مقایسه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اسپرم و عناصر سلنیوم و روی پلاسمای منی در بین مردان بارور و نابارور ایدیوپاتیک*

هادی خرازی[1]؛ اسد ویسی‌رایگانی[2]؛ بهروز اعتصامی[3]*؛ مظفر خزاعی[2]؛ امیر کیانی[4]؛ عزت‌اله رفیعی‌علوی[5]؛ سید سعید شاهرخی[6]

چکیده

زمینه: تصور می‌شود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اسپرم و عناصر سلنیوم و روی موجود در پلاسمای منی به‌علت خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه و با جلوگیری از اثرات مخرب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) بتوانند تأثیر مهمی در زمینه کاهش لیپید پراکسیداسیون اسپرم داشته باشند. در تحقیق حاضر میزان فعالیت آنزیم‌ها و عناصر مذکور، در اسپرم و پلاسمای منی مردان بارور و نابارور ایدیوپاتیک، مورد ارزیابی قرار گرفته و ارتباط آن‌ها با پارامترهای تعداد، حرکت و مرفولوژی اسپرم بررسی شده است.

روش‌ها: نمونه‌های منی مورد استفاده به دو گروه بارور و نابارور، هر کدام 30نفر، تقسیم شده و آنالیز منی به کمک روش کامپیوتری و دستی انجام شد. پس از جداسازی اسپرم‌ها از پلاسمای منی، برای اندازه‌گیری عناصر از روش جذب اتمی استفاده شد. سنجش فعالیت کاتالاز به‌روش Aebi و تعیین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت‌های تجاری راندوکس صورت گرفت.

یافته‌ها: بین فعالیت کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و میزان عناصر سلنیوم و روی در افراد بارور و نابارور تفاوتی وجود نداشت. ارتباطی بین میزان فعالیت هر یک از آنزیم‌ها و مقادیر هر کدام از عناصر با پارامترهای منی وجود نداشت. تنها در گروه آستنوتراتواسپرمیک، بین فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با حرکت اسپرم (P=0/033 و r=-0/901) و میزان سلنیوم پلاسمای منی با مرفولوژی اسپرم رابطه معکوسی وجود داشت (P=0/038 و r=-0/659)، اما میزان فعالیت کاتالاز در این دسته افراد با سوپراکسید دیسموتاز رابطه مستقیم داشت (P=0/024 و r=-0/894).

نتیجه‌گیری: اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز اسپرم و تعیین میزان روی و سلنیوم پلاسمای منی، ابزار مفیدی برای تعیین پتانسیل باروری اسپرم نیست.

کلیدواژه‌ها: ناباروری ایدیوپاتیک، آنزیم آنتی‌اکسیدان، روی، سلنیوم.

«دریافت: 1388/9/10 پذیرش: 1389/3/4»

1. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

2. مرکز تحقیقات باروری و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

3. کمیته تحقیقات دانشجویان، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

4. گروه سم‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

5. گروه آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

6. گروه اورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

***عهده‌دار مکاتبات:** کرمانشاه، سرخه لیژه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه ، تلفن: 09163615176

Email: etesamibehrooz@yahoo.com

* **این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی آقای بهروز اعتصامی در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد.**

مقدمه

ناباروری به معنی عدم توانایی در صاحب فرزندشدن پس از یکسال مقاربت‌های جنسی و بدون استفاده از روش‌های جلوگیری از بارداری است. حدود 18-13 درصد زوج‌های جوان از این مسأله رنج می‌برند. علت حدود نیمی از موارد ناباروری مربوط به مردان است. ناباروری در مردان می‌تواند در اثر عوامل مختلفی مانند جهش‌های ژنی، ناهنجاری‌های کروموزومی، بیماری عفونی، انسدادمجاری، واریکوسل، تشعع، شیمی‌درمانی، و... ایجاد می‌شود. با این‌حال حدود 50 درصد مردان نابارور به‌عنوان ایدیوپاتیک درنظر گرفته می‌شوند (1) و در 40 درصد موارد آن افزایش مقدار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS= Reactive Oxigen Spercies) در مایع منی به چشم می‌خورد که خود را به‌صورت کاهش تعداد اسپرم، تغییر حرکت و مورفولوژی اسپرم در آنالیز مایع منی ظاهر می‌سازد (2).

ROSها اصولاً توسط متابولسیم طبیعی اکسیژن در سلول‌ها تولید شده و محل اصلی تولید آن‌ها کمپلکس I و III زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری است (3). شایع‌ترین آن‌ها که اثرات بالقوه در بیولوژی تولیدمثل دارند عبارتند از: آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های پراکسیل، ردایکال‌های فوق‌العاده فعال هیدروکسیل، ردایکال‌های آزاد نیتریک اکسید و آنیون پراکسی نیتریت (4).

ROSها می‌توانند اثرات مضر و مفیدی بر عملکرد اسپرم داشته باشند. این اثرات متناسب با نوع و غلظت ROS و مدت‌زمانی که اسپرم در معرض آن قرار می‌گیرد متغیرند. مقدار کمی ROS توسط اسپرم‌ها در شرایط فیزیولوژیک ایجاد می‌شود که برای ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی اسپرم مورد نیاز است. از طرفی دیگر ROS تولیدشده توسط اسپرم‌ها و گلبول‌های سفید می‌تواند از طریق واکنش با ماکروملکول‌های سلولی، موجب آسیب سلولی اسپرم گردد و مشخص شده که مقادیر بالای آن، رابطه منفی با حرکت و تعداد اسپرم دارد (5).

غشای اسپرم به‌علت دارا بودن مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA= Poly Unsaturated Fatty Acid) (به‌ویژه اسید چرب دارای 6 پیوند دوگانه)، مستعد پراکسیداسیون لیپید بوده و در واقع علت اصلی ناباروری ناشی از استرس اکسیداتیو همین مسأله است (6). به‌طورکلی افزایش میزان ROS در مایع منی موجب پراکسیداسیون لیپید، آسیب غشایی و در نتیجه کاهش حرکت اسپرم، غیرفعال‌سازی آنزیم‌های گلیکولیز، آسیب به غشای اکروزوم و اکسیداسیون DNA می‌شود. به‌همین دلیل اسپرم قادر به بارورکردن تخمک نبوده و ناباروری رخ می‌دهد (7).

مولکول‌هایی به نام آنتی‌اکسیدان (آنزیمی و غیرآنزیمی) برای حفظ هموستاز اکسیداتیو و مقابله با استرس اکسیداتیو وجود دارند. این ملکول‌ها یا مانع تولید ROS می‌شوند، یا آن‌ها را خنثی‌می‌کنند و یا اعمال آن‌ها را بی‌اثر می‌سازند (4). وجود آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز (SOD= Superoxide dismutase)، کاتالاز (CAT= Catalase) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX= Glutathione peroxidase) در اسپرم به اثبات رسیده است (8). علاوه بر آن ملکول‌های غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدان، شامل ویتامین C و E، پیروات، گلوتاتیون، کارنیتین، N-استیل L-سیستئین، کاروتنوئیدها (B-کاروتن‌ها)، کوآنزیم Q10 و... در مایع منی وجود دارند.

در اسپرم‌ها فعالیت بالایی از ایزو آنزیم Cu/Zn سوپراکسید دیسموتاز به اثبات رسیده (9) و مطالعات زیادی در خصوص نقش آن به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در بیولوژی تولیدمثل صورت گرفته است (4). این آنزیم در برابر سمیت خودبه‌خودی اکسیژن، پراکسیداسیون لیپید و اثرات مخرب آن، از اسپرم محافظت می‌کند. در واقع، سوپراکسیددیسموتاز با جلوگیری‌از پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم، موجب کاهش تولید مالون دی‌آلدهید و در نهایت افزایش حرکت اسپرم می‌شود (9).

کاتالاز نیز در برابر اثرات سمی پراکسیدهیدروژن از

اسپرم محافظت می‌کند. این آنزیم به همراه سوپراکسید دیسموتاز، آنیون سوپراکسید تولیدشده توسط NADPH اکسیداز در نوتروفیل‌ها را برداشته و ممکن است در طول التهاب دستگاه تناسلی، نقش مهمی در کاهش پراکسیداسیون لیپید غشا و حفاظت از اسپرم داشته باشد. در واقع کاتالاز، پراکسیدهیدروژن تولیدشده توسط سوپراکسید دیسموتاز را تجزیه کرده و مانع تشکیل رادیکال فوق‌العاده سمی هیدروکسیل می‌شود. بدین‌ترتیب قادر است از اسپرم در برابر اثرات مخرب رادیکال هیدروکسیل حفاظت نماید (6).

عملکرد آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز، شدیداً به وجود سلنیوم در جایگاه فعال آنزیم وابسته است (10). این آنزیم نیز مانند سوپراکسید دیسموتاز، با ممانعت از پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم و در نهایت، از طریق بهبود حرکت اسپرم بر عملکرد اسپرم تأثیر می‌گذارد. گلوتاتیون پراکسیداز نقش مهمی را در بلوغ اسپرم، از زمان تولید تا هنگامی که اسپرم ظرفیت باروری می‌یابد بازی می‌کند و عدم وجود آن منجر به کاهش ظرفیت بارورسازی اسپرم می‌گردد (11).

نشان داده شده که عناصر کمیاب مختلفی برای رشد بیضه‌ها و ساخت اسپرم ضروری‌اند. عناصری مانند کلسیم، منیزیوم، مس، سلنیوم (Se: Selenium) و روی(Zn: Zinc)، نقش حیاتی را در پارامترهای مایع منی بازی می‌کنند (12).

در پستانداران، ساخت طبیعی اسپرم به جذب کافی سلنیوم توسط بیضه‌ها وابسته است (13). کمبود متوسط تا شدید آن، با حرکت معیوب اسپرم و تغییرات مرفولوژیکی قطعه میانی مشخص شده، که اغلب منجر به جدایی سر اسپرم از دم آن می‌گردد. در کمبود شدید، ساخت اسپرم کاملاً متوقف می‌گردد (14). گزارش شده که تجویز خوراکی سلنیوم (225 میکروگرم در روز)، به‌مدت سه‌ماه، به‌طور محسوسی موجب کاهش غلظت «مالون دی آلدهید» پلاسمای مایع منی و بهبود حرکت اسپرم می‌گردد (15).

عنصر «روی» در جایگاه فعال سوپراکسید دیسموتاز، نقش ویژه‌ای را بر عهده داشته و برای عملکرد مناسب این آنزیم و نقش آنتی‌اکسیدانی آن مورد نیاز می‌باشد. از میان عناصر کمیاب بیشترین دلایل، حاکی از ارتباط مستقیم «روی» با پارامترهای مایع منی است (16). معلوم شده که این عنصر برای ساخت اسپرم ضروری است (17). عنصر روی در پلاسمای مایع منی، غشا و کروماتین اسپرم را پایدار ساخته و از تجزیه آن‌ها جلوگیری می‌نماید (16). به‌نظر می‌رسد این عنصر به‌عنوان یک پاکسازکننده بالقوه آنیون‌های سوپراکسید تولیدشده توسط اسپرم‌ها و گلبول‌های سفید عمل می‌کند (18). لذا تصور می‌شود پلاسمای مایع منی، به‌علت مقادیر بالای «روی»، در مواجه با مقادیر زیاد آنیون سوپراکسید، فعالیت شبه آنتی‌اکسیدانی را انجام دهد.

بنابراین به‌دلیل نقش‌های بسیار مهم آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز اسپرم و عناصر سلنیوم و روی پلاسمای مایع منی، در عملکرد اسپرم و از طرفی دیگر محدود بودن مطالعات در این زمینه در ایران و فقدان یک مطالعه جامع که همه موارد مذکور را بررسی کرده باشد، مطالعه حاضر به‌منظور مقایسه فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز اسپرم و همچنین میزان عناصر سلنیوم و روی پلاسمای مایع منی مردان بارور و نابارور ایدیوپاتیک و تعیین ارتباط آن‌ها با پارامترهای مایع منی طراحی و انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه حاضر، کاربردی است. پس از تأئید طرح در کمیته اخلاقی، نمونه‌ها در قالب دو گروه مردان بارور (30 نفر) و نابارور ایدیوپاتیک (30 نفر)، در محدوده سنی 40-20 سال جمع‌آوری گردید. افراد نابارور توسط پزشک متخصص اورولوژیست و افراد بارور (صاحب فرزند) نیز به‌صورت داوطلبانه به آزمایشگاه پاتوبیولوژی مرکزی خرم‌آباد ارجاع داده شدند. از تمامی افراد، به‌دلیل استفاده از نمونه مایع منی

آن‌ها، رضایت‌نامه آگاهانه اخذ و اطلاعات ایشان (نام، نام خانوادگی، سن، مدت زمان ازدواج و ...) به‌صورت محرمانه نگه‌داری گردید. همسان‌سازی نمونه‌ها از لحاظ سنی صورت گرفته و 4-2 روز پس از آخرین مقاربت جنسی، نمونه منی به‌صورت خودتحریکی از این افراد جمع‌آوری شد. نمونه‌های حاوی گلبول‌های سفید و اسپرم‌های نابالغ و همچنین نمونه‌های مردان نابارور با علت مشخص (واریکوسل، کریپتورکیدیسم، عفونت کلیه و مجاری ادراری، تروما، شیمی درمانی و ..) از مطالعه حذف شدند (19)، از نمونه‌های مردان بارور نرمو اسپرمیک و افراد نابارور ایدیوپاتیک (با اسپرموگرام غیرطبیعی) استفاده گردید.

جمع‌آوری نمونه‌ها 6 ماه به‌طول انجامید. هر نمونه پس از ارسال به آزمایشگاه، مدت 20 دقیقه برای مایع شدن (Liquefaction) در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد قرارداده شد. سپس آنالیز مایع منی بر اساس استانداردها و معیارهای سازمان بهداشت جهانی (20)، به‌صورت دستی و همچنین با استفاده از آنالیز کامپیوتری صورت گرفت و نمونه‌ها به گروه‌های نرمواسپرمیک (30 نفر)، الیگوآستنوتراتواسپرمیک (20نفر) و تراتوآستنواسپرمیک (10نفر) طبقه‌بندی شدند.

بعد از آنالیز مایع منی، برای جداشدن پلاسمای منی از اسپرم‌ها نمونه‌ها به‌مدت 10 دقیقه در دور 500g سانتریفوژ گردید. مایع رویی (حاوی پلاسما) به میکروتیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری منتقل شده و تا زمان اندازه‌گیری مقادیر سلنیوم و روی، در دمای 70- درجه سانتیگراد نگه‌داری گردید. 0/5 میلی‌لیتر بافر هموژنیزان به رسوب (حاوی اسپرم) اضافه شد و بعد از مخلوط کردن به میکروتیوب‌های 1/5 میلی‌لیتری منتقل شده، تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها در دمای 70- درجه سانتیگراد فریز شد. نمونه‌ها را از دمای 70- درجه خارج کرده و20 دقیقه در انکوباتور 37 درجه قرار دادیم تا ذوب شدند. برای اندازه‌گیری سلنیوم و روی پلاسمای منی از روش اسپکترفتومتر جذب اتمی استفاده گردید، در مورد سلنیوم، سیستم تولید هیدرید این روش به‌کار گرفته شد.

سپس نمونه‌های اسپرم به‌مدت 10 دقیقه در دور 3000 (دور در دقیقه) با سانتریفوژ یخچال‌دار (دمای 4 درجه سانتیگراد)، سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و به‌هرکدام از نمونه‌ها 500 میکرولیتر تریتونX-100 (0/1%) اضافه گردید. بعد از آن نمونه‌ها به‌مدت 30 دقیقه در دور 8000 در دمای 4 درجه سانتیگراد، مجدداً سانتریفوژ شدند. از مایع رویی، برای اندازه‌گیری پروتئین و فعالیت‌های آنزیمی اسپرم استفاده گردید (19).

برای اندازه‌گیری پروتئین اسپرم از روش «برادفورد میکرو» استفاده شد (21). این روش، تعیین غلظت بر اساس رنگ و متکی بر اتصال فرم آنیونی رنگ «کوماسی‌بلو» به واحدهای آرژینیل و لیزیل پروتئین‌ها است.

برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز اسپرم در این مطالعه از روش Aebi استفاده گردید (22). اساس این روش، کاهش جذب نوری آب اکسیژنه در طول موج 240 نانومتر است.

در اندازه‌گیری میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، با استفاده از گزانتین و آنزیم گزانتین اکسیداز، رادیکال‌های آزاد سوپراکسید تولید شد. این رادیکال‌های آزاد سپس با کروموژن I.N.T (2-(4- iodophenyl) -3-(4- Nitrophenol) -5- phenyltetrazolium chloride) واکنش داده، تا رنگ ایجاد شود. میزان فعالیت آنزیم از طریق مهار این واکنش و جلوگیری از تشکیل رنگ قابل‌اندازه‌گیری است (23). یک واحد سوپراکسید دیسموتاز مقداری از آنزیم است که در شرایط آزمایش، از 50 درصد میزان واکنش تولید رنگ جلوگیری نماید.

اندازه‌گیری آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بر اساس روش Paglia & Valentine انجام شد (24). این آنزیم با استفاده از «کیومن هیدروپراکسید»، اکسیداسیون گلوتاتیون را کاتالیز می‌کند. در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و NADPH، شکل اکسیده‌شده گلوتاتیون نیز

به فرم گلوتاتیون احیا تبدیل می‌شود. هم‌زمان با آن NADPH، اکسید شده و به NADP+ تبدیل می‌گردد. کاهش جذب NADPH در 340 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود که متناسب با غلظت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز است. متغیرهای حرکت، مورفولوژی و تعداد اسپرم به‌عنوان متغیر وابسته و متغیرهای گلوتاتیون پراکسیداز ، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، سلنیوم و روی به‌عنوان متغیرهای مستقل و سطح اطمینان 95 درصد، به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شدند (α=0/05).

برای مقایسه میانگین غلظت متغیرهای گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز، «روی» و سلنیوم بین گروه بارور و نابارور از آزمون Independent-samples t-test برای متغیرهای مستقل و برای مقایسه میانگین غلظت متغیرهای مذکور بین سه‌گروه نورمواسپرمیک، الیگوآستنوزوتراتو اسپرمیک و آستنوزوتراتواسپرمیک از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. برای مقایسه میانگین غلظت متغیر سوپراکسید دیسموتاز بین گروه بارور و نابارور از آزمون U-Mann-Whitney و بین سه گروه نورمواسپرمیک، الیگوآستنوزوتراتو اسپرمیک و آستنو تراتوزو اسپرمیک از آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد. برای بررسی ارتباط گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز، «روی» و سلنیوم با حرکت، شکل و تعداد اسپرم و همچنین برای بررسی ارتباط گلوتاتیون پراکسیداز با سلنیوم از ضریب همبستگی پیرسون و برای بررسی ارتباط سوپراکسید دیسموتاز با حرکت، شکل و تعداد اسپرم و «روی» از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده گردید.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اسپرموگرام بر اساس تعداد، مرفولوژی و حرکت اسپرم از هم تفکیک شدند (جدول 1).

فعالیت آنزیم‌ها در گروه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه گردید (نمودار 3-1). پس از تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد تفاوت آماری معناداری بین میانگین فعالیت آنزیم‌ها در گروه‌های مورد مطالعه وجود ندارد.

همچنین مقادیر عناصر روی و سلنیوم در گروه‌های مورد مطالعه با هم مقایسه گردید (نمودار 4 و 5). پس از تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد تفاوت آماری معناداری بین میانگین غلظت عناصر در گروه‌های مورد مطالعه وجود ندارد.

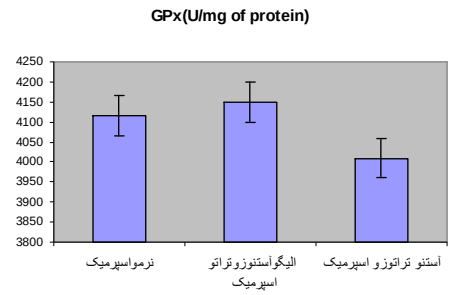
ارتباط آنزیم‌ها و عناصر با پارامترهای کیفی اسپرم بررسی شد. پس از تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد که ارتباطی بین میزان فعالیت آنزیم‌ها و عناصر با پارامترهای کیفی اسپرم وجود ندارد. تنها در گروه نابارور آستنوتراتواسپرمیک بین میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و حرکت اسپرم و همچنین غلظت سلنیوم و مرفولوژی اسپرم رابطه معکوس وجود داشت (P=0/033، r=-0/901 و P=0/038، r=-0/659).

جدول 1 - مشخصات کیفی و کمی مایع منی در گروه‌های مورد مطالعه

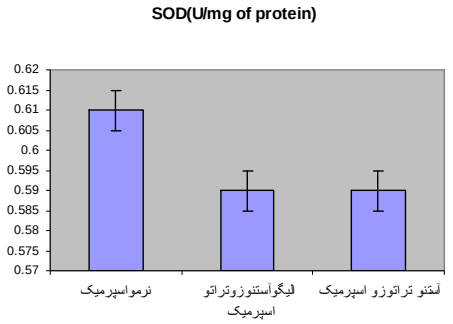
پارامترهای منی	گروه‌های مورد مطالعه		
	نابارور		بارور
	الیگوآستنوزوتراتو اسپرمیک(n= 20)	آستنوزوتراتواسپرمیک(n= 10)	نرمواسپرمیک(n= 30)
تعداد اسپرم*	12/29 ± 5/21	79/50± 52/45	113/63±72/39
درصد حرکت اسپرم**	12/06 ± 7/82	13/11±9/05	59/58±14/12
درصد اسپرم سالم***	16/15±6/15	17/55±8/54	41/70±11/70

* تعداد اسپرم بر حسب میلیون در هر میلی لیتر مایع منی ** درصد حرکت طبیعی اسپرم (A+B grade) بر اساس معیارهای WHO

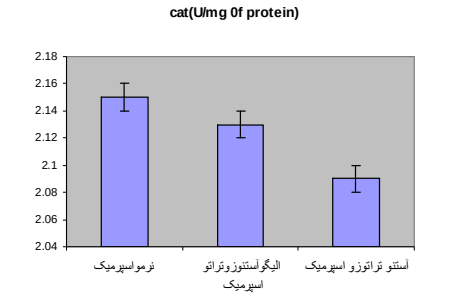
*** درصد اسپرم با مرفولوژی سالم



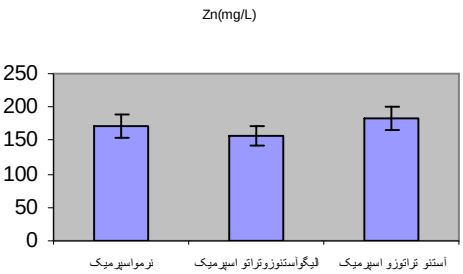
نمودار 1 - میزان فعالیت GPx در گروه‌های مورد مطالعه



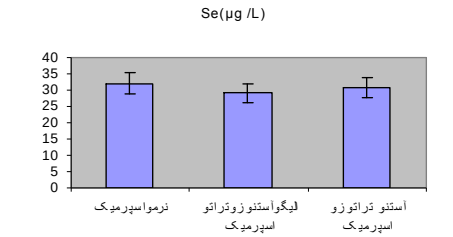
نمودار 2 - میزان فعالیت SOD در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار 3 - میزان فعالیت Cat در گروه‌های موردمطالعه



نمودار 4 - مقادیر عنصر روی در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار 5 - مقادیر عنصرسلنیوم در گروه‌های مورد مطالعه

همچنین مشخص شد که تنها در گروه آستنوتراتواسپرمیک بین فعالیت آنزیم کاتالاز با آنزیم سوپراکسید دیسموتاز رابطه مستقیم وجود دارد (P=0/024 و r=-0/89).

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که غلظت سلنیوم پلاسمای منی هیچ‌گونه رابطه‌ای با پارامترهای منی ندارد. در مطالعه Takasaki و همکاران (25) که بر روی 32 نفر بارور و 73 نفر نابارور صورت گرفت نتایجی مشابه تحقیق حاضر به‌دست آمد، با این تفاوت که رابطه‌ای منفی بین سلنیوم پلاسما و حرکت اسپرم وجود داشت. اما Roy و همکاران (26) با مطالعه 211 مرد نابارور بیان کردند که هیچ‌گونه ارتباطی بین مقدار Se پلاسمای منی با تعداد و حرکت اسپرم وجود ندارد.

با این وجود، Hurst و همکاران (27) بر خلاف تحقیق حاضر بیان کردند که مقادیر سلنیوم مایع منی افراد بارور بیشتر از افراد نابارور است. در مطالعه Noack-Fuller و همکاران (28) ارتباط مثبت قابل‌توجهی بین مقدار Se با تعداد و مرفولوژی اسپرم مشاهده گردید. Shinohara و همکاران (29) نیز با مطالعه 113 مرد نابارور، بیان کردند که غلظت Se مایع منی و پلاسمای آن، یک نشانگر خوب برای تعداد اسپرم می‌باشد. در مطالعه Akinloye و همکاران (30) که بر روی 60 مرد نابارور (40 نفر الیگواسپرمیک و20 نفر آزواسپرمیک) و 40 نفر بارور صورت گرفت نیز مشخص شد که Se پلاسمای منی با پارامترهای حرکت، مرفولوژی و تعداد اسپرم ارتباط دارد.

گزارش شده که سلنیوم از طریق کاهش MDA (Malodialdhyde) (محصول نهایی لیپیدپراکسیداسیون) موجب ارتقای پارامترهای کیفی اسپرم می‌گردد (31 و 32). این امر می‌تواند نتایج مطالعات مبنی بر وجود ارتباط بین Se پلاسمای منی و پارامترهای کیفی اسپرم را توجیه نماید. البته گفته می‌شود این عنصر ممکن است از طریق نقش آنتی‌اکسیدانی خود، از DNA اسپرم

در برابر آسیب اکسیداتیو حفاظت کرده و بدین‌وسیله موجب بهبود حرکت اسپرم و بقای آن شود **(33)**.

با این‌حال ممکن است پروتئین‌های حاویSe موجود در سطح بیرونی اسپرم، طی سانتریفوژ کردن نمونه‌های منی از اسپرم جدا شده و به‌طورکاذب باعث افزایش میزان Se پلاسمای منی شوند. این امر می‌تواند منجر به ایجاد ارتباط مثبت کاذب بین تعداد اسپرم و میزان Se پلاسمای منی گردد **(31)**.

مطالعه حال حاضر نشان داد که غلظت روی در پلاسمای منی هیچ‌گونه رابطه‌ای با پارامترهای منی ندارد. در برخی مطالعات دیگر نیز نتایجی مشابه مطالعه ما گزارش شده است **(28**، **34** و **35)**.

اما بر خلاف مطالعه حاضر، Netter و همکاران**(36)** بیان کردند که بین Zn پلاسمای منی و تعداد اسپرم، ارتباط قابل‌توجهی وجود دارد. Stankovic و همکاران **(37)** نیز بیان کردند که مقدارغلظت Zn مایع منی با حرکت اسپرم ارتباط دارد. درحالی‌که یافته‌های مطالعات دیگری نشان می‌دهد که Zn پلاسمای منی ارتباط منفی با حرکت اسپرم در نمونه‌های الیگواسپرمیک دارد **(38)**.

مطالعه‌ای توسط Hassan Ali و همکارانش **(12)**، بر روی **58** مرد نابارور **(30** نفر الیگواسپرمیک و **28** نفر آزواسپرمیک**)** و **25** نفر مرد بارور **(**نرمواسپرمیک**)** نشان داد که Zn پلاسمای مایع منی، ارتباط مثبتی با تعداد اسپرم و ارتباط منفی با حرکت اسپرم در افراد نرمواسپرمیک و الیگواسپرمیک دارد، اما هیچ رابطه‌ای با مرفولوژی اسپرم ندارد.

مشخص شده که پلاسمای منی به‌علت مقادیر بالای Zn، نقش شبه‌آنتی‌اکسیدانی در مواجه با مقادیر زیاد آنیون‌های سوپراکسید تولید شده توسط اسپرم‌های غیرطبیعی و گلبول‌های سفید دارد **(39** و **40)**. با این وجود نشان داده شده که غلظت بالای Zn موجب کاهش جذب اکسیژن توسط اسپرم شده و تأثیر منفی در حرکت و مرفولوژی اسپرم دارد **(41)**.

ROS تولیدشده توسط اسپرم‌های غیرطبیعی مردان نابارور، می‌تواند به Zn موجود در پلاسمای منی متصل شده و موجب کاهش کاذب مقادیر Zn در پلاسمای منی شود. این امر نشان می‌دهد که اندازه‌گیری Zn پلاسمای منی، تنها به‌منظور بررسی رابطه بین Zn و پارامترهای منی مناسب نیست **(42** و **43)**.

به‌طورکلی میزان Zn و Se موجود در پلاسمای منی تا حدود زیادی به ترشحات پروستاتیک وابسته است. ازطرفی دیگر میزان این ترشحات، تحت تأثیر عوامل مختلفی تغییر می‌کند، لذا به‌نظر می‌رسد که اندازه‌گیری Zn و Se پلاسمای منی، ابزار مناسبی برای بررسی رابطه بین این عناصر با پارامترهای کیفی اسپرم و باروری مردان نباشد **(44)**. علاوه بر آن یک سری از عوامل مانند فروکتوز و کلسیم نیز در پلاسمای منی وجود دارند که حرکت اسپرم را تعدیل می‌کنند **(45)**. بنابراین نمی‌توان تغییرات پارامترهای منی، به‌ویژه حرکت اسپرم را تنها به میزان Zn و Se پلاسمای منی نسبت داد.

در واقع تصور می‌شود Se و Zn بافت بیضه از طریق تأثیر مستقیم بر ساخت اسپرم در سلول‌های لایدیگ **(36)** و یا بواسطه وجود Se در ساختمان PHGPx (Phospholipids Hydroperoxide Glutathione Peroxidase, 4 type of GPX) اسپرم **(46)** و حضور Zn در بخش‌های مختلف آن **(17)**، بر پارامترهای کیفی منی و در نهایت باروری مردان تأثیر داشته باشند. به‌نظر نمی‌رسد میزان غلظت این عناصر در پلاسمای منی بتواند تأثیر محسوسی در این زمینه داشته باشد.

Kobayashi و همکاران **(47)** با اضافه کردن **400**U/ml از SOD اگزوژن به سوسپانسیون اسپرم، نشان دادند که SOD با ممانعت از پراکسیداسیون لیپید غشایی اسپرم، موجب کاهش تولید MDA و در نهایت، افزایش تحرک اسپرم می‌شود. اما نتایج مطالعه ما نشان داد که بین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز اسپرم در افراد بارور و نابارور تفاوتی وجود ندارد. در مطالعه Hsieh و همکاران **(48)** نیز مشخص شد که تفاوتی در فعالیت SOD اسپرم و پلاسمای منی در گروه‌های مورد بررسی وجود ندارد و هیچ‌گونه ارتباطی بین حرکت و تعداد اسپرم با میزان فعالیت این آنزیم نیز مشاهده نشد.

با این حال در برخی مطالعات بر خلاف مطالعه ما، مشخص شد که میزان فعالیت SOD اسپرم در گروه‌های مورد بررسی متفاوت بوده و این میزان در افراد نابارور نسبت به افراد بارور بالاتر است (49 و 50). البته در این مطالعات افزایش فعالیت SOD، همراه با افزایش میزان تولید ROS در نمونه‌های نابارور بوده، که این امر نشان‌دهنده عدم بلوغ کامل اسپرم است. Gavella و همکاران (51) نیز نشان دادند که میزان فعالیت SOD در افراد الیگواسپرمیک بیشتر از افراد نرمواسپرمیک است. در این مطالعه علاوه بر SOD اسپرم، فعالیت آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز (Lactate Dehydrogenase) (ایزوآنزیم C4) و NADH اکسیداز نیز اندازه‌گیری شد. این دو آنزیم از شاخص‌های وجود سیتوپلاسم اضافی در اسپرم هستند. ارتباط نزدیکی بین میزان فعالیت SOD و فعالیت این شاخص‌ها وجود داشت. این امر نشان می‌دهد که فعالیت بالاتر SOD در افراد الیگواسپرمیک ممکن است بازتابی از نقص در رشد و یا بلوغ اسپرم باشد. لذا به‌نظر می‌رسد اندازه‌گیری میزان فعالیت SOD اسپرم می‌تواند اطلاعاتی در خصوص وضعیت بلوغ اسپرم بدهد تا این‌که در تعیین قدرت باروری اسپرم کاربرد داشته باشد.

به‌هرحال در برخی مطالعات دیگر، میزان فعالیت SOD در افراد بارور نسبت به افراد نابارور بالاتر بوده است (52 و 53). Murawski و همکاران (54) نشان دادند که فعالیت SOD مایع‌منی در نمونه‌های الیگواستنواسپرمیک، به‌طور قابل‌توجهی پایین‌تر از نمونه‌های نرمواسپرمیک است و رابطه‌ای مثبت بین فعالیت SOD با تعداد و حرکت اسپرم وجود دارد. در واقع فعالیت پایین SOD در نمونه‌های نابارور از یک‌طرف و تأثیر مثبت میزان فعالیت SOD بر پارامترهای کیفی مایع منی از طرف دیگر این نتیجه را بیان می‌کند که کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع منی، به‌ویژه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی SOD، می‌تواند مسئول ناباروری مردان باشد. با این حال، Gallardo و همکاران (55) بیان کردند که اندازه‌گیری فعالیت SOD اسپرم، می‌تواند در مواردی برای ارزیابی باروری به‌کار رود که نتیجه اسپرموگرام طبیعی به نظر برسد.

نتایج مطالعه ما نشان داد که بین فعالیت کاتالاز اسپرم در افراد بارور و نابارور، تفاوتی وجود ندارد. Dandekar و همکاران (19) با مطالعه 83 نفر (15 نفر نرمواسپرمیک، 15 نفر آستنوزواسپرمیک، 43 نفر الیگواسپرمیک و 10 نفر آزواسپرمیک) مشابه نتایج ما بیان کردند که اختلافی در فعالیت کاتالاز اسپرم در بین نمونه‌ها وجود ندارد.

با این حال Sanocka و همکاران (56) با مقایسه فعالیت کاتالاز در مردان استنوزواسپرمیک، تراتوزواسپرمیک و اولیگواسپرمیک با افراد نرمواسپرمیک بیان کردند که کاهش در میزان فعالیت کاتالاز در نمونه‌های‌نابارور دیده‌می‌شود. درمطالعه خسروبیگی و همکاران (57) نیز مشخص‌شد که فعالیت کاتالاز در افراد نرمواسپرم بیشتر از افراد الیگوآستنوزوتراتو اسپرمیک، آستنواسپرمیک و آستنوزوتراتواسپرمیک است و میزان کاتالاز پلاسمای منی، رابطه مثبتی با حرکت و مورفولوژی اسپرم دارد. در واقع فعالیت پایین کاتالاز در نمونه‌های نابارور در دو مطالعه مذکور و تأثیر مثبت میزان فعالیت کاتالاز بر پارامترهای کیفی مایع منی این نتیجه را بیان می‌کند که ممکن است میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاتالاز مایع منی، مسئول ناباروری مردان باشد.

از طرفی دیگر Zini و همکاران (58) نشان دادند فعالیت کاتالاز در نمونه‌های ناباروری که ROS تولید می‌کنند در مقایسه با نمونه‌هایی که ROS تولید نمی‌کنند، بیشتر است. این نتیجه نشان می‌دهد که میزان فعالیت این آنزیم نمی‌تواند مسئول باروری باشد، بلکه این آنزیم می‌تواند در برابر اثرات مخرب افزایش ROSها از اسپرم محافظت کند.

Hall و همکاران بیان کردند که عدم وجود GPX، ممکن است منجر به کاهش ظرفیت و توان باروری گردد (59). مطالعات نیز نشان داده‌اند که مهار فعالیت GPX منجر به تولید پراکسید در غشا و کروماتین شده،

در نتیجه شکاف در DNA اسپرم ایجاد می‌شود (60). با این‌حال، Hsieh و همکاران (61) با مطالعه 51 نفر (20 نفر نرمواسپرمیک، 31 نفر الیگوآستنواسپرمیک) مشابه نتایج مطالعه ما، نشان دادند که فعالیت GPx مایع منی، ارتباط قابل‌توجهی با پارامترهای مایع منی نداشته و تفاوتی در میزان فعالیت GPX بین دو گروه مورد بررسی نیز وجود ندارد. Tamer و همکاران (62) نیز نشان دادند که اختلافی بین فعالیت GPX در نمونه‌های نرمواسپرم با نمونه‌های آستنواسپرم وجود ندارد. اما Alkan و همکاران (63) نشان دادند که فعالیت GPX افراد نابارور کم‌تر از افراد بارور است. Giannattasio و همکاران (64) نیز ثابت کردند که فعالیت این آنزیم در افراد سالم 10 برابر افراد نابارور است. Dandekar و همکاران (19) بیان کردند که فعالیت GPx رابطه مثبتی با نمونه‌های استنوزو اسپرمیک دارد و میزان پراکسیداسیون لیپید در این نمونه‌ها بالاست. این نتیجه بیانگر آن است که فعالیت بالای آنزیم GPX در نمونه‌های پاتولوژیک ممکن است ROSها را کاتالیز کرده و بدین‌وسیله منجر به افزایش حرکت اسپرم شده و در قدرت باروری آن نقش داشته باشد.

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های مطالعه ما، احتمالاً Zn وSe موجود در پلاسمای منی نمی‌تواند تأثیر مستقیمی در پارامترهای کیفی اسپرم داشته باشد و اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، SOD و GPX اسپرم، به‌تنهایی نمی‌تواند در تعیین میزان قدرت باروری اسپرم مناسب باشد. به‌نظر می‌رسد که عناصر روی و سلنیوم از طریق تأثیر بر ساخت اسپرم در بیضه‌ها و به‌واسطه شرکت در بخش‌های مختلف اسپرم در باروری مردان نقش داشته باشند. البته پیشنهاد می‌شود به‌منظور بررسی دقیق‌تر ارتباط این عناصر با پارامترهای اسپرم، اندازه‌گیری آن‌ها با توجه به منبع مربوطه (پروستات، اپی‌دیدیم و وزیکول سمینال) و با تعداد نمونه‌های بیشتری صورت پذیرد. برهمکنش‌های پیچیده‌ای بین ROS و آنتی‌اکسیدان‌های مختلف موجود در مایع منی، اعم از آنزیمی و غیرآنزیمی وجود دارد که شناخت نقش و تأثیر دقیق این آنزیم‌ها را در عملکرد اسپرم با مشکل مواجه می‌سازد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی، برای بررسی دقیق‌تر تأثیر این آنزیم‌ها بر عملکرد اسپرم و باروری، علاوه بر استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر، میزان ROS و MDA مایع منی و همچنین میزان لیپید پراکسیداسیون غشای اسپرم نیز همزمان با اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم‌ها صورت پذیرد.

References

1. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum Reprod 2001; 16(9): 1922-30.
2. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. Fertil Steril 1997; 67(6): 1115-20.
3. Sugioka K, Nakano M, Totsune-Nakano H, Minakami H, Tero-Kubota S, Ikegami Y. Mechanism of O2- generation in reduction and oxidation cycle of ubiquinones in a model of mitochondrial electron transport systems. Biochim Biophys Acta 1988; 936(3): 377-85.
4. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. Front Biosci 1996; 1: e78-86.
5. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. Curr Opin Obstet Gynecol 2006; 18(3): 325–32.
6. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. J Androl 1987; 8(5): 338-48.
7. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem 1973; 248(13): 4793-6.
8. Bonnes-Taourel D, Guerin MC, Torreilles J. Is malodialdhyde a valuable indicator of lipid peroxidation? Biochem pharmacol 1992; 44(5): 985-8.

9. Mennella MR, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation reactions in semen. Biochem J 1980; 191(2): 289–97.
10. Sies H. Oxidative stress: oxidants and anti-oxidants. Exp Physiol 1997; 82(2): 291-5.
11. Hall L, Williams K, Perry AC, Frayne J, Jury JA. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. Biochem J 1998; 333(1): 5-9.
12. Ali H, Ahmed M, Baig M, Ali M .Realationship of zinc concentrations in blood and seminal plasma with various semen parameters in infertile subjects. Pak J Med Sci 2007; 23(1): 111-4.
13. Wu AS, Oldfield JE, Shull LR, Cheeke PR. Specific effect of selenium deficiency on rat sperm. Biol Reprod 1979; 20(4): 793-8.
14. Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. J Reprod Fertil 1996; 106(2): 291-7.
15. Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. Mol Aspects Med 1997; 18(2): 213-9.
16. Chvapil M. New aspects in biological role of zinc; a stabilizer of macromolecules and biological membrane. Life Sci 16; 13(8): 1041-9.
17. S?rensen MB, Bergdahl IA, Hj?llund NHI, Bonde JPE , Stoltenberg M, Ernst E. Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. Mol Hum Reprod 1999; 5(4): 331–7.
18. Plante M, Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. Fertil Steril 1994; 62(2): 387–93.
19. Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Punekar S. Lipid peroxidation and antioxidants enzymes in male infertility. J Postgrad Med 2002; 48(3): 186-9.
20. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and spermcervical mucus interaction, 4thed. New York: Cambridge University Press 1999; 218-20.
21. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 7(72): 248-54.
22. Aebi H. Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer: Chemie Weinheim 1974; 11: 673-84.
23. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyragallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 1974; 47(3): 469-74.
24. Pagila DE, Valentine WN. Methods of glutathione peroxidase activity assay. J Lab Clin Med 1967; 70(3): 158-9.
25. Takasaki N, Tonami H, Simizu A, Ueno N, Ogita T, Okada S, et al. Serum selenium in male fertility. J Bul Osaka Med Sch 1987; 33(3): 87-96.
26. Roy AC, Karunanithy R, Ratnam SS. Lack of correlation of selenium level in human semen with sperm count/motility. Arch Androl 1990; 25(1): 59-62.
27. Hurst R, Bao YP, Ridley S. Phospholipid hydroperoxide cysteine peroxidase activity in human serum. Biochem J 1999; 33(3): 715-23.
28. Noack-Fuller G, Beer C, Seiber H. Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally unexposed men. Andrologia 1993; 25(1): 7-12.
29. Shinohara A, Chiba M, Takeuchi H, Kinoshita K, Inaba Y. Trace elements and semen parameters in semen of male partner of infertile couples. Nippon Eiseigaku Zashi 2005; 60(4): 418-25.
30. Akinloye O, Arowololu AO, Shittu OB, Adejuwon CA, Osotimehin B. Selenium status of idiopathic infertile Nigerian males. Biol Trace Ele Res 2005; 104(1): 9-18.
31. Oldereid NB, Thomassen Y, Purvis K. Selenium in human male reproductive organs. J Hum Reprod 1998; 13(8): 2172–6.
32. Huang YL, Tseng WC, Cheng SY, Lin TH. Trace elements and lipid peroxidation in human seminal plasma. J Trace Elelement Research 2000; 76(3): 207-15.
33. Lerda D. Study of sperm characteristics in persons occupationally exposed to lead. Am Ind Med J 1992; 22(4): 567-71.
34. Lin YC, Chang TC, Tseng YJ, Lin YL, Huang FJ, Kung FT, et al. Seminal plasma zinc levels and sperm motion characteristics in infertile samples. Chang Gung Med J 2000; 23(5): 260-6.
35. Saaranen M, Suistoaa U, Kantola M, Saarikoski S, Vanha- Tertula T. Lead, magnesium, selenium and zinc in human seminal fluid: Comparision with semen parameters and fertility. Hum Reprod 1987; 2(6): 475-9.
36. Netter A, Hartoma R, Nahail K. Effects of zinc administration on plasma testosterone and dihydro testosterone and sperm count. J Arch Androl 1981; 7(1): 69-73.
37. Stankovic H, Mikac-Devic D. Zinc and copper in human semen. Clin chem Acta 1976; 70(1): 123-26.
38. Riffo M, Leiva S, Astudillo J. Effect of zinc on human sperm motility and acrosome reaction. J Int Androl 1992; 15(3): 229-37.

39. Henkel R, Bittner J, Weber R, Huther F, Miska W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. J Fertil Steril 1999; 71(6): 1138-43.
40. Gavella M, Lipovac V. In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. J Andrologia 1998; 30(6): 317–23.
41. Kvist U, Kjellberg S, Bjorndahl L.The role of zinc in sperm chromatin stability in fertile men. Scand J Urol Nephrol 1988; 22(1): 1–6.
42. Liu DY, Baker HWG.Tests of human sperm function and fertilization in vitro. Fertil Steril 1992; 58(3): 465-83.
43. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM , Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. J Androl 2000; 21(1): 53–7.
44. Behne D, Gessner H, Wolters G, Brotherton J. Selenium, rubidium and zinc in human semen and semen fractions. Int J Androl 1988; 11(5): 415-23.
45. Kilic S, Sarica K, Yaman O, Soygur T, Gogus O, Yaman LS. Effect of total and ionized calcium levels of seminal fluid on sperm motility. Urol Int 1996; 56(4): 215–8.
46. Foresta C, Flohe L, Garolla A, Roveri A , Ursini F, Maiorino M . Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Biol Reprod 2002; 67(3): 967 -71.
47. 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(7): 987–91.
48. Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, Lee YS, Tsai HD, Lin CS. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. J Clin Lab Anal 2002; 16(3): 127-31.
49. Zalta A, Hafez T, Comhaire F. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. Hum Reprod 1995; 10(6): 1444-51.
50. Sinha S, Pradeep KG, Layoraya M, Warikoo D. Over expression of super oxide dismutase and lack of surfacthiols in spermatozoa: inherent defects in oligospermia. Biochem Biophys Res Commun 1991(1); 174: 510-17.
51. Gavella M, Lipovac V, Vucic M, Rocic B. Relationship of sperm superoxide dismutase-like activity with other sperm-specific enzymes and experimentally induced lipid peroxidation in infertile men. Andrologia 1996; 28(4): 223-9.
52. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefsno C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia . J Androl 2001; 22(5): 798-803.
53. Storey BT. Biochemistry of induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. Mul Hum Reprod 1997; 3(3): 203-13.
54. Murawski M, Saczko J, Marcinkowska A, Chwilkowska A, Grybos M, Banas T. Evaluation of super oxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. Folia Histochemica Et Cytobiologica 2007; 45(7): 123-6.
55. Gallardo JM. Evaluation of antioxidant system in normal semen. J Rev Invest Clin 2007; 59(1): 42-7.
56. Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Chelmonka- Soyta AC, Kurpisz M. Effect of reactive oxygen species and activity of antioxidant system on human semen: association with male infertility. Int J Androl 1997; 20(5): 255-64.
57. Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. BMC Clin Pathol 2007; 20(7): 6-9.
58. Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. J Urology 2000; 55(6): 922-6.
59. Hall L, Williams K, Perry AC, Frayne J, Jury JA. The majority of human glutathione peroxidase type 5 (GPX5) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of GPX5 in the male reproductive tract. Biochem J 1998; 1(33): 5-9.
60. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis o 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. J Hum Reprod 1998; 13(6): 1429-36.
61. Hsieh YY, Chi-Chen C, Chich-Sheng L. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. Int J Biol Sci 2006; 2(1): 23-9.
62. Tramer F, Caponecchia L, Sgr? P, Martinelli M, Sandri G, Panfili E, et al. Native specific activity of glutathione peroxidase (GPx-1), phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) and glutathione reductase (GR) does not differ between normo- and hypomotile human sperm samples.Int J Androl 2004; 27(2): 88-93.

63. Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S, et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. J Urol 1997; 157(1): 140-3.
64. Giannattasio A, De Rosa M, Smeraglia R, Zarrilli S, Cimmino A, Di Rosario B, et al. Glutathione peroxidase (GPX) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. J Endocrinol Invest 2002; 25(11): 983-6.