

Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis

Araş. Gör. Merih Tekcan (MSc.)

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Oksijen canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (1).

Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar verir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirse, hücrede serbest radikaller artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) 'oksidatif stres' denir (2).

Dejeneratif hastalıkların gelişiminde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Nöronlar, yani sinir/beyin hücrelerindeki oksidatif stres kendini nöro-dejeneratif hastalıklar olarak göstermektedir (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, vb.). Damar iç yüzeyindeki hücrelerde (endotelde) oksidatif hasar damar sertliği (ateroskleroz) gelişiminde rol oynamakta, dolayısıyla kalp-damar, beyin-damar ve diğer damar hastalıklarına neden olmaktadır. Hücre DNA'sına gelen oksidatif hasar kanser gelişimine yol açabilmektedir. Hücre DNA'sına toksinlerin verdiği hasar kanser gelişimine yol açabilmektedir.

Oksidatif stres ve serbest radikaller

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya

da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur (2,3). 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (2,3).

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna (O_2^-) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığında hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutasyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır. Dietilditiyokarbamat gibi süperoksit dismutazın etkinliğini engelleyen maddeler, süperoksit gruplarının zararsız hale getirilmesini sınırlandırırken, lipid peroksidasyonu hızlandırırlar. Ayrıca katalazın etkinliğini engelleyen maddeler (aminotriazol gibi herbisidler) de etkin oksijen gruplarına veya bu grupları oluşturan maddelere duyarlılığı artırır (2,3).

Serbest radikallerin atomlarında elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, atomik yada moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümleri olduklarından başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girerler ve "oksidan moleküller" veya "reaktif oksijen partikülleri (ROP)" ni içerirler (2).

Serbest radikaller, hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklı etmenlere bağlı olarak oluşurlar. Ekzojen kaynaklı etmenler arasında parakuat, allokstan gibi kimyasalların etkisi altında kalma, karbon tetraklorür, parasetamol gibi ilaç toksikasyonları, iyonize ve ultraviyole radyasyon, hava kirliliği yapan fitokimyasal maddeler, sigara dumanı, solventler gibi çevresel faktörler, nitrofurantoin, bleomisin, doksorubisin ve adriamisin gibi antineoplastik ajanlar, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapıcı maddeler bulunması nedeniyle serbest radikaller toksikolojik açıdan da önemlidir (2,3).

Eğer serbest radikaller nötralize edilmezlerse hücre membran proteinlerini yıkarak, membran lipit ve proteinlerini yok ederek, hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonunu engelleyerek, nükleer membranı geçip nükleustaki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirerek, bağışıklık sistemindeki hücreleri yok edip bağışıklık sistemini zorlayarak vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler (2,3).

Serbest radikaller hücreye nasıl zarar vermektedir?

3 mekanizma mevcuttur:

1. **Membran Lipitlerinin Peroksidasyonu;** serbest radikaller hücrenin membranına saldırdıklarında gerçekleşir. Serbest radikaller, hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hızlı hücre ve doku bozulmalarına neden olurlar.
2. **Disülfid Bağı Oluşumu;** Glutasyon, tüm memeli hücrelerinde milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Glutasyon (GSH) gibi tiyollerin (R-SH) oksidasyonu tiyol ve oksijen radikallerinin oluşumuna neden olur. Bunlar sülfür merkezli radikallerdir (RSH) ve proteinlerdeki homolitik fisyon (sülfürlerin karşılıklı bağlanması) reaksiyonları disülfid bağı oluşturur. Bu da proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerini engeller.
3. **DNA Hasarı;** DNA molekülü yeniden sentezlenemeyen ancak kopyalanabilen bir molekül olduğundan DNA modifikasyonları mutasyonlara ve genetik bozukluklara neden olmaktadır. Bu yüzden DNA hasarının ROS ile indüklenen hücresel modifikasyonların en ciddi olduğu düşünülmektedir. Oksidatif DNA modifikasyonları memeli DNA'sında

sıktır. Bu modifikasyonların karsinogenez, diyabet ve yaşlanmanın mekanizmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Hidroksil radikalının DNA molekülünün tüm bileşenleriyle reaksiyona girdiği bilinmektedir. Pürin, primidin bazlarında ve deoksiriboz iskelette hasara yol açmaktadır. Hidroksil radikali DNA'nın çapraz bağlarına eklenebilmekte, timinin metil grubundan bir hidrojen atomu ve 2' deoksiribozun beş karbon atomunu çıkarmaktadır. Baz ve şekerin ileriki reaksiyonları, oluşan modifiye baz ve şekerlerin, baz-serbest bölgelerin, kenar kırılmalarının ve DNA-protein çapraz bağlanmalarının çeşitliliğine yol açmaktadır.

Ayrıca peroksinitrit ve nitrojen oksit gibi reaktif nitrojen türleri de DNA hasarına neden olmaktadır. Bununla birlikte, dokularda oksidatif DNA modifikasyonunun artmış düzeylerinin veya oksidatif modifiye nükleik asit ürünlerinin artmış üriner atılımının insanlarda kanser gelişimini öngörebileceğine ilişkin epidemiyolojik kanıtlar mevcut değildir. Bu nedenle kanser gelişimi, yaşlanma ve diğer hastalıkların DNA oksidasyonu ile ilişkisini gösteren ileriki çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. ROS'nin mutajeniteye yol açabilen bazı DNA baz modifikasyonlarını onarabilen spesifik ve genel mekanizmalar vardır. ROS'ne maruz kalma sonrasında onarıcı mekanizmaların verimliliğinin ilginç olarak artması oksidatif stresi takiben birçok DNA onarıcı enzimin ekspresyonunun artmasına bağlıdır.

Testisteki Durum

Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyel oksijen tüketimini göstermektedir. Ayrıca; testisteki zayıf vaskülarizasyon, bu dokuda oksijen durumunun düşük ve bu düşük oksijen miktarı için olan rekabetin oldukça şiddetli olmasıdır.

Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi steroidogenezini oksidatif stresle hasar görebildiği için bu dokudaki düşük oksijen miktarı, testisin kendini serbest radikallerin hasarından koruyabileceği mekanizmaların önemli bir parçası olabilmektedir (4-7).

Testis bu korunmayı sağlamak için; çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir.

Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir,

çünkü peroksidatif hasar testiküler torsiyondan diyabete ve ksenobiyotik maruziyeti gibi koşullarda patolojik sonuçları destekleyen bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebiymiş gibi kabul edilir (8,9). Testiküler mikroçevredeki düşük oksijen miktarına rağmen testis; fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle, OKSİDATİF STRESE karşı hassas hale gelmektedir.

Birçok hastalığın oluşumunda rol oynayan oksidatif stres, ROS'nin üretimi ve vücudun antioksidan savunma sistemleri arasında dengesizlik olduğunda ortaya çıkmaktadır (10,11).

ROS; mitokondriden ve ksantin- ve NADPH- oksidazları içeren çeşitli enzimlerden ve ayrıca sitokrom P450'lerden oluşabilir. Bu enzimler ROS'un oluşumunda özelleşmiştir ya da bu toksik metabolitleri kendi biyokimyasal aktivitelerinin istenmeyen bir sonucu olarak üretmektedir.

Bu risklerin üstesinden gelebilmek için, testis hem enzimatik hem de non-enzimatik öğelerden oluşan antioksidan sistemleri içermektedir (12,13).

SOD (süperoksit dismutaz); süperoksit anyonu hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne dönüştüren ve antioksidatif reaksiyonların tam ortasında rol oynayan önemli bir enzimdir. SOD1 (CuZnSOD)- sitosolik, SOD2 (MnSOD)-mitokondriyal, SOD3 (ECSOD)-ekstraselüler olmak üzere 3 izozimi vardır. Testiste her 3 formu da vardır (14). Testiküler ısı maruziyetine bırakılmış SOD1 -/- farelerle yapılan bir çalışmada; germ hücrelerinin mitokondri-lerindeki sitokrom c kaçağı ve DNA zincir kırıklarındaki artış yabanıl tipte karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmıştır (15,16).

H₂O₂ (hidrojen peroksit); lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif hasarının indüklenmesini engellemek amacıyla hızlıca hücreden elimine edilen güçlü bir membran geçici oksidandır.

Katalaz; hidrojen peroksidi detoksifiye eder ve elektron donörü ihtiyacı yoktur (17). En iyi bilinen antioksidan enzimlerden biridir, H₂O₂'ye karşı koruma etkisi gösterilmiştir, lokalizasyonu peroksizomla sınırlıdır, karaciğer gibi bazı organlarda rolü vardır, ancak erkek genital sistemindeki rolü henüz bilinmemektedir (18,19).

Testis; önemli ROS elimine eden enzimlere ek olarak, oksidatif hasara karşı koruma için küçük moleküler ağırlıklı antioksidan faktörlere de başvurmaktadır. Antioksidan maddeler, serbest radikallerin eşleşmemiş elektron duru-

munu ortadan kaldırmak için elektron vermek yada almak suretiyle serbest radikal süpürücü etkinlik gösteren maddelerdir. Bu faktörler; iyonlar ve serbest radikal süpürücülerini (scavenger) kapsamaktadır.

Çinko (Zn); SOD gibi serbest radikal süpürücü enzimlerin en önemli bileşenidir ve sülfidril grupların bilinen koruyucusudur. Ayrıca, katalitik bölgelerdeki Cu ve Fe gibi geçiş metallerinin yerini değiştirerek lipid peroksidasyonunu engellediği düşünülmektedir (20-25).

E Vitamini; peroksil radikallerini yok ederek polidoy-mamış yağ asitleri (PUFA)'ni oksidasyona karşı korumaktadır. Yüksek miktarda Sertoli hücrelerinde ve pakiten spermatozoidlerde ve daha az derecede ise yuvarlak spermatozoidlerde mevcuttur (26,27).

C Vitamini; sulu fazda reaktif oksijen türleri (ROS)'nin en önemli süpürücüleridir ve böylelikle E vitamini'nin aktivasyonunu tamamlamaktadır. Spermatojenezi desteklemektedir. Dengeli beslenen insanlarda C ve E vitamini-nin eksikliğinin görülmesi oldukça nadirdir (28,29).

E ve C Vitamini eksikliğinde; Testiste, hem spermatojenezi hem de testesteron üretimini bozan oksidatif stres durumu ortaya çıkmaktadır. Aksine normal hayvanlara askorbat uygulaması hem sperm üretimini hem de testesteron salınımını stimüle etmektedir (26). C vitamini aynı zamanda; Arsenik, Arochlor 1254, Kadmiyum, Endosulfan, alkol gibi pro-oksidanlara maruz kalarak indüklenen testiküler oksidatif strese karşı koymaktadır (30-34).

Melatonin; Pineal bezden salınan bir hormondur (5-methoxy-N-acetyl-tryptamine). Aynı zamanda güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidandır. Testisi oksidatif stresten korumaktadır. Melatonin hem lipid hem de sulu çevrede çözünebilir formdadır ve germinal epiteli korumak için kan-testis bariyerini geçebilmektedir (45). Seminal plazmadaki düşük melatonin seviyesi, zayıf motilite, lökositospermia, varikosel ve non-obstrüktif azospermi gösteren infertil hastalarda gözlenmiş ve erkek genital sistemindeki oksidatif strese ilişkilendirilmiştir (46). İlginç olarak; sol taraflı varikosel oluşturulmuş deney modelinde melatoninin intraperitoneal enjeksiyonunun testiste oksidatif stresi hafiflettiği gösterilmiştir (47).

Sitokrom c; testis spesifik formu H₂O₂'nin azaltılmasında önemli rol oynayan bir moleküldür. Bu Sitokrom C izoformu aynı zamanda apoptozun da en güçlü aktivatörü olduğundan hasarlı germ hücrelerinin azalmasını kolaylaştırarak testislerin korunmasını sağlamaktadır (48).

Testiste antioksidan durumun bozulması

Testis; steroidogenez ve sperm üretimini desteklemek amacı ile antioksidan açıdan korunmasına rağmen, bazı endojen ve ekzojen faktörlerin bu savunmayı alt üst ettiği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir. Meydana gelen rahatsızlıklar; kriptorşidizm, testiküler torsiyon, varikosel, hipertiroidizm, diyabet, enfeksiyon, repodüktif hormon dengesizliği, zenobiyotiklerin etkisi (50). Bunların sonucunda; erkek germ hücre hattında DNA hasarı, spermatozoada DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, oksidatif stres indüklenmesi, lipid peroksidasyonunun indüklenmesi, ROS temizleyicilerinin kaybı, testiküler SOD ve katalazın baskılanması görülmektedir.

Antioksidan terapi

Antioksidanlar, çeşitli hastalıkların oluşmasında tetikleyici rol oynayan “oksidatif stres” sonucu açığa çıkan serbest radikallerin üretilmesini engellemekle vazifelendirilmiştir.

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Vücutta bulunan antioksidan savunma sistemleri, serbest radikalleri tesirsiz hale getirmeye çalışır. Ancak savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda güncel bir metod olarak erkek

infertilitesinde de kullanılan antioksidan terapi devreye girmektedir. Oksidatif stres kaynaklı rahatsızlığı bulunan hastalarda endojen kaynaklı antioksidanlar etkili olmadığından, oksidatif hasarı azaltabilecek diyet sadece dışardan alınacak antioksidanlardır (Örn: Vitamin E,C, Melatonin). Böylece uygulanan antioksidan terapi sperm kalitesini de geliştirmektedir. Antioksidan terapi ile lipid peroksidasyon potansiyelinin azaltılması; fertilizasyon oranlarının gelişmesiyle paralellik göstermektedir (57,58,60-64).

Sonuç

OS, erkek infertilitesinin etiolojisindeki en önemli faktördür. İzole spermatozoonda ROS saldırısı; lipid peroksidasyonunu indüklemekte, hücrelerin hem motilitesini hem de DNA fragmentasyonunu ve normal embriyonik gelişimi destekleyen yeteneğini bozmaktadır. Testiste ise; Leydig hücrelerinin steroidogenik kapasitesini bozulmasına neden olmaktadır. Ejakulatta OS'un varlığı ile erkek infertilitesi arasında korelasyonel bir ilişki olduğu klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır (69-78). Bu derlemede deneysel hayvan modellerinin ışığında, testiste OS'in indüklenmesi ve erkek repodüktif fonksiyonu bozulması arasındaki ilişki incelenmiştir. Erkek infertilitesinin etiolojisinde OS dominant olmasına rağmen, altında yatan diğer mekanizmalar hala çözülememiştir. Testis üzerinde OS meydana getiren; fiziksel, kimyasal, patolojik ve çevresel faktörlerin bulunduğu ise artık bilinmektedir.

Kaynaklar:

1. Janos Z, Krishnamurti D. *Oxidative Stres and Disease 10: Nutrients and cell signaling*. Taylor & Francis, 2005: Önsöz.
2. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. *Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 1997; 3-4: 92-95*
3. Burçak G, Andıcan G. *Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. Cerrahpaşa Tıp Dergisi Cilt (Sayı) 35 (4)*.
4. Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA. *Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. Biol Reprod 1976; 14:481-488*.
5. Peltola V, Mantyla E, Huhtaniemi I et al. *Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. J Androl 1994; 15:353-361*.
6. Quinn PG, Payne AH. *Oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in cultured leydig cells: Role in steroidogenic desensitization. J Biol Chem 1984; 259:4130-4135*.
7. Chen H, Liu J, Luo L et al. *Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. Exp Gerontol 2005;40:728-736*.
8. Banfi B, Molnar G, Maturana A et al. *A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. J Biol Chem 2001; 276:37594-37601*.
9. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J et al. *Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. Mol Hum Reprod. 2002; 8:118-123*.
10. Zangar RC, Davydov DR, Verma S. *Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. Toxicol Appl Pharmacol 2004; 199:316-331*.
11. Kaur P, Kaur G, Bansal MP. *Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: Role of transcription factor NF-kappaB and testicular antioxidant enzymes.Reprod Toxicol 2006; 22:479-484*.
12. Zini A, Schlegel PN. *Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. J Androl 1996;17:473-480*.
13. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. *Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. J Androl 1992; 13:450-455*.
14. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY et al. *Antioxidant superoxide dismutase - A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. Contraception 2002; 65:305-311*.
15. Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y et al. *Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. Free Radic Res 2005; 39:697-705*.
16. Gu W, Hecht NB. *Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse. J Androl 1996; 17:256-262*.
17. Vaisberg CN, Jelezarsky LV, Dishlianova B et al. *Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. Theriogenology 2005; 64:416-428*.

18. Baek JJ, Seo DS, Yon JM et al. Tissue expression and cellular localization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) mRNA in male mice. *J Mol Histol* 2007; 38:237-244.
19. Kaur P, Bansal MP. Influence of selenium induced oxidative stress on spermatogenesis and lactate dehydrogenase-X in mice testis. *Asian J Androl* 2004; 6:227-232.
20. Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1990; 8:281-291.
21. Nair N, Bedwal S, Prasad S et al. Short-term zinc deficiency in diet induces increased oxidative stress in testes and epididymis of rats. *Indian J Exp Biol* 2005; 43:786-794.
22. Khan S, Khan MA, Bhatnagar D et al. Zinc protection against lipid peroxidation from cadmium. *Indian J Exp Biol* 1991; 29:823-825.
23. Batra N, Nehru B, Bansal MP. The effect of zinc supplementation on the effects of lead on the rat testis. *Reprod Toxicol* 1998; 12:535-540.
24. Ozkan K, Boran C, Kilinc M et al. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg* 2004; 39:91-95.
25. Amara S, Abdelmelek H, Garrel C et al. Preventive Effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *J Reprod Dev* 2007, [Epub ahead of print].
26. Johnson FC. The antioxidant vitamins CRC. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1979; 11:217-309.
27. Yoganathan T, Eskild W, Hansson V. Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and Sertoli cells. *Free Radic Biol Med* 1989; 7:355-359.
28. Paolicchi A, Pezzini A, Saviozzi M et al. Localization of a GSH-dependent dehydroascorbate reductase in rat tissues and subcellular fractions. *Arch Biochem Biophys* 1996; 333:489-495.
29. Sonmez M, Turk G, Yuce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology* 2005; 63:2063-2072.
30. Senthil kumar J, Banudevi S, Sharmila M et al. Effects of Vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. *Reprod Toxicol* 2004; 19:201-208.
31. Maneesh M, Jayalakshmi H, Dutta S et al. Experimental therapeutic intervention with ascorbic acid in ethanol induced testicular injuries in rats. *Indian J Exp Biol* 2005; 43:172-176.
32. Rao M, Narayana K, Benjamin S et al. L-ascorbic acid ameliorates postnatal endosulfan induced testicular damage in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2005; 49:331-336.
33. Chang SI, Jin B, Youn P et al. Arsenic-induced toxicity and the protective role of ascorbic acid in mouse testis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 218:196-203.
34. Sen Gupta R, Sen Gupta E et al. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Mol Cells* 2004; 17:132-139.
35. Verma RJ, Nair A. Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian J Androl* 2001; 3:217-221.
36. Aruldas MM, Subramanian S, Sekar P et al. Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: Study in a non-human primate (*Macaca radiata* Geoffroy). *Hum Reprod* 2005; 20:2801-2813.
37. Marchlewicz M, Wiszniewska B, Gonet B et al. Increased lipid peroxidation and ascorbic acid utilization in testis and epididymis of rats chronically exposed to lead. *Biometals* 2007; 20:13-19.
38. Lucesoli F, Fraga CG. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and alpha-tocopherol supplementation. *Toxicology* 1999; 132:179-186.
39. Gavazza MB, Catala A. The effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from rat testis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 74:247-254.
40. Ghosh D, Das UB, Misro M. Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: A correlative approach to oxidative stress. *Free Radic Res* 2002; 36:1209-1218.
41. Latchoumycandane C, Mathur PP. Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodi-benzo-p-dioxin toxicity in rat testis. *J Appl Toxicol* 2002; 22:345-351.
42. Manna I, Jana K, Samanta PK. Intensive swimming exercise-induced oxidative stress and reproductive dysfunction in male wistar rats: Protective role of alpha-tocopherol succinate. *Can J Appl Physiol* 2004; 29:172-185.
43. Jedlinska-Krakowska M, Bomba G et al. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J Reprod Dev* 2006; 52:203-209.
44. Zhou DX, Qiu SD, Zhang J et al. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian J Androl* 2006; 8:584-588.
45. Mogulkoc R, Baltaci AK, Aydin L et al. Pinealectomy increases oxidant damage in kidney and testis caused by hyperthyroidism in rats. *Cell Biochem Funct* 2006; 24:449-453.
46. Awad H, Halawa F, Mostafa T et al. Melatonin hormone profile in infertile males. *Int J Androl* 2006; 29:409-413.
47. Semercioz A, Onur R, Ogras S et al. Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24:86-90.
48. Liu Z, Lin H, Ye S et al. Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:8965-8970.
49. Ahotupa M, Huhtaniemi I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biol Reprod* 1992; 46:1114-1118.
50. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 1999; 61:393-399.
51. Koc A, Narci A, Duru M et al. The protective role of erdosteine on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *Mol Cell Biochem* 2005; 280:193-199.
52. Etensel B, Ozkisacik S, Ozkara E et al. The protective effect of dexpanthenol on testicular atrophy at 60th day following experimental testicular torsion. *Pediatr Surg Int* 2007; 23:271-275.
53. Yagmurdu H, Ayyildiz A, Karaguzel E et al. The preventive effects of thiopental and propofol on testicular ischemia-reperfusion injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006; 50:1238-1243.
54. Ozyurt B, Parlaktas BS, Ozyurt H et al. A preliminary study of the levels of testis oxidative stress parameters after MK-801-induced experimental psychosis model: Protective effects of CAPE. *Toxicology* 2007; 230:83-89.
55. Turk G, Atessahin A, Sonmez M et al. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology* 2007; 67:778-785.
56. Luo Q, Li Z, Huang X et al. Lycium barbarum polysaccharides: Protective effects against heat-induced damage of rat testes and H2O2-induced DNA damage in mouse testicular cells and beneficial effect on sexual behavior and reproductive function of hemicastrated rats. *Life Sci* 2006; 79:613-621.
57. El-Missiry MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14:238-243.
58. Oner-Ilyidogan Y, Gurdol F, Oner P. The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacol Res* 2001; 44:89-93.
59. Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA. The protective action of melatonin on indomethacin-induced gastric and testicular oxidative stress in rats. *Redox Rep* 2001; 6:173-177.
60. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT et al. Melatonin and roentgen irradiation of the testis. *Fertil Steril* 2006; 86:750-752.
61. Gavazza M, Catala A. Melatonin preserves arachidonic and docosapentaenoic acids during ascorbate-Fe2+ peroxidation of rat testis microsomes and mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:359-366.
62. Gavazza MB, Catala A. Protective effect of N-acetyl-serotonin on the non-enzymatic lipid peroxidation in rat testicular microsomes and mitochondria. *J Pineal Res* 2004; 37:153-160.
63. Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T et al. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J Nutr* 2005; 135:757-760.
64. Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *J Nutr Biochem* 2003; 14:104-110.
65. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: Protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17:530-537.
66. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch Androl* 2003; 49:83-94.
67. Aitken RJ, De Lullis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007; 14:727-733.

68. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250:66-69.
69. Aitken RJ. Founders' Lecture: Human spermatozoa: Fruits of creation, seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16:655-664.
70. Aitken RJ. The Amoroso Lecture: The human spermatozoon—a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115:1-7.
71. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem* 2001; 8:851-862.
72. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18:325-332.
73. Kumar TR, Muralidhara. Male-mediated dominant lethal mutations in mice following prooxidant treatment. *Mutat Res* 1999; 444:145-149.
74. Hales DB, Allen JA, Shankara T et al. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1061:120-134.
75. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001; 7:473-481.
76. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006; 18:325-332.
77. Uz E, Sogut S, Sahin S et al. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J Urol* 2002; 20:264-270.
78. Salmasi AH, Beheshtian A, Payabvash S et al. Effect of morphine on ischemia-reperfusion injury: Experimental study in testicular torsion rat model. *Urology* 2005; 66:1338-1342.