 23:1396-1397.
35. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and rôle in human disease. **Am J Med** 1991; 91 (3c): 145-225.
36. Halliwell B: Free radicals, reactive oxygen species and human disease: Acritical evaluation with special reference to atherosclerosis. **Br J Exp Path** 1989; 70:737-757.
37. Hallwell B, Chirico S. Lipid peroksidation: Its mechanism, measurement and significance. **Am J Clin Nutr** 1993; 57: 715-725.
38. Hallwell B. Oxidative Stress. Nutrition and Health. Experimental Strategies for Optimization of Nutritional Antioxidant Intake in Human. **Free Radic Res** 1996; 25: 57-74.
39. Hinder RA, Stein HJ. Oxygen -derived free radicals. **Arch Surg** 1991; 126(1):104-105.
40. Hinsow DB, Sklor LA. Morphologic impact of celluler oxidant injury. **Am J Pathol** 1986; 123 :454-64.
41. Hochstein P, Atalah AS. The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibiton of mutation an cancer. **Mut Res** 1988; 202:363-375.
42. Hollan S. Free radicals in health and disease. **Heamatologia** 1995; 26(4):177-189.
43. Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, Lee YS, Tsai HD, Lin CS. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. **J Clin Lab Anal** 2002;16(3):127-131.
44. Hull MG, Glazener CM, Keliy NJ, et al. Population study of causes, treatment and outcome of infertility. **Br Med J** 1985; 291:1693-1697.
45. Hull MG, Williams JA, Ray B, McLaughlin EA, Akande VA, Ford WC. The contribution of subtle oocyte or sperm dysfunction affecting fertilization in endometriosis-associated or unexplained infertility: a controlled comparison with tubal infertility and use of donor spermatozoa. **Hum Reprod** 1998;13(7):1825-1830.

46. Ignatowicz E, Rybczynska M. Some biochemical and pharmacological aspects of free radikal-mediated tissu damage. **Pol J Pharmacol** 1994; 46(3):103-114.
47. Ivvasaki A, Gagnon C. Formation of reacnve oxygen species in spermatozoa of inferdle patients. **Fertil Steril** 1992; 57: 409.
48. İnci E, Civelek S, Seven A and et. al. Larengeal cancer: in relation to oxidative stress. **Tohoku J of Exp Med** 2003; 200(1):17-23.
49. Kehrer JP, Smith CV. Free Radicals in Biology:Sources,Reactivities and Roles in the etiology of human disease. In: FREI B. Editor. **Natural Antioksidants in Human Health and Disease. San Diego; Acedemic Press**1994; 25-62.
50. Kendler BS. Free radicals in heath and disease:İmplications for primary health care providers. **Nurse pract** 1995; 20(7):29-36.
51. Knapp PM, Kulb TB, Lingeman JE: Extracorporeal shock wave lihotripsy induced perirenal hematoma. **J Urol** 1998; 139: 700-703.
52. Knight JA: Diseases related to oxygen-derived free radicals. **Ann Clin Lab Sci** 1995; 25(2):111-121.
53. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. **Hum Reprod** 1991; 6(7):987-991.
54. Koca Y, Ozdal OL, Celik M, Unal S, Balaban N. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertil men. **Arch Androl** 2003; 49(5); 355-359.
55. Koksall IT, Usta M, Orhan I, Abbasođlu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. **Asian J Androl** 2003; (5), 95-99.
56. Kumaragrupan R, Subapriya R, Viswanathon P. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in ppatients with adenicarcinoma of the breast. **Clin Chim Acta** 2002; 325:165-170.
57. Lamb EJ. Prognosis for the infertile Couple. **Fertil Steril** 1972; 23: 320-325.
58. Ledwozyw A, Michalak J, Steplen A and et al. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. **Clin Chim Acta** 1986; 155: 275-284.
59. Levy RD, Oosthuizen MM, Degiannis E and et.al. Glutathione-linked enzymes in benign and malignant oesophageal tissue. **Br J Cancer** 1999; 80(112):32-37.
60. Lowy DF, Base R, Simo AA. Evidence for a high free radical state in low-grade astrocytomas. **Neurosurgery** 1997; (41)146-150.

61. Manju V, Sailaja S, Nalini N. Circulating lipid peroxidation and antioxidant status in cervical cancer; a case-control study. **Clin Biochem** 2002; 35:621-625.
62. McCord JM. Oxygen-derived free radicals. **New Horiz** 1993; 1(1) 70-76.
63. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. **Adv Exp Med Biol** 1994; 366:17-27.
64. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M. Pathological Aspects of Active Oxygens/Free Radicals. **Jpn J Physiol** 1996; 46: 15-32.
65. Neno M, Ichimura S, Mita K, Yukawa O, Cartwright IL. Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. **Cancer Res** 2001 1;61(15):5885-94.
66. Nikiforova NV, Khodyreva LA, Kirpatovskii VI, Chumakov AM. Lipid peroxidation in malignant tumors of human kidneys. **Bull Exp Biol Med** 2001;132:1096-1099.
67. Nishida K, Ohta Y, Kobayashi T. Involvement of xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **Digestion** 1997; 58: 340-351.
68. Oberley LW, Oberley TD. Free radicals, aging and degenerative diseases. Alan R Liss, New York 1986; 325-371.
69. Oehninger S. Pathophysiology of oligoasthenozoospermia: are we improving in the diagnosis?. **Reprod Biomed Online** 2003 ; 7(4):433-439.
70. Öner-İyidoğan Y, Genç S, Koçak H, Akkuş E. Seminal plazma superoksit dismutaz ve total antioksidan düzeylerinin erkek infertilitesine etkileri. **Türk Üroloji Dergisi** 2003; 29(3):296-300.
71. Özdemirler G, Pabuççuoğlu H, Bulut T. Increased lipoperoxide levels and antioxidant system in colorectal cancer. **J Canc Res Clin Oncol** 1998; 124:555-559.
72. Perinondi NL, Thomson W, Schmid HHO. Diabetic heart and Kidney exhibit increased resistance to lipid peroxidation. **Biochim Biophys Acta** 1990;1047:63-69.
73. Polat MF, Taysi S, Gül M and et.al. Oxidant/antioxidant status in blood of patients with malignant breast tumour and benign disease. **Cell Biochem Funct** 2002; 20:327-333.
74. Poli G. Liver damage due to free radicals. **British Med Bulletin** 1993; 49:604-620.

75. Prior LR and Cao G. In vivo total antioksidan capacity: compparasion of different analytical methods. **Free Radikal Biology & Medicine** 1999; 27:1173-1181.
76. Rao GM, Rao AV, Rajo A. Lipid peroxidation in brain tumors. **Clin Chim Acta** 2000; 302:205-211.
77. Reilly PM , Schiller HJ, Bulk GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am J Surg** 1991; 161(4) 488-503.
78. Riley PA: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **Int J Radiat Biol** 1994; 65(1):27-33.
79. Roob JM, Khoschsorur G, Tiran A, et al. Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. **J Am Soc Nephrol** 2000;11:539-549.
80. Sabitha KE, Shyamalodev CS. Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy. **Oral Oncol** 1999;.35:273-277.
81. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertil Steril** 2003; 79 Sup.3:1597-1605.
82. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell count and oxidative stres in men treated at an infertility clinic. **J Androl** 2001; 22(4):575-583.
83. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Hum Reprod** 1999; 14(11):2801-2807.
84. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol** 1997; 82(2):291-295.
85. Sies H. Stratetegie of antioxidant defense. **Eur J Biochem** 1993; 215(2):213-219.
86. Sigman M, Jarow JP. Male infertility, in Campbell Urology. (Eds. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ). ed 18 Saunders, Philadelphia, 2002; Vol:2, 1475-1515.
87. Southorn PA. Free Radicals in Medicine I. Chemical Nature and Biological Reactions. **Mayo Clin Proc** 1988; 63: 381-389.

88. Southorn PA, Powis G. Free radical in medicine. II. involvement in human disease. **Mayo Clin Proc** 1988; 63:390-408.
89. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil Steril** 2003; 80(3): 531-535.
90. Wetberg AB, Weitzman SA, Clarck EP. Effects on antioxidants induce sister chromatid exchange formation. **J Clin Invest** 1985; 75: 1835-1837.
91. Yaman O, Soygur T, Yilmaz E, Elgun S, Keskinoglu A, Gogus O. The significance of testicular reactive oxygen species on testicular histology in infertile patients. **Int Urol Nephrol** 1999; 31(3):395-399.
92. Yoshimura S, Suemizu H, Taniguchi K, et al. The human plasma glutathione peroxidase encoding gene: Organization sequence and localization to chromosome 5q 32. **Gene** 1994; 145: 293-297.

