

VARİKOSELLİ OLGULARDA SPERMATİK VE PERİFERİK VENDEKİ OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS IN THE SPERMATIC AND PERIPHERAL VEINS OF PATIENTS WITH VARICOCELE

Mustafa KARALAR*, Murat ŞAMLI*, Emre TÜZEL*, Tülay KÖKEN**, Murat DEMİRBAŞ*, Cem GÜLER*

* Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, AFYON

** Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, AFYON

ABSTRACT

Introduction: It is suggested that oxidative stress has an important role in sperm dysfunction in patients with varicocele. The aim of this study was to determine the free oxygen radicals from peripheral and spermatic vein blood samples of the men with infertility or clinical varicocele before varicocelectomy.

Materials and Methods: A total of 18 patients with varicocele were recruited in this study. Semen analyzes of patients were evaluated at least two times. Blood samples of 2 cc were drawn from the testicular side of the spermatic vein before ligation of varicocele veins. Synchronous blood samples were drawn from the corresponding peripheral vein as well. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase and glutathione reductase levels were measured at spermatic and peripheral blood erythrocytes; malondialdehyde and total antioxidant capacity were measured. All patients were clinically evaluated in postoperative 1st and 3rd months, as well as control semen analyzes were done.

Results: The mean age of patients was 24.5 ± 4.2 (range:16-30 years) and the grade of varicoceles that was detected with physical examination was 2.2 ± 0.6 . At spermatic vein erythrocytes SOD, glutathione peroxidase and glutathione reductase levels were statistically lower than peripheral vein erythrocytes ($p=0.012$, $p<0.0001$ and $p=0.006$, respectively). Spermatic vein plasma malondialdehyde level was statistically higher than peripheral vein plasma ($p<0.0001$). Total antioxidant capacity was higher than the peripheral plasma ($p=0.014$).

Conclusion: Oxidative stress is significantly higher in the spermatic vein of patients with varicocele. We think that oxidative stress is one of the factors that is involved in the varicocele associated sperm dysfunction.

Key words: Varicocele, Infertility, Oxidative stress, Reactive oxygen species

ÖZET

Varikoselli hastalarda oksidatif stresin sperm disfonksiyonu oluşturmada önemli bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Bu çalışmada infertilite veya klinik varikozel ile başvuran olgularda varikosektomi öncesi spermatik ve periferik venöz kan örneklerindeki oksidatif stresin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Klinik değerlendirmede varikozel tespit edilen 18 hasta çalışmaya alındı. Hastaların en az 2 semen örneği içeren semen analizleri değerlendirildi. Ameliyat sırasında spermatik ven ayrılmadan önce, testiküler venöz dönüş tarafından 2 cc kan alındı. Ameliyat sırasında eşzamanlı periferik venöz kan örneği alındı. Spermatik venöz kan ve periferik ven kanı eritrositlerinde süperoksitdismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz, plazmada malondialdehit ve total antioksidan kapasite ölçüldü. Ameliyat sonrası 1. ve 3. aylardaki kontrollerinde hasta klinik olarak değerlendirildi.

Hastaların ortalama yaşı $24,5 \pm 4,2$ (16-30) yılıdır. Fiziksel inceleme ile tespit edilen varikosellerin grade ortalaması $2,2 \pm 0,6$ bulundu. Spermatik ven eritrositlerinde süperoksitdismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz, periferik ven eritrositlerine göre anlamlı olarak düşük tespit edildi (sırasıyla $p=0,012$, $p<0,0001$ ve $p=0,006$). Testiküler ven plazmasında malondialdehit, periferik ven plazmasına göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0,0001$). Total antioksidan kapasite ise periferik ven plazmasında anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,01$).

Varikoselli hastalarda spermatik vende oksidatif stresin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular varikozele sekonder oluşan oksidatif stresin varikozele bağlı infertilite patogenezinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Varikozel, İnfertilite, Oksidatif stres, Reaktif oksijen ürünleri

GİRİŞ

Varikoselin patofizyolojisi konusunda sınırlı bilgilere sahip olmamıza karşın, olası kuramlar

arasında; böbrek ya da adrenal toksik metabolitlerin reflüsü, bozulmuş hormon dengesi, testiküler hipoksiye sekonder staz, anormal ısı düzenlenmesi,

Dergiye Geliş Tarihi: 12.12.2006

Yayına Kabul Tarihi: 02.03.2007 (Düzeltilmiş hali ile)

SPERMATİK VE PERİFERİK VENDEKİ OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ (Evaluation of Oxidative Stress in The Spermatic and Peripheral Veins)

apoptozis artışı ve artmış oksidatif stres sayılabılır¹⁻⁷. Ancak bu etkenlerin nasıl sperm fonksiyonuna zarar verdiği konusu tam olarak anlaşılamamıştır.

Varikoselin artmış serbest oksijen radikali ve azalmış seminal plazma antioksidan kapasitesiyle ilişkisi birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir^{5,7,8}. Aerobik şartlar altında insan hücreleri süperoksit radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) gibi çeşitli serbest oksijen radikalleri üretirler. Serbest oksijen radikalleri hücre membranındaki lipitlerde peroksidatif hasar meydana getirir. Lipit peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşur. Çoğu hücre çeşitli enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemler ile reaktif oksijen ürünlerine karşı korunma altındadır. Enzimatik koruma sistemlerini süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz oluşturur⁵. Non-enzimatik antioksidanların başlıcaları ise ürik asit, E ve C vitaminleri ile albumindir.

Her ne kadar serbest oksijen radikalleri sperm hiperaktivasyonu ve kapasitasyonu gibi olaylarda normal bir fizyolojik role sahip olsalar da, aynı zamanda sperme toksik de olabilirler⁸. Sitoplazmada azalan antioksidan üretimi spermatazoayı oksidatif hasara karşı hassas hale getirebilmektedir⁷. Ayrıca oksidatif stresin varikoselli hastalarda sperm disfonksiyonunda rol oynadığı bildirilmektedir⁵.

Daha önce yapılan çalışmalarda varikoselli olguların semenlerinde reaktif oksijen ürünlerinin anlamlı ölçüde yüksek, total antioksidan kapasitenin ise düşük olduğu bulunmuştur^{5,7-9}. Ancak yayınlarda spermatik vendeki oksidatif stresi araştıran az sayıda çalışma mevcuttur. Bundan dolayı bizde bu çalışmada varikoselli olgularda spermatik ve periferik venöz kan örneklerinde oksidatif stres ve antioksidan kapasiteyi değerlendirmeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kurumumuz üroloji polikliniğine skrotal ağrı, skrotal şişlik yakınmaları ile başvuran ve klinik değerlendirmede varikosel tespit edilen 18 hasta çalışmaya alındı. Hastalardan ayrıntılı anamnez alındı, fiziksel incelemeleri yapıldı ve en az iki semen örneği içeren semen analizleri değerlendirildi. Semen analizi sonuçları Dünya Sağlık Örgütü

(WHO) kriterlerine göre değerlendirildi. Çalışma kurumumuz etik kurulundan onay alındıktan sonra başlatıldı ve çalışmaya alınan tüm hastalardan ameliyat öncesi yazılı aydınlatılmış onam alındı.

Varikosel tanıları fiziksel inceleme ile konuldu. Fiziksel incelemeyi güçleştiren durumların varlığında, yani testisleri skrotumun üst tarafında olan hastalar, küçük skrotum kesesine sahip hastalar, fiziksel incelemede zorluk yaratan anatomik özellikler, kremaster hiperrefleksisi, ortam-hasta yapısı nedeniyle inceleme zorluğu olan hastalara renkli Doppler ultrasonografi yapıldı.

Hastalarda varikoselektomi endikasyonu, ağrı olsun ya da olmasın anormal seminal ölçütlere sahip olunması ile konuldu. Çalışmamızda inguinal veya subinguinal yaklaşımla ameliyatlar gerçekleştirildi. Subinguinal yaklaşımda küçük venöz yapıları atlamamak, lenfatik ve arter zedelenmesini minime indirmek için ameliyat loopu kullanıldı. Ameliyat sırasında spermatik ven ayrılmadan önce, testiküler venöz dönüş tarafından ve eşzamanlı olarak mediyan kübital venden 2cc kan örneği alındı.

Kan örnekleri heparinize tüplere konuldu. Plazma +4°C'de, 10 dakika, 2500 devirde santrifüj ile ayrıştırıldı. Eritrositler buzlu serum fizyolojikle 3 kez yıkandı. Her yıkamadan sonra üstteki eritrosit tabakasıyla, soluk sarı renkli tabaka çıkarıldı ve atıldı. Yıkama işleminden sonra paketlenmiş hücreler ve plazma analize kadar -20°C'de depolandı. Paketlenmiş eritrosit hemoglobin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, cyanmethemoglobin yöntemiyle lizise uğramış hücrelerde tespit edildi.

Spermatik ve periferik venöz kanı eritrositle-rinde SOD, GPx ve GR, plazmada MDA ve total antioksidan kapasite ölçüldü. Çalışılan ölçütlerin aktiviteleri ve plazma total antioksidan kapasite Randox Laboratuvarlarından (*Randox Laboratories Ltd. Antrim, UK*) elde edilen ticari kitlerin kullanıldığı Hitachi 917 otoanalizeri ile ölçüldü. Tüm kimyasallar *Sigma Chemical Co. (St. Lois, MO, USA)*'dan alındı. Plazma ve doku MDA seviyeleri Okhawa ve ark.'nın tanımladığı 'thiobarbituric asit' yöntemiyle tespit edildi¹⁰. Biyokimyasal analiz sırasında plazma 1:10 oranında deiyonize su ile dilüe edildikten sonra, ortama 10 µL 'horseradish' peroksidaz eklenmiştir. Bu daha sonra Trolox (6-hidroksi-2, 5, 7, 8-tetrametil kroman-2-karboksilik asit) adı verilen bir tokoferol analogu ile 1:1 oranında dilüe edilmiştir. Daha sonra ortama standart

dozda horseradish peroksidaz ilave edilmiş ve oto-analizörde ölçüm yapılmıştır. Plazma total antioksidan kapasite ölçüm değerleri molar Trolox olarak verilmiştir.

Hastalara ait ameliyat öncesi ve sonrası semen ölçütleri Wilcoxon rank testi ile ve periferik kan ve spermatik kan reaktif oksijen ürünlerine ait değerler Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. İstatistik işlemleri için SPSS v.12 (Chicago, Illinois, USA) kullanıldı.

BULGULAR

Hastaların ortalama yaşı $24,5 \pm 4,2$ (16-30) idi. Fiziksel incelemede olguların 13'ünün grade 2, 5'inin ise grade 3 varikoseli olduğu saptandı ve varikosel grade ortalaması $2,2 \pm 0,6$ idi. Çalışmamıza alınan 18 hastanın 15'i ağrı veya skrotal şişlik gibi şikayetlerle polikliniğimize başvurdu. Bu hastaların yapılan spermogramlarında bozukluk mevcuttu. Kalan 3 hasta ise infertilite nedeniyle başvurmuşlardı. Ağrı şikayetleri yoktu ve bu hastaların semen analizleri de normal sınırlarda değildi.

Hastaların ortalama 5,1 (min:3, mak:7) günlük abstinans sonrası yapılan semen analizlerinde, ortalama ejakülat hacmi $2,7 \pm 0,8$ cc, ortalama mililitredeki sperm sayıları $64,3 \pm 43,8$ milyon, A motilite $\%18,1 \pm 12$, B motilite $\%27,8 \pm 8,2$, C motilite $\%18,9 \pm 8,8$ ve D motilite oranları $\%27 \pm 10,6$ olarak bulundu. Düşük ejakülat hacmine sahip bazı olgular başka patolojilerin varlığı yönünden incelendi, ancak bunlarda varikosel dışı bir patoloji saptanmadı.

Spermatik ven eritrositlerinde SOD, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz, periferik ven eritrositlerine göre anlamlı olarak düşük tespit edildi. Spermatik ven plazmasında malondialdehit, periferik ven plazmasına göre anlamlı olarak yüksekti. Total antioksidan kapasite ise periferik ven plazmasında, spermatik ven plazmasına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu ölçütlere ait tüm veriler Tablo 1'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Semendeki reaktif oksijen ürünlerinin kaynağı spermatozoa ve fagositik lökositlerdir¹¹. Serbest radikaller fizyolojik koşullarda spermatozoanın kapasitasyonunda, hiperaktivasyonunda ve füzyonunda önemli rol oynarlar¹¹. Serbest radikallerin zararlı etkilerini kontrol altına almak üzere seminal plazmada enzimatik ve non-enzimatik defans mekanizmaları mevcuttur. Oksidan ve antioksidan sistemi arasındaki dengenin oksidan sistem lehine bozulduğu durumlarda hücre fonksiyonları olumsuz yönde etkilenir. Semende bu dengede pro-oksidanlar lehine bir bozulma olduğunda sperm üzerinde oksidatif stres indüklenir. Özellikle motilitede azalma olmak üzere sperm fonksiyonlarında bozulma meydana gelir⁷. Reaktif oksijen ürünlerinin sperm metabolizması, morfolojisi, motilitesi ve fertilizasyon kapasitesi üzerinde zararlı etki yaptıkları gösterilmiştir. Fertil erkek popülasyonu ile karşılaştırıldığında, infertil erkeklerin büyük kısmının seminal plazmalarında reaktif oksijen ürünlerinin düzeylerinde artış olduğu bulunmuştur¹². Diğer taraftan, semende antioksidanlarda bir düşüşün meydana gelmesi de idiyopatik infertilite ile ilişkilidir¹³.

Tablo 1. Çalışılan ölçütlerin ortalama±standart sapma (minimum-maksimum) değerleri

Ölçüt (U/g Hb)	Periferik ven eritrosit	Spermatik ven eritrosit	p
SOD	$2398,38 \pm 607,44$ (1623-3901)	$1910,03 \pm 386,29$ (1309-2539)	0,012
GPx	$60,06 \pm 7,06$ (49,20-74,04)	$49,88 \pm 7,63$ (36,86-65,61)	<0,0001
GR	$48,34 \pm 12,49$ (34,56-79,16)	$38,50 \pm 7,94$ (26,33-51,72)	0,006
Ölçüt	Periferik ven plazma	Spermatik ven plazma	
MDA (umol/L)	$1,714 \pm 0,52$ (0,73-2,66)	$2,76 \pm 0,71$ (1,61-4,41)	<0,0001
Total Antioksidan Kapasite (mmol Trolox equive./L)	$2,72 \pm 0,58$ (1,86-3,86)	$2,26 \pm 0,43$ (1,66-3,22)	0,014

SPERMATİK VE PERİFERİK VENDEKİ OKSİDATİF STRESİN DEĞERLENDİRİLMESİ
(Evaluation of Oxidative Stress in The Spermatic and Peripheral Veins)

Reaktif oksijen ürünlerinin üretimindeki artış, antioksidan enzim aktivitesini inhibe edebilir ve oluşan potansiyel oksidatif stres sonucu olarak, infertiliteye sebep olabilecek lipid peroksidasyonu artar, sperm motilitesi, canlılığı ve fonksiyonları azalır. Alkan ve arkadaşları idiyopatik infertilitesi olan hastalar ve sağlıklı donörlerin spermelerini serbest oksijen radikalleri üretimi yönünden incelemişler. Sonuç olarak da düşük seminal plazma antioksidan aktivitenin ve yüksek serbest oksijen radikali üretiminin idiyopatik infertiliteden sorumlu olabileceğini göstermişlerdir¹⁴. Lewis ve arkadaşları genel infertil popülasyonda seminal sıvıda % 40 oranında reaktif oksijen ürünlerinde artış bulmuşken, bu oranı varikoseli olan infertil popülasyonda %80 olarak saptamışlardır¹⁵. Başka bir çalışmada insidental varikosel tespit edilenlerde seminal sıvıda reaktif oksijen ürünü artışı %77 iken, kontrol grubunda bu oran %20 olarak bulunmuştur¹⁶. Seminal yüksek reaktif oksijen ürünleri düzeyleri sonucunda, membran yağ asitlerinin peroksidasyonu ile sperm fonksiyonlarının ve canlılığının azaldığı bildirilmektedir. İnfertil erkeklerin % 40'ında görülen yüksek seminal reaktif oksijen ürünleri düzeylerinin in vitro fertilizasyon (IVF) sonuçlarıyla ters orantılı olduğu ve bu hastalarda reaktif oksijen ürünleri seviyeleri düşük bulunan infertil erkeklere göre beş kat az gebelik olasılığı olduğu bildirilmektedir¹⁷.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda¹²⁻¹⁷ varikosel veya infertilite nedeniyle takip edilen hasta gruplarında reaktif oksijen ürünleri seminal sıvıda araştırılmıştır. Bilindiği üzere seminal sıvıdaki reaktif oksijen ürünlerinin kaynağı sperm ve lökositlerdir¹⁸. Seminal vezikül, prostat ve epididim gibi diğer genital sistem organlarının enfeksiyon ve enflamasyonu nedeniyle ortaya çıkabilecek reaktif oksijen ürünleri çalışmaların sonuçlarını etkileyebilir. Bundan dolayı çalışmamızda oksidatif stresin değerlendirilmesi spermatic venöz kan örneklerinde yapılmış ve varikoselin testis üzerine direkt etkisini ortaya konmaya çalışılmıştır. Buna benzer olarak yayınlarda çok ender klinik çalışma mevcuttur.

Spermatic hücreler, glutatyon peroksidaz ile hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitleri inaktive etmek için redukte glutatyon sağlayan GPx ile bu reaktif oksijen ürünlerinin zararlı etkilerinden korunmaktadır¹⁹. Giannattasio ve ark., sağlıklı normal kişilerde, seminal plazma GPx aktivitesinin,

infertil hastalara göre daha yüksek olduğunu ve bunun gonadal fonksiyonlar için çok yararlı yeni bir belirteç olarak kullanılmasını önermektedirler²⁰. Bu nedenle çalışmamızda varikoseli olan hastalarda, spermatic ven eritrositlerinde glutatyon peroksidaz ve glutatyon reduktaz düzeyleri incelenmiştir.

Yine çalışmamıza benzer şekilde Romeo ve ark., spermatic ven ve periferik ven oksidatif stresini ortaya koymak üzere adolesan varikoselelilerde bir araştırma yapmışlardır²¹. Oksidatif stres belirteci olarak nitrik oksit (NO) seviyesini incelemişlerdir. Periferik vene kıyasla, spermatic vende NO seviyesini yüksek olarak bulmuşlardır. Fakat spermatozoalar tarafından yapılan en önemli reaktif oksijen türevi süperoksit anyonudur ve bu anyon SOD enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile hidrojen peroksit oluşturmaktadır. Hidrojen peroksitin sperm hücreleri üzerindeki toksik etkisinin diğer oksijen türevlerine kıyasla daha fazla olduğu ve spermatozoa hücrelerinin oositler ile birleşme yeteneğinin ortama eklenen hidrojen peroksit ile azaldığı gösterilmiştir²². Dolayısıyla çalışmamızda oksidatif stres belirteci olarak SOD da özellikle kullanılmış ve SOD'n spermatic ven eritrositlerinde periferik ven eritrositlerine göre anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada oksidatif stres belirteci olan malondialdehit ve antioksidan aktivite tayini için total antioksidan kapasite kullanılmıştır. Spermatic ven plazmasında malondialdehit, periferik ven plazmasına göre anlamlı olarak yüksek, total antioksidan kapasite ise periferik ven plazmasında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Bu çalışma, vazektomi, orşiyektomi veya herniorafi planlanan hastalardan oluşturulacak bir kontrol grubuyla geliştirilebilirdi fakat bulunduğu popülasyonda vazektomi için başvuran hastanın olmaması, herniorafi planlanan hastalarda sağlam spermatic venden kan örneği almak için damar yaralanmasına sebep olma olasılığı ve ameliyat sonrası kanama yan etkisi olasılığı nedeniyle tercih edilmemiştir. Varikoselektomi sonrası izlem sürecinde spermatic ven kanındaki reaktif oksijen ürünlerinin düzeyinin normale gelip gelmediği konusunda araştırma yapmak tekrar cerrahi gerektireceğinden uygulanmamıştır. Seminal plazmadaki reaktif oksijen ürünlerinin düzeyinin araştırıldığı çalışmalarda ameliyat sonrası 3. ayda reaktif oksi-

jen ürünleri düzeylerinin normale gelmesi ve buna paralel olarak seminal parametrelerin normale yaklaşması⁵, infeksiyon, inflamasyon gibi reaktif oksijen ürünlerinin yükseldiği durumların yokluğunda, varikoselektominin seminal plazmadaki reaktif oksijen ürünleri miktarını azalttığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada varikoseli olan hastalarda spermatik vende SOD, GPx ve GR gibi reaktif oksijen ürünlerini inhibe eden enzimlerin seviyeleri, periferik vene kıyasla daha düşük olarak bulunmuştur. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'de spermatik vende periferik vene göre anlamlı derecede yüksek çıkmış, antioksidan kapasite ise daha düşük bulunmuştur. Bu bulgular varikosele sekonder oluşan oksidatif stres ve reaktif oksijen ürünlerinin varikosele bağlı infertilite patogeneğinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- **Segenreich E, Israilov SR, Shmueli J, et al:** Correlation between semen parameters and retrograde flow into the pampiniform plexus before and after varicocelectomy. *Eur Urol.* 32: 310-314, 1997.
- 2- **Su LM, Goldstein M, Schlegel PN:** The effect of varicocelectomy on serum testosterone levels in infertile men with varicoceles. *J.Urol.* 154: 1752-1755, 1995.
- 3- **Chakraborty J, Hikim AP, Jhunhunwala JS:** Stagnation of blood in the microcirculatory vessels in the testes of men with varicocele. *J Androl.* 6: 117-126, 1985.
- 4- **Wright EJ, Young GP, Goldstein M:** Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology.* 50: 257-9, 1997.
- 5- **Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, et al:** Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *Int J Androl.* 24: 261-265, 2001.
- 6- **Ku JH, Shim HB, Kim SW, et al:** The role of apoptosis in the pathogenesis of varicocele. *BJU-Int.* 96: 1092-6, 2005.
- 7- **Agarwal A, Ikemeto I, Loughlin KR:** Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol.* 152: 107-110, 1994.
- 8- **Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, et al:** Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *J Androl.* 20: 713-7, 1999.
- 9- **Köksal IT, Usta M, Orhan I, et al:** Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl.* 5: 95-99, 2003.
- 10- **Okhawa H, Ohishi N and Yagi K:** Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annal Biochem.* 95: 351-358, 1979.
- 11- **Sharma RK, Agarwal A:** Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 48: 835-850, 1996.
- 12- **Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, et al:** Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil Steril.* 62: 862-8, 1994.
- 13- **Gajnan C, Iwasaki A, De Lamirande E, et al:** Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci.* 637: 436-444, 1991.
- 14- **Alkan I, Simsek F, Haklar G, et al:** Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: Relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol.* 157: 140-143, 1997.
- 15- **Lewis SE, Sterling ES, Young IS, et al:** Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 67: 142-7, 1997.
- 16- **Kass EJ, Belman AB:** Reversal of testicular growth failure by varicocele ligation. *J. Urol.* 137: 475-476, 1987.
- 17- **Aziz N, Salh RS, Sharma RK, et al:** Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril.* 81: 349-354, 2004.
- 18- **Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Barratt CL, et al:** Origin of reactive oxygen species in human semen: Spermatozoa or leucocytes? *J Reprod Fertil.* 94: 463-70, 1992.
- 19- **Kurtel H, Fujimoto K, Zimmerman BJ:** Ischemia reperfusion induced mucosal dysfunction: Role of neutrophils. *Am. J. Physiol.* 261: 490-496, 1991.
- 20- **Giannattasio A, De Rosa M, Zarrilli S, et al:** Glutathione peroxidase (GPx) activity in normal and pathological human seminal plasma. *Int J Androl.* 20: 17-20, 1997.
- 21- **Romeo C, Ientile R, Santoro G, et al:** Nitric oxide production is increased in the spermatic veins of adolescents with left idiopathic varicocele. *J Pediatr Surg.* 36: 389-93, 2001.
- 22- **Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S:** Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod.* 41: 183-97, 1989.