

## Erkek infertilitesinde antioksidan tedavinin yeri

Yrd. Doç. Dr. Tuna Karatağ<sup>1</sup>, Doç. Dr. Muammer Kendirci<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mevlana Üniversitesi, Üroloji Kliniği, Konya

<sup>2</sup>Liv Hospital Ulus, Üroloji Kliniği, İstanbul

### Giriş

Dünya çapında seksen milyon insanın çocuk sahibi olamamaktan etkilendiği belirtilmektedir (1). Üreme dönemindeki çiftlerin ise yaklaşık %15'inde infertilite deneyimleri olabilmektedir (2). Çiftlerdeki infertilitenin %25-40'ının oligospermi ve/veya astenospermi gibi erkek faktörüne bağlı olduğu tahmin edilirken, daha güncel yıllarda erkek faktörü oranının %50'lerde olduğu, her 20 erkekten birinin subfertiliteden etkileneceği vurgulanmaktadır (3).

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), nitrik oksit (NO), peroksinitrit gibi serbest oksijen ürünlerinin (ROS), spermatozoada fazla miktarda bulunmasının, erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (4). ROS'la ilişkili sperm hasarının, infertil erkeklerin %30-80'inde önemli katkısı olan bir faktör olduğu vurgulanmaktadır (5). Oksidatif stres, antioksidan savunma sisteminde azalma ve/veya ROS' un aşırı üretimi sonucu oluşmakta ve bu oksidatif stres lipidleri, proteinleri ve DNA'yı hedef alarak, mitokondrial aktivite ve sperm motilitesini azaltmakta, paternal genomlarda hasar oluşturmaktadır (6). Varikozel ve testiküler torsiyon gibi hastalıklar, spermde DNA hasarı ve düşük motiliteye yol açan oksidatif stresle ilişkili sık gözükten durumlardır (7). Yaşam tarzı modifikasyonunun yanı sıra; vitamin C, vitamin E, beta-karoten gibi diyetel önlemlerin oksidatif stres yoğunluğunu azaltarak erkek üreme potansiyelini geliştirebileceği öne sürülmüştür (8).

Bununla birlikte; literatürde erkek infertilitesinde antioksidan kullanımıyla ilgili çok sayıda karşıt görüş mevcut olup, görüş birliği henüz sağlanamamıştır. Bu derlemede, güncel literatür ışığında, oksidatif stresin spermatogenez üzerine etkileri ve antioksidan tedavinin erkek infertilitesine etkilerini irdelemeyi amaçladık.

### ROS; testis ve spermatogenez üzerine etkileri

Aerobik solunumun hücresel düzeydeki en önem-

li çelişkilerinden biri, oksijenin enerji üretimi için gerekli olmasının yanı sıra ROS üretimine yol açması nedeniyle zararlı olabilmesidir. ROS seviyesi, vücut antioksidan savunma sisteminden baskın olduğu zaman oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres, yükselen ROS seviyeleriyle birlikte hücrelerde, dokularda ve organlarda harabiyet oluşturabilmektedir (9). Aslında ROS'lar normal fertilizasyon için gerekli, sperm kapasitasyon, hiperaktivasyon ve sperm-oosit füzyonu gibi birçok fizyolojik süreçinde önemli rol oynayan serbest radikallerdir (10). Ancak; aşırı ROS üretimi, lipid peroksidasyonu, motilite kaybı ve DNA hasarı yoluyla sperm disfonksiyonuna neden olmaktadır. Böylelikle erkek üreme sisteminde birçok patolojik süreci başlatabilmektedir.

Spermatozoa oksidatif strese duyarlıdır; çünkü spermatozoanın sitoplazmik defansif bariyerleri yoktur. Bununla birlikte, sperm plazma membranı, ROS saldırısıyla zedelenmeye oldukça yatkın çoklu doymamış yağ asitleri içerirler (11). Bunlar; normalde maddelerin membrandan füzyon yoluyla geçişi ve sperm motilitesi için gerekli akışkanlığı sağlamaktadır. Aşırı ROS üretimi, poliunsature yağ asidi varlığında lipid peroksidasyonu adını verdiğimiz bir çeşit kimyasal reaksiyon zinciri başlatırlar (12). ROS, aynı zamanda DNA'da mutasyon, delesyon yoluyla genetik hasar oluşturabilirler Hücre ve dokulara oksidatif stresin indüklediği zararı bloke etmek zordur; çünkü ROS'lar hücresel aerobik metabolizma ile sürekli üretilmektedir (13).

### Semende ros kaynakları

Semende ROS'un iki ana kaynağı bulunur; lökositler ve immatür spermatozoa (14). Bunlar içinde lökositin, primer ROS kaynağı olduğu düşünülmektedir. Çoğunluğu nötrofil ve makrofajlardan oluşan lökositler, aşırı ROS üretiminin yol açtığı sperm disfonksiyonuyla ilişkilidirler (15). Spermatozoanın ROS üretimi daha çok sitoplazmik damlacıkların sızmasıyla sonuçlanan, spermatogenez sırasında

meydana gelen bir defektle gerçekleşmektedir. İmmatür spermatozoa ve ROS üretimi arasında, sperm kalitesini olumsuz yönde etkileyen güçlü bir pozitif korelasyon meydana gelmektedir (16).

ROS üretiminin iki ana alanı; mitokondri ve sperm plazma membranıdır. Mito- kondrinin, solunumun güç merkezi olması nedeniyle ROS üretiminin büyük kısmı, NAD bağımlı oksidoredüktaz yolağıyla burada gerçekleşmektedir. Buna karşılık, sperm plazma membranı, ROS üretimini NADP bağımlı oksidaz sistemiyle gerçekleştirmektedir (17).

### Testisin antioksidan kapasitesi

Seminal plazma ve spermatozoa, oksidatif strese karşı oldukça etkin bir dizi koruyucu antioksidan mekanizmaya sahiptirler. Seminal plazma; superoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi bir takım yüksek molekül ağırlıklı enzimatik antioksidan içerirler. Bu enzimlerdeki eksikliğin sperm DNA hasarına ve erkek infertilitesine neden olduğu gösterilmiştir (18).

Seminal sıvı aynı zamanda askorbik asid, alfa tokoferol, piruvat, glutatyon, L- karnitin, taurin ve hipotaurin gibi seminal antioksidan kapasitenin büyük kısmını oluşturan enzimatik olmayan antioksidanları içerir. Bunun yanı sıra; seminal plazmanın değişik oranlarda oksidatif strese karşı etkili olduğu öne sürülen urat, piruvat, albumin, melatonin, beta-karoten ve ubiquinol içerdiği gösterilmiştir. Ayrıca, prostaglandin D2 sentaz gibi lipokalinlerin, lipid peroksidaz ürünlerini ayırarak oksidatif hasara karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir (19).

### Antioksidanlar

Serbest radikallerin başlattığı oksidatif strese karşı ana koruyucular, antioksidanlardır. Antioksidanlar koruyucu ve süpürücü olmak üzere iki grupta değerlendirilebilir. Önleyici antioksidanlar, yeni ROS oluşumunu önleyen metal bağlayıcı proteinler gibi yapılar iken; süpürücü antioksidanlar önceden oluşmuş ROS' u ortadan kaldıran bileşenlerdir.

### Önleyici antioksidanlar

Çoğunluğunu demir oluşturmak üzere transizyon metal iyonları, yüksek reaktif özellik gösteren OH üretimine katılırlar. Bu iyonlar peroksidleri, peroksil ve alkoksil radikallerine ayrıştıran lipid peroksidasyonunu uyarırlar. İnsan

seminin de bulunan transferrin, lakto- ferrin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcılar, sperm plazma membranının bütünlüğünü koruyan lipid peroksidasyonunu kontrol ederler (20).

D-penisilamin, 2,3-dimerkaptopropan sülfonat ve 2,3-dimerkaptosüksinimik asit gibi in vitro bileşenlerin, yardımcı üreme teknikleri sürecindeki sperm kalitesinde artış gösterdiği belirtilirken, Wroblewski ve ark. Spermin D-penisilaminle inkübasyonunda sperm motilitesinde belirgin artış gözlemlenmiştir (22).

Çinkoyla yer değiştirme özelliği olan kadmiyum, spermatogenezde toksik etki gösterebilmektedir. Metallothionin, kadmiyuma bağlanarak vücuttan atılmasını sağlar ve spermatogenez, spermatozoanın maturasyonu ve kapasitesiyonunu geliştirmektedir (23).

### Süpürücü antioksidanlar

Diyetsel antioksidanlar, insan antioksidan koruyucu sisteminin önemli bir parçasını teşkil ederler. Günlük olarak tükettiğimiz meyve ve sebzeler, çeşitli antioksidanların potansiyel kaynağını oluştururlar. Erişkin bir erkek için günlük 60 mg vitamin C önerilirken, vitamin E gereksinimi 50-800 mg kadar değişebilmektedir. Karatonoidler ve selenyum, vitamin E ile sinerjistik çalıştığı için, diyetle günlük 70- 1000 mikrogram düzeyinde alınmalıdır (24).

Oksidatif stres, aynı zamanda medikal ilaç olarak alınabilen zincir kırıcı özellikteki vitamin C ve vitamin E ile de sınırlanabilmektedir. Hücre dışı sıvıda bulunan ve en büyük zincirkıran antioksidanlardan biri olan vitamin C; hidroksil, süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerini nötralize eder ve sperm aglütinasyonunu önler (5). Bunun yanı sıra, vitamin E'nin geri kazanılmasına yardımcı olmaktadır (25). Nitekim infertil hastalarda seminal plazmada vitamin C miktarının düştüğü gösterilmiştir (21). C vitaminin flavonoidlerle kombinasyonunun, her iki bileşenin etkinliğini artırdığı belirtilmektedir (26). Düşük dansiteli lipoproteinlerin, alfa-tokoferol bileşenini koruduğu ve lipid peroksidasyonunun başlamasını geciktirdiği belirtilmektedir. Quersetin ve ksantomol diyetle alınan önemli flavonoidlerdendir.

Temel zincir kırıcı antioksidan olan vitamin E, hücre membranı içerisinde yer alır ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi nötralize ederek lipid peroksidasyonuna karşı plazma membranını korur. Çapraz kesişen randomize bir çalışmada, 600 mg/gün oral alınan vitamin E'nin sperm fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (27). Selenyum, glutatyon peroksidaz sen-

tezi için gerekli bir bileşen olmakla birlikte vitamin E ile sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Keskes-Ammar ve ark. yaptığı bir çalışmada, 3 ay boyunca oral yolla alınan 225 mg/gün dozda selenyum ve 400 mg/gün vitamin E'nin seminal plazmada malondialdehid konsantrasyonlarını belirgin azalttığı ve sperm motilitesini iyileştirdiği gösterilmiştir (28).

Beta-karoten ve likopen gibi karotenoidler antioksidan koruyucu sisteminin önemli bileşenini oluştururlar. Beta-karotenler, lipid peroksidasyonuna karşı plazma membranını korumaktadırlar. Likopenin domateslerde bol miktarda olduğu belirtilmekte birlikte, günlük 5-10 mg alımı önerilmiştir (29). Lipid peroksidasyonunu önlemede ve oksijen artıklarını süpürmede likopenin beta-karotene göre 2 kat, vitamin E'ye göre 10 kat daha potent olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (29).

Glutasyon, vücutta en fazla bulunan antioksidan olmakla birlikte; oksidatif hasara karşı lipidleri, proteinleri ve nükleik asitleri korumaktadır. Glutasyon peroksidazı oluşturmak için vitamin E ve selenyum ile birleşirler. Plasebo kontrollü çift-kör bir çalışmada; 20 infertil erkeğe 2 ay boyunca 600 mg glutasyonun intramuskuler enjeksiyonu uygulanmış ve glutasyon tedavisinin özellikle ileri hareketlilikte olmak üzere sperm motilitesini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (30).

Koenzim Q-10 (CoQ-10) spermde vitamin E döngüsünü sağlamakta ve enerji üretimine katılmaktadırlar. İnfertil 32 erkekte yapılan bir çalışmada CoQ-10'nun seminal sıvı ve plazmada H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumunu inhibe ettiği belirtilmektedir (31). Yapılan bir başka çalışmada ise; astenozoospermik 22 semen örneğinde 50 Mm CoQ-10 ile inkübasyonun, sperm motilitesinin önemli ölçüde arttığı in vitro gösterilmiştir (32).

Çinko ve bakır, enzimatik bir antioksidan olan süperoksid dismutazı oluşturan önemli metallerdir. Bu enzimlerin optimal fonksiyonlarının sürdürülmesi için yeterli miktarda alımı gereklidir. Günlük ortalama alımı çinko için 12,3 mg, bakır için 900 mg olarak tahmin edilmektedir. ROS oluşumuna yol açabileceği için fazla miktarda alınmamasına dikkat edilmelidir. İnsanlarda yapılan herhangi bir çalışmada olmamakla birlikte, in vitro deneysel hayvan çalışmalarında bu metal iyonlarının fazla verilmesinin DNA kırılmalarına yol açtığı gösterilmiştir. Bununla birlikte insanlarda seminal plazmada bulunması gereken in vivo dozaj hala bilinmemektedir.

Karnitinler ise, mitokondrial ROS üretiminden sorumlu olan hücre içi toksik asetil-CoA'ları ortadan kaldırarak ROS üretimini azaltmaktadırlar. Karnitinler aynı zaman sperm motilitesini de arttırmaktadırlar (33).

### Meta-analizlerle antioksidanların etkinlikleri

Güncel literatür ve meta-analizler esas alındığında, erkek infertilitesinde antioksidan tedavinin yeri ve etkin olduğu söylenebilir. Cochrane veri tabanına girmiş kanıt dayalı randomize klinik çalışmalarda, antioksidan tedavi kullanılan infertil erkeklerde kontrol grubuna göre canlı doğum oranlarında istatistiksel anlamlı başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir (35). Meta-analize dayanak oluşturan üç klinik çalışmada (Kessopoulou 1995; Omu 1998; Suleiman 1996); randomize edilen 214 infertil çiftten 20'sinde canlı doğum gerçekleşmiş; bunların 18'i (%15) antioksidan grupta (n:116) yer alırken, ancak 2'si (%2) kontrol grubunda (n:98) bulunmuştur (27, 23, 34). İki çalışmada (Kessopoulou 1995; Suleiman 1996), vitamin E ile plasebo karşılaştırılmış; canlı doğum sayısında, antioksidan alan grupta plaseboya göre istatistiksel anlamlı fark saptanmış, antioksidanların plaseboya üstünlüğü vurgulanmıştır (27, 34).

Omu ve ark.'nın çalışmasında ise; çinko ile tedavi verilmeyen grup karşılaştırılmış, randomize edilen 97 çiftin 10'unda canlı doğum gerçekleşmiş, bunların 8'inin antioksidan grupta (n:49) yer aldığı, 2'sinin ise tedavi edilmeyen grupta (n:48) gerçekleştiği saptanmış, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (23).

Bir başka Cochrane meta-analizine dahil edilen 15 randomize klinik çalışmadaki gebelik oranları değerlendirildiğinde; 964 çiftten, antioksidan alan 515'inin 82'sinde (%16), kontrol grubuna alınan 449'un 14'ünde (%3) spontan gebelik sağlanabilmiş; bu farkın istatistiksel anlamlı düzeye ulaştığı bildirilmiştir (35). Her ne kadar bu 15 çalışmanın 2'si IVF veya ICSI yapılan çiftleri içerse de (Sigman 2006; Tremellen 2007), bunların değerlendirmeden çıkarılması bile antioksidan kullanımı yine de kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı şekilde üstün çıkmaktadır. Ancak, bu iki çalışma alt grup olarak değerlendirildiğinde, yine antioksidanların üstünlüğü sabit kalmaktadır.

Diğer iki çalışmada (Galatioto 2008; Tremellen 2007) ise, infertil erkeklerde kombine antioksidan kullanımı kontrollerle karşılaştırılmıştır. Antioksidan kullanan grupta (n: 58) 21 gebelik, kontrol grubunda (n:42) 4 gebelik

bildirilirken, gebelik oranlarındaki fark istatistiksel anlamlı bulunmuştur. L-karnitin ile plasebonun infertil erkeklerdeki etkilerinin karşılaştırıldığı 3 çalışmada ise (Balercia 2005; Lenzi 2003; Peivandi 2010); antioksidan kullanan (n:73) infertil erkeklerin 11'i, kullanmayanların (n:63) ise ancak 1'inde çiftler spontan gebelik sağlayabilmişler ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. L-asetil karnitin ile L-karnitin kombinasyonun, plaseboya randomize edildiği bir başka Cochrane meta-analiz değerlendirmesinde; antioksidan tedavi alan infertil erkeklerde (n:96) tedavi almayan kontrol grubuna (n:87) göre çiftlerin spontan gebeliğe ulaşma oranları istatistiksel olarak antioksidanlar lehine sonuçlanmıştır (19 gebeliğe karşı 3 gebelik) (35).

Başka iki çalışmada (Balercia 2009; Safarinejad 2009); Koenzim, plaseboya karşı değerlendirilmiş, tedavi alan gruptaki gebelik oranları kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (35). Suleiman ve ark. vitamin E'yi plaseboyla randomize etmiş, antioksidan tedavi alan infertil erkeklerde (n:52) gebeliğe ulaşma oranlarının (11 gebelik) plasebodan (gebelik yok) anlamlı şekilde yüksek olduğunu bildirmişlerdir (43). Rolf ise infertil erkeklerde vitamin C ve E'yi plaseboyla karşılaştırmış, ancak her iki grupta da spontan gebeliğin sağlanmadığını bildirmiştir (35). Bununla birlikte, sperm fragmantasyon seviyeleri sonuçlarını değerlendiren bir başka çalışmada ise (Greco 2005); Vitamin C ve vitamin E kombinasyonundan oluşan antioksidan tedavi alan grubun sonuçları plasebo grubuna göre istatistiksel anlamlı şekilde daha iyi bulunmuştur (36).

Cochrane meta-analiz verilerinde antioksidan tedavi ile plasebonun sperm konsantrasyonları üzerine etkilerini değerlendiren randomize, plasebo kontrollü 16 çalışmanın sonuçları irdelenmiştir. Buna göre; çalışmaların 7'sinde sperm konsantrasyonunda tedavinin 3. ve 6. aylarında artış saptanmazken, 6 çalışmada tedavinin 6. ayında, 3 çalışmada ise 9. ayında antioksidan alanlarda plaseboya göre sperm konsantrasyonunda istatistiksel anlamlı artış-

lar gösterilmiştir (35). Ancak iki çalışmada (Balercia 2005; Lenzi 2004), L-asetil karnitin ve L-karnitin kombinasyonu ile plasebo, altıncı aydaki sperm konsantrasyonları açısından karşılaştırılmış, gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanamamıştır Diğer 2 çalışmanın analizinde (Balercia 2009; Safarinejad 2009) ise, 272 katılımcının altıncı aydaki sperm konsantrasyonu değerlendirmesinde, koenzim Q-10 (n:136) ve plasebo (n:136) karşılaştırılmış ve antioksidan tedavi lehine istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (35). Yan etkilerin değerlendirilmesinde, antioksidan kullanımı plasebodan anlamlı farklılık göstermemiştir.

### Sonuç

Ürologlar için erkek infertilitesine yaklaşımda temel amaç, düzeltilebilir nedenlerin saptanması ve tedavi edilmesidir. Cerrahi yöntemler ve medikal yaklaşımlar bu amaçla kullanılmaktadır. Her ne kadar yıllardır erkek infertilitesinin medikal tedavisinin yararı, ürolog dışındaki reproduktif disiplinler tarafından sorgulansa da, son yıllarda kanıta dayalı klinik çalışmalarda elde edilen veriler, gerek hormonal, gerekse medikal tedavinin yararı konusunda destekleyici bulgular ortaya çıkarmıştır.

Düzeltilbilir açık patolojisi bulunmayan infertil erkeklerin bazıları için medikal tedaviye gereksinim bulunmaktadır. Erkek üreme fizyolojisi temeline dayanan bazı destekleyici tedaviler spermi canlandırmak için yararlı olabilir. Ampirik destek tedavisinin; spontan gebelik isteyen veya ICSI'de gebelik şanslarının artmasını isteyen bazı çiftlerde yararlı olabileceği dikkate alınmalıdır. Kanıta dayalı verilerde, erkek infertilitesinin medikal tedavisi için bazı antioksidan yaklaşımların yararı gösterilmiştir. Bu amaçla, özellikle karnitinler; spontan gebelik oranları, sperm hareketi ve atipik sperm sayısının azaltılması için yararlı görülmektedir. Spermin reproduktif fizyolojisinde rol oynayan bazı faktörlerin, dışarıdan yerine konması, infertil erkekte sperm parametrelerini düzelterek gebelik oranlarını anlamlı şekilde artırabilir.

### Kaynaklar

1. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J and Freundl G: Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod* 2005; 20: 7.
2. Sigman M, Jarow JP. Male Infertility. In: Wein AJ, ed. *Campbell- Walsh Urology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Sanders Elsevier; 2007:609-653.
3. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002
4. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert*. 1987;81:459-469.
5. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Repro Biomed Online*. 2004;8:616-627.
6. Bennetts LE, Aitken RJ. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 2005;71:77-87.
7. Anderson JB, Williamson RCN. Fertility after torsion of the spermatic cord. *Br J Urol*. 1990;65:225-230.
8. Silver EW, Eskenazi B, Evenson DP, Block G, Young S et al. Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl* 2005; 26: 550-6.

9. Aitken RJ, de Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25: 2415–26.
10. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; 20: 61–9.
11. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2: 48–54.
12. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992; 13: 368–78.
13. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod* 1991; 6: 987–91.
14. 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.
15. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998; 13: 1429–36.
16. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*. 2001;
17. Gavella M, Lipovac V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl*. 1992;28:135–141.
18. Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995; 64: 868–70.
19. Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26: 427–32.
20. Tauber PF, Zaneveld LJ, Propping D, Schumacher GF. Components of human split ejaculates. I. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrin, transferrin and other plasma proteins. *J Reprod Fertil* 1975; 43: 249–67.
21. Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 67:42–7.
22. Wroblewski N, Schill WB, Henkel R. Metal chelators change the human sperm motility pattern. *Fertil Steril*. 2003;79(suppl 3):1584–1589.
23. Omu EA, Fernandes S. The relationship between zinc/cadmium ratio in human semen: effect on immune response. *Kuwait Med J*. 2001;33:38–43.
24. National Academy of Sciences. *Recommended Dietary Allowances*. 10th ed. National Academy Press. 1989
25. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;669:7–20.
26. Dawson EB, Harris WA, Rankin WE, Charpentier LA, McGanity WJ. Effect of ascorbic acid on male fertility. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;498:312–323.
27. Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, Barratt CL. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril*. 1995;64:825–831.
28. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, Ghazzi H, Hammami S, Zghal K, Fki H, Damak J, Bahloul A. 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
29. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*. 1989; 274:532–538.
30. Lenzi A, Culasso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod*. 1993;8:1657–1662
31. Alleva R, Scaramucci A, Mantero F, Bompadre S, Leoni L, Littarru GP. The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. *Mol Aspects Med*. 1997;18
32. Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med*. 1997;18
33. Balercia G, Armeni T, Mantero F, Principato G, Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. *Clin Chem Lab Med*. 2003
34. 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.
35. Antioxidants for male subfertility Marian G Showell1, Julie Brown1, Anusch Yazdani2, Marcin T Stankiewicz3, Roger J Hart4. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011
36. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005.