

Varikoselli Hastaların Seminal Sıvısında Preoperatif ve Postoperatif Antioksidan Enzim Aktivitesi

Emin Özbek*, Yusuf Türköz**, Mustafa Çekmen***

Özet: Son yıllarda yapılan çalışmalarda varikoselli hastaların seminal sıvılarında antioksidan enzim (AOE) aktivitesinin azaldığı bildirilmiş, fakat operasyonun AOE aktivitesi üzerine etkileri konusunda bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmamızda varikoselli, infertil hastaların operasyon öncesi ve sonrası seminal sıvılarında AOE aktivitesini araştırdık. Çalışmaya infertil, Grade-2 ve 3 (klinik olarak belirgin varikoselli olan) toplam 15 hasta ve fertil 12 normal kontrol hastası alındı. Spermilerin seminal plazmadan ayrılmasından sonra enzimatik metotla glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi değerlendirildi ve sonuçlar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Hasta grubunun preoperatif ve postoperatif GSH-Px (Mu/ mg. protein) ve SOD (U/mg.protein) aktivitesi sırasıyla 325.27 ± 28.30 ; 70.20 ± 15.16 ve 450.35 ± 30.20 ; 130.30 ± 20.00 olarak bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubunda ise GSH-Px (Mu/ mg. protein) ve SOD (U/mg.protein) aktivitesi sırasıyla 440.45 ± 20.30 ; 135.50 ± 22.00 olarak bulundu. Preoperatif değerler kontrol grubna göre düşük bulunurken ($p < 0.05$), post operatif değerlerle kontrol grubu arasında belirgin bir fark bulunamadı ($p > 0.05$). Sonuç olarak varikoselli hastaların seminal sıvısındaki azalmış AOE aktivitesinin bu hastalardaki sperm disfonksiyonundan sorumlu olabileceğini ve operasyon sonrası bu değerlerin normale gelebileceğini söyleyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Varikosel, Antioksidan enzim aktivitesi, Seminal sıvı, İnfertilite.

Varikoselin erkek infertilitesiyle ilişkisi ve varikoselli hastaların bir çoğunda spermogramın anormal olduğu ve operasyonla sperm kalitesinin düzeldiği ve gebelik oranının arttığı uzun zamandır bilinmektedir (1-3). Varikoselli hastalarda sperm disfonksiyonlarının nedenlerini açıklamak için bir çok fikir ileri sürülmüştür, fakat kesin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bunlar arasında venöz staza bağlı hipoksi ve Leydig hücre ve germinal hücre disfonksiyonuna neden olan küçük damarların oklüzyonu gibi görüşlerdir (4). Bunlardan başka retrograt yolla adrenal metabolitlerin testise ulaşması, artmış testiküler ısı ve gonadotropin veya androjen sekresyonundaki bozukluklar ileri sürülen diğer görüşlerdir (5).

Son yıllarda erkek infertilitesinde serbest radikaller ve antioksidanların rolüne dair yapılan yeni çalışmalar vardır (6-8). Varikoselli hastaların seminal sıvısında serbest oksijen radikallerinin yüksek ve antioksidan enzim aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir (9), fakat operasyon sonrası bu değerlerin nasıl olduğu konusunda literatürde herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışmamızda operasyon öncesi ve sonrası infertil varikoselli hastaların seminal

sıvısında antioksidan enzim aktivitesini araştırdık ve normal kontrollerle karşılaştırdık.

Gereç ve Yöntem

İnfertilite nedeniyle üroloji polikliniğine başvuran 15 varikoselli hasta (25-36 yaş arası) ve 12 fertil normal hasta (24-36 yaş arası) çalışmaya alındı. Varikosel grubundaki tüm hastalar en az 1 yıllık evli ve çocuk sahibi olamayan hastalar ve fizik muayenelerinde klinik olarak belirgin varikosel (grade-2 ve 3) olan hastalardı. Testiküler atrofi olanlar, endokrin patolojileri olanlar ve genital sistem enfeksiyonu olanlar ve azospermik hastalar çalışmaya alınmadı.

Semen örnekleri en az 48 saatlik cinsel perhizden sonra masturbasyonla alındı. Steril bir tüp içinde alınan numuneler oda ısısında likefiye olmaya bırakıldı ve sperm sayısı, motilite, volüm ve lökosit sayımı ve morfolojisi WHO 'nun kriterlerine göre yapıldı (10). Semen analizinden sonra Percoll gradyentlerde (% 40-6-95) numuneler fraksiyonlara ayrıldı. Daha sonra oda ısısında 2000 devirde 5 dakika semen santrifüje edildi. Percoll gradyentin üzerinde kalan seminal plazma ayrıldı ve çalışma yapılmaya kadar tüm numuneler -20 derecede saklandı ve tüm çalışmalar +4 derecede yapıldı.

Antioksidan enzimlerin trayini: GSH-Px aktivitesi redükte nikotinamidadenin dinükleotid fosfatın 340 nm'de oksidasyonunun

*Gaziantep Üniv. Tıp Fak. Üroloji AD, Gaziantep

**İnönü Üniv. Tıp Fak. Biyokimya AD, Malatya

***Gaziantep Üniv. Tıp Fak. Biyokimya AD, Gaziantep

Yazışma adresi: Dr. Emin ÖZBEK

Gaziantep Üniv. Tıp Fak. Üroloji AD, GAZİANTEP

Tablo-Ia. Hasta ve kontrol grubunun ameliyat öncesi spermogram değerleri

	Hasta sayısı (n)	Volüm (ml)	Sperm sayısı 10^6 / ml	Motilite%	Normal morfoloji %
Hasta (pre op)	15	3.7 $\pm$ 0.4	18.4 $\pm$ 2.1	28.3 $\pm$ 1.7	42.2 $\pm$ 1.6
Kontrol	12	3.5 $\pm$ 0.5	76.4 $\pm$ 1.5	72.6 $\pm$ 2.3	80.2 $\pm$ 4.2
p-değeri		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

Tablo-Ib. Hasta ve kontrol grubunun ameliyat sonrası spermogram değerleri

	Hasta sayısı (n)	Volüm (ml)	Sperm sayısı 10^6 / ml	Motilite%	Normal morfoloji %
Hasta (post op)	15	3.6 $\pm$ 0.4	68.5 $\pm$ 2.2	70.3 $\pm$ 1.6	78.0 $\pm$ 1.5
Kontrol	12	3.5 $\pm$ 0.5	76.4 $\pm$ 1.5	72.6 $\pm$ 2.3	80.2 $\pm$ 4.2
p-değeri		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

belirlenmesiyle tayin edildi (11). Sonuçlar miliunite/mg.protein olarak belirtildi. SOD ksantın ve ksantın oksidazla oluşan süperoksit anyonu tarafından nitroblue tetrazolium (NBT)'un redüklenmesinin ölçülmesiyle tayin edildi (12).

İstatistiksel analiz: İstatistiksel analiz için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Veriler %95 güven aralığında ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi ve $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Hasta ve kontrol grubuna ait spermogram değerleri tablo-Ia, ve Ib'de gösterilmiştir. Hasta ve kontrol grubu arasındaki yaş farkı ve semen volümü istatistiksel olarak farksızken ($p>0.05$), sperm sayısı, motilite ve morfoloji arasındaki fark anlamlı bulundu ($p<0.05$). AOE aktiviteleri tablo-IIa,b, ve IIc'de gösterilmiştir. Preoperatif AOE aktivitesi postoperatif AOE aktivitesine göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Preoperatif AOE aktivitesi kontrol grubuna göre düşük bulunurken ($p<0.05$), postoperatif değerlerle kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

Tartışma

Varikosel ile erkek infertilitesi arasındaki ilişki uzun zamandır bilinmesine rağmen varikoselli hastalardaki sperm disfonksiyonunun patofizyolojisi tam olarak bilinmemektedir (4). Son yıllarda yapılan çalışmalarda reaktif oksijen türleri (ROS) ile erkek infertilitesi arasındaki ilişki araştırılmış ve infertil hastaların seminal sıvısında serbest oksijen radikallerinin arttığı ve buna karşılık AOE aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (13). Yine en son yapılan bir çalışmada varikoselli infertil hastaların seminal sıvısında serbest oksijen radikallerinin arttığı ve AOE aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (14). Çalışmalarda artmış serbest oksijen radikallerinin

sperm fonksiyonlarını bozduğu bildirilmiştir (6). Bunlardan da en fazla insan spermatozoasına zararlı etkinin hidrojen peroksitten kaynaklandığı gösterilmiştir (7).

İnsan üreme biyolojisi üzerinde en olumsuz etkili ROS, süperoksit, hidrojen peroksit, peroksil radikali ve hidroksil radikali (15). Seminal sıvıdaki ROS'un kaynağı sperm ve lökositlerdir (16). Normal miktarlardaki ROS'un sperm hiperaktivasyonu, kapasitizasyon ve akrozom reaksiyonu için gerekli olduğu bilinmektedir (17). İnfertil hastalardaki artmış ROS seminal sıvıdaki ROS yapımı ve AOE'ler arasındaki imbalanstan kaynaklanabilir. Seminal sıvıda bulunan lökositler tarafından da ROS yapımı olabileceği ve bu hastaların seminal sıvılarından AOE aktivitelerinin de etkileneceğini düşünerek genital enfeksiyonu olan hastaları çalışmaya almadık, ayrıca perkol ile semen örneklerini lökositlerden ayırdık. İnsan spermatozoası tarafından yapılan major ROS, süperoksit anyonudur. Çalışmamızda varikoselli hastaların seminal sıvısında SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu ve operasyon sonrası değerlerin yükseldiği ve kontrol grubu ile aynı değerlere ulaştığını bulduk. Varikoselli hastalarda seminal sıvıdaki azalmış SOD aktivitesinin bunlarda artmış olan süperoksit anyonunu detoksifiye etmek için fazla miktarda SOD kullanıldığına bağlı olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızda bir diğer bulgu da varikoselli hastaların seminal sıvısında azalmış GSH-Px enzim aktivitesidir. GSH-Px aktivitesi operasyon sonrası normal kontrol grubundaki hastalarla aynı değerlere yaklaşmış olarak bulunmuştur ($p>0.05$). GSH-Px, peroksil radikallerini uzaklaştıran bir antioksidan enzimdir. Bu enzimin rat sperminde sperm motilitesinin devamından sorumlu olduğu ve peroksil radikallerini detoksifiye ettiği gösterilmiştir (18). Ayrıca GSH-Px ve GSH-

redüktaz enzimi sperm lipid peroksidasyonunda etkili antioksidan enzimlerdir.

Tablo-IIa. Hasta grubunun ameliyat öncesi ve sonrası AOE (GSH-Px ve SOD) aktiviteleri

	Hasta sayısı	GSH-Px	SOD
Hasta (pre op)	15	325.27±28.30	70.20±15.16
Hasta (post op)	15	440.45±20.30	135.50±22.00
p-değeri		<0.05	<0.05

Tablo-IIb. Hasta ve kontrol grubunun ameliyat öncesi AOE (GSH-Px ve SOD) aktiviteleri

	Hasta sayısı	GSH-Px	SOD
Hasta (pre op)	15	325.27±28.30	70.20±15.16
Kontrol	12	450.35±30.20	130.30±20.00
p-değeri		<0.05	<0.05

Tablo-IIc. Hasta ve kontrol grubunun ameliyat sonrası AOE (GSH-Px Mu/ mg. protein ve SOD U/mg.protein) aktiviteleri

	Hasta sayısı	GSH-Px	SOD
Hasta (pre op)	15	440.45±20.30	135.50±22.00
Kontrol	12	450.35±30.20	130.30±20.00
p-değeri		>0.05	>0.05

Çalışmamızın sonucu olarak varikoselli hastaların seminal sıvısında AOE aktivitesinin azaldığını ve operasyon sonrası normal kontrol grubuyla benzer sonuçlara ulaştığını tespit ettik. Literatürde varikoselli hastaların seminal sıvısında AOE aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir (14), fakat operasyon sonrası azalmış bu AOE aktivitesinin nasıl değiştiğine dair herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Sonuç olarak seminal sıvıda azalmış AOE aktivitesinin varikoselli hastalardaki sperm disfonksiyonunun nedenlerinden birisi olabileceğini ve operasyonla bunun düzelebileceğini söyleyebiliriz.

Preoperative and Postoperative Antioxidant Enzyme Activity in The Seminal Fluid of Patients with Varicocele

Abstract: Recent studies have shown that antioxidant enzyme activity (AOE) of patients with varicocele is low in the seminal fluid, but there is no study concerning the role of operation on the AOE activity. In this study, we evaluated the AOE activity of patients with varicocele in the seminal fluid before and after operation. A total of 15 patients with grade-2 and grade-3 varicocele (clinically palpable

varicocele) and 12 normal controls were included in the study. After separation of spermatozoa, glutathion peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) activity were assessed by enzymatic methods and results were compared using Mann-Whitney U test. GSH-Px and SOD activity of patients in the seminal fluid before and after operation were found as a 325.27±28.30; 70.20±15.16 and 450.35±30.20; 130.30±20.00, respectively (p<0.05). GSH-Px and SOD activity in the control group were found as a 440.45±20.30; 135.50±22.00. Preoperative values were found as lower than control group (p<0.05), however there was no significant differences between postoperative values and control group (p>0.05). As a result, we conclude that reduced AOE activity of patients with varicocele is associated with impaired sperm function in these patients and these values return to normal.

Key words: varicocele, after operation antioxidant enzyme activity, seminal fluid, infertility.

Kaynaklar

1. Greenberg SM: Varicocele and male infertility. Fertil Steril, 28:699-674, 1977.
2. Schlesinger MH, Wilets IF, Nagler HM: Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis. Urol Clin N Amer 21:517-20, 1994.
3. Chakraborty J, Hikim AP, Jhunjhunwala JS: Stagnation of blood in the microcirculatory vessels in the testes of men with varicocele. J Androl 6:117-21, 1985.
4. Cohen MS, Plaine L, Brown JS: The role of internal spermatic vein plasma catecholamine determination in subfertile men with varicocele. Fertil Steril 26:1243-46, 1975.
5. Goldstein M, Eid JF: Elevation of intratesticular and scrotal temperature in men with varicocele. J Urol 142:743-47, 1989.
6. Aitken RJ, Clarkson JS: Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fert 81: 459-62, 1987.
7. Alvarez JG, Storey BT: Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. Gamete Res 23: 77-81, 1989.
8. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod 40: 183-186, 1989.
9. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D: Use of a xantine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. J Reprod Fert 97: 441-444, 1993.
10. World Heath Organization Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction, 3rd ed. Cambridge University Press, 1992.

11. Paglia DE, Valentine WN: Studies on the qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-163, 1967.
12. Sun Y, Oberly LW, Li Y: A simple method for clinical assay of SOD. *Clin Chem* 34: 479-500, 1988.
13. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancıoğlu E, Özveri H, Yalcin S, Aktas A: Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: Relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urology* 157:140-143, 1997.
14. Hendin EN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A: Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 161(6):1831-1834, 1999.
15. Koppenol W, Moreno J, Pryor W, Ischiropoulos HJS, Beckman JS: Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical Res in Toxicol* 5: 834-42, 1992.
16. Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID: Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J Reprod Fert* 94:463-70, 1992.
17. Sigman M., Lipshultz LI, Howards SS: Evaluation of the subfertile male. In: *Infertility in the male*, 2nd ed. Edited by L.I. Lipshultz and S.S. Howards. St. Louis: Mosby Year Book Inc, chapt. 9, pp. 179-210, 1991.
18. Calvin HI, Cooper GW, Wallace EW: Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteine-rich structural proteins of the mitochondrial capsule. *Gamete Res* 4: 139-145, 1981.