

## Varikosel patofizyolojisinde güncel durum

Yard. Doç. Dr. Sadık Görür<sup>1</sup>, Doç. Dr. Selahittin Çayan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji AD, <sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji AD

Erkek infertilitesinin en sık düzeltilebilir patolojisi olan varikosel, genel popülasyonda % 15, infertil erkeklerde ise % 19-41 görülme sıklığına sahiptir. Varikoseli olan erkeklerin bir kısmı fertil olmasına karşın bir kısmı ise varikoselektomiye rağmen infertildir. Bu durum erkek infertilitesinde sebebinin multifaktöryel olabileceğini ve varikosel ile birlikte genetik ve moleküler etkenlerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Son yıllarda savunulan önemli bir görüşe göre; moleküler/genetik bozukluğu olmayan varikoselli olguların fertil olabileceği, bozukluk varlığında varikoselektomiye rağmen infertilitenin devam edeceği, sınırlı bozukluk varlığında ise varikoselektomi sonrası infertilitenin düzelebileceği savunulmaktadır (1-2). Son zamanlarda yapılan genetik ve moleküler çalışmalar ile varikoselin sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi üzerine olan etkisi daha iyi anlaşılmaktadır. Ayrıca, androjen deprivasyonunun, kadmiyum gibi toksik elementlerin sperm üretimi üzerine olan etkileri ve hücre morfolojisi ile ilgili olarak da hipoozmotik şişme ve akrozom reaksiyon indüksiyon testi (ART) araştırma konuları olmuştur. Ayrıca reaktif oksijen türlerinin (ROS) varikoselli hastalardaki etkisinin saptanması ile tedavi seçeneklerine yeni boyut katıldı. Bu derlemede varikosel patofizyolojisindeki güncel yenilikler tartışılmaktadır.

Varikosel ile birlikte karyotip bozukluğu ve/veya Y-kromozom mikrolezyonları gibi genetik bozukluğa sahip infertil erkeklerde varikosel cerrahisine yanıt alınamaması, varikosel patofizyolojisinde genetik faktörlerin de rol oynayabileceğini ortaya koydu. Varikosele bağlı nonobstrüktif azospermisi (NOA) olan 28 hastanın % 43'ünde varikoselektomi sonrası 24 ay izlem sonrası ejakülatlarında sperm gösterildiği bildirildi. Bu hastalara aynı zamanda testis biyopsisi de yapıldı ve operasyon sonrası düzelme görülen hastalarda hipospermatogenez veya spermatid seviyesinde spermatogenik arrest olduğu görüldü. Histopatolojik incelemesinde "Sertoli Cell-Only Sendromu" (SCO) saptanan hastalarda ise herhangi bir düzelme saptanmadı (3). Diğer bir çalışmada 200 azoos-

permik hastada genetik defekt varlığını araştırmak için Y-kromozom haritalaması yapıldı ve 70'inde varikosel ve ikisinde ise Y-kromozom mikrolezyonu saptandı (4). Çayan ve arkadaşları ise, varikoseli olan 33 oligospermik hastanın genetik incelemesinde 7 hastada genetik anomali saptadılar (5). Genetik anomali saptanan 5 hastaya ve genetik anomali saptanmayan 14 hastaya mikrocerrahi subinguinal varikoselektomi uygulandığında, genetik anomali olan grupta semen parametrelerinde herhangi bir düzelme saptanmazken, genetik anomali olmayan grupta ise semen parametrelerinde düzelme elde ettiler. Bu bulgular varikoselli hastalarda tanımlanabilir bir genetik sorunun olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, azospermi veya şiddetli oligospermisi olan varikoselli hastalarda Y-kromozom incelemelerinin önemli ön bulgular verebileceği ileri sürülmektedir.

Hücre membranında "Fas" ve "Fas ligand" olarak bilinen ve "Tümör Nekrozis Faktör" reseptör ailesinin hücre ölümü sinyallerini kontrol eden spesifik membran reseptörleri bulunur. İmmünohistokimyasal olarak Fas germ hücrelerinde, Fas ligand ise Sertoli hücrelerinde olduğu gösterildi (6). Sitoplazmik düzeyde "Caspas" olarak bilinen sistein proteazları içeren sinyal ileti yolları vardır. Fas Fas liganda bağlandığı zaman hücre membranının iç kısmında bulunan procaspas-8'i aktive eder ve aktive caspas-8, diğer caspaslar gibi apoptozisi kontrol eden caspas-3'ü aktive eder. Nükleer seviyede ise apoptozisi kontrol eden p53 ve pro-apoptotik Bax, anti-apoptotik Bcl-2 geni vardır. p53 geni, tümör süpresör bir gen olup DNA hasarına yanıt verir ve geçici olarak hücre siklusunu G1 fazında durdurarak DNA tamiri için yeterli süreyi sağlar (7). DNA hasarı geri dönüşümsüz ise p53 Fas reseptörlerini ve Fas genini aktive ederek hücre ölümünü başlatır. Bcl-2 ise mitokondriden sitokrom-C salınımını stimüle veya inhibe ederek apoptozisi başlatabilir veya inhibe edebilir. Bu enzimin varlığı caspas-9'u stimüle eder, bu da apoptozis yolğunun bir parçası olan caspas-3'ü stimüle eder (8). Fas'a bağımlı

apoptozisin blokörü olan “soluble-Fas” (s-Fas)’ın seminal plazma içindeki konsantrasyonunun ölçüldüğü bir çalışmada, oligospermisi olan varikoselli hasta grubunda s-Fas miktarının azalmış olduğu ve bu yüzden apoptozun attığı, azalmış olan s-Fas miktarının varikoselektomi ile düzeldiği, bunun da apoptozisi azaltarak sperm parametrelerinde düzelmeye yol açtığı gösterilmiştir (9). Deneysel olarak oluşturulan bir varikosel modelinde, varikosel oluşturulduktan 7, 14 ve 28 gün sonra elektron mikroskobu ile seminifer tübül başına apoptotik hücre sayıları sırasıyla 0.15, 0.23 ve 0.27 saptanarak karşı testisteki apoptotik hücre sayılarına göre (0.14, 0.16 ve 0.17, sırasıyla) apoptoziste istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptandı ve bu artışın 14. günden sonra başladığı gösterildi (10). p53 ekspresyonunu ile apoptozisin araştırıldığı bir başka çalışmada ise varikosel ile apoptozis arasında bir ilişki saptanmadı (11). Bu bulgu, daha önce yapılan bir çok çalışma ile çeliştiğinden bu konunun daha fazla incelenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Varikoselli hastalarda bir diğer apoptozis nedeninin androjen deprivasyonu olduğu bildirilmiştir. Hayvan modeli ve insanlarda varikoselin testis dokusundaki pregnanolonun 3-hidroksi testosterona dönüşümü üzerine olan etkisine bakıldı ve azalma olduğu bildirildi (12). İmmatür ratlarda yapılan bir çalışmada hipofizektomiden 4 gün sonra apoptozisin başladığı gözlemlendi (13). Matür ratlarda ise GnRH antagonisti verildikten 5 gün sonra preleptoten ve pakiten spermatositlerde ve evre 7-8 spermatidlerde apoptozisin başladığı saptandı (14). Rekombinant LH ve rekombinant FSH verildikten sonra apoptoziste azalma saptandı. İntratestiküler testosteron (T) seviyesi ise normale yükseldi. Bir in-vitro çalışmada, izole seminifer tübülleri serumdan arınmış bir ortamda inkübe edilmiş ve 48 saat içinde germ hücrelerinde apoptozisin başladığı görüldü. Ortama T eklendikten sonra apoptozisin baskılandığı gösterildi (15). Normal sağlıklı erkeklerin perkütan testiküler aspiratlarında intratestiküler T seviyelerine bakıldı ve ortalama T konsantrasyonu serum değerinden büyük olarak (485 ng/ml) bulundu (16). Bu teknik varikoseli olan infertil erkeklere de uygulanarak apoptozisi başlatmak için gereken intratestiküler T konsantrasyonu tespit edilmeye çalışıldı. Son zamanlarda androjen reseptörlerinin moleküler yapısı değerlendirildi ve aşırı glutamin tekrarına bağlı reseptör disfonksiyonu olduğu gösterildi. Yong ve arkadaşları bu mutasyonların infertil erkeklerin %

30’undan fazlasını etkileyebileceğini savunurken, Yoshida ve arkadaşları varikoseli olan 41 azospermik hastada androjen reseptörüne baktı ve reseptörlerde aşırı glutamin tekrarı olduğuna dikkat çekti (17,18). Defektif androjen reseptörünün varikoselle birlikte ko-insidental olarak bulunabileceğini belirterek androjen reseptörünün moleküler çalışmasının yapılması gerektiğini belirttiler.

Oksidatif stresin (OS) ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) sperm parametreleri üzerine olan etkisi bilinmektedir. Fujisawa ve arkadaşlarının varikoseli olan infertil hastalarda DNA polimeraz enzim aktivitesinin azaldığını ve buna bağlı olarak spermatogenezin azaldığını göstermesinden sonra bu konuda çalışmalar hız kazandı (19). Sol varikoseli olan 16 hastalık bir seri ile yapılan çalışmada, ROS’un varikosel ile arttığı ve buna bağlı olarak DNA fragmentasyonunda bir artış olduğu gösterildi (20). Zini ve arkadaşları ise mikrocerrahi varikoselektomi operasyonundan sonra DNA bütünlüğünde iyileşme olabileceğini saptadı (21). Deneysel olarak oluşturulan bir varikosel modelinde, varikoselin yaratmış olduğu apoptotik etkinin melatonin verilmesi ile azaldığı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doku malondialdehit (MDA) ve anti-apoptotik Bax protein seviyelerinin benzer olduğu gösterildi. Bu etkinin antioksidan enzim aktivitesinin artışı ile sağlandığı saptandı (22). Testiküler doku nitrik oksit (NO) ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin (TBARS) etkisinin araştırıldığı bir başka deneysel çalışmada ise sperm motilitesinin doku NO düzeyi ile yakın ilişkili olduğu ve TBARS’ın ise NO yolu ile etkili olduğu gösterildi (23).

Varikoselin patofizyolojisinde incelenen konulardan birisi de varikoselin testis dokusu üzerinde yarattığı hipoksidir. Bu konuda yapılan deneysel bir çalışmada, varikosel sonrası gelişen hipoksik reaksiyonun varlığı araştırıldı. Dokuda “Hypoxia Inducible Factor-1” (HIF-1), pro-angiogenic büyüme faktörü olan “Vascular endothelial Growth Factor” (VEGF)’un ve buna bağlı olarak angiogenezin arttığı gözlemlendi (24).

Laboratuvar hayvanlarında, kadmiyum birikiminin testiküler hasara yol açtığı ve sperm fonksiyonlarını değiştirdiği gösterilmiştir (25). Günlük yaşamda kontamine su, sigara içimi ve aerosollerle aşırı miktarda kadmiyuma maruz kalınabilmektedir. Kadmiyum, havayolu ile akciğerlerden gastrointestinal sisteme göre yaklaşık 2 kat kadar fazla absorbe edilmektedir. Emilen kadmiyum artmış testiküler kan akımı nedeniyle testise ulaşarak birikir. Testiste vaskü-

ler endotelde hasara yol açar ve intratestiküler ödem ve hücrelerarası sıvı basıncının artışına neden olur (26). Hasar oluştuktan sonra testis içindeki tüm bölümlere ulaşır. Kadmiyuma maruz kalan işçilerde ve sigara içenlerde serum kadmiyum konsantrasyonu sigara içmeyenlere göre iki kat yüksek bulunmasından dolayı spermatogenez için toksik bir ajan olduğu iddia edilmektedir (27). Varikoselli hastalarda, ağır içicilerle karşılaştırıldığında seminal plazma ve testiküler kadmiyum seviyesinin arttığı gösterildi (28,29). Varikoselli hastaların testis biyopsilerinde apoptotik hücrelerde kadmiyum biriktiği saptandı. Kontrol grubunda tübül başına % 10 apoptotik hücre ile birlikte 0.3 mg Cd<sup>2+</sup>/mg saptanırken varikoseli olan normal spermatogenezli hastalarda da benzer sonuçlar elde edildi. Buna karşın, hipospermatogenezi olan varikosel grubunda ise tübül başına % 20-50 apoptotik hücre ile birlikte 1.3 mg Cd<sup>2+</sup>/mg tespit edildi. Bu bilgiler kadmiyumun varikoselli hastalarda spesifik bir toksik ajan olduğunu göstermektedir. Benoff ve arkadaşları, spermatozoaları değişik kadmiyum konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda bir süre beklettikten sonra, spermatozoaların sivrileştiğini ve bunun hücre iskeletindeki bozulmaya bağlı olduğunu gözlemlediler (30). Benoff ve arkadaşları başka bir çalışmada, sol varikoseli olan hastalardan peroperatif olarak iğne aspirasyon biyopsisi ile testis dokusu alarak ve atomik absorpsiyon yöntemi ile seminifer dokuda kadmiyum seviyesine ve apoptozis yüzdesine bakarak varikoselektominin sonucunu önceden tahmin etmeyi amaçladı. Sonuçta seminifer epitel içindeki apoptotik hücre nükleusu oranı ile varikoselektomi sonrası spermatojenik yanıt arasında negatif ilişki saptadılar (31). Laboratuvar hayvanlarınca kadmiyuma maruz kalmadan önce ve sonra verilen çinkonun, askorbik asitin ve selenyumun koruyucu oldukları çeşitli çalışmalarla gösterildi (32-34). Geçmişte bazı klinisyenler varikoselli hastalara ampirik olarak çinko verdiler (35). Çinko, askorbik asit ve selenyum tedavisi, seminal ve/veya testiküler kadmiyumu yüksek veya çinko değeri düşük olarak saptanan hastalara verilmesi uygun bir tedavi seçeneği gibi gözükmektedir.

İnsanlarda varikoselin semende güçlü bir antioksidan olan mitokondrial koenzim Q10 seviyesini düşürdüğü saptandı (36). Bir başka çalışmada ise koenzim Q10 tedavisinin total antioksidan kapasiteyi arttırdığı, bunu da muhtemelen oksijen radikalleri ile antioksidan defans arasındaki balansı sağlayarak oluşturduğu gösterildi (37). Superoksit dismutaz ve katalaz gibi diğer doğal antioksidan-

ların da defektif olduğu gösterildi (38,39). ROS miktarının semende arttığı ve antioksidanların defektif olduğu olgularda araştırmacılar antioksidan olarak vitamin E ve glutatyonu kullandılar ve sperm motilite ve morfolojisinde iyileşme elde ettiklerini bildirdiler (40,41). Yapılan başka bir çalışmada ise vitamin E tedavisi ile varikoselele bağlı oluşan ROS üretimi ve apoptozisin azaldığı gösterildi (42). Bu bilgiler, varikoseli olup sperm motilitesinde azalma ile birlikte oksidatif stres bulguları veren hastalarda, varikoselektominin antioksidan tedavi ile kombine edilmesinin hastalarda daha fazla yarar sağlayacağını göstermektedir.

İnfertilite konusundaki bir başka araştırma konusu ise oligospermisi olan varikoselli hastalarda akrozom reaksiyonu indüksiyon testidir (ART). Bu test için önceleri ionoforlar kullanılırken daha sonra ART için daha fizyolojik olan immunofloresan tekniği ve insan foliküler sıvısı kullanımıyla varikoseli olan infertil erkeklerde % 38 oranında anormallik saptandı (43). Bu test özel aletler gerektirdiği için daha basit olan hipoozmotik şişme ve çift boyama yöntemi ART'de kullanılmıştır (44). Bu yöntemin kullanıldığı bir çalışmada, varikoselli erkeklerin % 48'inde anormal ART saptanmış ve operasyon sonrası ise bu grubun % 35'inde düzelme saptanırken varikoselektominin akrozom fonksiyonlarına olumlu etkisi olabileceği belirtildi. Benoff ve arkadaşları, akrozom reaksiyonunun kalsiyuma bağlı bir olay olduğunu söyleyerek sperm membranında fonksiyonel kalsiyum kanallarına ihtiyaç olduğuna dikkat çektiler (45). Daha sonraki çalışmalarında ise akrozom reaksiyonunun "L-tip voltage -dependent kalsiyum iyon kanalları" (L-VDCC) ile ilişkili olduğunu belirttiler (46). Yine Benoff ve arkadaşları, son zamanlarda yaptığı başka bir çalışmada ise varikoselli hastalarda kalsiyum kanallarının iyon porlarındaki amino asitlerin delesyonlarını gösterdiler ve bu hastalarda infertilitenin etiyolojisinde genetik bir sebep olduğunu söylediler (47). L-VDCC'ler çinko, kadmiyum, nikel, kobalt, alüminyum ve kurşun transportunu da sağladığı için kalsiyum kanalları çevresel toksinlerden etkilenmektedirler (48). Varikoseli olan infertil erkeklerin spermalarında çinkonun azaldığı ve kadmiyumun arttığı saptandı ve kadmiyumun sperm başına girerek kalsiyum kanallarını ortadan kaldıran etkisi olduğu gösterildi (49). Varikoselektominin kadmiyumun yaptığı etkiyi tekrar geriye döndürüp döndürmediği veya çinko verilmesinin L-VDCC'leri kadmiyumun toksik etkisinden koruyup koruyamayacağı hala net değildir.

## Kaynaklar:

- Marmar JL. Varicocele and male infertility: Part II. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update* 2001; 7 (5): 461-472.
- Benoff S and Gilbert BR: Varicocele and male infertility: part I, preface. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 47.
- Kim ED, Leibman BB, Grinblat DM. Varicocele repairs improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *J Urol* 1999;161:737-740.
- Pryor JL, Kent-First M, Maullen A et al. Microdeletion in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336: 534-539.
- Çayan S, Lee D, Black LD, Reijo Pera RA and Turek JP. Response to varicocelectomy in oligospermic men with and without defined genetic infertility. *Urology* 2001;57: 530-535.
- Lee J, Richburg JH, Shipp EB et al. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis is differentially up-regulated in Sertoli versus germ cell injury in the testis. *Endocrinology* 1999;140: 852-858.
- Fuchs EJ, McKenna KA, Bedi A. P53 -dependent DNA damage-induced apoptosis requires FAS/APO-1 independent activation of CPP32 beta. *Cancer Res* 1997;57: 2550-2554.
- Woo M, Hakem R, Soengas MS et al. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 1998;12: 806-819.
- Fujisawa M and Ishikawa T. Soluble forms of Fas and Fas ligand concentrations in the seminal plasma of infertile men with varicocele. *J of Urol* 2003 170;6(1 of 2): 2363-2365.
- Barqawi A, Caruso A and Meacham RB. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol* 2004;171(1):501-3.
- Kılınc F, Güvel S, Kayaselçuk F, Aygün C, Eğilmez T ve Özkardes H. p53 expression and apoptosis in varicocele in the rat testes. *J Urol* 2004;172: 2475-2478.
- Weiss DB, Rodriguez-Rigau L, Smith KD et al. Quantitation of Leydig cells in testicular biopsies or oligospermic men with varicoceles. *Fertil Steril* 1978; 30: 305-312.
- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK et al. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 643-650.
- Sinha-Hikim AP and Swerdloff RS. Temporal and stage-specific effects of recombinant human follicular stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropin releasing hormone antagonist treated rat. *Endocrinology* 1995; 136: 253-261.
- Erkkila K, Henriksen K and Hirvonen V. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules. *In Vitro* 1997; 82: 2314-2321.
- Jarow JP, Chen H, Rosner TW et al. Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. *J Androl* 2001; 22: 640-645.
- Yong EL, Wang Q, Tut TG et al. Male infertility and the androgen receptor: molecular, clinical and therapeutic aspects. *Reprod Med Rev* 1997; 6: 113-131.
- Yoshida K-I, Yano M, Chiba K et al. CAG repeat length in the androgen receptor gene is enhanced in patients with idiopathic azoospermia. *Urology* 1999; 54: 1078-1081.
- Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, Kojima K and Kamidono S. Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1988;50:795-800.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sika SC and Thomas AJ. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003;80:1431-6.
- Zini A, Blumenfeld A, Libman J and Willis J. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 2004; Dec: 1-4.
- Onur R, Semerciöz A, Orhan I, Yekeler H. The effect of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulatory proteins (Bax-Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol Res* 2004;32:204-208.
- Kısa Ü, Başar MM, Ferhat M, Yılmaz E, Başar H, Çağlayan O and Batıslam E. Testicular tissue nitric oxide and thiobarbituric acid reactive substance levels: evaluation with respect to the pathogenesis of varicocele. *Urol Res* 2004;32:196-199.
- Kılınc F, Kayaselçuk F, Aygün C, Güvel S, Eğilmez T, Özkardes H. Experimental varicocele induces hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in the rat testis. *J Urol* 2004;172:1188-1191.
- Hew KW, Erickson WA and Welsh MJ. A single low cadmium dose causes failure of spermatogenesis in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 121: 15-21.
- Setchell BP and Waites GMH. Changes in permeability of the testicular capillaries and the 'blood-testis barrier' after injection of cadmium chloride in the rat. *J Endocrinol* 1970; 47: 81-86.
- Chia SE, Ong CN and Tsakok FM. Effects of cigarette smoking on human semen quality. *Arch Androl* 1994; 33: 163-167.
- Benoff S, Hurley I, Barcia M et al. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* 1997; 67: 336-347.
- Hurley IR, Cooper GW, Napolitano B et al. High testicular cadmium levels in varicocele-associated infertility (VAI). *Andrologia* 2000; 32: 190-191.
- Benoff S, Cooper GW, Hurley IR et al. Calcium-ion channel blockers and sperm fertilization. *Assist Reprod Rev* 1995; 5: 2-13.
- Benoff SH, Millan C, Hurley IR, Napolitano B and Marmar JL. Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele. *Human Reprod Update* 2004 19; 3: 616-627.
- Saksena S, White MJ, Mertzlufft J et al. Prevention of cadmium-induced sterility by zinc in the male rat. *Contraception* 1983; 27: 521-530.
- Shiraishi N, Uno H and Waalkes MP. Effect of L-ascorbic acid pretreatment on cadmium toxicity in the male Fischer (F344/NCR) rat. *Toxicology* 1993; 85: 85-100.
- Jones MM, Xu C and Ladd PA. Selenite suppression of cadmium-induced testicular apoptosis. *Toxicology* 1997; 116: 169-175.
- Takahara H, Cosentino MJ and Cockett AT. Zinc sulfate therapy for infertile male with or without varicocelectomy. *Urology* 1987; 29: 638-641.
- Mancini A, DeMarinis L, Oradei A et al. Coenzyme Q10 concentrations in normal and pathological human seminal fluid. *J Androl* 1994; 15: 591-594.
- Mancini A, Milardi D, Meucci E, Bianchi A, Pantano AL, Giacchi E, Littarru GP, Marinis LD and Pontevorci A. Coenzyme Q10 effects on non-enzymatic total antioxidant capacity in seminal plasma of varicocele patient. *Int Congress Series* 2004; 1271: 215-218.
- Alvarez JG and Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod* 1982; 27: 1102-1108.
- Gagnon C, Iwasaki A and DeLamirande E. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Ann NY Acad Sci* 1991; 637: 436-444.
- Lenzi A, Lombardo F, Gandini L et al. Glutathione therapy for male infertility. *Arch Androl*, 1992; 29: 65-68.
- Bolle P, Evandri MG and Saso L. The controversial efficacy of vit E for human male infertility. *Contraception* 2002 65; 313-315.
- Çam K, Simsek F, Yuksel M, Turker L, Haklar G, Yalcin S and Akdaş A. The role of reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vit E treatment. *Int J Urol* 2004 27;4: 228-33.
- Virgil P, Wohler C, Bustos-Obregon E et al. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 1994; 26: 55-60.
- Glazier D, Marmar JL, Diamond SM et al. A modified acrosome induction test. *Arch Androl* 2000; 44: 59-64.
- Benoff S, Hurley I, Cooper GW et al. Head specific mannose-ligand receptor expression in human spermatozoa is dependent on capacitation-associated membrane cholesterol loss. *Hum Reprod* 1993; 8: 2141-2154.
- Benoff S. Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. *Front Biosci* 1998; 3: 1220-1240.
- Benoff S, Goodwin LO, Hurley IR et al. Variation in region IS6 of the L-type voltage dependent Calcium channel (L-VDCC) alpha-1 subunit in testis and sperm: implications for role of cadmium in varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* 2000; 74: 555.
- Florman HM. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca are initiated by the zona pellucida during acrosome exocytosis. *Dev Biol* 1994; 165: 152-164.
- Benoff S, Hurley I, Barcia M et al. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* 1997; 67: 336-347.