

## Semende Reaktif Oksijen Türevleri Ve Antioksidanlar

Seda Yılmaz<sup>1</sup>, Kenan Sofuoğlu<sup>2</sup>, Nuri Delikara<sup>1</sup>, Tansel Çetinkaya<sup>2</sup>, Elif Yılmaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ferticenter Tüp Bebek Merkezi, İstanbul

<sup>2</sup>Zeynep Kamil Hastanesi, Tüp Bebek Ünitesi, İstanbul

Adres : Fahrettin Kerim Gokay Cad. No: 16 B Blok Altunizade İstanbul – Türkiye

Tel: 0 216 651 88 00 Cep: 0 532 273 98 64 e-mail: seda2410@yahoo.com

### ÖZET:

Fertilite potansiyeli ile oksijen toksisitesi ve serbest radikallerin (reaktif oksijen türevleri) ilişkisi bilinmektedir. Yağlar, proteinler, nükleik asitler ve şekerler gibi tüm hücrel yapılar reaktif oksijen türevleri için potansiyel hedeflerdir. Reaktif oksijen radikallerinin sitotoksitesisi üretilme ve yokedilme oranları arasındaki hassas denge sonucu belirlenmektedir. Bu dengedeki herhangi bir bozukluk hücrel zarara neden olmaktadır. Spermatozoaların lipid peroksidasyonundan korunmaları bu hücrelerin fonksiyonlarını doğru bir şekilde yerine getirebilmeleri ve hücre zararlarının devamlılığını koruyabilmeleri açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu durum teorik olarak O<sub>2</sub>- ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri sınırlandırılarak, metal katalizörlerinin varlığı sınırlandırılarak ve peroksidasyon başladığı anda durdurularak sağlanabilir. Hücre içi ve dışı koruma sistemleri (antioksidanlar) bu amaçla hizmet eden ve serbest radikallerin potansiyel toksik etkilerine karşı hücreyi koruyan mekanizmalardır. Spermatozoonların oksidatif zarar görmemesi ya da mümkün olduğunca az zarar görmesi için infertilite tedavisinde diyetle antioksidan alımı ya da antioksidan içeren medyumların sperm hazırlama tekniklerinde kullanımı önerilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** spermatozoon, fertilite, reaktif oksijen türevleri, antioksidanlar

### SUMMARY:

#### *Reactive oxygen species and antioxidants in semen*

The role of oxygen toxicity and free radical reactions (reactive oxygen species) in association with fertility potential is known. All cellular elements such as lipids, proteins, nucleic acids and sugars are known to be the potential targets for these radicals. Cytotoxicity of reactive oxygen species is held in check by the delicate balance between their rates of generation and the rate of their removal. Any shift in this equilibrium can lead to cellular damage. The ability of the spermatozoa to prevent lipid peroxidation is of critical importance in maintaining proper function and stability of the cell membrane. Intra and extra-cellular scavenger systems (antioxidants) serve to prevent the potential toxic effects of reactive oxygen species. Therefore dietary and supplement intake of antioxidants and treating spermatozoa with solutions containing antioxidants during the preparation of semen should be advised during infertility treatment.

**Key words:** spermatozoa, fertility, reactive oxygen species, antioxidants

Fertilite potansiyeli ile oksijen toksisitesi ve serbest radikallerin (reaktif oksijen türevleri/ ROT) ilişkisi uzun yıllardır bilinmektedir. Mikroorganizmaların özellikle de bakterilerin istilasına karşı vücudun korunmasında nötrofiller görevlidir. Bu hücrelerin fagositoz sırasında aşırı oksijen kullanması sonucu reaktif oksijen radikalleri oluşur (1). Bu olay solunum patlaması olarak adlandırılır ve ROT üretiminin başlıca yoludur (2). Yağlar, proteinler, nükleik asitler ve şekerler gibi tüm hücrel yapılar ROT için potansiyel hedeflerdir (3). Yüksek konsantrasyonda ROT üretimi lipid peroksidasyonu ve bozulmuş membran

fonksiyonlarına neden olarak sperm metabolizmasını dolayısıyla morfoloji, motilite, ve fertiliteyi olumsuz yönde etkileyerek erkek infertilitesinde önemli rol oynamaktadır. (4,5,6). ROT'nin yağlara zararları, yağ peroksidasyonu yoluyla gerçekleşir (7). Yağ peroksidasyonu, doymamış poli yağ asitlerinin oksidatif bozulması olarak tanımlanır. yağ peroksidasyonu spermatozoon fonksiyon bozukluklarının en önemli nedenlerinden biridir (1). Sperm hücreleri de hücre zarı fosfolipid tabakasındaki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle, yüksek oksijen konsantrasyonuna karşı oldukça duyarlı hücrelerdir. Doymamış

yağ asitlerinin moleküler yapısındaki karbon-karbon çift bağları komşu hidrojen atomundaki karbon-hidrojen bağı zayıflatarak kırılmaya yatkın hale getirir. Bunun sonucunda, süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi serbest radikaller hücre membranları ile reaksiyona girerek peroksidatif zarara neden olmaktadır (8, 9). ROT'ne maruz kaldıklarında spermatozoonların doymamış poli yağ asiti içeriği %20'den fazla oranda düşmektedir (10). Membran akışkanlığındaki bu azalma sonucu, fazla miktarda ROT'ne maruz kalan spermatozoonlar, membran birleşmesi olayına bağlı olan fonksiyonların hiçbirini gerçekleştiremez (11). Membran bütünlüğünün bozulması aynı zamanda hücrenin elektrolitlere karşı geçirgen olmasına da neden olur. Kalsiyumun ve kısmen sodyum iyonlarının hücre içine alınması, hücrenin enerji üretme mekanizmasını bozar ve ATP azlığına neden olur. İntrasellüler kalsiyum iyonlarındaki artış aynı zamanda proteazları ve fosfolipazları da aktive ederek proteinlerin ve yağların zarar görmesine neden olur. Serbest radikaller bunun yanı sıra enzim inaktivasyonuna neden olarak DNA'da yapısal hasara neden olur ve bu da hücrenin ölümüyle sonuçlanır (4,12,13,14).

ROT'nin sitotoksitesisi, üretilme ve yokedilme oranları arasındaki hassas denge sonucu belirlenmektedir. Bu dengedeki herhangi bir bozukluk hücreye zarar neden olmaktadır (8). Spermatozoaların lipid peroksidasyonundan korunmaları bu hücrelerin fonksiyonlarını doğru bir şekilde yerine getirebilmeleri ve hücre zarlarının devamlılığını koruyabilmeleri açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu durum teorik olarak  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$  seviyeleri sınırlandırılarak, metal katalizörlerinin varlığı sınırlandırılarak ve peroksidasyon başladığı anda durdurularak sağlanabilir. Hücre içi ve dışı koruma sistemleri (antioksidanlar) bu amaçla hizmet eden ve serbest radikallerin potansiyel toksik etkilerine karşı hücreyi koruyan mekanizmalardır (15,16,17). Antioksidan koruma mekanizmaları primer ve sekonder koruma mekanizmaları olarak gruplandırılmaktadır. Primer koruma mekanizmaları antioksidan bileşikler (E, A ve C vitamini, glutatyon ve ürik asit) ve antioksidan enzimleri ( süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) içermektedir.

Sekonder koruma mekanizmaları ise lipolitik enzimler, fosfolipazlar, proteolitik enzimler, proteazlar, peptidazlar, DNA onarım enzimleri, endonükleaz, eksonükleaz ve ligaz sıralanmaktadır (18).

## Primer koruma mekanizmaları

### 1. Antioksidanlar

**E vitamini:** Doğada bulunan en yaygın antioksidandır. Tokoferolün en az sekiz yapısal izomerini kapsamaktadır. Tüm bunlar içinde en iyi bilinen izomer  $\alpha$ -tokoferol, en potansiyel antioksidan aktivitesine sahiptir. E vitamini lipofilik özelliğinden dolayı lipofilik çevre için (örneğin plazma lipoproteinleri) majör serbest radikal zincir blokeridir. Bazı memeli dokularında (örneğin adrenal bezler, kalp, testis ve karaciğer) yüksek oranda tokoferol bulunmaktadır. Dokulardaki bu dağılım yüksek lipid çözünürlüğünden kaynaklanmaktadır. İntrasellüler olarak mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi yağ bakımından zengin membranlarda bulunmaktadır. Bu nedenle tokoferolün lipid peroksil ve alkoksil radikalleriyle reaksiyona girerek membran lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan aktivitesinin yüksek olması beklenir (18).  $O_2^-$  ve  $\cdot OH$  ve lipid peroksil radikallerini daha az reaktif formlara çevirir ve lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını yıkar.

**C vitamini (askorbik asit):** E vitamini ile karşılaştırıldığında hidrofildir ve sulu ortamlarda E vitaminine göre daha fonksiyoneldir. Redükte edici ve antioksidan bir ajan olarak  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$  ve çeşitli lipid hidroperoksitleri ile reaksiyona girer. Ayrıca oksidize olmuş E vitamininin tekrar antioksidan özelliğini geri kazanmasını sağladığından C vitamininin majör özelliği E vitamini radikalini geri kazandırmasıdır. Memeli dokularında yaygın olarak bulunmaktadır. Adrenal ve tükürük bezlerinde yüksek miktarda, karaciğer, dalak, pankreas ve beyinde ise daha az miktarda bulunmaktadır. Semendeki konsantrasyonu kandakine göre yaklaşık 8 kat daha fazladır. Diğer suda çözünen vitaminlerle karşılaştırıldığında plazma lipid peroksidasyonuna karşı en etkili korumayı sağlar (18). Askorbik asit hem antioksidan hem de prooksidan olarak çalışmaktadır. Bir antioksidan olarak C vitamini, E vitamini ve

selenyumun antioksidan etkilerini kullanmalarına yardımcı olur. Diğer taraftan, yüksek miktarlarda (~ 1 mM) C vitamini, lipid peroksidasyonu sırasında aktive edilmiş oksijen radikallerinin kofaktörlerini üreterek, Fe<sup>3+</sup> ya da Cu<sup>2+</sup> gibi geçiş metalleri varlığında bir prooksidan gibi hareket eder. Ascorbik asitin ikili rolü E vitamini gibi diğer antioksidanların varlığında daha da artar. Örneğin E vitamini yetersiz hayvanlarda mikrozomların lipid peroksidasyonu askorbat tarafından artırılır, normal koşullarda ise baskılanır. Yüksek miktarda sigara içenlerin dışarıdan C vitamini verildiğinde sperm kalitesinin arttığı gösterilmiştir (19,20). C vitamini alımının E vitamini, β-karoten ve çinko ile birlikte alınmalıdır çünkü sinerjik etkilidirler.

**A vitamini:** Karotenoidler serbest radikalleri temizleyebilme kapasiteleri nedseniyle antioksidanlar olarak tanımlanmaktadırlar. Serbest radikaller ve diğer ROT ile özellikle tek oksijen ile reaksiyona girerek lipidleri korurlar. *b*- karoten, ksantin oksidaz sistemi ile indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe ederek etkili bir radikal önleyici antioksidan aktivitesi göstermektedir (18). *b*- karotenlerin konjuge çift bağlı uzun zincirleri içeren yapısal dizilimi, onların serbest radikaller için çok iyi bir koruyucu olmalarına neden olur. Kunert ve Tappel A vitamini noksanı domuzlarda yaptıkları bir çalışmada, serbest radikal oluşturan karbon tetrakloride maruz bırakıldıklarında *b*-karoten uygulanmış hayvanlarda azalmış lipid peroksidasyonu belirlemişlerdir. *b*-karoten de C vitamini gibi hem antioksidan hem de prooksidan olarak fonksiyon göstermektedir.

**Çinko:** Sperm ROT'nin zararlı etkilerinden koruyan bir antioksidandır. Semende çinko miktarı 5 mg olup günlük vücuda alınan çinko oranının üçte birini içerir. Sperm çekirdeğindeki DNA molekülü sabit ve sağlam bir yapı oluşturabilmek için özel bazı proteinlerle çevrilidir. Başarılı fertilizasyonun oluşabilmesi için bu yapı önemlidir. Çinko bu yapının sabitliğini korumasında ve bozulmasını önlemede görevlidir (21).

**Glutasyon:** Bir tripeptid olan redükte olmuş glutasyon (GSH), *g*-glutamil-sistein-glisin, hemen hemen tüm memeli doku sistemlerinde bulunan düşük molekül ağırlıklı bir tioldür. Hücre içi konsantrasyonu genellikle ~0.5

mM'dır fakat bazen 10 mM'a kadar yükselebilmektedir. Redükte olmuş glutasyon, reaktif tiol grubu ve *g*-glutamil bağıyla karakterizedir ki bu bağ molekülü peptidaz saldırısına karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Etkili bir redükten olarak GSH birçok detoksifikasyon olayında önemli rol oynamaktadır. Redükte olmuş glutasyon hidroksil ve karbon radikalleri gibi serbest radikallerle bir hidrojen atomu vererek etkileşime girer. Bu reaksiyonlar, serbest radikal hasarının önemli bir kaynağı olan reaktif .OH'ı nötralize ederek koruma sağlar(18). Birçok antioksidan korumada olduğu gibi GSH seviyeleri, yaşlanma gibi çeşitli fizyolojik durumlarda değişkenlik gösterebilmektedir. GSH'ın aminoasitlerinden biyosentezi, glutamilsistein sentetaz ve GSH sentetaz tarafından katalize edilmektedir. Yaşlanma ile birlikte peroksitlerin artmasıyla GSH'a olan ihtiyaç da artmaktadır.

**Ürik asit:** Ürik asit pürin metabolizmasının son ürünü olarak bilinmesine karşın biyolojik bir antioksidan olarak görev aldığı da gösterilmiştir. OH molekülü ile reaksiyona girerek oksidatif hasara karşı rol alır. Üratın. OH'ı etkisizleştirdiği ilk olarak 1960 yılında gösterilmiştir. Daha sonra oksidatif hasara karşı koruma sağladığı gösterilerek antioksidan etkisi onaylanmıştır. Ürik asitin potansiyel fizyolojik koruma aktivitesi ilk olarak Ames ve ark. tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmanın bulguları, üratın ekstrasellüler ve intrasellüler koruma mekanizması olarak çalıştığını göstermektedir (18).

## 2. Antioksidan koruma enzimleri

**Süperoksit dismutaz (SOD):** Bu enzim O<sub>2</sub>'yi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye çevirir ve hücrenin ilk savunması olarak adlandırılır çünkü daha fazla serbest radikal oluşmasını engeller. Süperoksit dismutazlar metal iyon içeriğine bağlı olarak 3 ana gruba ayrılır: Cu/Zn SOD, Mn SOD ve Fe SOD. SOD aktivitesinin bir kısmı ekstrasellüler olarak gerçekleşmesine rağmen aktivitenin büyük kısmı intrasellüler olarak mitokondri ve sitosolde gerçekleşir (18). SOD aktivitesi değişik dokularda değişkenlik gösterir. Bu enzim en fazla karaciğer, adrenal bez, böbrek ve dalakta bulunur.

**Katalaz:** Primer antioksidan koruma komponentlerinden biridir ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi H<sub>2</sub>O'ya

çevirir. Süperoksitten kökenlenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimini katalizleyerek reaktif oksijen türevlerini detoksifiye eder. SOD gibi katalazın doku dağılımı da oldukça geniştir. Enzim aktivitesi farklı dokularda ve aynı hücre içinde değişkenlik gösterir. Karaciğer, böbrekler ve kırmızı kan hücrelerinde daha yüksek seviyelerde bulunur. Hepatositlerde peroksizomlarda yüksek katalaz aktivitesi görülmekle birlikte mikrozomlar ve sitosolde de enzim aktivitesi görülür (18).

**Glutasyon peroksidaz:** Enzim aktivitesi sitosol ve mitokondrial matrixde gerçekleşir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi H<sub>2</sub>O'ya ayrıca organik hidroperoksitleri H<sub>2</sub>O'ya çevirir. İki çeşit glutasyon peroksidaz vardır: Selenyuma bağımlı ve selenyum bağımsız. Enzimin her iki türünün de peroksitleri redükte ederek radikal hasara karşı koruma sağladığı gösterilmiştir. İki enzim türü farklı substrat spesifitesi göstermektedir. Selenyuma bağımlı tip sitosolde bulunur ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin redüksiyonu için daha az kapasiteyle gerçekleştirir. Selenyum bağımsız tip ise organik hidroperoksitleri tercihli olarak kullanır. Enzimin lipid peroksidasyonunu inhibe ettikleri ilk olarak McCay ve ark tarafından gösterilmiştir(18)

**Sekonder koruma mekanizmaları:**  
**Lipolitik enzimler:** Hücreler, hasar görmüş ya da değiştirilmiş membran bileşiklerini onarmak üzere görev alan çeşitli enzimlerle donatılmıştır. Serbest radikal hasarına karşı ve hasar görmüş membran onarımında görev alırlar. Hasar görmüş membranların ortadan kaldırılması membran bütünlüğünün korunması açısından çok önemlidir. Membran lipidlerinin peroksidasyonu fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin lipolitik aktivitesini stimüle eder. Fosfolipidlerin peroksidize formunun, fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin tercihli substratı olduğu gösterilmiştir. fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin oksidize lipidleri tercih etmesi membran tamiri ve detoksifikasyon olayı için önemli bir fizyolojik olaydır çünkü hücrelere, lipid peroksidasyonuna karşı ek koruma mekanizması sağlamaktadır. fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin yaşa bağlı membran tamirinde görev alması Yu ve ark tarafından da gösterilmiştir. Bu çalışmada mikrozomal membranlarda fosfolipaz A<sub>2</sub>'nin yaşa bağlı olarak artması ile aynı mikrozomların oksidatif olarak hasar görmüş lipid hidroperoksitleri arasında bir ilişki

belirlenmiştir (18).

**Proteolitik enzimler:** Oksidatif olarak hasara uğramış proteinlerin ortadan kaldırılmasında görevlidirler. Böylece değişime uğramış proteinlerin hücrede birikimi engellenir (18). Tüm bu antioksidanlara rağmen bazı serbest radikaller hücreye zarar verebilirler. Bunun sonucunda tüm hücresel yapılar ve DNA oksidatif hasara uğrar. Radikaller DNA'ya yakın yerde oluşmuşsa, purin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girerek mutasyonlara neden olabilir (8). Yardımla üreme teknikleri uygulamalarında kullanmak üzere semenin yıkanması işlemi sırasında, spermatozoon hücreleri, çeşitli antioksidanlar içeren ve kendilerini dış ortama karşı koruyan seminal plazmadan uzaklaştırılmaktadır. Bu durum, spermatozoonların oksidatif strese karşı daha da hassas olmalarına neden olmaktadır (22). Hücrenin kendi antioksidanlarının çok etkili olmadığı durumlarda infertilite tedavisinde diyetle antioksidan alımının ( E ve C vitamini, β-karoten, flavonoidler) önerilmesi ya da antioksidan içeren medyumların kullanımı konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Dawson ve ark. (1992) askorbik asit uygulamasını takiben sigara tiryakilerinin sperm kalitesinde artış belirlemişlerdir (19). Lenzi ve ark. (1993) glutasyon terapisinin infertil hastalarda etkisini araştırmış ve sperm motilitesi ve morfolojisi üzerinde pozitif etkisi olduğunu belirlemişlerdir (23). Ayrıca Geva ve ark. antioksidan tedavisi ( E vitamini) ile lipid peroksidasyon potansiyelinde bir düşüş olduğunu ve bu sonucunda fertilizasyon oranlarındaki artışla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (24). Yardımla üreme tekniklerinde sperm hazırlanırken santrifüj yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemin ROT üretimini indüklediğini ve bu nedenle de sperm fonksiyonları üzerine zararlı etkisi olduğu gösterilmiştir (25). Yine Parinaud ve ark. (1997) santrifügasyon nedeniyle oluşan hasarın antioksidanlar içeren bir medyumun kullanımıyla azabileceğini göstermiştir. Böylece daha fazla motil sperm elde edildiğini göstermişlerdir (26). Sonuç olarak, infertilite tedavisinde spermatozoonların oksidatif zarar görmemesi ya da mümkün olduğunca az zarar görmesi için diyetle antioksidan alımı ya da antioksidan içeren medyumların sperm hazırlama tekniklerinde kullanımı önerilebilir.

**KAYNAKLAR**

1. *Junqueira L, Carneiro J. Basic Histology ,10 th edition, Lange Medical Books, 2003.*
2. *Babior B.M., Curnette J.T. and McMurrich B. J. The particulate superoxide-forming system in human neutrophils. J. Clin. Invest. 1976; 58: 989-996.*
3. *Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Hum. Reprod. 1995; 10(1):15-21.*
4. *Cummins J. M., Jequier A. M. and Kan R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? Mol. Reprod. Dev. 1994; 37: 345-362.*
5. *Agarwal A, Saleh RA., Bedaiwy M. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil. Steril. 2003; 79(4): 829-843.*
6. *Yılmaz S, Koyutürk M, Kılıç G, Alpak O, Aytoz A. Effects of Leukocytospermia on semen parameters and outcomes of intracytoplasmic sperm injection. International Journal of Andrology 2005; 28: 337-347.*
7. *Aitken RJ., Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. Mol. Reprod. Devel. 1993; 35:302-315.*
8. *Geva E, Lessing J. B., Lerner-Geva L., Amit A. Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. 1998; 13(6):1422-4.*
9. *Sharma R K, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Clinical review. Urology; 1996; 48(6): 835-850.*
10. *Griveau JF, Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. Int. J. Androl. 1997; 20: 61-69.*
11. *Hargreave TB. Male Infertility Second edition, 1994, 94-103.*
12. *Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet, 1994; 344: 721-724.*
13. *Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples J. Androl. 2002; 23(5):717-723.*
14. *Lopes S, Jurisicova A, Sun J, Casper R. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum. Reprod. 1998; 13(4):896-900.*
15. *Li T. K. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. Biol. Reprod. 1975; 12: 641- 646.*
16. *Nissen H.P. and Kreysel H. W. Superoxide dismutase in human semen, Klin. Wochensch. 1983; 61: 63-65.*
17. *Jeulin c., Soufir J. C., Weber P., et al. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. Gamete Res. 1989; 24: 185-196.*
18. *Byung Pal Yu Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiological Reviews 1994;74(1): 139-162.*
19. *Dawson E. B., Harris W.A., Teter M.C. et al. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. Fertil Steril. 1992; 58: 1034-1039.*
20. *Eskenazi B., Kidd SA., Marks AR, Slotter E, Block G., Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. Hum. Reprod.2005; 20(4):1006-12.*
21. [www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/mens health/part1\\_4-2.html](http://www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/mens health/part1_4-2.html)
22. *Gomez E, Aitken J. Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa. Fertil. Steril. 1996; 65(4):880-2.*
23. *Lenzi A., Culasso F, Gandini L., et al. Placebo-controlled, doubleblind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Hum Reprod. 1993; 8: 1657-1662.*
24. *Geva E., Bartoov B., Zabludovsky N. et al. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. Fertil Steril. 1996; 66: 430-434.*
25. *Warren J.S., Johnson K.J., and Ward P.A., Oxygen radicals in cell injury and cell death. Pathol. Immunopathol. Res. 1987; 6: 301-315.*
26. *Parinaud J., Le Lannou D., Vieitez G., et al. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit) following ejaculation. Hum. Reprod. 1997; 12: 2434-2436.*