

FARKLI TESTİKÜLER PATOLOJİLERDE LİPİT PEROKSİDASYON DÜZEYİ

PEROXIDATION LEVELS IN DIFFERENT TESTICULAR PATHOLOGIES

KADIOĞLU, A., KÖKSAL, İ.T., ABBASOĞLU, S., ORHAN, İ., UYSAL, M.

ÖZET

Lipit peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan malondialdehid (MDA) düzeyi serbest oksijen radikallerinin yarattığı hasarın indirekt göstergesidir.

İnfertil grupta değişik testiküler patolojilerde MDA düzeyini tespit etmek için 25 hasta çalışmaya alındı. Bu hastalardan ayrıntılı seksüel anamnez alındı ve fizik muayene yapıldı. Tüm hastalar semen analizi (2 kez), FSH ve serbest testosteron düzeyleri, testis biopsisi / touch imprint ve varikoselden şüphe edildiğinde renkli Doppler ultrasonografi ile değerlendirildi. Testis biopsi örneklerindeki MDA düzeyleri Buege ve Aust yöntemi ile ölçüldü ve sonuçlar pikomol MDA / mg. doku olarak verildi.

Histopatolojik inceleme sonucunda 10 (%40) hastada hipospermatogenez, 7(%28) hastada germ hücre aplazisi, 4(%16) hastada geç maturasyon arresti, 2(%8) hastada germ hücre aplazisi ve fokal spermatogenez, 2(%8) hastada normal spermatogenez saptandı. MDA düzeyleri normal spermatogenez grubunda 15.30 ± 4.66 pmol/mg. doku, geç maturasyon arresti grubunda 49.56 ± 19.70 pmol/mg. doku, germ hücre aplazisi grubunda 36.99 ± 20.12 pmol/mg. doku, germ hücre aplazisi ve fokal spermatogenez grubunda 40.96 ± 10.01 pmol/mg. doku ve hipospermatogenez grubunda ise 43.74 ± 22.65 pmol/mg.doku olarak tespit edildi. Malondialdehid düzeyleri normal spermatogenez grubunda en düşük iken geç maturasyon arrestinde en yüksek bulundu.

Malondialdehid düzeyinin serbest oksijen radikalleri ile süregelen hücre hasarının iyi bir göstergesi olduğu ve herhangi bir etyolojik neden bulunamayan infertil hastalarda, testiste MDA düzeyinin tespiti ile antioksidan tedavi uygulanabilecek hasta gruplarının tespit edilebileceği düşünüldü.

ABSTRACT

The level of malondialdehyde, which is an end product lipid peroxidation, is an indirect indicator of injury induced by reactive oxygen species (ROS).

In order to determine the level of lipid peroxidation in different testicular pathologies among infertile group, 25 infertile men were enrolled to the study. All patients were evaluated by detailed history, physical examination, semen analyses (2 times), serum FSH and free testosterone levels, testicular biopsy and touch imprint. Scrotal color Doppler ultrasonography was performed when varicocele was suspected.

The level of malondialdehyde, which is an indirect indicator of injury induced lipid peroxidation, was measured by the thiobarbituric acid test according to the method suggested by Buege and Aust and results were expressed as picomol MDA/mg. tissue.

Histopathological examination revealed hypospermatogenesis in 10 (40%), germinal cell aplasia in 7 (28%), late maturation arrest in 4 (16%), germinal cell aplasia and focal spermatogenesis in 2 (8%) and normal spermatogenesis in 2 (8%) patients. The mean malondialdehyde level (picomol MDA/mg tissue) in normal spermatogenesis group

ANAHTAR KELİMELER: Serbest oksijen radikalleri, infertilite, testis biopsi

KEY WORDS: Reactive oxygen species, infertility, testicular biopsy

Dergiye geliş tarihi: 18.03.1998

Yayına kabul tarihi: 02.07.1998

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji ABD, İstanbul
İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, İstanbul

was 15.3 ± 4.66 picomol MDA/mg tissue while mean levels of 49.56 ± 49.70 , 36.99 ± 20.12 , 36.46 ± 13.42 and 35.22 ± 22.65 picomol MDA/mg tissue were observed in late maturation arrest group, germinal cell aplasia group, germinal cell aplasia and focal spermatogenesis group and hypospermatogenesis group, respectively. These data indicate that the level of malondialdehyde is lowest in normal spermatogenesis group while it is highest in late maturation arrest group.

Our initial data suggest that, determination of MDA level which is an indirect indicator of injury induced by lipid peroxidation may establish infertile men of idiopathic origin as candidates for antioxidant therapy.

GİRİŞ

Son yıllarda infertilite üzerinde yoğunlaşan çalışmalar, herhangi bir neden tespit edilemeyen idiopatik infertilitede serbest oksijen radikallerinin (SOR) önemli bir rolü olduğunu göstermiştir.¹⁻⁵

Ejerkülatta hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil iyonu ($HO\cdot$), peroksil iyonu ($ROO\cdot$) en sık tespit edilen SOR'dur.¹⁻⁶ Bu radikaller özellikle doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna yol açarlar. Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan son ürün malondialdehidir.⁸⁻¹⁰ MDA stabil bir bileşik olup çeşitli yöntemlerle tespit edilebilmektedir. Bunlar arasında çeşitli spektrofotometrik, fluorometrik veya yüksek performanslı lipid kromatografisi (HPLC) gibi kromatografik yöntemler sayılabilir. Bu yöntemler arasında en çok kullanılan, MDA veya MDA'ya benzer bileşiklerin tiobarbitürik asit ile girdiği reaksiyona dayanan yöntemdir.^{8,9,11,12}

Bu çalışmanın amacı, infertilite nedeniyle başvuran hastalardan alınan testis biopsi örneklerinde MDA düzeylerini tespit ederek böylece farklı testiküler patolojilerde lipid peroksidasyonunu ve dolayısıyla a serbest oksijen radikallerinin yarattığı hasarı araştırmaktır.

MATERYAL-METOD

İnfertilite nedeniyle polikliniğimize başvuran 25 hasta çalışmada değerlendirildi. Hastalardan ayrıntılı seksüel anamnez alınarak öz ve soygeçmişleri sorgulandı. Hastaların eşleri de jinekolojik açıdan değerlendirildi. Hastalara yapılan fizik muayenede varikoselden şüphe edildiğinde renkli Doppler ultrasonografi yapıldı. Tüm hastalara Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kriterlerine uygun olarak en az 2 kez spermiogram yapıldı. Serum FSH ve serbest testosteron düzeyleri tespit edildi.

Testis biopsisi ve touch imprint örnekleri lokal

anestezi altında açık biopsi (pencere tekniği) tekniği ile alınarak Bouin solüsyonu içinde patoloji laboratuvarına gönderildi ve rutin boyamaları (Hemotoksilen-Eosin) takiben ışık mikroskopu ile değerlendirilip histopatolojik olarak aşağıda belirtilen şekilde sınıflandırıldı.

- Normal spermatogenez
- Hipospermatogenez
- Maturasyon arresti (erken, geç)
- Germ hücre aplazisi ve fokal spermatogenez
- Germ hücre aplazisi

Testis biopsi örneklerinde MDA düzeyleri Bu-ge ve Aust yöntemine göre ölçüldü (11). Biopsi örnekleri, %15 triklorasetik asit, %0.375 tiobarbitürik asit, 0.25 N HCl içinde homojenize edildi. Homojenat 15 dk kaynar su banyosunda bekletildikten sonra 1000 xg'de 10 dk santrifüj edildi. Örneklerin absorbansları 535 nm'de köre karşı okundu. Standart olarak 1,1,3,3, tetraetoksipropen kullanıldı ve sonuçlar pikomol MDA/mg doku olarak verildi.

Farklı histopatolojik gruplar arasında MDA düzeyleri Student's t testi kullanılarak karşılaştırıldı ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışmada değerlendirilen 25 hastanın yaşları 21 ile 45 arasında değişmekte olup ortalama 29.68 ± 4.98 'dir. Hastalarda tespit edilen infertilite nedenleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu çalışmada varikosel en sık infertilite nedeni olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1. Hastaların tespit edilen infertilite nedenlerine göre dağılımı

İnfertilite nedenleri	n	%
Varikosel	15	60
Obstrükiyon	2	8
Testiküler yetersizlik	4	16
İdiopatik	4	16

Tablo II. Histopatolojik dağılıma göre malondialdehit düzeyleri

Histopatoloji	n	MDA düzeyi pikamol MDA/mg doku
Germ hücre aplazisi	7	36.99±20.12
Germ hücre aplazisi ve fokal spermatogenez	2	40.96±10.01
Geç maturasyon arresti	4	49.56±19.70
Hipospematogenez	10	43.74±22.65
Normal spermatogenez	2	15.30±04.66*

* Malondialdehit (MDA) düzeyi normal spermatogenezde en düşük iken, geç maturasyon arrestinde en yüksek bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. (p<0.05)

Hastaların yapılan spermiogramları sonucunda 14 (%56) hastada azospermi, 7(%28) hastada oligo-asthenozoospermi, 3(%12) hastada normospermi ve 1(%4) hastada asthenozoospermi tespit edildi.

Histopatolojik inceleme ve MDA düzeyleri tablo 2'de gösterilmiştir. Bu tabloda görüldüğü üzere 10(%40) hastada hipospematogenez, 7(%28) hastada germ hücre aplazisi, 4(%16) hastada geç maturasyon arresti, 2(%8) hastada germ hücre aplazisi ve fokal spermatogenez ve 2(%8) hastada ise normal spermatogenez tespit edildi.

Bu histopatolojik gruplarda ölçülen MDA düzeylerine göre en yüksek düzey geç maturasyon arresti grubunda tespit edilmiş olup bu değer 49.56±19.70 pikamol/mg doku'dur. En düşük değer ise normal spermatogenez grubunda olup bu değer 15.30±4.66 pikamol/mg doku'dur (tablo 2). Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05). Hipospematogenez, germ hücre aplazisi, germ hücre aplazisi fokal spermatogenez grubunda da MDA düzeyi normal spermatogenez göre anlamlı (p<0.05) olarak yüksek bulunmasına rağmen bu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05).

Bu çalışmada en sık etyolojik neden olarak tespit edilen varikozel ile MDA düzeyi arasındaki ilişki tablo 3'de verilmiştir. Bu tabloya göre varikozel tespit edilen grupta MDA düzeyi 38.34±22.92 pikamol/mg iken varikozel tespit edilmeyen grupta 33.49±18.93 pikamol/mg doku bulunmuştur. Bu 2 grup arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (p>0.05).

TARTIŞMA

Serbest oksijen radikalleri en dış yörüngede tek sayıda eşleşmemiş elektron içeren ve moleküller oksijenden kaynaklanan atom veya moleküllerdir. Bu konfigürasyonları nedeniyle çok aktif ve kararsız bileşiklerdir. Normalde hücre içinde çok küçük konsantrasyonlarda bulunan serbest oksijen radikalleri özellikle membran ve nükleik asitlerdeki anahtar moleküller ile reaksiyon girerek direkt hücre hasarı yaptıkları gibi otokatalitik reaksiyonları başlatarak yeni radikallerin oluşumuna da yol açıp zincirleme reaksiyonlara neden olurlar. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil iyonu (HO^-) ve peroksil iyonu (ROO^-) en sık tespit edilen serbest oksijen radikalleri olup bu radikaller hücrenin çeşitli organellerindeki oksidatif enzimler tarafından katalize edilen reaksiyon sırasında oluşurlar. (Örn.: Mitokondri - solunum zinciri enzimleri, membran - NADPH oksidaz, endoplazmik retikulum - P - 450 oksidaz, peroksizom - oksidazlar, sitozol - sitozolik enzimler v.b.). Bunlar hücrelerdeki çeşitli enzim sistemleri ile etkisiz hale getirilirler. Bu enzim sistemlerinin en önemlileri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz/redüktazdır. Serbest oksijen radikallerinin (SOR) yapımı ve yıkımı arasındaki dengenin bozulması sonucunda hücre içindeki SOR düzeyi artar ve hücre hasarı meydana gelir.^{6,13-17}

Spermatozoa, plazma membranındaki fazla sayıdaki doymamış yağ asitleri nedeniyle serbest oksijen radikallerinin etkisine son derece duyarlıdır. Yapılan çalışmalar ile spermatozoada serbest oksijen radikalleri ve antioksidan sistemler gösterilmiştir. Bu antioksidan enzimler spermatozoada süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz/redüktaz ve daha az olmak üzere katalazdır, özellikle seminal plazmada bulunmaktadır. Bundan dolayı spermatozoa için en toksik SOR hidrojen peroksit (H_2O_2)'dir.^{5-7,14,18,19}

İnfertil erkeklerde SOR ile ilgili çalışmaların büyük bir kısmı ejakülat üzerinde yapılmış olup bu çalışmalarda SOR kaynağı olarak 3 hücre gösterilmiştir. Bunlar morfolojik olarak anormal sper-

Tablo III. Varikozel ve malondialdehit düzeyi

	n	MDA düzeyi pikamol MDA/mg doku
Varikozel (+)	15	38.34±22.92
Varikozel (-)	10	33.49±18.93

matozoa, morfolojik olarak normal fakat biyokimyasal ve fonksiyonel olarak defektif spermatozoa ve polimorfonükleer lökosit (PMN) özellikle de granülosittir. Aktif bir PMN herhangi bir spermatozoaya göre 1000-10.000 kez daha fazla SOR üretir. SOR düzeyi ile sperm motilitesi arasında negatif ilişki vardır. Ayrıca SOR düzeyinde artma ile sperm-oosit füzyonunda ve viabilitede azalma tespit edilmiştir. SOR düzeyinin arttığı bazı hastalarda semende spermatozoada özellikle orta bölümde morfolojik defekt tespit edilmiştir. Bilindiği üzere spermatozoanın bu bölümünde antioksidan enzim sistemleri (SOD, glutatyon peroksidaz/redüktaz ve az oranda katalaz) bulunmaktadır.^{3-7,12,20-22}

Serbest oksijen radikalleri özellikle doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna yol açarlar. Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan son ürün malondialdehit olup stabil bir bileşiktir ve lipid peroksidasyonunun indirekt göstergesidir. Dolayısıyla lipid peroksidasyonu serbest oksijen radikallerinin yarattığı hasarın bir göstergesidir. MDA düzeyi çeşitli yöntemlerle tespit edilebilmektedir. En sık kullanılan yöntem tiobarbitürik asidin MDA ile girdiği reaksiyona dayanan yöntemdir.⁸⁻¹²

Testis dokusunda lipid peroksidasyonunun araştırıldığı çok az çalışma vardır. Bu çalışmalar deney hayvanlarında yapılmış olup, insan testis dokusunda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada MDA düzeyi normal spermatogenezde en düşük tespit edilirken, en yüksek maturasyon arrestinde bulunmuştur. Hipospermatoenez, germ hücre aplazisi, germ hücre aplazisi ve fokal spermatogenez grubunda da MDA düzeyi normal spermatogeneze göre anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen bu gruplar arasında arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Bu sonuçlara göre MDA düzeyi hücre hasarı ile iyi bir korrelasyon göstermektedir.

Testiste 3 ayrı hücre grubu bulunmaktadır. Bunlar germ hücreleri, Leydig ve Sertoli hücreleridir. Bu hücrelerin hepsinde serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Maturasyon arrestinde ve hipospermatoenezde SOR kaynağı muhtemelen defektif germ hücreleri olarak düşünülmekte iken germ hücre aplazisinde germ hücrelerinin olmaması SOR kaynağı olarak diğer hücreleri yani Sertoli ve Leydig hücrelerini düşündürmektedir.^{23,24}

Bu çalışmada erkek infertilitesinin en sık etyolojik nedeni olarak varikozel tespit edilmiştir. Varikozel nedeniyle oluşan hipoksi ve ısı artışı serbest oksijen radikallerinin oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Varikozel bu çalışmada 15 hastada tespit edilmiş olup bu grupta MDA düzeyi 38.34 ± 22.92 pikamol/mg doku tespit edilmiştir, r. varikozel bulunamayan 10 hastada ise 33.49 ± 18.93 pikamol/mg doku bulunmuş olup bu iki grup arasında istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Peltola ve arkadaşları sıçanlarda kriptorşitik testislerde lipid peroksidasyonunu araştırmışlar ve MDA düzeyini yüksek bulmuşlardır. Bunuda özellikle $37-40^{\circ}\text{C}$ 'de instabil olan SOD'nin inaktivasyonunda ziyade ısı artışıyla artan metabolizma hızına bağlı SOR'un fazla yapılmasına bağlamışlardır. Bundan dolayı varikozel ile SOR arasında ilişkiyi tespit etmek için varikozel oluşturulan ve MDA düzeyi ile koruyucu enzimleri araştıran hayvan deneylerine ihtiyaç vardır.^{23,25-27}

Sonuç olarak malondialdehit düzeyi, serbest oksijen radikalleri ile süregelen hücre hasarının iyi bir göstergesi olabilir. Böylece herhangi bir etyolojik neden bulamadığımız infertil hastalarda testiste MDA düzeyinin tespiti ile antioksidan tedavi düşünülen hasta grupları tespit edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Iwasaki A and Gagnon C: Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil. Steril.* 57:409,1992.
2. D'Agata R, Vicari E, Moncada M et al: Generation of reactive oxygen species in subgroups of infertile men. *Int. J. Androl.* 10:214,1991.
3. Aitken R.J., Clarkson J.S., Hargreav T.B.: Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J. Androl.* 10:214,1989.
4. Agarwal A., Ikemoto I., Lounhlin R: Relationship on sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J. Urol.* 152:107,1994.
5. Alkan İ., Şimşek F., Goncagül H., et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: Relationship to seminal plasma antioxidants. *J. Urol.* 157:140,1997.
6. Sikka S.C., Rajasekaran M., Hellstrom W.J.G.: Role of oxidative and antioxidants in male infertility. *J. Androl.* 16:464,1994.
7. Gagnon C., Iwasaki A., de Lamirande E et al: Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad sci* 637:436,1991.
8. Wang Y., Sharma R.K., Agarwal A: Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. *Urology* 50:409,1997.

9. Hellstrom W.J., Bell M., Wang R et al. Effect of sodium nitroprusside on sperm motility, viability, and lipid peroxidation. *Fertil Steril* 61:1117,1994.
10. Hong C.Y., Lee M.F., Lil L.J., et al: Effect of lipid peroxidation on beating frequency of human sperm tail. *Andrologia* 26:61,1994.
11. Buege J.A., and aust S.D.:Microsomal lipid peroxidation. *Methods enzymology* 52:302,1978.
12. Aitken R.J., Harkiss D., Buckingham D.W.: Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 35:302,1993.
13. Cotran R.S.:Cellular injury and cellular death. In: Basic pathology. Ed:Robinson S.L., Kumar V. Philadelphia WB Saunders Co. Chapt:1,pp:11,1996.
14. Alvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L., et al:Spontaneous lipid peroxidation and production of peroxide and superoxide in human spermatozoa: Superoxide dismutase was major enzyme protectant oxygen toxicity. *J Androl* 8:338,1987.
15. Fridavich I: Superoxide radical. Endogenous toxicant. *Ann. Rev. Toxicol.* 23:239,1983.
16. Kettener B: Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica* 16:957,1986.
17. Porter N.A: Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in enzymology.* 105:273,1984.
18. Alvarez J.G., Storey B.T.:Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 24:185,1989.
19. Aitken R.J., Clarkson J.S., Fiahel S.: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* 40:183,1989.
20. Aitken R.J., Bunckingham D., West K., et al:Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J. Reprod. Fert.* 94:451,1992.
21. Kovalski N.N., de Lamirande E., Gagnon C.: Determination of neutrophil concentration in semen by measurement of superoxide radical formation. *Fertil Steril* 56:946,1991.
22. Kovalski N.N., de Lamirande E., Gagnon C: Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: Protective effect on seminal plasma and scavenger. *Fertil Steril* 58:809,1992.
23. Peltola V., Huhtaniemi I., Ahotupa M.: Abdominal position of the rat testis in associated with high level of lipid peroxidation. *Biol Reprod.* 3:1146,1995.
24. Jow W.W., Schlegel P.N., Cichon Z., et al: Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. *J. Androl.* 14(6):439,1993.
25. Sigman M., Howards S.:Varicocele. In: Campbell's Urology. Ed: Walsh P.C., Gittles R.F. et al. Philadelphia W.B. Saunders Co. pp: 682,1992.
26. Turek P.J., Lipshultz I.L.:The Varicocele Controversies 1. Etiology and Pathology. In: AUA Update Series. Ed: Ball PT, Donald EN pp:106-111,1955.
27. Turek P.J., Lipshultz I.L.:The Varicocele Controversies 2. Diagnosis and Management. In: AUA Update Series. Ed: Ball P.T., Donald E.N. pp: 114-119,1995.