دور بعض مضادات الأكسدة في ضعف الخصوبة الأولي عند النساء في محافظة السليمانية

أ.م. د صباح حسين خورشيد
الباحثة. عفاف فاروق مولود البياتي
جامعة تكريت – كلية التربية – قسم الكيمياء
*Chemistryafaf @ Gmail.com **Dr .Sabah.khorsheed @ yahoo .com ,

الخلاصة

تم في هذه الدارسة تحديد عدد من العوامل المسببة لضعف الخصوبة. أجريت الدراسة في محافظة السليمانية خلال الفترة من شهر تشرين الثاني 2013 ولغاية شهر اذار للعام 2014، وتضمنت (60) حالة مرضية مصابة بضعف الخصوبة وبأسباب مختلفة و(20) حالة طبيعية كمجموعة ضابطة. أجريت الفحوصات الكيموحيوية على مجموعة ضعيفات الخصوبة حيث اظهرت النتائج وانخفاضا معنويا في تركيز الكتاليز والالبومين عند مستوى ($P \leq 0.05$). أما بالنسبة لتأثير المالوندايالديهايد MDA في ضعف الخصوبة فقد أظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي عال ($p<0.01$) لدى النساء ضعيفات الخصوبة مقارنة بنساء مجموعة السيطرة .في حين لم نلاحظ أي فروق معنوية في مستوى فيتامين E والبروتين الكلى لمجموعة المرضى ضعيفات الخصوبة مقارنة بالسيطرة.

كلمات مفتاحية: ضعف الخصوبة، مضادات الأكسدة، الألبومين، الكتاليز

Role of Some Antioxidants and Hormones in primary Infertility of womenIn Sulaymaniyah governorate

**** Assist. Prof . Dr. Sabah Hussain Khorsheed**
***Afaf F-Mwloud Al-bayaty**
Chemistry Department / College of Education / Tikrit University

Received 15 September 2014 ; Accepted 2 November 2015

Abstract

In this study is to determine the causative factors of the infertility in a number of women. The study has been conducted in Sulaymaniyah governorate during the period from November (2013) until March (2014). Infertile patients (60) with different etiologies and (20) normal fertile as a control group are included in the research . The following biochemical markers are estimated on infertile group there was no significant changes in physical characteristics while the results revealed decrease significant levels ($P \leq 0.05$) in the effect of catalase enzyme and albumin level in infertile women compared with control group. The effect of Malondialdehyde level in infertility , the results revealed high significant levels ($P<0.01$) in the effect of Malondialdehyde level in infertile women compared with control group. While there was no significant changes in vitamin E , total protein Level infertile women compared with control group.

Key word: Infertility , Antioxidants , Albumin ,Catalase

المقدمة

يعرف ضعف الخصوبة على أنه عدم القدرة على تحقيق الحمل بعد مرور سنه واحدة من العلاقة الجنسية المستمرة دون اللجوء الى اية موانع للحمل [1] ، يعتبر ضعف الخصوبة مسؤولية مشتركة بين الزوجين حيث يكون الرجل مسؤولا عن (30%) من حالات ضعف الخصوبة وتكون المرأة مسؤولة عن (35%) من حالات ضعف الخصوبة ويكون كلا الزوجين مسؤولين عن (20%) من اسباب ضعف الخصوبة والتي تسمى أسباب مشتركة (Combined Factor) ويبقى (15%) من أسباب ضعف الخصوبة غير مفسرة (Unexplained Factor)[2، 3] هناك عدة عوامل تكون مسؤولة عن انخفاض مستويات الحمل منها رداءة نوعية البيوض وانسداد قنوات فالوب التي تمنع اتحاد البويضة (egg) مع الحيوانات المنوية (sperm) او مشاكل تتعلق بالرحم أو قد تكون الاباضة عند المرأة غير منتظمة فيؤدي الى عدم انتظام الدورة الشهرية Menstrual cycle [4]. وكذلك عوامل كيميائية وفيزيائية والعديد من الاغذية والاجهاد النفسي والعصبي وعدد من الأمراض تسبب زيادة في اصناف الاوكسجين والنتروجين الفعالة وفي نفس الوقت تسبب أستنزافا في الأنظمة الدفاعية المضادة للأكسدة مؤدية الى التحطيم التأكسدي للمكونات الكيميائية وأن الأذى الذي تسببه مركبات الاكسدة لها دور أساسي في الكثير من الحالات المرضية لذلك اوجدت اجسام الكائنات الحية اليات دفاعية ضد مركبات الأكسدة المختلفة التي تسمى مضادات الأكسدة[5]. مضادات الأكسدة هي مركبات عضوية خاصة تثبط تأثير الاكسدة لانها تعمل على إزالة اصناف الاوكسجين الفعالة ROS والنيتروجين مثل nitric oxide. المواد المضادة للأكسدة تتفاعل مع الجذور الحرة قبل أن تكون قادرة على التفاعل مع جزيئات أخرى، وبالتالي توفير الحماية من تفاعل الأكسدة[6].

المواد وطرائق العمل

مدة البحث وموقعه

اجريت هذه الدراسة في مختبرات مستشفى شيري نقيب للنسائية في محافظة السليمانية وجمعت نماذج الدم من المرضى المصابات بضعف الخصوبة الأولي خلال الفترة من شهر تشرين الثاني 2013 ولغاية شهر أذار للعام 2014 ، شملت الدراسة (60) مريضة من النساء اللواتي يعانين من ضعف الخصوبة تراوحت أعمارهن بين (18-45) سنة بعد أن شُخصت حالتهم من قبل الملاك الطبي المتخصص.

طرائق العمل

تقدير تركيز الألبومين في مصل الدم

Determination of albumin in blood serum

تم تقدير تركيز الألبومين بأستخدام طريقة بروموكريسول الأخضر التي أستخدمت فيها عدة التحاليل الجاهزة من شركة (BIOLABO) الفرنسية حيث تم تحضير عدد من أنابيب الاختبار، أضيف 1 مل من كاشف بروموكريسول الأخضر لكل أنبوبة.وأضيف 10µl من نماذج مصل الدم لكل انبوب مزجت جميع الأنابيب وحضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق وحسب تركيز الألبومين أعتمادا على المعادلة الاتية :

$$\text{Albumin conc.} = \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Standard absorbance}} \times \text{(calibratot value. 5 gm /dL)}$$

تقدير تركيز انزيم الكتاليز في مصل الدم

Determination of Catalase in blood serum

المبدأ الأساس Basic principle

تم تقديره بأستخدام طريقة L- Goth يعتمد طريقة القياس على قابلية تفكك H_2O_2 وتكوين الماء H_2O والأوكسجين O_2 ، والتي تعتمد على الانخفاض في امتصاصية H_2O_2 عند طول موجي 240 نانوميتر ، يمثل الاختلاف في الامتصاصية قيمة فعالية الأنزيم [7].

طريقة العمل

تم تحضير المحول الأساس بأذابة 65µmol من H_2O_2 في 60mmol محلول دارئ الفوسفات pH (7.4).وبعدها تم أضافة 0.2mL من مصل الدم الى 1mL من محول الأساس .ثم حضن النموذج عند درجة حرارة 37°

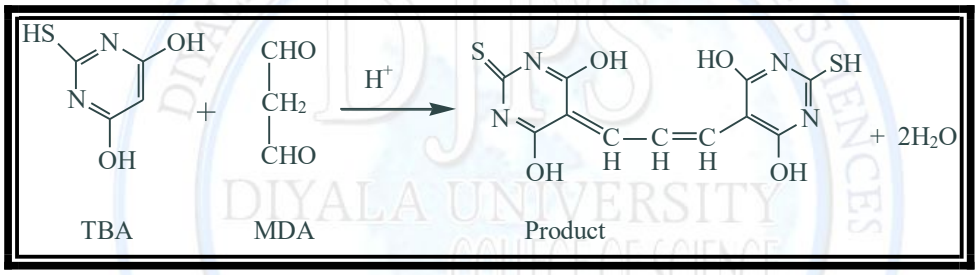
لمدة 120 ثانية .وتم قراءة الأنخفاض في الأمتصاصية عند طول موجي 240nm.تم احتساب فعالية الأنزيم بوحدة (وحدةعالمية/ لتر).

تقدير مستوى (المالون داي الديهايد) في مصل الدم

Estimation of Malodialdehyde(MDA) in blood serum

المبدأ الأساس Basic principle

تم تقدير تركيز المالون داي الديهايد في مصل الدم عن طريق تفاعل حامض ثايوباربيوتريك thiobarbituric (acid (TBA)) مع بيروكسدة الدهن وبشكل رئيسي المالون داي الديهايد (MDA) وفقا للطريقة التي حضرت من قبل (Rao et al) . وهذا التفاعل يتم في وسط حامضي ويكون ناتجا ملونا وتم قياس شدة الأمتصاصية له عند الطول الموجي 532 نانوميترا[8].



طريقة العمل Procedure

- تم تحضير كاشف TBA عن طريق إذابة (0.67gm) من حامض TBA في (100mL) من DW الماء المقطر مع (20gm) من حامض الخليك ثلاثي الكلور TCA و (2mL) من حامض الخليك البارد (glacial acetic acid)
- اضيف 0.1 mL من البلازما في 0.9mL من الماء المقطر distilled water بداخل أنبوب زجاجي glass tube.
- اضيف 0.5 mL من كاشف حامض ثايوباربيوتريك thiobarbituric acid (TBA)
- ثم ترك الخليط لمدة ساعة واحدة في حام ماء مغلي .boiling water bath. بعد التبريد أجريت عملية الطرد المركزي لكل أنبوب لمدة 10 دقيقة بسرعة 4000 rpm.
- تم قراءة شدة امتصاصية الناتج الوردي اللون عند 532nm.
- تم تحديد مستوى MDA اعتمادا على المعادلة الأتية :

$$(\text{MDA}) \text{ concentration} = \frac{\text{Ab} \times 10^6 \times 10^3 \times \text{Vs}}{(1.56 \times 10^5) \times \text{Vt}}$$

Ab : امتصاصية النموذج absorbance of the sample

Vs: حجم النموذج Sample volume (0.1mL)

Vt: الحجم الكلى total volume (1.0mL)

$1.56X10^5$: معامل الامتصاص المولاري (molar absorption coefficient)

لمعقد (MDA-TBA) .

تقدير فيتامين E في مصل الدم

Estimation of vitamin E in blood serum

المبدأ الأساس Basic principle

تم تقدير قياس فيتامين E في مصل النماذج بأستخدام العدة المعتمدة على طريقة الاليزا أذ تم أضافة النماذج والمحاليل القياسية الى الحاويات ثم أضافة مضادات فيتامين E الحاوية على أنزيم horseradish peroxidase (HPR) ، يحضن المزيج ثم يغسل لأزالة الأنزيم غير المقترن بعد أضافة محلول التلوين لتغيير اللون الى اللون الأزرق وبعد أضافة محلول الأيقاف يتحول الى اللون الأصفر تتناسب كثافة اللون مع تركيز فيتامين E.

طريقة العمل Procedure

- تم أضافة50mL من المحلول القياسي الى الحاويات standard wells.
- تم أضافة 40mL من المحلول المخفف standard diluent و10µL من العينة الى الحاويات.
- تم أضافة 50µL من محلول أيقاف التفاعل Stop solution الى كل حاوية لأيقاف التفاعل وتحول اللون الأزرق مباشرة الى الاصفر.
- تم قياس شدة الامتصاصية له عند الطول الموجي 450nm.
- تم استخلاص النتائج من خلال قراءة الامتصاصية Absorbance بوساطة جهاز ELISA وعلى الطول الموجي (450) نانومتر ومن ثم تم رسم منحنى بين تركيز المادة Concentration القياسية Standard والأمتصاصية وبعدها تم تسقيط قراءات العينات قيد الدراسة على المنحنى لاستخراج تركيزها.

تقدير مستوى البروتين الكلي في مصل الدم

Estimation of total protein in blood serum

تم قياس تركيز البروتين الكلي في مصل الدم وفقا لطريقة البايوريت (Biuret) حيث تتفاعل الأصرة الببتيدية للبروتين مع ايونات النحاس في المحلول القاعدي لتكون معقدا لوني (بنفسجي – مزرق) كما في الشكل (2-3) يمتص وبعدها تقاس الأمتصاصية بواسطة المطياف عند الطول الموجي 450 نانو ميترا [9] .

$$\text{Protein} + Cu^{+2} + OH^{-} \longrightarrow \text{blue - violet complex}$$

طريقة العمل Procedure

- ❖ تم تحضير عدد من أنابيب الاختبار، اضيفت 1 مل من كاشف البايوريت لكل واحد.
- ❖ تم أضافة 10µl من نماذج مصل الدم serum samples لكل أنبوب
- ❖ مزجت جميع الأنابيب وحضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق
- ❖ تم حساب تركيز البروتين الكلي أعتمادا على المعادلة الاتية

$$\text{protein conc.} = \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Standard absorbance}} \times (\text{calibratot value. 6 gm /dL})$$

النتائج والمناقشة

تأثير تركيز الألبومين والبروتين الكلي في ضعف الخصوبة

أظهرت الدراسة الحالية وكما هو مبين في الجدول رقم (1) الذي يبين المقارنة بين مجموعة النساء ضعيفات الخصوبة ومجموعة النساء السليمات وجود انخفاض معنوي(0.013) في تركيز الالبومين وكانت النتائج بالنسبة لمجموعة النساء ضعيفات الخصوبة (2.8857±0.6520 gm./dL) وبالنسبة لمجموعة النساء السليمات (4.3184±0.6119 gm/dL). في حين لم يظهر البروتين الكلي فروقا معنوية أذ كانت النتائج للنساء المصابات (8.105±2.023 gm/dL) والنساء السليمات (8.001±1.540 gm/dL).

الجدول (1): تأثير مضادات الأكسدة وناتج أكسدة الدهون (MDA) لدى مجموعة النساء المصابات بضعف الخصوبة مقارنة بالنساء السليمات

المتغيرات	المعدل ± الانحراف المعياري	
	مجموعة المصابات بضعف الخصوبة N=60	مجموعة السيطرة N=20
البروتين الكلي gm/dL	8.105±2.023 Range 5.31-14.27	8.001±1.540 Range 5.36-10.22
الالبومين gm/dL	2.8857±0.6520 Range 2.51-5.2	4.3184±0.6119 Range 3.41-5.69
فيتامين E ng/mL	0.4593±0.3757 Range 0.24-2.74	0.5538±0.5554 Range 0.225- 2.524
مالون داي الديهايد nmol/mL	115.87±39.90 Range 64.53-210.08	88.75±18.30 Range 64.96-180.34
الكتاليز U/mL	1.1630±0.5650 Range 0.60-2.55	1.5458±0.5143 Range 0.69-2.46

يعزى سبب انخفاض الالبومين نتيجة لتغيرات حاصلة للهرمون اللوتيني او لهرمون البرولاكتين وكذلك نتيجة تناول الادوية والعقاقير حيث ان تناول الادوية والعقاقير من شانها خفض تركيز الالبومين ويتفق معنا الباحث [10].

يعتبر الالبومين من مضادات الأكسدة داخلية المنشأ لان له القابلية على الارتباط بالعناصر المعدنية والتي تشارك في حدوث الأكسدة بتفاعلاتها المختلفة عندما تكون بشكلها الحر وبالتالي يثبط توليد جذر الهيدروكسيل ويقلل من الأجهاد التأكسدي ، بالاضافة الى انه يلعب دوراً اساسياً في المحافظة على الضغط الاوزموزي وعلى استقراريته والذي ينضم توزيع السوائل داخل وخارج الأوعية وكرد فعل لوجود حالة الأجهاد التأكسدي (Oxidative stress) يقل تركيز الالبومين في هذه الدراسة الذي يعد من الكاسحات للجذور الحرة التي تتكون عند حدوث حالة الاجهاد التأكسدي الذي يؤدي الى تغير في الوظيفة الحيوية للبروتين.[11, 12] .حيث يحدث الإجهاد التأكسدي عندما يزداد أنتاج جذر الأوكسجين الفعال ROS والأنواع الأخرى من الجذور الحرة و يكتسح هذا من قبل مانعات التأكسد نتيجة للإنتاج المتزايد لجذر الأوكسجين الفعال ROS أو الكميات الناقصة لمانعات التأكسد نتيجة الاستخدام المتزايد. أن مانعات التأكسد (مثل الالبومين) تكون قادرة على إيقاف انتاج الجذور الحرة وبالتالي يقل تركيز البومين المصل بسبب استهلاكه كمضاد للأكسدة في الدم[13]. ومن

المعلوم ان زيادة الجذور الحرة يؤثر بشكل سلبي على خصوبة المرأة حيث أن الجذور الحرة تعيق عمل الخلايا الطبيعية وقد تحولها الى خلايا غير طبيعية ومؤكسدة ، إذ إن تكوين كميات كبيرة من الجذور الحرة تكون المسؤولة عن إحداث العديد من التغيرات الكيميائية الحياتية في بنية ووظيفة الخلايا التناسلية وهذا الخلل الحاصل لتركيز الالبومين من شانها احداث أعاقة في الاخصاب لدى الاناث وبالتالي تسبب ضعف الخصوبة عند النساء [14].

تأثير مستوى المالون داي الديهايد في ضعف الخصوبة

نتائج الجدول (1) توضح المقارنة بين مجموعة النساء المصابات بضعف الخصوبة والنساء السليمات في تأثير مستوى المالون داي الديهايد ، اذ أظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي (p=0.005) في مستوى المالون داي الديهايد وكانت النتائج بالنسبة لمجموعة النساء المصابات بضعف الخصوبة (115.87±39.90 nmol/mL) وبالنسبة لمجموعة النساء السليمات (88.75±18.30 nmol/mL)

جاءت هذه النتائج متطابقة مع النتائج التي توصل إليها الباحث [15]. والذين من خلال بحوثهم تبين لديهم ارتفاع معنوي في مستوى الـ (MDA).

لوحظ في هذه الدراسة ارتفاعا في تركيز MDA الذي يعد الناتج النهائي لأكسدة الدهون للأحماض الدهنية غير المشبعة للعديد من الخلايا التي من ضمنها خلايا البويضة نتيجة زيادة ROS ونتوقع أن هذه الزيادة تعطي مؤشرا واضحا على حدوث حالة الاجهاد التأكسدي كون ان قيمة MDA هي احدى اهم المؤشرات على حدوث الأكسدة داخل الجسم [16،17]. والناتجة عن تداخل العديد من العوامل منها الداخلية الناجمة عن تفاعلات الايض والى امراض اخرى مصاحبة لضعف الخصوبة مثل البدانة والأمراض القلبية الوعائية وداء السكري وأمراض اخرى وكذلك الخارجية كالعوامل البيئية والإشعاعات [18،19] . بالأضافة الى ذلك تكون ناجمة عن زيادة أنواع الأوكسجين الفعالة Reactive oxygen species التي تمارس تأثيرها السمي الخلوي بوساطة أحداث أكسدة الدهون للبتيدات الفوسفاتية للغشاء الخلوي مما يؤدي الى زيادة نفوذيته وفقدان تكامل ونشاط انزيماته وبالتالي الموت الخلوي وتقود هذه الى حالة الإجهاد التاكسدي damage Oxidative المسببة لضعف الخصوبة عند الإناث [20] . فضلا عن ذلك ان التأثير الأكثر وضوحا هو اتلاف وتحطيم اغشية وصررا كبيرا في تركيب الخلايا التناسلية ووظائفها وبالتالي تؤدي خللا في التبويض وتتلف بشكل مباشر الدور الدفاعي لمضادات الاكسدة فضلا عن ذلك ان مركبات الأكسدة يمكن ان تحطم الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين والبروتينات وذلك من خلال أكسدة قواعد DNA النيوكليوتيدية [21].

تأثير تركيز الكتاليز وفيتامين E في ضعف الخصوبة

أشارت النتائج الموضحة في الجدول رقم (1) الى وجود انخفاض معنوي (p=0.010) في مستوى الكتاليز لدى مجموعة النساء ضعيفات الخصوبة مقارنة مع مجموعة النساء السليمات ، وكانت النتائج بالنسبة لمجموعة النساء ضعيفات الخصوبة (1.1630±0.5650) وبالنسبة لمجموعة النساء السليمات (1.5450±0.5143). بينما لم يظهر فيتامين E كأحد

مضادات الأكسدة غير الانزيمية فروقا معنوية للنساء المصابات (0.4593±0.3757 ng/ mL) مقارنة بالنساء السليمات (0.5538±0.5554 ng/ mL).

يعد الكتاليز من مضادات الأكسدة الكاسحة التي تمنع من عملية استمرار الانتشار للجذور الحرة Free radicals و يلعب الكتاليز دورا مهما في ازالة السموم الناجمة عن بيروكسيد الهيدروجين نلاحظ في الدراسة الحالية انخفاض في تركيز الكتاليز ويعزى سبب ذلك الى حدوث أجهاد تأكسدي وانخفاض مضادات الأكسدة يؤدي الى عدم القدرة على التخلص من الجذور الحرة [22] .حيثُ يعد إنزيم الكتاليز هو احد كاسحات الجذور الحرة إذ يقوم بإزالة تأثير (H_2O_2) الضار في الخلية [24،23] . وفي حالة تكون الجذور الحرة وزيادة فرط الأكسدة فإنها تؤدي إلى سرعة استهلاك الأنظمة الدفاعية[25] .حيث أن حالة الأجهاد التأكسدي تؤثر بصورة مباشرة على وظيفة الجهاز التناسلي الأنثوي ومن المعروف أنه يحدث نتيجة حصول عدم التوازن المواد المؤكسدة(الجذور الحرة) ومضادات الأكسدة فأن تكوينه يؤدي الى زيادة أصناف الأوكسجين الفعالة والجذور الحرة وتثبيط عمل مضادات الأكسدة [26]. وبالتالي فأن انخفاض تركيز الكتاليز أدى الى زيادة تركيز بيروكسيد الهيدروجين الذي يسبب تغيرات هيكلية ووظيفية في خلايا البويضة تؤدي ضررا كبيرا في الجهاز التناسلي وتمنع اندماج الحيوان المنوي بالبويضة وبالتالي تسبب ضعف الخصوبة [27].

المصادر

1. Kelley-Anne Sabarre ,Zainab Khan , Amanda N Whitten , Olivia Remes and Karen p Phillips. qualitative study of ttawa university students awareness, knowledge and perceptions of infertility, infertility risk factors and assisted reproductive technologies (ART). REPRODUCTIVE HEALTH ,2013; 10:41.
2. Izatulla Jumayev I1, Harun-Or-Rashid M, Rustamov O, Zakirova N, Kasuya H, Sakamoto J., Social correlates of female infertility in Uzbekistan. Nagoya J Med Sci. 2012 Aug;74(3-4):273-83.
3. Manoj kumar Sharma1, Deepak Parchwani2, Pankaj Maheria3, Amit Upadhyah1. Relationship between thyroid profile and semen quality. National Journal of Community Medicine ,2012 ,3.p (20).
4. Philip Teg-Nefaah Tabong1, Philip Baba Adongo, Understanding the Social Meaning of Infertility and Childbearing: A Qualitative Study of the Perception of Childbearing and Childlessness in Northern Ghana, 2013, Jornal Plos One ,8(1).
5. Tremellen, K. Oxidative stressand male infertility: A clinical persective . Hum. Reprod ,2008. Update.14(3):243-258

6. Cross C.E., Vander V A. and Neil C.O. "Reactive oxygen species and the lung". *Lancet;*1994, Vol.344, pp.930-933. ,
7. L. Goth , A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range , Clinics *Chimica AC*. 196 (1991) 143-152
8. Rao, B., Soufir, J. C., Martin, M. and David, G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as relatd to midpiece abnormalities and motility. Gamete Research, 1989, 24(2), 127-134.
9. *Silverman LM, Christenson RH, Grante GA*. protiens. In: *Carl AB, Edward RA.*Tietz text book of clinical chemistry, 3rded, Vol. 1. Philadelphia:WB, 1999:PP 477-541.
10. Doumas,B. T., Waston,W. A., Bigg,H. G.. Albumin standards and the measurement of serum albumin with BCG. *Clin Chim Acta*; (1971), 31: 87-96.
11. Mahajan, A. and Tandon V. R.. Anti oxidants and rheumatoid arthritis . J. Indi. Rheumatol. Assoc, 2004, 12, pp : 139 . 142
12. Berg , J.M., Tymoczko,J.L.,Stryer , L. Biochemistry . W.H. Freeman and company . New York, USA, 2007,.pp.138,139,145,146.
13. Ebisch IM, van Heerde WL, Thomas CM, van der PN, Wong WY and Steegers-Theunissen RP .C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism interferes with the effects of folic acid and zinc sulfate on sperm concentration. Fertil Steril , 2003, 80,1190–1194.
14. Honaramooz, A.,. Impacts of Oxidative stress and antioxidants on Semen Function " Veterinary Medicine Internation al ,2011,Volume, Article ID 686137,7.
15. عبدالله، آمنة احمد طايس .(2011). دراسة فسلجية ،كيميوحيوية لدى النساء العقيمات و السليمات في محافظة صلاح الدين. رسالة ماجستير. كلية التربيه/ جامعة تكريت.
16. Mehendale , S., Kilari , B., Deshmukh, C., Dhorepatil , B., Nimbargi. V., Joshi , S. Oxidative stress- mediated essential polyunsaturated fatty acid alterations in female infertility. Department of Obstetrics and Gynecology.Bharati Vidyapeeth University Mediccal College , Pune , India. ., 2009,12(1): 28-30.
17. Yildirim , B., Demir, S., Temur , I., Erdemir, R., Kaleli, B., "Lipid peroxidation in follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome", Jornal of Reprodactive Medicine,2007 .52(8): 722-726.

18. Demir,S.;Yilmaz,M.;Akalin,N.;and Aslan,D.Role Of free radicals in peptic ulcer and gastritis .*Turk. J. Gastroenterol* , 2003,14(1):39.
19. Ojo, O. O.; Kabutu, F.R.; Bello, M.and Babayo, U.Inhibitio of paracetamol-induced oxidative stress in rats by extracts of lemongrass (Cymbropogon citratus)and green tea (Camellia sinensis) in rats.AJB, 2006, vol.5(12) pp.1227-1232 .
20. Halliwell . B.; and Gutteridge , J.M.C.. Free Radicals in Biology and Medicine .3rd ed ., Oxford University press UK,1999, pp:435_556.
21. Kothari, S., Thompson, A., Agarwal,A., Du Plessis, S.S.. free radicals: Their beneficial and deterimental effects on sperm function . Indian J.Exp. Biol, 2010.48(5):425-435.
22. Zelen, I., Mitrović, M., Jurišić-Škevin, . and rsenijević, S. ctivity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Medicinski pregled*, 2010, *63*(9-10), 624-629.
23. Bagchi , M .; Mukherjee, s . and Basu , MK ., J . Biochem . Biophys, 1993, 30 (5) : 277 - 281 .
24. Beauchamp , C. and Fridovich , I . , Biochem. Biopys .Acta, 1973, 317 : 50 – 54 .
25. Visoli , F. and Gall , C. , Rev. Food Sci. Nutr, 2002, 42 :209-221 .
26. Beena J. Premkumar, Anamar Aponte, Amani Shaman, Ashok Agarwal Ph.D., HCLD , Reactive Oxygen Species and Female Infertility, Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants 2014, pp 2743-2772
27. Blondin, P., Coenen, K. and Sirard, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *Journal of andrology*, 1997, *18*(4), 454-460.