

ARTIKEL PENELITIAN

Histopatologi Epitel Tubulus Seminiferus Testis, Kualitas dan Kuantitas Sel Sperma Tikus Hiperkolesterolemia yang Diberi Vitamin C

Wan Muhammad Ismail

Magister Biomedik Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara

Email: dr.eenk@yahoo.com

Abstrak: Hiperkolesterolemia dapat menyebabkan ketidaknormalan fungsi reproduksi laki-laki, dimana terjadi peningkatan produksi radikal bebas dan lipid peroksidase di tiap jaringan yang berbeda yang menimbulkan stres oksidatif. Akibatnya terjadi kerusakan pada membrane sperma, struktur protein, dan DNA yang mempengaruhi fertilitas. Vitamin C merupakan antioksidan pemecah rantai utama dan dapat menetralkan radikal bebas. Jenis penelitian ini eksperimental dengan menggunakan 35 ekor tikus wistar jantan terbagi dalam 5 kelompok. Diperiksa kadar kolesterol total sebelum dan sesudah perlakuan pada hari 1 dan hari 61. Kemudian mengamati histopatologi ketebalan epitel tubulus seminiferus testis, kualitas dan kuantitas sel sperma setelah tikus didekapitasi. Hasil dianalisis univariat untuk menghitung *mean* dan standar deviasi Uji normalitas data dengan *Saphiro Wilk*, dilanjutkan *One Way Anova*, *Post Hoc*, *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney U*. Hasilnya kadar kolesterol total sebelum dan sesudah perlakuan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), ketebalan epitel tubulus seminiferus pada masing-masing kelompok berbeda nyata ($p < 0,05$), kualitas dan kuantitas sel sperma pada masing-masing kelompok berbeda nyata ($p < 0,05$). Maka vitamin C dapat memperbaiki dan mempertahankan epitel tubulus seminiferous, kualitas dan kuantitas sel sperma tikus hiperkolesterolemia dikarenakan proses transportasi vitamin C pada epitel tubulus seminiferus yang memungkinkan untuk komunikasi dengan perkembangan sel germinal

Kata kunci: epitel tubulus seminiferus, hiperkolesterolemia, kualitas dan kuantitas sel sperma, vitamin C.

Histopathology of Seminiferous Tubules Epithelium of Testis, the Quality and Quantity of Sperm Cells in Hipercolesterolemia Rats Given by Vitamin C

Abstract: Hypercholesterolemia can causes the abnormalities of the male reproductive function, achieved increase of oxygen radicals and lipid peroxidation production in different tissue, and inducing oxidative stress. The results is damage sperm membranes, structure of proteins and DNA that effect on fertility. Vitamin C is the major chain breaking antioxidant and can neutralize free radical. This study is an experimental design using 35 rats were divided into

5 groups. Total cholesterol levels checked before and after treatment on day 1 and day 61. Then observed seminiferous tubules epithelium thickness and quality, quantity of sperm cell after the rats decapitated. Using univariate analysis to calculate the mean and standard deviation. Data test with Shapiro Wilk normality, One Way Anova, Post Hoc, Kruskal Wallis and Mann Whitney U. There were not significantly different between total cholesterol levels before and after treatment ($p>0,05$), seminiferous tubules epithelium thickness was significantly different in each group ($p<0,05$). The quality and quantity of sperm cells in each group was significantly different ($p<0,05$). Vitamin C can improve and maintain the seminiferous tubules epithelium, the quality and quantity of sperm cells hipercolesterolemia caused by transportation of vitamin C in seminiferous tubules epithelium which allows communication with development of germ cell.

Keywords: *Seminiferous tubules epithelium, hipercolesterolemia, the quality and quantity of sperm cells, vitamin C*

PENDAHULUAN

Infertilitas (ketidaksuburan) merupakan masalah kesehatan pasangan suami istri, didefenisikan sebagai ketidakmampuan untuk menghasilkan keturunan setelah 1 tahun menikah melakukan hubungan seksual normal tanpa menggunakan alat kontrasepsi.¹ Peningkatan angka infertil sekitar 15%-20% dari 50 juta pasangan di Indonesia dan laki-laki menjadi faktor utama yang bertanggung jawab atas 50 % kasus infertilitas.² Ada beberapa kasus yang nyata penyebab infertilitas (ketidaksuburan) seperti idiopatik, varicocele, infeksi, maldescenden testis, gangguan kandungan semen, hypogonadism, penyakit umum dan sistemik, factor imunologi, tumor

testis, obstruksi dan factor lainnya.³

Salah satu penyebab yang baru-baru ini dipertimbangkan adalah keadaan stres oksidatif dimana terjadi ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan dan merupakan bagian dari penyebab idiopatik. Metode dalam menentukan infertilitas pada pria tergantung dari penyebabnya yang didapati dari pemeriksaan fisik, analisis laboratorium cairan.⁴ Masyarakat modern saat ini memang terbiasa mengkonsumsi makanan yang rendah serat dan mengandung kolesterol tinggi. Beberapa contoh dari makanan tersebut antara lain produk daging (sapi, kambing, babi) dan olahannya, kuning telur, jerohan, keju, dan mentega. Makanan

berlemak yang memiliki kadar lemak jenuh tinggi sangat tidak baik dikonsumsi dalam jumlah besar. Konsumsi makanan berlemak dengan kadar kolesterol lebih dari 300 mg per hari dapat memicu timbulnya berbagai penyakit yang diakibatkan oleh meningkatnya konsentrasi kolesterol di dalam darah atau yang biasa disebut hiperkolesterolemia.⁵

Hiperkolesterolemia dapat menimbulkan ketidaknormalan dari fungsi reproduksi laki-laki.⁵ Hiperkolesterolemia menyebabkan peningkatan produksi radikal oksigen dan lipid peroksidase jaringan yang berbeda,⁶ sehingga terjadi stress oksidatif yang ditandai dengan peningkatan LPO (*Lipid Peroksidase*) yang merusak membran sel sperma, struktur protein, dan DNA (*Deoxy Nukleat Acid*) dan merupakan bentuk mekanisme yang mempengaruhi keadaan fertilitas.⁷ Tingginya radikal bebas memberikan efek negatif terhadap spermatozoa antara lain adanya penurunan jumlah spermatozoa, gangguan motilitas spermatozoa, meningkatnya jumlah spermatozoa yang abnormal,

penurunan aktifitas *Superoxidase Dismutase* (SOD) dan *Glutation Peroxidase* (GPx) menyebabkan terjadi penurunan kualitas dan matinya spermatozoa.^{8,9}

Vitamin C adalah salah satu antioksidan pemecah rantai utama dan terdapat di cairan ekstrasel dapat menetralkan anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang merupakan radikal bebas, dan sedikit jumlahnya pada pria infertil. Secara *invivo*, vitamin C meningkatkan jumlah sperma pada pria infertil dengan dosis 200-1000 mg/hari.¹⁰

METODE

Penelitian eksperimental ini menggunakan desain *pre* dan *post test*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium FMIPA laboratorium Fisiologi Hewan Biologi USU Medan, Laboratorium Patologi Anatomi FK USU Medan. Menggunakan 35 ekor tikus wistar jantan terbagi dalam 5 kelompok, dimana P0=sebagai kontrol dengan pakan standar pada hari 1-60, P1=pakan lemak pada hari 1-60, P2=pakan lemak+vitamin C pada hari 1-

60, P3= pakan lemak pada hari 1-30, pakan standart pada hari 31-60, P4 =pakan lemak pada hari 1-30, vitamin C pada hari 31-60 (Kadar vitamin C 3,6 mg/hari, kuning telur =5 gram/200 gram BB).

Pengukuran kadar kolesterol total pada ekor tikus menggunakan alat stik "Nesco". Suspensi sperma yang diperoleh dari cauda epididimis dapat digunakan untuk pengamatan kualitas (morfologi, motilitas) dan kuantitas (jumlah) sel sperma. Selanjutnya 10 µl sampel diambil dan dimasukkan ke dalam kotak-kotak Hemositometer Improved Neubauer dan ditutup dengan kaca penutup. Dilakukakan pengamatan di bawah mikroskop terhadap morfologi normal dan abnormal (%), motilitas (%), jumlah (juta/ml) yang terlebih dahulu dihomogenkan. Dan pengamatan gambaran mikroskopis

diameter tubulus seminiferus testis dan tebal lapisan sel spermatogenik tikus, dibuat sediaan histologi menggunakan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin) dengan metode paraffin.

Analisis univariat untuk menghitung *mean* dan standar deviasi. Uji normalitas data dengan *Saphiro Wilk*, dilanjutkan *One Way Anova*, *Post Hoc*, *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney U*. Penelitian ini telah mendapatkan kelaikan penelitian dari komite etik penelitian hewan FMIFA USU Medan.

HASIL

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa kolesterol total ada yang bertambah besar (P0, P2, dan P4) dan ada pula yang menurun (P1 dan P3) sebelum dan setelah perlakuan dengan perbedaan yang tidak nyata ($p>0,05$).

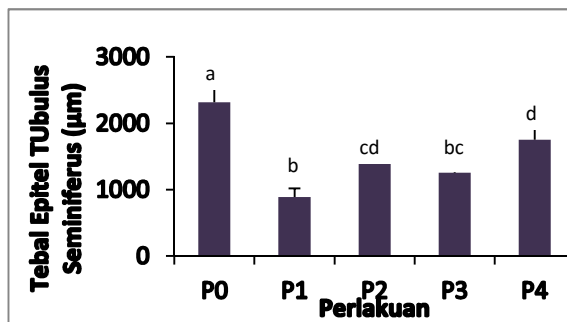
Tabel 1. Persentase Perubahan Kolesterol Total (KT)

| Perlakuan | Sebelum | Setelah | Selisih KT (KT akhir-KT awal) | Selisih KT (%) |
|-----------|---------|---------|-------------------------------|----------------------|
| P0 | 136,6 | 146,2 | 9,60 | 4,82 ^{tn} |
| P1 | 183,8 | 178,8 | -5,00 | -2,51 ^{tn} |
| P2 | 187,4 | 199,0 | 11,60 | 7,40 ^{tn} |
| P3 | 187,6 | 156,8 | -30,80 | -14,86 ^{tn} |
| P4 | 192,6 | 207,2 | 14,60 | 7,05 ^{tn} |

Keterangan = KT= Kolesterol Total, ^{tn} = berbeda tidak nyata antara sebelum dan setelah perlakuan ($p>0,05$).

Hasil pengukuran data ketebalan epitel tubulus seminiferus setelah perlakuan pemberian pakan kolesterol dan vitamin C di dapatkan hasil bahwa ketebalan epitel tubulus seminiferus berbeda nyata terdapat adanya perbedaan P0 dengan perlakuan lainnya (P1, P2, P3, dan P4) ($p < 0,05$). Ketebalan epitel tubulus seminiferus yang paling tebal pada P0 ($2315,59 \pm 388,64$) yang berbeda nyata dengan P0, P1, P2, dan P3 ($p < 0,05$). Sedangkan ketebalan epitel seminiferus yang terkecil adalah P1 ($889,65 \pm 128,03$) dan berbeda nyata dengan P0, P2, dan P4 tetapi tidak berbeda nyata dengan P3.

Gambar 1. Tebal epitel tubulus seminiferus (μm) tikus (*Rattus sp.*).

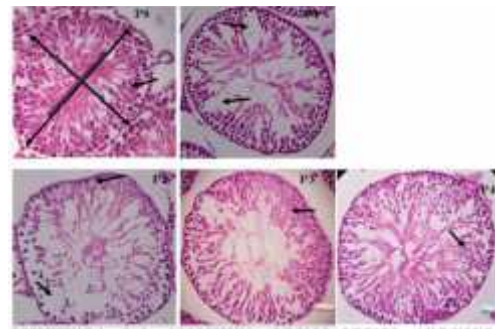


Huruf kecil yang beda antara masing-masing perlakuan (P0 s/d P4) adalah berbeda nyata ($p < 0,05$).

Hasil pengukuran data motilitas sperma setelah perlakuan

pemberian pakan kolesterol dan vitamin C di dapatkan hasil bahwa motilitas sperma berbeda nyata antara perlakuan. Terdapat adanya perbedaan yang nyata antara P0 dengan dengan perlakuan P1 dan P3 ($p < 0,05$), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan P2 dan P4. Motilitas sperma yang paling tinggi P0 ($79,17 \pm 4,08$) yang tidak berbeda dengan P2, dan P4, tetapi berbeda nyata dengan P1 dan P3 ($p < 0,05$). Sedangkan motilitas sperma yang terendah P1 ($67,50 \pm 3,54$) dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (P0, P2, P3 dan P4) ($p < 0,05$).

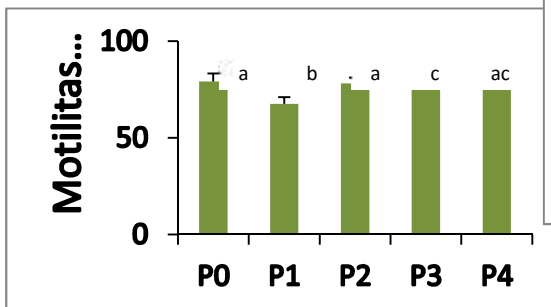
Gambar 2. Tubulus seminiferus (Mikroskop cahaya pembesaran 10x)



seminiferus menghilang hampir diseluruh lapangan pandang) P2 (pada sebahagian epitel tubulus seminiferus tampak menghilang dan tidak lengkap, tetapi sebahagian lagi mulai terbentuk epitel tubulus seminiferus dengan lengkap) P3 (terlihat epitel tubulus seminiferus lengkap dan hanya sedikit dibagian lain terlihat epitel

yang hilang) P4 (terlihat epitel tubulus seminiferus mulai lengkap dan lebih tebal)

Gambar 3. Motilitas sperma (%) tikus (*Rattus sp.*).

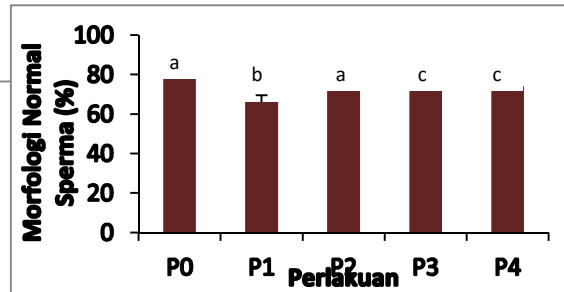


Huruf kecil yang beda antara masing-masing perlakuan (P0 s/d P4) adalah berbeda nyata ($^{a,b}p<0,05$).

Hasil pengukuran data morfologi sperma setelah perlakuan pemberian pakan kolesterol dan vitamin C di dapatkan hasil bahwa morfologi sperma berbeda nyata antara perlakuan.

Terdapat adanya perbedaan yang nyata antara P0 dengan P1, P3 dan P4 ($66,17\pm 3,39$), tetapi berbeda tidak nyata dengan perlakuan P2. Morfologi sperma yang paling tinggi a P0 ($78,17\pm 4,38$) yang tidak berbeda dengan P2, tetapi berbeda nyata dengan P1, P3 dan P4 ($p<0,05$). Sedangkan morfologi sperma yang terendah P1 ($67,50 \pm 3,54$) dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (P0, P2, P3 dan P4) ($p<0,05$).

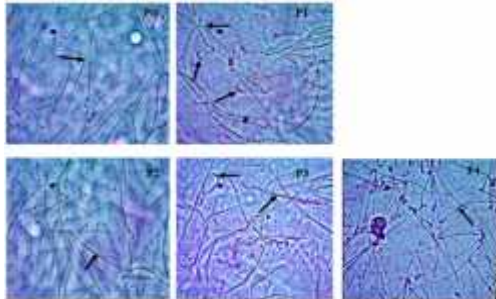
Gambar 4. Morfologi normal sperma (%) tikus (*Rattus sp.*).



Huruf kecil yang beda antara masing-masing perlakuan (P0 s/d P4) adalah berbeda nyata ($^{a,b}p<0,05$).

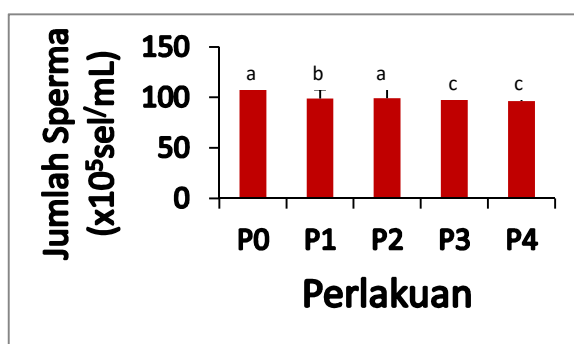
Hasil pengukuran data jumlah sperma setelah perlakuan pemberian pakan kolesterol dan vitamin C di dapatkan hasil bahwa jumlah sperma berbeda nyata antara perlakuan. Terdapat adanya perbedaan nyata P0 ($110,07\pm 8,83 \times 10^5$ sel/mL) dengan perlakuan P1 ($98,87\pm 8,78 \times 10^5$ sel/mL), dan P4 ($92,20\pm 3,39 \times 10^5$ sel/mL), tetapi berbeda tidak nyata dengan perlakuan P2 ($99,10\pm 16,86 \times 10^5$ sel/mL) dan P3 ($104,40\pm 6,45 \times 10^5$ sel/mL). Jumlah sperma yang paling tinggi P0 yang tidak berbeda dengan P2, tetapi berbeda nyata dengan P1, P3 dan P4 ($p<0,05$). Sedangkan jumlah sperma yang terendah P1 ($98,87\pm 8,78 \times 10^5$ sel/mL) dan berbeda nyata dengan lainnya (P0, P2, P3 dan P4) ($p<0,05$).

Gambar 5. Morfologi sel sperma tikus mikroskop pembesaran 40x



P0 (terlihat banyak morfologi sel sperma yang normal yaitu kepala seperti kait, badan dan ekor yang lurus) P1 (mulai terlihat banyak morfologi sel sperma abnormal yaitu kepala tanpa ekor dan ekor sel sperma yang terlalu bengkok) P2 (terlihat sel sperma yang normal dan terlihat juga abnormal) P3 (terlihat sel sperma normal dan abnormal yang mempunyai ekor bengkok) P4 (terlihat banyak sel sperma yang normal)

Gambar 6. Jumlah sperma ($\times 10^5$ sel/mL) tikus (*Rattus sp.*)



Huruf kecil yang beda antara masing-masing perlakuan (P0 s/d P4) adalah berbeda nyata ($^{a,b}P < 0,05$).

DISKUSI

Rata-rata kadar kolesterol total antara sebelum dan setelah perlakuan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Kemungkinan disebabkan oleh kolesterol total yang terbentuk karena pakan lemak lebih banyak digunakan untuk membentuk membran sel, memproduksi hormon steroid dan mensintesis protein reseptor untuk mengikat LDL (*Low Density Lipid*). Seperti yang dinyatakan sebelumnya bahwa kolesterol LDL menuju jaringan perifer, sehingga memberi kontribusi untuk sintesis dan pemeliharaan membran sel.¹¹

Epitel tubulus seminiferus pada P0 (pakan standar) lebih tebal secara nyata dari P1, P2, P3, dan P4. Kemungkinan disebabkan oleh pakan standar yang tidak menekan kadar testosteron intratestikular yang penting untuk perkembangan sel-sel spermatogenik. Pada kondisi pakan standar, hormon tersebut berjalan seperti normal tanpa ada yang menekannya secara nyata. Sedangkan pada P1 (pakan lemak 60 hari) terlihat banyak sel-sel spermatogeniknya menghilang pada

lapisannya ini menandakan bahwa kemungkinan terjadi penekanan kadar testosteron intratestikular sehingga terjadi gangguan perkembangan sel-sel spermatogenik. Hal ini menyebabkan ketebalan epitel seminiferus lebih tipis secara nyata jika dengan kontrol (P0). Pada P2 juga terlihat sebahagian sel spermatogenik menghilang dan sebahagian lagi mulai tampak lengkap ini menunjukkan bahwa terjadi perbaikan sel-sel spermatogenik akibat pemberian vitamin C. Testosteron dibutuhkan pada produksi spermatozoa (spermatogenesis) dan kesuburan pria.¹² Proses spermatogenesis terjadi pada tubulus seminiferus testis dan dalam tubulus seminiferus testosteron adalah androgen utama. Dalam testis, sel peritubular, sel leydig dan sel sertoli mengekspresikan reseptor untuk testosteron (reseptor androgen/RA). Target utama testosteron di testis adalah sel sertoli, yang mengelilingi dan memelihara sel-sel germinal sampai menjadi matur atau spermatozoa.¹³

Pemberian vitamin C dapat menekan pengaruh negatif yang ditimbulkan dengan pakan lemak. Ketebalan epitel seminiferus pada P4 (pakan lemak 1-30 hari + Vitamin C 31-60 hari) terlihat lebih tebal dari pada P3 (pakan lemak 1-30 hari + pakan standar). Vitamin C dapat berfungsi sebagai antioksidan atau penangkap radikal bebas yang terbentuk dari konsumsi lemak yang berlebihan.

Pemberian pakan lemak tinggi dapat menurunkan persentase morfologi sperma, motilitas sperma. Hal ini berhubungan dengan adanya penghambatan dari enzim utama dari steroidogenesis contohnya Hydroxysteroid Dehydrogenates (HDS's), penghambatan rangsangan antiandrogenic dari axis pituitary hypothalamus dan penghambatan sintesis dan pelepasan LH.⁶ Jalur yang lain adalah terbentuknya lipid peroksidase yang melepaskan radikal bebas sehingga yang merupakan bagian dari ROS (*Reactive Oxygen System*). Studi sebelumnya menemukan bahwa kadar ROS berkorelasi dengan motilitas spermatozoa.¹⁴ Penelitian in vitro

juga menunjukkan bahwa motilitas yang terganggu bisa bersifat sementara atau permanen. Peroksidasi membran lipid oleh radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan membran sel yaitu dengan mengubah fluiditas (kestabilan), struktur dan fungsi membran yang dapat menyebabkan pergerakan spermatozoa menjadi lambat, serta akhirnya dalam keadaan fatal menyebabkan kematian sel spermatozoa.¹⁵

Penurunan status antioksidan plasma semen khususnya aktivitas katalase dan kapasitas antioksidan total/TAC (*Total Antioxidant Capacity*) mempunyai peran yang signifikan terhadap munculnya abnormalitas sperma.¹⁶ Kerusakan DNA juga terjadi akibat oksidatif, dengan tingginya kadar ROS menunjukkan fragmentasi DNA terlihat dalam spermatozoa dari pria infertile, normalnya DNA sperma dilindungi dari kerusakan oksidatif oleh zat spesifik dan antioksidan diseminal plasma tetapi spermatozoa tidak dapat memperbaiki DNA dan tergantung dari perbaikan oosit setelah pembuahan.^{17,18} Penambahan

suplemen vitamin C pada pria infertil dapat meningkatkan jumlah sperma, motilitas sperma, dan morfologi sperma dan mungkin dapat menjadi suplemen tambahan untuk meningkatkan kualitas semen terhadap konsepsi (pembuahan sel telur oleh sperma). Ini dapat dilihat dari proses transportasi vitamin C pada epitel seminiferus menunjukkan bahwa asam askorbat (AA) memasuki sel sertoli melalui pembawa SVCT (*Sodium-dependent Vitamin C Transporter*) dan kemudian mungkin diangkut ke ruang adluminal oleh pembawa diketahui atau melewati *gap junction* yang memungkinkan untuk komunikasi dengan perkembangan sel germinal. Hal ini juga mungkin bahwa vitamin C masuk sertoli sel sebagai asam dehidroaskorbat oleh transporter GLUT (*Glucose Transporter*) Pembawa asam askorbat dan pembawa asam dehidroaskorbat), dan dengan cepat direduksi menjadi asam askorbat dalam sel. Sekali diangkut ke dalam sel, asam dehidroaskorbat kemudian langsung diangkut oleh pengangkut GLUT ke cairan adluminal. Semua

kemungkinan ini harus dipertimbangkan dalam upaya untuk memahami metabolisme vitamin C dalam epitel seminiferus.¹⁹

ROS dapat menginisiasi reaksi rantai yang akhirnya menyebabkan apoptosis pada sel spermatozoa dengan mengaktifkan caspases. Apoptosis merupakan proses yang menghilangkan sel-sel yang sudah tua atau tidak berfungsi lagi dan merupakan program kematian sel yang terprogram pada sel germinal manusia, apoptosis dapat membantu menghilangkan sel germinal yang abnormal dan mencegah kelebihan produksi. Pada pusat penelitian tingkatan ROS berhubungan positif terhadap apoptosis pada sel sperma yang matang. Tingkat caspases merupakan protease yang terlibat dalam apoptosis berkorelasi dengan tingkatan ROS, hasil penelitian juga menunjukkan bahwa apoptosis diinduksi dalam kultur sel dengan H₂O₂ yang selanjutnya mendukung teori bahwa ROS terlibat dalam apoptosis. Proses apoptosis juga dapat dipercepat oleh kerusakan DNA akibat ROS yang terinduksi

dan akhirnya dapat menyebabkan penurunan sperma.²⁰

KESIMPULAN

Pemberian vitamin C dapat mempertahankan dan memperbaiki ketebalan epitel tubulus seminiferus testis, kualitas dan kuantitas sel sperma tikus hiperkolesterolemia. Pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan kadar kolesterol total pada pemberian pakan tinggi lemak sebelum dan sesudah perlakuan pada tikus.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge University Press, Cambridge.1993.
2. Abid S, Maitra A, Meherji P, Patel Z, Kadam S, Shah J et al. Clinical and Laboratory Evaluation of Idiopathic Male Infertility in a Secondary Referral Center in India. *J Clin Lab Anal.* 2008; 22: 29-38.
3. Nieschlag E. Classification of andrological disorder. In

- andrology: male reproductive health and dysfunction. Ed: Nieschlag E, Behre HM. Springer Berlin. 1997. 81-86.
4. Dahlan MS and Tjokronegoro A. Oxidative Stress and Male Infertility: pathophysiology and clinical implication, Jakarta, Jurnal kedokteran YARSI. 2002. Vol 10 No I.
 5. Lichtenstein AH *et al.* Diet and lifestyle recommendations revisitation 2006: A scientific statement from the American heart association nutrition committee. *Circulation*. 2006. 114: 82-96.
 6. Bataineh HN, Nusier M.K. Effect of cholesterol diet on reproductive function in male albino rats department of physiology and biochemistry and molecular biology. *Saudi med j*. 2005. vol 26.
 7. Ohara, Y, T.E. Peterson and D.G. Harrison. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin*. 1993. Invest, 91 : 2546-2551.
 8. Sikka S. Oxidative stress and role of antioxidant in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*. 1996. 1:78-86.
 9. Alvarez JG and Storey BT. Oxygen as ultimate spermicide: implications for male infertility. Oxidants, antioxidant and oxidative injury. In Ochendorf FR, Fuchs J. *Oxidative stress in male infertility*, Gardez, Verlag, St Agustin, 1997. 57-84.
 10. Agarwal. A, Prabakaran, S.A. Said, T.M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl*. 2005. 26, 654-60.
 11. Barter, P. The role of HDL-cholesterol in preventing atherosclerotic disease. *European Heart Journal Supplements* 7. 2005.
 12. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Kretser DM, Pratis K. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res*. 2002. 57:149-79.

13. Griswold MD. Perspective on the function of Sertoli cells. In: Griswold MD, editor. Sertoli cell biology. San Diego: Elsevier Science. 2005; p. 15–8.
14. Iwasaki, A and C. Gagnon. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertile, steril.* 1992. 57: 409-416.
15. Du Plessis SS, Cabler S, McAlister DA, Sabanegh E and Agarwal A. The effect of obesity on sperm disorders and male infertility. *Nature Review Urology.* 2010. 153–161.
16. Khosrowbeygi A, Zarghami N, and Deldar Y. Correlation between Sperm Quality Parameters and Seminal Plasma. *Iran J Reprod Med.* 2004. Vol. 2. No.2 pp: 58-64.
17. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 1997. 56:602-7.
18. 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.
19. Angulo C et al. Vitamin C and oxidative stress in the seminiferous epithelium, Chile *Biological Research.* 2011. 44:169-180.
20. Agarwal A, SR Shyam, Allamaneni. Oxidants and antioxidants in human fertility. *American Society for Reproductive Medicine.* 2004. Vol 80 no 3.