

VARİKOSELLİ HASTALARIN SEMEN PLAZMASINDA ANTİOKSİDAN SEVİYESİ

LEVELS OF ANTIOXIDANTS IN THE SEMINAL PLASMA OF VARICOCELES

GÜMÜŞ B.*, UYANIK B.S.**, LEKİLİ M.*, YİĞİTOĞLU M.R.**, TEMELTAŞ G.*, BÜYÜKSÜ C.*

* Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, MANİSA

** Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, MANİSA

ÖZET

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) sperm membranında harabiyet yaptığı ve sperm motilitesini inhibe ettiği bilinmektedir. Semendeki süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz gibi antioksidanlar sperm ROS'un harabiyetinden korurlar.

Çalışmamızda, varikozel ve normal kontrol grubunun semen plazmasında süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz düzeylerini araştırdık.

22 varikozelli ve 10 sağlıklı kişi çalışmaya dahil edildi ve semenleri alındı. GPX (Randox-Ransel Ireland), SOD (Randox-Ransod Ireland) kitleriyle, sırasıyla Paglia-Valentine ve enzimatik fotometrik metotları kullanılarak ölçüldü.

GPX değerleri varikozelli hastaların semen plazmasında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek (254 ± 50.8 U/L, 214 ± 19.2 U/L, $p < 0.05$), SOD düzeyi ise düşük (42.3 ± 15.9 U/mL, 63.9 ± 18.5 U/mL, $p < 0.05$) bulundu. SOD değerinin düşük bulunması spermatozoonun sayısı ile ilgili gibi gözükmektedir. Bu bulgular varikozelin semende ROS' un zararlı etkine neden olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Varikozel, semen plazması, antioksidan, infertilite

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are known to cause damage to the sperm membrane and inhibit sperm motility. Antioxidants in semen such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase protect spermatozoa from ROS damage.

In our study, we researched levels of SOD and GPX in seminal plasma of both varicoceles patients and healthy control group.

Twenty-two varicoceles patients and 10 healthy control men were included in this study. GPX (Randox-Ransel Ireland), SOD (Randox-Ransod Ireland) levels were measured by using Paglia-Valentine and enzymatic photometrical (xanthine oxidase) methods respectively.

GPX levels were higher as statistically in seminal plasma of study group than control group (254 ± 50.8 U/L, 214 ± 19.2 U/L, $p < 0.05$). Levels of SOD were measured low in study group than control group (42.3 ± 15.9 U/mL, 63.9 ± 18.5 U/mL, $p < 0.05$). Levels of SOD seem to be related with the number of spermatozoa.

These findings suggest that varicocele may cause harmful effect of ROS in the seminal plasma.

Key Words: Varicocele, seminal plasma, antioxidant, infertility

GİRİŞ

Varikozel, erkeklerde infertilitenin en önemli nedenlerinden biri olarak düşünülmektedir. İnternal ve eksternal spermatik venöz sistemin dilatasyonu ile seminal değişiklikler arasındaki ilişki bir çok çalışmada gösterilmiştir^{1,2}. Reaktif oksijen türlerinin (ROS), yani serbest radikallerin infertilitenin temelini oluşturan sperm morfoloji ve motilitesini etkilediği bilinmektedir. Sperm, membranında poliansatüre yağ asitleri oranının yüksek olması ve antioksidatif mekanizmaların yetersizliği dolayısıyla ROS'tan kolayca etkilenmektedir^{3,4}. Seminal plazmada ise, bir çok antioksidanın oluşturduğu sistem içinde yer alan

glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimler sperm ROS'un yapacağı harabiyetten korurlar⁵⁻⁷. Seminal plazmadaki total antioksidan kapasitenin fertil sağlıklı erkeklerde astenozoospermik erkeklerden önemli derecede yüksek olduğu ileri sürülmektedir⁸⁻¹⁰. Çalışmamızda varikozel vakalarında, infertilite nedeni olabilecek ROS üretimine karşı seminal plazma antioksidan süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz düzeylerini araştırdık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma grubuna genel ürolojik muayene sırasında klinik olarak varikozel saptanan 22 hasta

ile 10 sağlıklı kontrolü dahil ettik. Çalışmaya üri-
ner sistem enfeksiyonu olan ve infertilite nedeni
ile tedavi gören hastalar dahil edilmedi. Hastala-
rın 3 günlük cinsel perhiz sonrası spermiogram-
ları elde edildi, alınan semen numunelerinin bir
kısmı antioksidan enzim analizi için 2000 rpm de
10 dakika santrifüj edildi. Üst tabaka (süperna-
tan), seminal plazma GPX ve SOD ölçümünde
kullanılmak üzere ayrılarak, analize kadar -20°C
de saklandı. Seminal plazma süperoksit dismutaz
(SOD) değerleri, ksantin ve ksantin oksidaz
kombinasyonu ile oluşturulan süperoksit radikal-
lerinin neden olduğu nitroblue tetrazolium redük-
siyonunun inhibisyon derecesi ile korele bir şekilde
enzimatik fotometrik yöntemle (Ksantin- ksantin
oksidaz) Ransod kitleri (Katalog no: SD 125,
Randox Laboratories, Ireland) kullanılarak ölçül-
dü¹².

GPX aktiviteleri ölçümünde ise, Paglia Va-
lentine'nin substrat olarak hidrojen peroksiti kul-
landığı yöntemin bir modifikasyonu enzimatik-
UV Ransel kitleri (Katalog no: RS 504, Randox,
Ireland) kullanıldı. GPX ve hidrojen peroksinin
etkisiyle oluşturulan oksit glutatyon (GSSG),
glutatyon redüktaz (GSSG-RD) ve NADPH ile
redükte edilmesiyle, GPX aktivitesi ile orantılı
olarak azalan NADPH konsantrasyonunun absor-
bansı 340 nm dalga boyunda ölçüldü¹¹.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde
SPSS programında, nonparametrik testler; grup-
lar arası farklılıklar için Mann-Whitney U Testi,
veriler arasındaki ilişkiler için Sperman Correla-
tion Analizi kullanıldı.

BULGULAR

Kontrol hastaları ile karşılaştırıldığında va-
rikoselli hastaların semen analizinde sırasıyla
motilite 30. dakikada %49.3(10.0-90.0), kontrol-
lerde %63.0 (50.0-70.0) ($p<0.05$), 60. dakikada
%39.5 (0-80.0), %54.5 (40.0-70.0) ($p<0.05$), sayı
varikosellilerde $13.4 (0.6-64.0)\times 10^6/\text{ml}$ ve kont-
rollerde $30.2 (16.5-46.6)\times 10^6/\text{ml}$ ($p<0.05$) idi.
İstatistiksel olarak anlamlı bir azalma mevcuttu.
Bu bulgular tablo 1 de özetlenmiştir.

Varikosel vakalarında, Tablo 2'de görüldü-
ğü gibi ortalama semen plazma glutatyon perok-
sidaz (554.1 ± 50.8) değerleri kontrollere ($214.4\pm$
 19.2) göre yüksek bulundu. Bu değerler istatis-
tiksel olarak ta anlamlıydı ($p<0.05$). Varikosel

grubunda semen süperokside dismutase ($42.3\pm$
 15.9) düzeyleri ise, sağlıklı kontrol grubu ($63.9\pm$
 18.5) ile karşılaştırıldığında; daha düşüktü ve bu
istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Bu antioksidan enzimlerin grup içi ilişkileri
araştırıldığında, hem hasta ($r:0.66$, $p<0.05$) hem
de kontrollerde ($r:0.89$, $p<0.01$) pozitif olarak
korele olduğu görüldü (Tablo 3).

	n	Motilite - 30 dk (%)	Motilite - 60 dk (%)	Sayı ($\times 10^6/\text{ml}$)
Vari- kosel	22	49.3 (10.0-90.0)	39.5 (0-80.0)	13.4 (0.6-64.0)
Kon- trol	10	63.0 (50.0-70.0)	54.5 (40.0-70.0)	30.2 (16.5-46.6)
P		$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.05$

Tablo 1. Kontrol ve varikoselli hastaların semen analiz para-
metreleri

Antioxidan enzimler		GPX (U/L)	SOD (U/mL)
GRUPLAR	Varikosel Mean $\pm$ SD	254.1 ± 50.8	42.3 ± 15.9
	Kontrol Mean $\pm$ SD	214.4 ± 19.2	63.9 ± 18.5
Z		3.27	2.74
p		<0.05	<0.05

Tablo 2. Varikosel ve kontrol grubu semen plazması ortalama süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz düzeyleri ve istatistiksel farklılıkları (Z: Mann Whitney U testi farklılık kat-sayısı)

	Varikosel		Kontrol	
	r	p	r	p
GPX - SOD	0.66	<0.05	0.89	<0.01

Tablo 3. Varikosel ve kontrollerde semen plazmaları süper-
oksit dismutaz, glutatyon peroksidaz enzimleri korelasyon
analizleri (r: korelasyon katsayısı (Spearman))

TARTIŞMA

Reaktif oksijen türleri (ROS) birçok hücre
tipinde sekonder haberci olarak fonksiyonel role
sahiptir. Bununla birlikte üretimleri kontrol edi-
lemezse, çeşitli patolojilerin etiolojisinde ve ö-
zellikle erkek infertiliterinde önemli bir faktör ola-
rak ortaya çıkarlar^{3-6,10}. Spermden ROS'un aşırı
üretimi motilite kaybı, morfolojik değişim ve
sperm oosit füzyon kapasitesi azalmasına yol
açarlar.

Zini ve arkadaşları, ROS üretiminin arttığı
infertilite gibi durumlarda, seminal plazma kata-
laz aktivitesinin arttığı fakat süperoksit dismutaz
enziminin artmadığı ya da etkilenmediğini ileri
sürmektedirler¹³.

Çalışmamızda varikoselli vakaların ortalama semen plazma SOD düzeyleri kontrol grubunun ortalama değerlerine göre düşük bulunmakla birlikte grup içinde de farklılıklar vardı. SOD aktivitesini çeşitli faktörler etkilemektedir. Bunlar sırasıyla, sperm dansitesi, spermilerin hareket ve karakteristik özellikleri, oosit füzyon kapasitesi ile negatif olarak, peroksidatif hasarın enzimi indüksiyonu ile pozitif olarak görülür.

Bulgularımız, Randox kitleri kullanarak seminal plazmada total antioksidan, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivite ölçümlerini yapan Jedrzejczak P ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumludur¹⁴.

Sperm süspansiyonlarında diğer antioksidanlarda olduğu gibi, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivite ölçümleri için sensitif yöntemler geliştirilmiş olup, bunlar analizler içinde önerilmektedir. Çalışmamızda referans yöntemler kullanılmış olup, kalibrasyon ve kalite kontrolünden istenilen sonuçlar alınmıştır. Kontrol serumları; SOD: 196 36 U/mL ve GPX: 428 U/L (364-492) değerleri sırasıyla 210 U/mL ve 439 U/L olarak ölçülmüştür ($p<0.05$).

Bununla birlikte, total antioksidan kapasitenin infertil erkeklerde seminal plazmada önemli miktarda azaldığı bir çok araştırmada vurgulanmaktadır. İnsan spermalarında oksidatif hasar, onların fertilite kapasitesinde önemli azalmaya yol açar. Spermatozoolar, glutatyon peroksidaz ile hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik hidroperoksitleri inaktive etmek için redükte glutatyon (GSH) sağlayan, GPX ile onların bu serbest oksijen radikallerinin etkilerinden korumaktadır^{8,15,16}. Çalışmamızda, varikoseel vakalarının ortalama semen plazma GPX düzeyleri artmış olarak bulundu ($p<0.05$). Kontrollere göre anlamlı şekilde yüksek olması, bu vakalarda ROS üretimi artışını karşılamak, onları elimine etmek üzere GPX aktivitesinin indüklendiğini düşündürmektedir.

Giannattasio A ve arkadaşları, sağlıklı normal şahıslarda, seminal plazma GPX aktivitesinin, infertil hastalara göre daha yüksek olduğunu ve erkeklerde gonadal fonksiyonlar için çok yararlı yeni bir marker olarak kullanılmasını önermektedirler^{17,18}. Ayrıca varikoselin tedavisinden belli bir süre sonra (5-6 ay), sperm dansite, morfoloji ve fonksiyonlarının düzelmesini, sperm ve

seminal plazma antioksidan enzim ve sistemleri ile birlikte değerlendirmek gerekir^{19,20}.

İstatistiksel korelasyon analizlerinde, her iki grupta da SOD ve GPX düzeyleri arasında anlamlı pozitif ilişkiler vardı (sırasıyla $p<0.05$, $p<0.01$). Bu bulgu antoksidan çalışmalarında SOD ve GPX aktivitelerinin birlikte değerlendirilmesi gerektiği görüşlerini desteklemektedir. Literatürle birlikte çalışma bulgularımız, varikoselin spermatozoo üzerinde reaktif oksijen radikalleri ile zararlı etkilere ve seminal plazma değişikliklerine neden olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- 1- **Sigman M, Howards SS:** Male infertility, varicocele. In Campbell's Urology, Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED (Eds): 6th Ed., Vol. 1: Philadelphia, W.B. Saunders Company, 682-3, 1992.
- 2- **Haggag S, Rahoia MM, Meliegy A:** Role of scrotal scintigraphy in diagnosis of shunt type varicocele. Int. J. Androl., 20(1): 94, 1997
- 3- **Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W:** Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertil Steril, 67(1): 142-7, 1997.
- 4- **Aitken RJ, Fisher H:** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. Bioassays, 16: 259-67, 1994.
- 5- **Giriveau JF, Le-Lannou D:** Reactive oxygen species and human spermatozoa: Physiology and pathology. Int. J. Androl., 20(2): 61-9, 1997.
- 6- **Kurpisz M, Miesel R, Sanocka D, Jedrzejczak P:** Seminal plasma can be a predictive factor for male infertility. Hum. Reprod., 11(6): 1223-6, 1996.
- 7- **Aitken RJ, Buckingham DW, Carreras A, Irvine DS:** Superoxide dismutase in human sperm suspensions: Relationship with cellular composition, oxidative stress and sperm function. Free Radic. Biol. Med., 21(4): 495-504, 1996.
- 8- **Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Kurpisz M:** Oxidative stress and male infertility. J. Androl., 17(4): 449-59, 1996.
- 9- **Andrade Rocha FT, De carvalho PP:** General characteristics of the spermatozoa in oligozoospermic men with and without clinical varicocele. Rev.assoc. med. Brs., 43(1): 58-60, 1997.
- 10- **De Lamirande E, Gagnon C:** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: A balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum. Reprod., 10(Sup 1): 15-21, 1995.
- 11- **Paglia DE, Valentina WN:** Glutathione Peroxidase. J.Lab. Clin.Med. 70: 158, 1967.

- 12- **Nissen HP, Kreysel HN:** Superoxide dismutase in human serum. *Klin Woehenschr*, 61: 63-65, 1983.
- 13- **Zini A, Lamirande E, Gagnon C:** Reactive oxygen species in semen of infertile patients: Levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.*, 16: 188, 1993.
- 14- **Jedrzejczak P, Sanocka D, Kurpisz M:** Investigation of the antioxidant system in ejaculates of infertile patients applying Randox Test. *Int. J. Androl.*, 20 (Sup 1): 18, 1997.
- 15- **Shekarriz M, Thomas AJ, Agarwal A:** Effects of time and sperm concentration on reactive oxygen species formation in human semen. *Arch. Androl.*, 34(4): 69-75, 1995.
- 16- **Shekarriz M, Thomas AJ, Agarwal A:** Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. *Urology*, 45(1): 103-7, 1995.
- 17- **Giannattasio A, De Rosa M, Zarrilli S, De Chiara M, Paesano L, Metafora S, Lombardi G:** Glutathione peroxidase (GPX) activity in normal and pathological human seminal plasma. *Int. J. Androl.*, 20(Sup 1): 17, 1997.
- 18- **Palmieri G, Giannattasio A, Ricci G, Marino G, Biondi E, De Chiara M, Torino G, Torino G, Zarrilli S, Colao A, Lombardi G, Metafora S, Bianco AR:** Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma: A new marker of gonadal function in testicular cancer patients. *Int. J. Androl.*, 20(Sup 1): 5, 1997.
- 19- **Johnsen N, Johnsen I, Tauber R:** Semen analysis after treatment of varicocele by antegrade scrotal sclerotherapy. *Int. J. Androl.*, 20(Sup 1): 96, 1997.
- 20- **Bianco AM, Villemur JA, Perco AM, Zanchetti FJ:** Seminal alpha 1-4 glycosidase (A-G) and sperm morphology in varicocelectomized patients. *Int. J. Androl.*, 20(Sup 1): 97, 1997.