

## SEMEN ANALİZİ VE YORUMLANMASI | INTERPRETATION OF SEMEN ANALYSIS

**Seminal Sıvı ve Spermde Oksidatif Stres ve Antioksidanlar**  
Antioxidants and Oxidative Stress in Seminal Fluid and Sperm

Abdullah Demirtaş, İbrahim Üntan

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Kayseri

## Özet | Abstract

Günümüzde erkek faktörü, infertilite için en büyük sebep olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkek infertilitesi için hâlihazırda bulunan varikosel, kriptorşidizm, enfeksiyonlar, tıkaçıcı lezyonlar, kistik fibrozis, travma ve tümörler gibi bilinen sebeplerin dışında son dönemde ilgi çeken bir yenisi eklenmiştir; oksidatif stres. Vücuttaki antioksidanlar ve serbest oksijen radikalleri arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan oksidatif stres, spermde zarar verir ve infertiliteye sebep olabilir. Bu; çekirdek ve mitokondri seviyesindeki peroksizomların DNA parçalarına ve hücre zarına hasar vermesine yol açar. Oksidatif stres, spermde DNA hasarına yol açan asıl etiyolojik faktör olarak ele alınmaktadır. Oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen DNA hasarı, sonraki nesillere kalıtılacak olan bozukluklara yol açabilir. Bu yazıda normal sperm fizyolojisinde reaktif oksijen metabolitlerine olan ihtiyaç, reaktif oksijen metaboliti üretim mekanizmaları, antioksidan kullanımının klinikteki faydaları ve oksidatif stresi ölçme metotları ele alınmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Erkek infertilitesi, oksidatif stres, antioksidanlar

Currently the male factor has been accepted as one of the most essential etiology for infertility. In addition to the conventional causes for male infertility such as varicocele, cryptorchidism, obstructive lesions, cystic fibrosis, trauma and malignancies; recently, a popular factor has been explored: oxidative stress. Oxidative stress, the result of imbalance between antioxidants and reactive oxygen species in metabolism, may impair sperm and cause infertility. The process may lead peroxisomes in mitochondria to harm the cell membrane and DNA fragments. Oxidative stress has been accepted as the main etiologic factor for DNA damage of sperm. Oxidative stress dependent DNA damage may bring about inherited defects. This text has examined the need for reactive oxygen species in sperm physiology, production mechanisms of reactive oxygen species, clinical benefits of antioxidant supplementation and measurement procedures of oxidative stress.

**Key words:** Male infertility, oxidative stress, antioxidants

## Giriş

İnfertilite insanları hem ruhsal hem de fiziksel olarak etkileyen tıbbi bir durumdur. Erişkin erkeklerin yaklaşık %6'sı infertilite ile karşı karşıyadır.(1) Son yıllarda erkek infertilitesi için bir sebep olarak suçlanan oksidatif stres popüler bir konudur ve ayrıntılı olarak ele alınmaya başlanmıştır. Spermatozoada nasıl hayatın devamı için oksijen gerekiyorsa, normal seviyelerde serbest oksijen radikalleri (SOR) de hücre faaliyetlerinin devamı için gereklidir. Diğer taraftan oksijenin yıkım ürünü olan SOR hücre işlevleri ve yaşamı için zararlı etkiler ortaya koyabilir.(2) SOR normal hücre metabolizması için gereklidir. Spermatozodaki oksidatif stres, hücre içi ve hücre dışı toplam SOR seviyesi antioksidan kapasiteyi aştığı zaman ortaya çıkar.(3)

**Serbest Oksijen Radikallerinin Fizyolojik Görevi**

Günümüze kadar SOR'un insan spermatozoasına toksik olduğu zannedilmekteydi ama elimizde düşük miktarda SOR'un spermatozoanın fertilizasyon kabiliyetleri için gerekli olduğuna dair sağlam veriler vardır.(4) Düşük mik-

tardaki SOR'un fertilizasyon, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyon, hareket ve kapasitasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir.(5) Süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) yüksek derecede reaktif olan, yakındaki moleküllerle etkileşime giren ve hücre organellerinde oksidatif stres hasarını başlatan oksijen metabolitleridir.(6) Spermatozoanın düşük miktarda hidrojen peroksitte bekletilmesi; sperm kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyonunu indüklemektedir.(7) Süperoksit anyonu da kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu arttırmaktadır.(8) Buna ilaveten, SOR sperm-oosit etkileşiminde de görevlidir.(9)

**Serbest Oksijen Radikallerinin Kaynakları**

SOR; radikal (hidroksil iyonu, süperoksit, NO, peroksil ve radikal olmayan (ozon, tekli oksijen, lipid peroksit, hidrojen peroksit) molekülleri içeren geniş bir dağılım gösterir. Reaktif nitrojen metabolitleri (nitroz oksit, peroksinitrit, nitroksil iyonu) serbest nitrojen metabolitleridir ve SOR'un alt sınıfı oldukları düşünülür.(10) NO'nun normal sperm üzerine hem hareketi hem de zona birleşmesini engelleyen zararlı etkileri ortaya konmuştur.(11)

Her ejakulata SOR ile kontamine olduğu varsayılmaktadır.(7) Semende spermatozoa, lökosit ve epitel gibi farklı hücreler bulunur. Bahsedilen bu hücreler içinde SOR'un başlıca kaynağı spermatozoa ve lökositlerdir.(12)

Stoplazmik damlacıklar, düşük sperm kalitesi ve artmış SOR miktarı arasındaki bağlantıyı ortaya koyar. Yanlış spermiyogenezin sonucu olan bu yapılar, SOR'un asıl kaynağıdır.(13) Muhtemeldir ki sitozolik bir enzim olan glukoz-6-fosfat dehidrojenaz vasıtasıyla, sitoplazmik kalıntılar ve artmış SOR üretimi paralellik gösterir.(4)

Spermatozoadaki SOR üretimi 2 yolla olur: sperm plazma zarında bulunan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz ve mitokondride bulunan NADPH bağımlı oksidoredüktaz sistemi.(14)

Semende  $1 \times 10^6$ /ml'den fazla lökosit olmasına lökositospermi adı verilir. Sperm kalitesinde düşüklük, azalmış hiperaktivasyon ve bozulmuş sperm fonksiyonları gibi durumlar lökositospermiye ilişkili olduğu düşünülmektedir.(15) Ancak azalmış sperm kalitesi ve bozuk sperm fonksiyonları ile seminal lökosit konsantrasyonu arasında bağlantı kurulamamıştır.(16) Bu ihtilaf;  $0,5 \times 10^6$ /ml lökosit olan semen örneklerinde, sınır değer olan  $1 \times 10^6$ /ml lökosit olan semen örneklerinden çok daha düşük SOR olmasıyla açıklanabilir.(17) Polimorfonükleer (PMN) elastazın spektrofotometrik ölçümü lökositospermiyi gösterebilir.(18)

İnfertil erkeklerde, yıkanmış ve yıkanmamış semen örneklerindeki SOR miktarı anlamlı derecede yüksektir.(19) Yıkanmış örneklerde yıkanmamış olanlardan daha yüksek değerler elde edilmiştir.(20) Fertil erkeklerde yıkanmış ve yıkanmamış semen örneklerindeki SOR değeri çok düşük bulunmuştur.(21)

Peroksidaz içeren lökositler; tüm seminal lökositlerin %50-60'ını oluşturan PMN lökositlerden ve geri kalan %20-30'u makrofajlardan oluşmaktadır.(22) Bu PMN lökositler ejakulata prostat ve seminal veziküller tarafından salınır.(15) Enfeksiyon ve inflamasyon lökositleri aktive eder ve aktive olmuş lökositlerin aktive olmayanlara göre 100 kat fazla miktarda SOR ürettiği gösterilmiştir.(23)

### Oksidatif Stresin Etkileri

Yağlar, proteinler, nükleik asitler ve şekerler gibi tüm hücrenel bileşenler oksidatif stres için birer hedefdir. Oksidatif strese bağlı hasarın derecesi; SOR miktarı, SOR maruziyet süresi ve diğer birtakım hücre dışı faktörlere bağlıdır.

Yağlar sperm plazma zarında doymamış yağ asitleri şeklinde bulunan ve oksidasyona en açık moleküllerdir. SOR, hücre zarındaki doymamış yağ asidine hücum eder ve lipit peroksidasyonu denilen kimyasal bir zinciri başlatır. Lipit peroksidasyonu ürünlerinden bir tanesi malondialdehittir ve spermatozomanın maruz kaldığı peroksidomal hasarı gösteren biyokimyasal testlerde kullanılır.(16) Bu tür testlerin sonuçları bozuk sperm fonksiyonları, hareket bozuklukları ve sperm-oosit füzyon kapasitesi ile ilgili değerli orantılar sunmaktadır.(24)

Bu prob hücre hücre membranlarına yerleştirilebilen ve oksijen radikalleriyle karşılaştığında kırmızıdan yeşile renk değiştiren ve flow-sitometri yöntemi ile ölçülen bir kimyasal maddedir. Bu madde BODIPY (581/591) C11'dir.(25)

Artmış SOR seviyeleri, azalmış sperm motilitesi ile ilgili bulunmuştur ancak tam mekanizması anlaşılamamıştır.(26) Bir hipoteze göre,  $H_2O_2$  hücre membranını geçmekte ve daha sonra spermatozoa tarafından SOR üretimini arttırmak için elektron kaynağı olarak NADPH oksidaz olarak bilinen enzim sistemi tarafından kullanılacak olan NADPH'nin hücre içinde elde edilmesini sağlayan heksoz monofosfat şanti yolu ile glukoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi bazı vital enzimlerin işlevini engellemektedir.(27) Bir diğer hipotez ise aksone-mal proteinlerin fosforilasyonunda ve sperm hareketliliğinde azalma ile sonuçlanan bir dizi olaya dayanır ki, her ikisi de sperm-oosit füzyonunda gerekli olan membran akışkanlığında azalmaya neden olmaktadır.(28)

Gece bekletilen örneklerde spermatozoadaki hareket azalması, lipit peroksidasyonu ile yakından ilgilidir.(29) Hücre zarını lipit peroksidasyonundan koruyan vitamin E ile yapılan çalışmalarda, hücre hareketlerinin korunması bu yönde güçlü kanıtlar sunmaktadır.(30)

Germ hücrelerindeki DNA hasarı; düşük fertilizasyon oranları, implantasyon bozuklukları, gelişme gerilikleri ve yüksek abort oranları ile ilişkilidir. Oligoastenoteratospermili hastalarda SOR seviyeleri ve aksone-mal bozukluk miktarı yüksek bulunmuştur.(31) DNA hasarı apoptoz, enfeksiyon, spermiyogenez defekti ve oksidatif strese bağlı olabilir.(25) DNA hasarı defektif apoptoz gibi bir sürecin sonucu olmaktan ziyade sıklıkla oksidatif stres kaynaklıdır.(32) Oksidatif stresin DNA hasar mekanizmaları; tüm bazların değişimi, boş baz alanları oluşumu, silinme, çerçeve kayması, çapraz bağlantılar ve kromozomal değişim şeklindedir. Ayrıca, tek veya çift DNA zincirindeki kırıkların sık tekrarlama da oksidatif stres ile ilgilidir.(33) Artmış SOR seviyesi, DNA kırılmalarında artış ve DNA metilasyonunda azalma ile ilişkilidir.(34) SOR ayrıca nokta mutasyonlar, polimorfizm gibi semen kalitesini düşüren mutasyonlar da yapabilir.(35) Denatürasyon ve DNA baz eşleniği oksidasyonu gibi mekanizmalarla da oluşabilir.(32) DNA hasarı küçük olduğunda spermatozoa kendini tamir edebilir; oositin de hasarlı spermatozoayı tamir yeteneği mevcuttur. Ancak hasar büyükse apoptoz ve embriyo harabiyeti gelişebilir.(9) Y kromozomundaki DNA hasarı gen delesyonuna sebep olup yeni kuşaklarda infertiliteye yol açabilir. Yüksek SOR seviyelerine sahip infertil erkeklerin fertil olanlara göre daha fazla kromozomal kırık taşıdığı gösterilmiştir.(36)

Apoptoz, doku hasarına karşı gelişen iltihabi olmayan bir yanıttır. Anormal spermatozoların eliminasyonunu hedefler.(37) Yüksek SOR seviyeleri iç ve dış mitokondri zarını parçalar ve kaspazları aktifleyen sitokrom c proteinlerini harekete geçirip apoptozu başlatır. Spermde apoptoz hücre yüzeyi proteini Fas ile SOR'dan bağımsız olarak da başlayabilir.(38) Düşük sperm konsantrasyonlu örneklerde

Fas-pozitif spermatozoaların oranı daha yüksektir.(37) İnfertil hastalarda apoptozun göstergesi olan sitokrom c, kaspaz 3 ve 9'un yüksek seviyeleri SOR tarafından meydana getirilen sperm hasarını yansıtmaktadır.(39) Erken apoptozun göstergesi olan anneksin V'in, infertil erkeklerin matür spermatozolarında normal bireylerden daha yüksek miktarda bulunduğu gösterilmiştir.(40)

Varikoselin genel popülasyondaki prevalansı %15-20'dir, erkek faktöre bağlı infertil çiftlerde bu oran %25-40'a kadar çıkar.(41) Varikoseli olan erkeklerde serum, testis ve semende SOR artışı mevcuttur.(42) Varikoselli olgularda malondialdehit ve NO seviyelerindeki yükseklik lipit peroksidasyonundaki artışı göstermektedir.(43) Varikoselli bireylerde, semende iltihabi sitokinler olan IL-1, IL-6 ve SOR artışı saptanmıştır.(44) Bu hastalarda varikoselektomi sonrası seminal sıvıda süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve vitamin C gibi antioksidanlar artarak, sperm kalitesinin düzeldiği belirtilmektedir.(45) Varikoselin en ucuz ve en faydalı tedavisi varikoselektomidir.(44) Seminal sıvıdaki total antioksidan seviyesi varikoseli olan bireylerde azalmıştır.(46) 2. ve 3. derece varikoseli olan bireylerde 1. derece varikoseli olanlara göre ciddi artmış SOR seviyeleri görülmüştür.(47) Son zamanlarda yapılan bir meta-analiz, varikoselli erkeklerde artmış SOR seviyesi ve düşük antioksidan miktarı saptanmıştır.(48)

#### Oksidatif Stresi Ölçme Yöntemleri

Ejakulatta oksidatif stresi çok sayıda metotla ölçmek mümkündür. Birincisi hücrede açığa çıkan SOR'un ölçümüdür. Ancak burada problem, lökosit kontaminasyonunun saptanan SOR düzeylerine etkisidir. Çünkü lökositlerin SOR üretim kapasitesi spermde 100 kat daha fazladır. Bu nedenle spermatozoanın SOR üretim kapasitesini değerlendirmek için ortamda bulunan lökositlerin uzaklaştırılması gerekir. Her ne kadar gradiyent ayırıştırma sistemleri varsa da, tek başına tüm lökositlerin elimine edilmesinde tam anlamıyla yeterli olamazlar.(49) En ideali sperm üzerindeki lökosit antijeni CD45'e karşı oluşturulmuş monoklonal antikolarla kaplanmış paramanyetik tanecikler veya ferrofluid ile inkübe etmek ve böylece lökositleri uzaklaştırmaktır.(50) Arkasından N-formil-metionil-lösil-fenilalanin (FMLP) provokasyon testi yapılarak lökositlerin elimine edildiği ortaya konulmalıdır.(51) Eğer lökositler yeteri kadar temizlendiğine karar verilirse spermatozoa forbol ester ile muamele edilerek SOR yapımı uyarılır. Forbol esterinin immatür, defektif spermatozoadan SOR üretimini artırıcı etkisi gösterilmiştir.(29) Bu etkisi matür, normal spermelerde ortaya çıkmamaktadır.

Serbest radikallerin saptanmasında bir diğer yöntem ise lüminol ve lusigenin gibi probalar kullanarak yapılan kemilüminesens metodudur.(14) Lüminol hem hücre içi hem hücre dışı SOR'u ölçebilirken, lusigenin hücre dışında salınan süperoksit radikallerini ölçebilir.(19)

Bir diğer yöntem de nitro blue tetrazolium (NBT) yöntemidir. Bu testin esası hücrelerin antioksidan kapasitesini

ölçmektir. Okside NBT renksizdir ve indirgendüğünde mavirengene dönüşür. Yıkanmış semenle reaksiyona sokulan NBT, daha sonra spektrofotometrik olarak ölçülür ve serbest radikal miktarı ölçülmüş olur.(18)

Oksidatif stresi ölçen biyokimyasal bir başka metod ise, tiobarbitürik asit (TBA) testidir. Bu test lipit peroksidasyon ürünleri için spesifik olmamakla birlikte oksidatif strese bağlı bozulmuş sperm fonksiyonlarının saptanmasında bir kriter olarak kullanılabilir.(24) TBA testinde esas reaktan malondialdehit olup lipit peroksidasyonunun gösterilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.(52) Çok daha spesifik bir yöntem ise lipit peroksidasyon oluşumunun spektrofotometrik yolla ölçümüdür. Erkek infertilitesinde kullanılan tanisal testler arasında oldukça etkin olduğu belirtilmektedir.(29)

#### Antioksidanlar

Yapılan çalışmalarda antioksidanların spermatozoayı SOR üreten anormal spermatozoalardan koruduğu, lökositlerin ürettiği SOR'u temizlediği, DNA kırılmalarını önlediği, sigara içenlerde semen kalitesini arttırdığı, soğukun spermatozoaya olan etkisini azalttığı, erken sperm olgunlaşmasını engellediği ve spermatozoayı destekleyerek yardımcı üreme tekniklerinin başarısını arttırdığı gösterilmiştir. Seminal plazmada süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaza ilaveten askorbat, ürat, vitamin E, piruvat, glutatyon, albumin, vitamin A, ubikinol ve hipotaurin gibi enzimatik olmayan antioksidanlar vardır.

L-Karnitin mitokondrial zarlardan yağ asitlerinin geçişinde ve asetil-koA'dan türeyen asetatin hücre içi depolanmasında önemli role sahiptir.(53) L-Karnitin ve L-asetil karnitin sperm metabolizması ve spermatozoanın kullanacağı enerjiyi sağlamak için önemlidir.(54) L-karnitin toksik bir ara ürün olan açıl-koA'yi ortadan kaldırarak apoptozu önler.(55) Oligoastenospermik erkeklerin seminal plazmasında fertil erkeklere oranla daha az L-karnitin bulunmuştur.(56) Epididimal sıvıda da yüksek miktarda L-karnitin bulunması aktif salgı mekanizmasına bağlıdır.(57) Ayrıca sperm hareketinin başlamasının, epididimal lümeninde L-karnitin artışına ve sperm hücresinde L-asetil karnitin artışına bağlı olduğuna dair kanıtlar vardır.(58) L-karnitin ve L-asetil karnitin tedavisinden sonra astenospermik erkeklerde hareketlilik ve antioksidan kapasite artışı gözlenmiştir.(59) Bu antioksidan özelliği ile karnitin enfekte erkeklerde artmış SOR'a karşı telafi edici bir görev üstlenebilir.(60) İnfertil erkeklerde L-karnitin tedavisi sonrası sperm konsantrasyonu ve hareketliliğinde artış gözlenmiştir.(61) L-karnitin tedavisi sonrası sperm miktarında da artış gözlenmiştir.(62)

Koenzim Q10 mitokondrial solumun zincirinin önemli bir parçasıdır ve enerji metabolizmasında esansiyel bir rolü vardır. Dahası, hücre zarları ve lipoproteinlerle ilgili önemli bir yağda çözünebilir antioksidandır. Testiste belirgin şekilde koenzim Q10 üretilir ve süpürücü olarak koruyucu görev yapan indirgenmiş formu olan ubikinol semende bol miktarda bulunur.(63) Hareket sorunu olan spermelerde,

spermatozoa ve seminal plazmanın antioksidan kapasitesinde düşüğe bağlı fosfolipit havuzunda eksiklik olduğuna dair kanıtlar vardır.(64) İnfertil erkeklerde seminal plazma ve sperm hücrelerinde düşük koenzim Q10 seviyeleri tespit edilmiştir.(65) Koenzim Q10 tedavisi sonrası; seminal plazma ve sperm hücrelerinde koenzim Q10 seviyesinde, fosfotidilkolin düzeyinde ve sperm hareketliliğinde artış görülmüştür.(66) Seminal plazma ve sperm ubiquinol seviyeleri de artmıştır.(67)

Çinko seminal plazmada diğer dokulardan yüksek konsantrasyonda bulunur.(68) Çinko, DNA bağlayan protein ve çinko parmak proteinleri kofaktör olarak çinko kullanan ve steroid hormon reseptörlerinin genetik ekspresyonunda yer alan yapılarıdır, kofaktörü olan bir metalloproteindir. Bakır-çinko-süperoksit dismutaz kompleksinde ve DNA tamirinde, transkripsiyonunda ve translasyonunda görevlidir.(69) Seminal plazmadaki değeri sperm sayısı ile doğru orantılıdır. (70) Seminal plazma çinko konsantrasyonu ile plazma testosteron miktarının da korele olduğu gözlenmiştir.(71)

Folat; DNA sentezi, RNA transferi, sistein ve metiyonin aminoasitleri için önemlidir. DNA sentezi germ hücrelerinde önemlidir, bu yüzden folat üreme için gereklidir. Ayrıca SOR'u süpürücü özelliği vardır.(72) Kombine folat ve çinko kullanımı sonrası, fertil ve infertil erkeklerde toplam normal sperm sayısı artmıştır.(73)

SOR etkilerini azaltan bir süpürücü ajan olan N-asetil sistein kullanımı ile infertil erkeklerin semen hacmi, hareketliliği, vizkozitesi ve antioksidan kapasitesinde artış olmuştur.(74)

Glutatyon peroksidaz enziminin kofaktörü olan eser element selenyum N-asetil sistein ile kombine olarak alan infertil erkeklerde FSH düşmüş, ve tüm sperm parametreleri ile birlikte testosteron ve inhibin B yükselmiştir.(75)

Vitamin E doz bağımlı bir etkisi var gibi görünen; süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini temizleyen sperm membran antioksidanıdır.(9) Astenospermik erkeklerde vitamin E tedavisi sonrası lipid peroksidasyonu azalmakta, hareketlilik ve gebelik oranları artmaktadır.(76)

Vitamin C süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine etki eden ve sperm aglutinasyonunu önleyen, vitamin E'yi yenileyen bir antioksidandır. Vitamin C'nin glutatyon ve vitamin E ile kombine tedavisi sonrasında, spermatozoa hidroksiguanin seviyesi düşüp, sperm sayısı artmaktadır.(32) Vitamin E ile birlikte kullanıldığında ise, DNA kırılmalarını azaltmaktadır.(77)

### **Yardımcı Üreme Teknikleri ve Antioksidanlar**

Oksidatif strese bağlı DNA hasarı, yardımcı üreme teknikleri (YÜT) açısından klinik öneme sahiptir. Çalışmalar YÜT için sperm hazırlarken kullanılan yöntemlerde yüksek miktarda SOR açığa çıktığını göstermektedir.(26) YÜT için seçilen spermatozoa çoğunlukla oksidatif strese sahip bir ortamdan gelmektedir ve bu spermeler büyük oranda hasarlı DNA içermektedir.(32) İntrauterin inseminasyon (İÜİ) veya in vitro fertilizasyon (İVF) sonrası bu hasarlar nedeniyle endi-

şeye gerek kalmaz; çünkü sperm plazma membranına olan kollateral peroksidatif hasar, DNA'sı hasarlı sperm fertlizasyonunu engeller. İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu (İSSE); bu doğal bariyerin aşıldığı ve hasarlı DNA'ya sahip sperm doğrudan oositin içine enjekte edildiği bir tekniktir. (6) YÜT'ün her aşamasında SOR üretimi olabilmektedir. İVF sonrasında SOR'un fertlizasyona anlamlı etkisi vardır ve İVF öncesinde semen örneklerinde SOR seviyesinin ölçümü, İVF'nin sonucunu tahminde faydalı olabilir. Kültür ortamındaki yüksek SOR seviyesi İSSE'de düşük blastokist oranı, düşük fertlizasyon oranı, düşük bölünme oranı ve yüksek embriyo parçalanması ile ilişkili iken İVF'de değildir, ancak hem İSSE'de hem İVF'de düşük gebelik oranları ile ilişkilidir. (78) YÜT in vitro antioksidan eklenmesi ile daha başarılı olmaktadır.(79) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin artan konsantrasyonlarında blastokist gelişim oranında doz-bağımlı bir düşüş gözlenmiştir. (80) Klinikte YÜT sistemlerinde kültür ortamına vitamin E, vitamin C, sistein, taurin ve hipotaurin gibi antioksidanlar eklenerek embriyonun SOR ile başa çıkma yeteneğinin artırılması amaçlanabilir.(81)

### **Tartışma**

Son zamanlarda erkek infertilitesi ile ilgili bilgilerimiz gerek sperm fonksiyonları, gerek teşhis yöntemleri, gerekse tedavi yöntemleri alanlarında gittikçe artmaktadır. Ayrıca oksidatif strese tanışmamız, bir çok yeni tedavi yaklaşımı gelişmesine öncülük etmiştir. Oksidatif stresi azaltacak ve sperm kalitesini arttıracak bir çok antioksidan olmasına rağmen, kullanımlarında etkileri konusunda yeterli bilimsel kanıt olmaması ve bu yüzden de onay almamaları nedeniyle ciddi endişeler vardır. YÜT'de SOR'u en aza indirmek için yoğunluk gradiyent santrifüjü, glass-wool filtrasyon ve sedimentasyon-migrasyon gibi lökositleri uzaklaştıran sperm hazırlama teknikleri mevcuttur. Son yıllarda kullanılan yeni bir teknik olan manyetik etkili hücre ayırma; hareketli, morfolojik olarak normal, canlı, soğuğa dirençli ve yüksek fertlizasyon potansiyeline sahip spermeleri elde etmektedir. (82) Bu ortama vitamin C ve vitamin E eklenmesi spermi DNA hasarından korur.(83)

Bununla birlikte, oksidatif stres erkek infertilitesinin sebeplerinden yalnızca biridir ve antioksidan tedavi artmış oksidatif stres bulunan ve DNA hasarı tespit edilmiş vakalarda kullanılmalıdır.

Oksidatif stresin ölçümü ve antioksidan tedavi klinik kullanıma henüz girmemiştir. Yakın zamanda SOR ve oksidatif stres tayini uygulanabilir hale getirilip ileri tekniklere gerek kalmadan rutinde kullanılabilir. Ayrıca, SOR için referans değerler belirlenmelidir. Tedavi için kullanılacak antioksidanlar, dozları ve süreleri de saptanmalıdır. YÜT kullanımının arttığı günümüzde, sperm hazırlama ortamı antioksidanlar ile desteklenmelidir. Bununla birlikte erkek infertilitesinde ve YÜT'de oksidatif stresin ve antioksidanların aydınlatılmasına yönelik daha fazla çalışma yapılmalıdır.



## Kaynaklar

- Purvis K, Christiansen E: Male infertility: current concepts. *Ann Med* 1992;24:258-72.
- de Lamirande E, Gagnon C: Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995;10:15-21.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson MC, Carrell DT: Effect of sperm preparation techniques by density gradient on intra-individual variation of sperm motility. *Arch Androl* 2007;53:349-51.
- Aitken RJ: The Amoroso Lecture. The human spermatozoon-a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999;115:1-7.
- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM: Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004;8:616-27.
- Coyle CH, Kader KN: Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in endothelial cells exposed to physiologic shear stress. *ASAIO J* 2007;53:17-22.
- Aitken RJ: Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:659-68.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D: Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1995;103:17-26.
- Agarwal A, Prabhakaran SA, Sikka SC: Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *AUA Update Series* 2007;26:1-12.
- Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B: Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* 1995;369:131-135.
- Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY: Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development. *Arch Androl* 2004;50:173-9.
- 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;6:59-65.
- Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ: Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996;17:276-87.
- Aitken RJ, Buckingham DW, West KM: Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol* 1992;151:466-77.
- Wolff H: The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1995;63:1143-57.
- Aitken J, Krausz C, Buckingham D: Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* 1994;39:268-79.
- Oborna I, Fingerova H, Novotny J, Brezinova J, Svobodova M, Aziz N: Reactive oxygen species in human semen in relation to leukocyte contamination. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009;153:53-8.
- Tunc O, Thompson J, Tremellen K: Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. *Int J Androl.* 2010;33:13-21.
- Brooks DE: Carnitine in the male reproductive tract and its relation to the metabolism of the epididymis and spermatozoa. In *Carnitine biosynthesis, Metabolism and Functions*, RA Frenkel, D McGarry (eds), New York, Academic Press, 1980;pp. 219-35
- Venkatesh S, Shamsi MB, Dudeja S, Kumar R, Dada R: Reactive oxygen species measurement in neat and washed semen: comparative analysis and its significance in male infertility assessment. *Arch of Gynecol Obstet* 2004;45:1432-9.
- Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A: Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 2001;22:575-83.
- Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S, Newton TA, Thornton SJ: Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Hum Reprod* 1997;12:2418-21.
- Plante M, de Lamirande E, Gagnon C: Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 1994;62:387-93.
- Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW: Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1993;35:302-15.
- Aitken RJ, Wingate JK, De Iulius GN, McLaughlin EA: Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol Hum Reprod* 2007;13:203-11.
- Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR: Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol* 1994;152:107-110.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev* 1997;47:468-82.
- de Lamirande E, Gagnon C: Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992;13:379-86.
- Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ: Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl* 1998;21:81-94.
- Kessopoulou E, Powers HC, Sharma KK, Pearson MC, Russel JM, Cooke ID, et al. A double-blind randomized placebo crossed-over trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril.* 1995;64:825-31.
- El-Taieb MA, Herwig R, Nada EA, Greilberger J, Marberger M: Oxidative stress and epididymal sperm transport, motility and morphological defects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2009;14:199-203.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T: Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997;68: 519-24.
- Duru KN, Morshedi M, Oehninger S: Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000;74:1200-7.

34. Tunc O, Tremellen K: Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26:537-44.
35. Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF: Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod* 2002;8:719-21.
36. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A: Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007;33:603-21.
37. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U: Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31-7.
38. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997;138:2081-8.
39. 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;80:531-5.
40. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829-43.
41. French DB, Desai NR, Agarwal A: Varicocele repair: Does it still have a role in infertility treatment? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008;20:269-74.
42. Koksalt IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A: Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl* 2003;5:95-9.
43. Turkyilmaz Z, Gulen S, Sonmez K, Karabulut R, Diñçer S, Can Bařaklar A et al. Increased nitric oxide is accompanied by lipid oxidation in adolescent varicocele. *Int J Androl.* 2004;27:183-7.
44. Richardson I, Grotas AB, Nagler HM: Outcomes of varicocelectomy treatment: An updated critical analysis. *Urol Clin North Am.* 2008;35:191-209.
45. Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, Imam H, Othman IA: Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *Int J Androl* 2001;24:261-5.
46. Hendin BN, 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.* 1999;161:1831-34.
47. Allamaneni SS, Naughton CK, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A: Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil Steril* 2004;82:1684-6.
48. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS: Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2006;12:630-3.
49. Aitken RJ, West KM: Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl.* 1990;13:433-51.
50. Aitken RJ, Buckingham DW, West K, Brindle J: On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions. *Am J Reprod Immunol.* 1996;35:541-51.
51. Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ: Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leukocytes. *Fertil Steril.* 1992;57:1317-25.
52. Aydos K, Soygur T, Kupeli B, Unsal A, Tolunay O, Erdem E, et al. Testicular effects of vasectomy in rats: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Urology.* 1998;51:1051-6.
53. Vitali G, Parente R, Melotti C: Carnitine supplementation in human idiopathic asthenospermia: Clinical results. *Drug Exp Clin Res* 1995;21:157-9.
54. Moncada ML, Vicari E, Cimino C, Calogero AE, Mongioi A, D'Agata R: Effect of acetylcarnitine treatment in oligoasthenospermic patients. *Acta Eur Fertil* 1992;23:221-4.
55. Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS: The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1033:177-88.
56. Lewin LM, Beer R, Lunenfeld B: Epididymis and seminal vesicle as sources of carnitine in human seminal fluid: the clinical significance of the carnitine concentration in human seminal fluid. *Fertil Steril* 1976;27:9-13.
57. Enomoto A, Wempe MF, Tsuchida H, Shin HJ, Cha SH, Anzai N, et al. Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. *J Biol Chem* 2002;39:36262-71.
58. Bohmer T, Johansen L: Carnitine-binding related suppressed oxygen uptake by spermatozoa. *Arch Androl* 1978;1:321-4.
59. Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril.* 2005;84:662-71.
60. Abd-Allah AR, Helal GK, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS, Al-Bakheet SA. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2:73-81.
61. Lenzi A, Lombardo F, Sgrò P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril.* 2003;79:292-300.
62. Moradi M, Moradi A, Alemi M, Ahmadian H, Abdi H, Ahmadi A et al. Safety and efficacy of clomiphene citrate and L-carnitine in idiopathic male infertility: a comparative study. *Urol J.* 2010;7:188-93.
63. Ernster L, Forsmark-Andree P. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. *Clin Invest* 1993;71:60-5.
64. Kelso KA, Redpath A, Noble RC, Speake BK. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *J. Reprod Fertil* 1997;109:1-6.
65. Balercia G, Arnaldi G, Fazioli F, Serresi M, Alleva R, Mancini A et al. Coenzyme Q10 levels in idiopathic and varicocele-associated asthenozoospermia. *Andrologia* 2002;34:107-11.
66. Balercia G, Mosca F, Mantero F, Boscaro M, Mancini A, Riccardo-Lamonica G et al. Coenzyme Q(10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertil Steril.* 2004;81:93-8.
67. Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S et al. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertil Steril.* 2009;91:1785-92.

68. Sørensen MB, Stoltenberg M, Danscher G, Ernst E. Chelating of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility. *Mol Hum Reprod* 1999;5:338-41.
69. Ebisch IMW, Thomas CMG, Peters WHM, Braat DD, Steegers-Theunissen RPM. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum Reprod Update* 2007;13:163-74.
70. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ: Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res.* 2009;29:82-8.
71. Fuse H, Kazama T, Ohta S, Fujiuchi Y: Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters. *Int Urol Nephrol.* 1999;31:401-8.
72. Joshi R, Adhikari S, Patro BS, Chattopadhyay S, Mukherjee T. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1390-9.
73. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril.* 2002;77:491-8.
74. Ciftci H, Verit A, Savas M, Yeni E, Erel O. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. *Urology.* 2009;74:73-6.
75. Safarinejad MR, Safarinejad S. Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *J Urol.* 2009;181:741-51.
76. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996;17:530-7.
77. Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005;26:349-53.
78. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE. et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactiveoxygen species. *Fertil Steril* 2004;82:593-600.
79. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004;25:5-18.
80. Zhang X, Sharma RK, Agarwal A, Falcone T. Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. *J Assist Reprod Genet* 2005;22:415-7.
81. Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. *Obstet Gynecol* 2005;105:653-60.
82. Wroblewski N, Schill WB, Henkel R. Metal chelators change the human sperm motility pattern. *Fertil Steril* 2003;79:1584-9.
83. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W: The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 1998;13:1240-7.