Archive of SID

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۹ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶ صفحات ۹۵- ۹۱

بررسی فعالیت وارزش تشخیصی آنتی اکسیدانهای غیر آنزیمی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در پلاسمای سمن و اسپرم مردان نابارورآستنوزواسپرم

دکتر محمد نوری: دانشیار بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
E-mail: nourimd@yahoo.com
دکتر عالیه قاسم زاده: استادیار زنان و مامائی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دکتر لعیا فرزدی: استادیار زنان و مامائی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
وحیده شهنازی: فوق لیسانس انگل شناسی دانشگاه علوم پزشگی تبریز

دریافت: ۸۵/۸/۳۰ **پذیرش:** ۸۶/۱/۲۹

چکیده

زمینه و اهداف: نشان داده شده که گونه های فعال اکسیژن می توانند اسپرمها را از نظر مورفولوژی، حرکت و ورود به اووسیتها تحت تاثیر قرار دهند. ترکیبات آنتی اکسیدانت آنزیمی و غیر آنزیمی سد دفاعی سلولها در مقابل اکسیداسیون بویژه اکسیداسیون لیپیدی می باشند. در این مطالعه میزان اکسیداسیون لیپیدی و سطح ترکیبات آنتی اکسیدانت غیر آنزیمی در مایع سمن و اسپرمها اندازه گیری و ارزش تشخیصی آنها در ناباروری مردان مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی: از میان زوجین مراجعه کننده به بخش نازایی، ۴۰ مرد بارور با خصوصیات نرموز و اسپرمی و ۶۰ مرد نابارور با خصوصیات آستنوزواسپرمی به روش انتخابی ساده برای این مطالعه انتخاب و بصورت یک سوکور بررسیهای آزمایشگاهی صورت گرفت. مالون دی آلدئید مایع سمن و اسپرمها بروش تیوباربیتوریک اسید ارائه شده توسط Yagi، سطح ویتامین C به روش ۲-۴ دی نیتروفنیل هیدرازین و سطح ویتامین E با استفاده از HPLC بر اساس روش B. L. Lee با اعمال برخی تغییرات جزئی اندازه گیری گردید. جهت لیز نمودن اسپرمها و استخراج محتویات سلولی آنها از روش فریز و ذوب کردن مداوم استفاده شد. بررسی مورفولوژی و تحرک اسپرمها بر اساس روش سازمان بهداشت درمان انجام گرفت.

یافته ها: غلظت مالون دی آلدئید در مایع سمن و اسپرم مردان آستنوزواسپرمی بیشتر از افراد نرموزواسپرمی بود ($P<۰/۰۰۱$). سطح ویتامین C در پلاسمای سمن مردان بارور بیشتر از مردان نابارور ($P<۰/۰۰۱$) و برعکس میزان آن در اسپرم مردان نابارور بیشتر از مردان بارور($P<۰/۰۰۱$) بدست آمد. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی MDA پلاسمای سمنی (به ترتیب۹۵٪ ، ۸۶٪ ، ۹۱٪ و ۹۳٪) و مالون دی آلدئید اسپرم (به ترتیب۹۰٪ ، ۸۳٪ ، ۹۰٪ و ۸۷٪) بیشتر از ویتامین های آنتی اکسیدانت بوده و ویتامین C اسپرم ارزش تشخیصی بیشتری نسبت به ویتامین C و ویتامین E پلاسمای سمن داشت.

نتیجه گیری: اندازه گیری مالون دی آلدئید پلاسمای سمن و اسپرم به همراه ویتامین C اسپرم در تشخیص مردان نابارور آستنوزواسپرمی می تواند کمک کننده باشد.

کلید واژه ها : مالون دی آلدئید، ویتامین C ، ویتامین E ، آستنوزواسپرمی، ناباروری

مقدمه

کاهش عملکرد اسپرم مهمترین عامل ناباروری مردانه می باشد(۱). یافته های متعددی نشان میدهد که گونه های فعال اکسیژن[1] می توانند پارامترهای متعدد اسپرم از جمله مورفولوژی و حرکت اسپرمها را به شدت تحت تاثیر قرار دهند(۴-۲). غشاء اسپرمها نیز بخاطر داشتن اسیدهای چرب غیر اشباع چند ظرفیتی به ROS بسیار حساس بوده و درغیاب ترکیبات دفاعی براحتی اکسیده می شوند(۵). امروزه غالبا از اندازه گیری مالون دی آلدئید[2] برای تخمین میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشاء سلولها استفاده می گردد(۶). مایع Semen و پلاسمای اسپرمها برای جلوگیری از اثرات مضر ROS دارای تعداد زیادی سیستم آنتی اکسیدانت میباشند که از جمله آنها آنتی اکسیدانتهای زنجیره شکن است که قادرند سطح رادیکالهای آزاد را کاهش داده و راکسیونهای زنجیره ای تولید رادیکالهای آزاد

1. Reactive Oxygen Species, ROS
2. malondialdehyde, MDA

www.SID.ir

Archive of SID

را قطع نمایند(۷). آنتی اکسیدانتهای موجود در مایع Semen و همینطور در اسپرمها را میتوان به دو دسته آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم کرد. یک ارتباط معنی داری مابین فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدانت موجود در مایع Semen با میزان فعالیت و Fecundity اسپرمها گزارش شده است(۸).

از جمله مهمترین آنتی اکسیدانتهای غیرآنزیمی در مایع سمن اورات، اسکوربات، توکوفرول و گروههای SH گزارش شده است(۹). با توجه به مصرف ویتامین های E و C بعنوان مکمل درمانی در بسیاری از بیماریها از جمله نازائی هدف از این مطالعه اندازه گیری سطح پلاسمای سمن و اسپرمی MDA ، ویتامین E و C و تعیین نقش تشخیصی آنها در نازایی می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع مطالعات توصیفی – آزمایشگاهی می باشد .صد زوج (۴۰ زوج بارور و ۶۰ زوج نابارور با علت مردانه) مراجعه کننده به مرکز نازائی دکتر مجیدی بیمارستان الزهرا بصور ت نمونه گیری ساده و یک سوکور[1] در این مطالعه وارد و نمونه های اسپرم براساس تقسیم بندی سازمان جهانی بهداشت به دو گروه عمده تقسیم شدند.

۱- نرموزواسپرمی بارور: با تعداد اسپرم بیشتر از ۲۰ میلیون در میلی لیتر، تحرک پیشرونده سریع درجه a بیشتر از ۱۵٪ ، تحرک پیشرونده سریع و آهسته (a+b) بیشتر از ۵۰ ٪ و مورفولوژی طبیعی بیشتر از ۱۵٪

[بر اساس درجه بندیWHO اسپرمها از نظر تحرک به چهار دسته تقسیم می شوند. ۱- پیشرونده سریع (درجه a) ۲- پیشرونده آهسته (درجه b) ۳- متحرک غیر پیشرونده (درجه c) ۴- غیر متحرک (درجه d)] (۱۰).

۲- آستنوزواسپرمی نابارور: با تعداد اسپرم کمتر از ۲۰ میلیون، تحرک a کمتر از ۱۰٪، تحرک a + b کمتر از ۴۵٪ و مورفولوژی طبیعی بیشتر از۱۵٪

تمامی نمونه ها بعد از ۳ روز از نزدیکی زوجین و به طریقه Masturbation اخذ گردیدند. بعد از آبکی شدن نمونه ها (تا ۴۵ دقیقه) حجم، تعداد، مورفولوژی و درجه تحرک (a: پیشرونده سریع)، (b: پیشرونده آهسته)، (C: غیرپیشرونده) و (d: غیر متحرک) اسپرمها مطالعه گردید(۱۰). پلاسمای سمن بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور g ×۱۰۰۰ جدا و در لوله های ۱ میلی لیتری در ^{o}c ۴۰ – فریز گردیدند. بعد از جدا کردن مایع رویی، باقیمانده رسوب را با نیم میلی لیتر محیط کشت HamsF10 حاوی آلبومین انسانی (۱۰٪) بهم زده و مجددا با دور g × ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نمودیم. مایع رویی را دور ریخته نیم میلی لیتر محیط کشت به روی رسوب اضافه نموده و در دمای ^{o}c ۳۷ و دی اکسید کربن ۵٪ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه نمودیم. بعد از ۴۵ دقیقه نتیجه Swim up را برای تمامی نمونه ها مطالعه و سپس با اضافه نمودن ۰/۲ میلی لیتر محلول فسفات بافر نمونه را بهم زده و ۵ دقیقه در دور g× ۳۰۰۰ سانتریفوژ و بعد از برداشتن مایع رویی، شست و شو را مجددا انجام دادیم. آنگاه تعداد سلولها را بررسی نموده و سوسپانسیون سلولی $۱۰^{۶}$ × ۲۵ سلول در نیم میلی لیتر تهیه و باقیمانده سلولها در لوله های اپندورف با غلظت های $۱۰^{۶}$× ۱۰ اسپرم تقسیم و فریز گردیدند. برای اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی در مایع سمن و اسپرمها از روش Yagi (۱۱) استفاده شد. در این روش MDA بعد از راکسیون با تیوباربیتوریک اسید بطور اسپکتروفلورومتری در طول موجهای ۵۱۵ و ۵۵۳ غلظت آن در مایع سمن بر حسب nmol MDA/ml و در اسپرمها برحسب $۱۰^{۷}$ سلول /nmol MDAمحاسبه می گردد. جهت بررسی غلظت α – توکوفرول ابتدا مایع سمن را به دمای آزمایشگاه رسانده، همچنین اسپرمهای فریز شده را در لوله های اپندورف با سه بار فریز و ذوب کردن مداوم لیز نموده و بعد از سانتریفوژ از مایع بالایی برای تزریق به HPLC استفاده کردیم. سطح ویتامین E بر اساس روش (P.1992) B. L. Lee (۱۲) و سطح ویتامین C به روش ۲-۴ دی نیتروفنیل هیدرازین (۱۳) مورد اندازه گیری قرار گرفت.

یافته ها

وضعیت اسپرم و سطح سرمی هورمونهای جنسی در مردان نازا و گروه نرموزواسپرمی در جدول ۱ نشان داده شده است. یافته ها نشان میدهد که فاکتورهای باروری اسپرم در دو گروه اختلاف معنی داری داشته ولی سطح سرمی هورمونهای جنسی یکسان می باشد. تمامی فاکتورهای باروری اسپرم بعد از شستشو و Swim up در هر دو گروه بهبود یافته (جدول ۲) و افزایش معنی داری را نشان میدهند(P<۰/۰۰۱).

سطح پراکسیداسیون لیپیدی که به صورت MDA اندازه گیری شده است، در مایع سمن ۰/۲ ± ۱/۴ و ۰/۳۵ ± ۱/۹ نانومول در میلی لیتر ، به ترتیب در افراد سالم و گروه نابارور می باشد. به همین ترتیب این مقادیر برای اسپرم به ترتیب ۰/۰۳ ± ۰/۱ و ۰/۰۶ ± ۰/۱۷ نانومول در $۱۰^{۷}$ اسپرم بدست آمد که ازنظر آماری اختلاف در هر دو مورد معنی دار می باشد. مقادیر ویتامین E و ویتامین C نیز در جدول نشان داده شده است. میزان ویتامین های آنتی اکسیدانت مایع سمن در مردان بارور بیشتر از مردان نابارور بوده و برعکس سطح این ویتامین ها در اسپرمهای مردان نابارور بیشتر از مردان بارور بدست آمد بطوریکه سطح ویتامین C در اسپرمهای مردان نابارور نزدیک به دو برابر مردان بارور بود. با در نظر گرفتن میانگین به اضافه انحراف استاندارد MDA و ویتامین های E و C در مردان نرموزواسپرمی به عنوان Cut off، میزان حساسیت، اختصاصیت، ارزش اخباری مثبت (PPV)[2] و ارزش اخباری منفی (NPV)[3] برای هر کدام از آزمایشها محاسبه و در جدول ۴ آورده شده است. طبق نتایج، MDA پلاسمای سمن بیشترین مقدار حساسیت (۹۵٪) ، اختصاصیت (۸۶٪) ، PPV (۹۱٪) و NPV (۹۳٪) را داشته است.

1. Blind
2. Positive predictive value, PPV
3. Negative predictive value, NPV

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ : فاکتورهای باروری اسپرم و سطح سرمی هورمونهای جنسی در مردان نرموزو اسپرمی و آستنوزواسپرمی

مشخصات	نرموزواسپرمی	آستنوزواسپرمی
سن	۳۷/۱ ± ۴	۳۴/۲ ± ۳/۴
غلظت اسپرم ($\times 10^{۶}$ / ml)	۸۲ ± ۲۰/۵	۳۰/۵ ± ۱۵/۲ ××
تحرک اسپرم (درجه a+b×)	۶۰/۸ ± ۱۰/۶	۳۱/۴ ±۱۱ /۲ ××
تحرک اسپرم(درجه a)	۲۵/۴ ± ۶ /۸	۵/۲ ± ۴/۱ ××
مورفولوژی اسپرم	۶۵/۵ ± ۲۰/۷	۱۹/۸ ± ۸/۶ ××
تستوسترون سرم (nmol/L)	۱۶/۸ ± ۳/۴	۱۷/۱ ± ۴/۸
LH سرم (nmol/L)	۴/۰ ± ۱/۸	۴/۲ ± ۱/۸
استرادیول (Pmol/L)	۶۰/۰ ± ۱۶/۷	۶۹/۸ ± ۱۹/۰

● × براساس درجه بندی WHO

● ×× از نظر آماری اختلاف معنی دار می باشد($P<۰/۰۰۱$).

جدول ۲: فاکتورهای باروری اسپرم بعد از Swim up سمن مردان نرموزواسپرمی و آستنوزواسپرمی

فاکتورهای باروری مردانه	نرموزواسپرمی		آستنوزواسپرمی	
	قبل	بعد	قبل	بعد
غلظت اسپرم (۶/ml ۱۰ ×)	۸۲ ± ۲۰/۵	۱۰۰ ± ۲۵ ×	۳۰/۵ ± ۱۵/۲	۵۰ ± ۲۰ ×
تحرک اسپرم (درجه a+b)	۶۰/۸ ±۱۲/۶	۹۵ ± ۴ ×	۳۱/۴ ± ۱۱/۲	۶۰ ± ۱۹ ×
تحرک اسپرم (درجه a)	۲۵/۴ ± ۶/۸	۷۰ ± ۲۱ ×	۵/۲ ± ۴/۱	۴۰ ± ۱۶ ×
مورفولوژی اسپرم	۶۵/۵ ± ۲۰/۷	۸۲ ± ۱۰ ×	۱۹/۸ ± ۸/۶	۷۰ ± ۲۳ ×

× اختلاف از نظر آماری معنی دار می باشد($P<۰/۰۰۱$)

جدول ۳ : سطح MDA ، VitCو VitE در مایع سمن و اسپرمهای مردان نرموزواسپرمی و آستنوزواسپرمی

	نرموزواسپرمی ××		آستنوزواسپرمی ××	
	پلاسمای سمن	اسپرم	پلاسمای سمن	اسپرم
MDA	۱/۴ ± ۰/۲	۰/۱ ± ۰/۰۳	۱/۹ ± ۰/۳۵	۰/۱۷ ± ۰/۰۶
VitE	۰/۵ ± ۰/۲۰	×	۰/۳۰ ± ۰/۱۵	×
VitC	۳۸۰± ۱۱۵	۱/۸ ± ۰/۷	۲۵۰ ± ۱۲۰	۴/۱ ± ۱/۹

MDA اسپرم برحسب نانو مول در $۱۰^{۷}$ اسپرم

MDA پلاسمای سمینال بر حسب نانومول در میلی لیتر

VitE, VitC پلاسما سمینال بر حسب میکرومول در لیتر

VitE, VitC اسپرم بر حسب میکرومول در $۱۰^{۱۰}$ سلول

×غیر قابل اندازه گیری

×× اختلاف سطح تمامی ترکیبات در دو گروه معنی دار می باشد($P<۰/۰۱$) .

جدول۴ : ارزش تشخیصی سطح MDA و ویتامین های آنتی اکسیدانت در مایع سمن و اسپرم مردان بارور و نابارور

	Cutt off	حساسیت	اختصاصیت	ارزش اخباری مثبت	ارزش اخباری منفی
MDA پلاسمای سمن	۱/۶	۹۵٪	۸۶٪	۹۱٪	۹۳ ٪
MDA اسپرم	۱۳٪	۹۰٪	۸۳٪	۹۰٪	۸۷ ٪
VitC پلاسمای سمن	۲۶۵	۵۰٪	۵۶٪	۶۶٪	۴۸ ٪
VitC اسپرم	۲/۵	۹۰٪	۸۰٪	۹۰٪	۸۴ ٪
VitE پلاسما ی سمن	۰/۳۵	۵۰٪	۶۳٪	۶۰٪	۵۰ ٪

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

گونه های فعال اکسیژن (ROS) یک وظیفه عملی بعنوان پیامبر ثانویه در بسیاری از سلولها به عهده دارند (۵). لذا اگر تولید آنها کنترل نگردد، در پاتولوژی ناباروری مردانه نقش مهمی را ایفا خواهد کرد (۸). در اسپرم، تولید ROS با کاهش تحرک و کاهش ظرفیت ورود به اووسیت همراه است (۱۴).

پراکسیداسیون لیپیدی به معنی اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع می باشد که به مقدار زیادی در غشاء سلولها به ویژه اسپرمها وجود دارد (۱۵). رادیکال هیدروکسیل شروع کننده قوی پراکسیداسیون لیپیدی می باشد (۱۶). تولید و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی بستگی به مقدار آنتی اکسیدانتهایی دارد که توسط اسپرمها مورد استفاده قرار می گیرد (۱۵). یکی از فاکتورهای بیوشیمیایی که سطح صدمه پراکسیداتیو را نشان میدهد MDA می باشد (۱۶). نتایج حاصل از این مطالعه نشان میدهد که نه تنها سطح MDA در سمن و اسپرم مردان نابارور بیشتر از مردان بارور می باشد، حساسیت (۹۵٪) و ویژگی (۸۶٪) این تست نیز بسیار بالا بوده و می توان از آن در افتراق این دو گروه استفاده نمود. MDA با PPV در حدود ۹۱٪ ارزش اخباری بیشتری حتی از MDA اسپرم دارد. نتایج مطالعه ما با گزارش Shang و همکاران و Taymour و همکاران همسو بوده ولی در مطالعات یاد شده ارزش اخباری و حساسیت آزمایش مورد آنالیز قرار نگرفته است (۱۷ و ۱۸).

اندازه گیری سطح MDA در سلولهای اسپرم اخیرا پیشنهاد گردیده است. Laudate و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که سطح این ترکیب در اسپرم مردان بارور خیلی کمتر از مردان نابارور می باشد(۱۹). Tavilani و همکاران نیز افزایش ۱/۵ برابری MDA در سلولهای اسپرم مردان نابارور نسبت به مردان بارور را گزارش نموده اند(۲۰). در این مطالعه نیز اندازه گیری MDA اسپرم با روش تیوباربیتوریک اسید با PPV و NPV به ترتیب ۹۰٪ و ۸۷٪ گویای اهمیت تشخیصی بالای آن می باشد.

بالا بودن سطح اسید اسکوربیک در مایع سمن نسبت به پلاسمای خون (۳۸۰ و ۴۰ میکرومول در لیتر به ترتیب) و سایر آنتی اکسیدانتها، نشانگر اهمیت فعالیت فیزیولوژیکی این ترکیب می باشد. به همین ترتیب بالا بودن سطح ویتامین C در اسپرم مردان نابارور بر عکس مایع سمن نشانگر احتیاج بیشتر سلولهای اسپرم نابارور به ترکیب یاد شده است. نشان داده شده که اسکوربات قادر است رادیکال هیدروکسیل و O_2^{-o} را از محیط برداشته و اثرات آنها را خنثی نماید (۲۱). بررسیهای آماری نیز ارزش تشخیصی اندازه گیری ویتامین C در اسپرم را بیشتر از مایع سمن نشان می دهد. اگر چه گزارش در مورد حساسیت، اختصاصیت، PPV و NPV ویتامین C تا به حال گزارش نشده است، با این حال گزارشاتی دال بر ارتباط مستقیم ویتامین C سمن با مورفولوژی نرمال و تحرک اسپرمها داشته و هم چنین رابطه منفی آن با پراکسیداسیون لیپیدی و MDA نشان داده شده است (۲۲و ۲۳).

در مطالعه حاضر ویتامین E پلاسمای سمن کمترین ارزش تشخیصی را نسبت به سایر فاکتورها نشان داد و به علت پایین بودن غلظت آن در اسپرمها، اندازه گیری آن امکان پذیر نشد. نشان داده شده که وجود ویتامین E برای فعالیت آنتی اکسیدانتی ویتامین C ضروری است (۲۴). لذا به نظر می رسد که به غلظت بالای این ترکیب نیازی نباشد.

نتیجه گیری

نهایتا بنظر می رسد که اندازه گیری MDA در پلاسمای سمن و اسپرم، هم چنین سطح ویتامین C در اسپرمها می تواند کاربرد زیادی برای افتراق مردان بارور از نابارور داشته باشد. به همین ترتیب تجویز ویتامین C در آستنوزواسپرمی پیشنهاد می گردد.

References

1. Chatterjee S, Chowdhury RG, khan B: Medical management of male infertility. *Indian Med Assoc* 2006; **104**(2): 74, 76-7.
2. Sanocka D, kurpisz M: Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; **2**: 12- 9.
3. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil steril* 2006; **86**(4):878-85.
4. Agarwal A, saleh R A, Bedaiwy M A: Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertile and Steri* 2003; **79**: 829- 43.
5. Aitken R J, Fisher H: Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and Risk. *Bioassays* 1994; **16**: 259- 67
6. Girotti M j, khao N, Melellen BA: Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasm of major blunt trauma patients 1991; **31**: 32- 35.
7. Marn T, Mann: Male reproductive Function and semen. Themes and Trends in physiology, biochemistry and investigative andrology.

www.SID.ir

Archive of SID

Biochemistry of spermatozoa, Beolin. *springer-Verlag*. 1981; PP: 200-220.
8. Athayde KS, cocuzza M, Agarwal A. Development of Normal Reference values for seminal Reactive oxygen species and their correlation with Leukocytes and Semen Parameters in a Fertile Population. *Androl* 2007; **4** : 221-4
9. Somogyi A,Rosta K, Pusztai P. Antioxidant measurements. *Physiol meas* 2007; **28**(4): R41-55.
10. World Health organizatiom WHO. Laboratory Manual for the examination of Human semen and semen- cervical Mucus interaction. 4 th ed. Cambridge, UK, cambridge University press, 1999; 23.
11. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. Methods *Enzymol* 1984; **105**: 328- 31.
12. Lee Bl, chua SC, Ong Hy, Ong CN. HPLC Method for routine determination of vitamins A and B- carotene in plasma. j- of *chromato*. 1992, **581**: 41- 47.
13. Natelson S. Determination of ascorbic acid using, 2, 4 dinitrophneyl hydrazine. In, "Technique of clinical chemistry." C. C. Thomas, spring field, *Illinois*, 1971.
14. Jancar N, Kopitar AN, Than A. Effect of apoptosis and reactive oxygen species production in human granulosa cells on oocyte fertilization and blastocyst. *J Assist Reprod Genet.* 2007; **24** (2-3): 91-7.
15. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. Free Radical Res. *Commun*. 1990; **9**: 1- 32.
16. Aitken Rj, fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and Risk. *Bioassays*. 1994; **16**: 259- 67.
17. Shang Xj, Lik, YeZQ, chen YG, YUX, Huang YF. Analysis of lipid peroxidative levels in seminal plasma of in fertile men by HPLC. Arch *Androl*. 2004; **50**(6): 411- 6.
18. Taymour M, Tarek H. A, sheriff. G, Abdol Rahman N, Hager I, and I hab A. O. Reactive oxygen species and antioxidants relationship in the internal spermatic vein blood of infertile men with varicocele. Asian J *Androl*. 2006; **8**(4): 451- 4.
19. Landat A, Karine L, Guechot j, Palluet AM. Values of sperm thiobarbituric acid- reactive substances in Fertile men. Clin chim *Acta*. 2002; 325: 113- 5.
20. Tavilani H. Doosti M, Saeidi H. malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. Clinica chimica *Acta*. 2005; **365**: 199-203.
21. Sheena E. M, Samantha L, sterling M. Camparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and sterility*. 1997; **67**- 1: 142- 7.
22. Mostafa T, Tawadrous G, Roaia MM. Effect of smoking on seminal plasma ascorbic acid in infertile and fertile males. *Andrologia.* 2006; **38**(6): 221-4.
23. 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**(7): 2063-72.
24. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidant. Lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. Arch Biochem *Biophys*. 1993; **300**: 535- 43.

www.SID.ir