

Review Article

A Cellular Perspective on the Importance of Oxidative Stress Effects on Sperm

Sadeghi N¹, Tavalae M^{1*}, Nasr- Esfahani M.H^{1,2},

1. Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

2. Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran.

**Corresponding author.* Tel: +983195015682, Fax: +983195015687, E-mail: Tavalae.m@royaninstitute.org

Received: Nov 21, 2017 Accepted: Feb 19, 2018

ABSTRACT

Infertility, especially in the last decade, has been rising as a global problem, affecting approximately 10-15% of the world's population. The abundance and origin of various types of infertility are different. Studies have shown that reactive oxygen species (ROS) are involved in infertility, in particular in male infertility. Although ROS is essential for normal physiological functions of sperm such as capacitation, hyper activation, acrosome reactions, and binding to the oocyte, excessive levels can be one of the main causes of defective sperm function, which not only impairs the health of sperm DNA, but also affects fertilization via oxidation of proteins, in particular the fatty acids of the sperm cell membrane. Also, the elevated ROS levels facilitate sperm DNA damage, which leads to activation of apoptotic pathway and cell death. Therefore, the quality of semen is functionally reduced. Since the oxidative damage to sperm DNA is associated with both miscarriage and development abnormalities in the offspring, it is essential to find new strategies to recognize the cellular and molecular biology of sperm. Therefore, considering different mechanisms of oxidative stress affecting sperm can contribute significantly to the etiology of male infertility.

Keywords: ROS; RNS; DNA Damage; Infertility; Antioxidant.

مقاله مروری

اهمیت اثرات استرس اکسیداتیو بر اسپرم از دیدگاه سلولی

نیلوفر صادقی^۱، مرضیه تولائی^{۱*}، محمد حسین نصر اصفهانی^{۱،۲}

۱. گروه زیست فناوری تولید مثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

۲. مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۱ ۹۵۰۱۵۶۸۷، فاکس: ۰۳۱ ۹۵۰۱۵۶۸۷، پست الکترونیک: Tavalaeem@royaninstitute.org

چکیده

ناباروری، به ویژه در دهه گذشته به عنوان یک مشکل جهانی در حال افزایش است. که تقریباً ۱۰-۱۵ درصد از جمعیت سراسر جهان را تحت تاثیر قرار داده است. منشأ انواع مختلف ناباروری متفاوت است. مطالعات حاکی از آن است که گونه های فعال اکسیژن (ROS) در علل ناباروری، به ویژه ناباروری مردان دخیل هستند. اگرچه ROS برای عملکردهای فیزیولوژیکی از جمله ظرفیت یابی، واکنش آکروزومی و اتصال اسپرم به تخمک ضروری می باشد ولی سطح بیش از حد آن می تواند یکی از علل اصلی عملکرد ناقص اسپرم باشد، که نه تنها باعث نقص در سلامت DNA اسپرم می شود بلکه به دلیل اکسیدشدن پروتئین ها و مخصوصاً اسیدهای چرب غشاء، لقاح را تحت تاثیر قرار می دهد. همچنین افزایش سطح استرس اکسیداتیو در اسپرم علاوه بر آنکه سرعت آسیب DNA اسپرم را تسهیل می نماید، می تواند منجر به فعال شدن مسیرهای آپوپتوز و مرگ سلول گردد. لذا کیفیت مایع منی از لحاظ عملکردی کاهش می یابد. از آنجا که آسیب اکسیداتیو به DNA اسپرم با سقط جنین و اختلالات رشدی در فرزندان همراه است. یافتن راهکارهای جدید شناخت بیولوژی اسپرم از دیدگاه سلولی ملکولی ضروری می باشد. بنابراین بررسی و توجه بیشتر به مکانیسم های مختلف تاثیر استرس اکسیداتیو بر اسپرم می تواند باعث پیشرفت چشمگیری در زمینه اتیولوژی ناباروری مردان گردد.

واژه های کلیدی: ROS، RNS، آسیب DNA، ناباروری، آنتی اکسیدان

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳۰

مقدمه

ناباروری یکی از جدی ترین مشکلات پزشکی جهان است. شیوع ناباروری به ویژه از دهه گذشته در حال افزایش است. در حال حاضر در سطح جهانی در هر شش تا هفت زوج، یک زوج با مشکل ناباروری مواجه است [۱]. در طول دهه گذشته، پیشرفت های قابل توجهی در تشخیص و درمان اختلالات تولید مثل صورت گرفته است. با این حال، هنوز به تحقیقات بیشتر، جهت شناخت عوامل ایجادکننده ناباروری و انتخاب صحیح روش کمک درمانی جهت دستیابی به

باروری موفق، نیاز است. در واقع، میزان موفقیت فعلی مبتنی بر حاملگی های بالینی بین ۲۵-۵۰ درصد است که به وضوح پیشرفت های پزشکی عمومی و تولیدمثل را به طور همزمان نشان می دهد. با این حال، الگوهای زندگی مدرن، مانند عوامل اجتماعی و محیطی، عاملی در افزایش شیوع ناباروری شمرده می شود. به همین دلیل، امروزه یکی از مهم ترین مسیرهای زیست پزشکی توسعه روش های درمانی جدید برای بهبود لقاح به هر دو روش طبیعی و روش های کمک باروری می باشد [۲]. در اکثر مردان

غلظت، حرکت [۹]، مورفولوژی اسپرم [۱۰] و تاثیر مضر آن بر DNA اسپرم و فرآیند آپوپتوز نشان داده است [۱۱]. برعکس، مطالعات دیگر هیچ ارتباطی بین گونه‌های فعال اکسیژن و تحرک اسپرم نشان ندادند [۱۲،۱۳]. در این مقاله مروری، قصد بر آن است که شواهد مربوط به مکانیسم تولید گونه‌های فعال اکسیژن، نقش فیزیولوژیکی آنها و همچنین تاثیر استرس اکسیداتیو بر روی ناباروری در مردان بررسی گردد. بدین منظور در این مطالعه مقالات مربوط، بین سال‌های ۱۹۹۲ تا ۲۰۱۷، از پایگاه داده PubMed و با کمک موتور جستجوی Google Scholar استخراج شد و مورد استفاده قرار گرفت.

تحقیقات گسترده در زمینه ناباروری نشان داده است که تولید بیش از حد گونه‌های فعال واکنش پذیر اکسیژن و نیتروژن (ROS و RNS)، استرس اکسیداتیو نام داشته که در علل ناباروری به خصوص ناباروری مردان دخیل است. مکانیسم عمل ROS و RNS شامل لیپید پراکسیداسیون غشای سیتوپلاسمی اسپرم است که به دلیل وجود اسیدهای چرب غیراشباع، بسیار نسبت به آسیب اکسیداتیو حساس بوده و باعث آسیب به سیالیت غشا و تحرک اسپرم خواهد شد. علاوه بر این، گونه‌های فعال واکنش پذیر اکسیژن و نیتروژن می‌توانند باعث آسیب به آکسونم اسپرم و اختلال در عملکرد میتوکندری، DNA، RNA و پروتئین‌های اسپرمی شوند [۲]. بر خلاف نقش این گونه‌های فعال در ناباروری مردان، مصرف آنتی‌اکسیدان‌های مکمل در انسان می‌تواند باعث بهبود عملکردهای تولید مثل شود [۱۴،۱۵]. اگرچه برخی از مطالعات، تغییری در پارامترهای منی و باروری مردان پس از مدت زمان طولانی مصرف خوراکی آنتی‌اکسیدان‌ها را گزارش نکردند [۱۶،۱۷]. این داده‌ها منجر به نگرانی و بحث در مورد اثربخشی استفاده خوراکی از آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان درمان ناباروری مردانه شده است. علت شکست درمان آنتی‌اکسیدانی در درمان ناباروری مردانه این است

ناباروری تعداد کافی اسپرم برای شروع بارداری تولید می‌شود، ولی عملکرد آن با مشکل مواجه شده است. بنابراین، نقص در عملکرد اسپرم را می‌توان به عنوان مهمترین عامل ناباروری در مردان تعریف نمود. بدون شک علل اولیه نقص در عملکرد اسپرم دارای دلایل متفاوتی از جمله ژنتیک، شیوه زندگی و فاکتورهای محیطی به صورت منفرد یا ترکیبی می‌باشد. اولین نظریه در مورد نقش استرس اکسیداتیو (OS)^۱ در نقص در عملکرد اسپرم توسط یکی از پیشگامان آندروالوژی مدرن، دکتر جان مک لود^۲ بیان شد. او مقاله مهمی در سال ۱۹۴۳ منتشر کرد که نشان می‌داد اسپرم در محیط اکسیژناسیون (محیطی با میزان بالای اکسیژن) به سرعت تحرک خود را به واسطه مکانیسم‌هایی از دست می‌دهد. اینکه اسپرم‌ها می‌توانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)^۳ و به خصوص پراکسید هیدروژن را تولید کنند، توسط توسیک^۴ و والتون^۵ تایید و تحت مقاله ای در مجله نیچر در سال ۱۹۴۶ منتشر شد [۳]. مطالعات نشان می‌داد که افزایش سطح ROS با ناباروری در بیش از ۴۰ درصد مردان جامعه مرتبط است [۴،۵]. همچنین مطالعات معاصر افزایش سطوح ROS در ۳۰ تا ۸۰ درصد مردان نابارور را نشان می‌دهد [۶،۷]. استرس اکسیداتیو در سیستم ادراری تناسلی می‌تواند باعث آسیب به اسپرم شده و منجر به کاهش حرکت، پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش آسیب DNA و کاهش اتصال اوسیت- اسپرم شود [۸]. گونه‌های فعال اکسیژن تاثیر قابل توجهی بر اسپرماتوزن و همچنین عملکرد اسپرم دارند. سطوح فوق فیزیولوژیکی گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند بر تمام جنبه‌های پارامترهای اسپرمی تاثیر بگذارد. همچنین مطالعات متعدد اثرات مضر گونه‌های فعال اکسیژن را بر

¹ Oxidative Stress

² John MacLeod

³ Reactive Oxygen Species

⁴ Tonic

⁵ Walton

که ROS و RNS در غلظت‌های فیزیولوژیکی کم و کنترل شده، برای عملکرد طبیعی اسپرم مورد نیاز است. بنابراین گونه‌های فعال واکنش پذیر اکسیژن و نیتروژن باید در سطوح مناسب برای اطمینان از عملکرد فیزیولوژیکی تنظیم شوند. به طور خاص، نشان داده شده است که مقدار کمی از ROS و RNS به عنوان یک محصول متابولیسم طبیعی در سلول‌های بنیادی، اسپرم و تخمک تولید می‌شود و این گونه‌های واکنش پذیر، زمانی که در غلظت فیزیولوژیکی کنترل شده تولید شود، فرآیندهای مهم تولیدمثل را به خصوص در سلول‌های اسپرم تنظیم می‌کنند. به خصوص که NO و رادیکال آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) در تنظیم فرآیند ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی اسپرم ضروری هستند. مهم است که توجه داشته باشیم محل اصلی تولید و هدف ROS و RNS میتوکنندری است. در نتیجه با تولید گونه‌های فعال واکنش پذیر اکسیژن یا نیتروژن و متعاقب آن، فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ مختلف وابسته به اکسیداسیون- احیا (Redox)، میتوکنندری‌ها در تنظیم عملکرد اسپرم درگیر می‌شوند. به علاوه، نشان داده شده است که میتوکنندری از طریق تولید ATP، می‌تواند فرآیند اسپرماتوژنز، تمایز، واکنش آکروزومی، اتصال تخمک و لقاح را تنظیم نماید. شواهد اخیر اهمیت میتوکنندری در عملکرد اسپرم را نشان می‌دهد به طوری که عملکرد میتوکنندری با پتانسیل لقاح و کیفیت اسپرم انسان ارتباط مستقیمی دارد [۲].

گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (ROS) یک اصطلاح عمومی رایج است که شامل رادیکال‌های اکسیداتیو مانند رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) و گونه‌های غیررادیکال مانند آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) یا پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌باشد. این اصطلاح همچنین می‌تواند شامل گونه‌های نیتروژن فعال واکنش پذیر [۱۸] و گونه‌هایی که به طور طبیعی محصولات جانبی متابولیسم هستند، باشد [۱۹]. غلظت

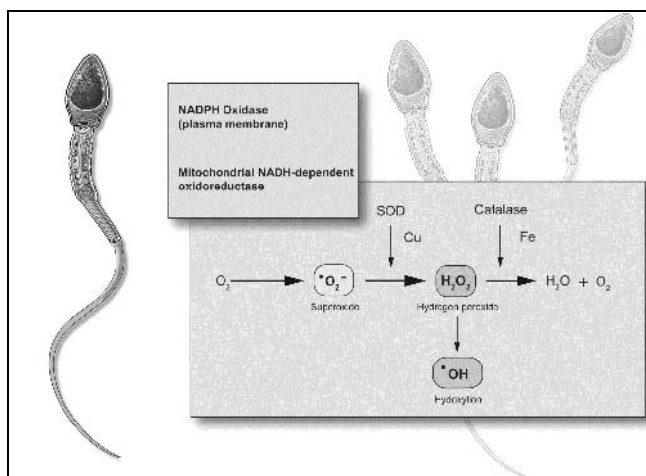
کم ROS جهت انجام بسیاری از فرآیندهای سلولی مورد نیاز است، در حالی که تولید بیش از حد آن توسط آنتی اکسیدان‌ها کنترل و یا بهبود می‌یابد. در اسپرم، ROS برای تعدادی از عملکردهای خاص و ضروری مورد نیاز است. نوع اصلی ROS تولید شده در اسپرم‌ها $O_2^{\cdot-}$ است که خود به خود تولید H_2O_2 می‌کند [۲۰]. با توجه به نیمه عمر کوتاه آنها، در اسپرم این گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط عادی نسبتاً بی‌ضرر هستند و مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی به حفظ تعادل کلیدی مورد نیاز برای عملکردهای وابسته به ROS کمک می‌کنند [۲۱]. ROSها از جمله H_2O_2 ، $O_2^{\cdot-}$ [۲۲] و اکسید نیتروژن (NO) نقش مهمی در ظرفیت یابی اسپرم ایفا می‌کنند [۱۸].

منابع ROS و استرس اکسیداتیو در اسپرم‌ها

اسپرم‌ها نیز همانند سلول‌های پیکری، مقدار کمی ROS را به عنوان یک محصول جانبی زنجیره انتقال الکترون در میتوکنندری تولید می‌کنند [۲۳]. تولید ROS در اسپرم ممکن است از طریق دو روش (۱) سیستم NADPH اکسیداز در سطح غشای پلاسمایی اسپرم و یا (۲) واکنش اکسید ردوکتاز وابسته به NADH در سطح میتوکنندری انجام شود. که به نظر می‌رسد مکانیسم دوم منبع اصلی ROS می‌باشد [۱۰] (شکل ۱).

بیشتر ROSهای تولیدشده عبارتند از $O_2^{\cdot-}$ و H_2O_2 ، و آنتی اکسیدان‌ها مانند گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز، که آنها را خنثی می‌کنند و هر دو آنها در حال حاضر در میتوکنندری و ترشحات دستگاه تولیدمثل وجود دارد [۲۴، ۲۵]. در صورت تولید بیش از حد ROS یا در صورت عدم وجود آنتی اکسیدان‌های کافی، غلظت ROS ممکن است افزایش یابد. همچنین DNA میتوکنندری نیز می‌تواند توسط ROS آسیب و تولید ATP و تامین انرژی برای تحرک در اسپرم‌ها را کاهش دهد و در نهایت منجر به کاهش باروری گردد. اما جهش‌های DNA میتوکنندری، بر سلامتی فرزندان اثر

نمی‌گذارند، زیرا DNAهای میتوکندری مردانه توسط اووسیت تخریب می‌شود و تنها از طریق مادر به فرزند به ارث می‌رسد [۲۶].



شکل ۱. تولید گونه‌های فعال اکسیژن شامل سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل بسیار واکنشی ($\bullet OH$) در اسپرم. سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به همراه کاتالاز یا گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) بسیاری از گونه‌های مضر اکسیژن را از بین می‌برند [۱۰]

منابع درونی تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)

تولید ROS در سیتوپلاسم سلول‌های اسپرم مشخص شده است، اگر چه مکانیسم دقیق آن هنوز مشخص نشده است. در طی اسپرماتوژنز طبیعی، بخش اعظم سیتوپلاسم اسپرم‌های در حال بلوغ توسط سلول‌های سرتولی خارج می‌شود. قطره سیتوپلاسمی باقیمانده در بخش میانی محتوی آنزیم‌هایی است شامل؛ کراتینین کیناز و گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز که برای تولید انرژی مورد نیاز هستند، همچنین در اینجا تولید ROS ضروری برای ظرفیت یابی اسپرم اتفاق می‌افتد [۲۷]. تصور می‌شود که سیتوپلاسم باقیمانده حاصل از اسپرماتوژنز ناقص، مقدار گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز را افزایش و نهایتاً منجر به افزایش تولید ROS می‌شود. به همین علت، اسپرماتوزوای نابالغ یا اسپرماتوزوای با بلوغ ناقص منبع اصلی تولید ROS در استرس اکسیداتیو است و ممکن است موجب آسیب DNA در اسپرم‌های بالغ در طول انتقال در اپیدیدیم شود [۲۸].

لوکوسیت‌ها

علاوه بر اسپرم‌های نابالغ یا غیرطبیعی، لوکوسیت‌ها منبع اصلی ROS و استرس اکسیداتیو می‌باشند [۲۹]. مطالعات متعدد نشان داد که لوکوسیتوسپرمی (افزایش بیش از یک میلیون لوکوسیت در مایع منی) معمولاً با افزایش آسیب DNA در اسپرم‌ها در ارتباط است [۳۰، ۳۱]. لوکوسیتوسپرمی همراه با کاهش غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها ارتباط مستقیمی با افزایش ROS مایع منی دارد. در زمان عفونت و یا التهاب مزمن، لوکوسیت‌های فعال شده باعث افزایش غلظت ROS شده و می‌توانند ۱۰۰۰ بار بیشتر از اسپرم ROS تولید کند. این سطح از غلظت ROS ممکن است از دفاع آنتی‌اکسیدانی مایع منی جلوگیری کند [۲۶].

واریکوسل

واریکوسل یکی از علل اصلی ناباروری در مردان، با شیوع ۱۵ درصد در کل جمعیت مردان و ۴۰ درصد در میان مردان نابارور می‌باشد [۳۲]. استرس اکسیداتیو عامل مهمی در پاتوفیزیولوژی تولیدمثل مردان نابارور دچار واریکوسل بوده و اصولاً سطوح بالای آسیب DNA در مطالعات متعدد نشان داده

شده است. افزایش غلظت ROS و کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی در اکثر موارد واریکوسل مشاهده شده است [۲۶،۳۳،۳۴]. همچنین نشان داده شده است که سطح ROS مایع منی با درجه واریکوسل مرتبط است؛ به گونه ای که در افراد واریکوسلی با درجه بالاتر، سطح ROS بیشتری تشخیص داده شده است [۳۵]. به علاوه این افراد با کاهش پارامترهای اسپرمی و افزایش آسیب DNA مواجه هستند [۳۶].

منابع بیرونی تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)

گرما

یکی از عوامل ایجادکننده شرایط استرس گرمایی، قرار گرفتن در معرض شرایط گرمایشی شغل است، به ویژه زمانی که این شغل زمان زیادی از روز ادامه داشته باشد. عامل دیگری که ممکن است به استرس گرما در مردان کمک کند، گرمای محیطی است که مردان در آن زندگی می‌کنند [۳۷]. موقعیت اسکروتوم به حفظ درجه حرارت بیضه کمک می‌کند. افزایش سطح دمای اسکروتوم یا هیپرترمی، با ناباروری و اختلال اسپرماتوژنز مرتبط است. توقف اسپرماتوژنز باعث افزایش تعداد اسپرم‌های نابالغ و یا بلوغ ناقص در اپیدیدیم و انزال می‌گردد و این خود منبع اصلی ROS می‌باشد [۲۶].

تابش تلفن همراه

افزایش استفاده از تلفن‌های همراه و نگهداری آن در جیب شلوار به عنوان یک منبع آسیب رسان به سیستم تولید مثل مردان معرفی شده است [۳۸]. افزایش استرس اکسیداتیو در بیضه مردانی که در معرض اشعه تلفن قرار داشته اند، با تولید رادیکال‌های آزاد و افزایش مقدار ROS در اسپرم همراه خواهد بود. ممکن است این فرآیند به دلیل برهم زدن پتانسیل غشای میتوکندریایی، ایجاد اثر منفی بر سیستم انتقال الکترون و فسفوریلاسیون اکسیداتیو و همچنین اثر بر لیزوزوم‌ها و آزادسازی آنزیم‌های هیدرولیز کننده، منجر به استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوز گردد. که

البته این استرس اکسیداتیو ممکن است با تیمار آنتی اکسیداتی کاهش یابد [۳۹]. نتایج مطالعه بررسی امواج الکترومغناطیس بر سلول‌های اسپرم نشان داد که، در شرایط آزمایشگاهی تابش این امواج نه تنها باعث افزایش تولید ROS و القای آسیب DNA می‌شود، بلکه باعث کاهش تحرک، حیات و همچنین تعداد اسپرم‌ها در طول زمان تابش شده است [۴۰]. امواج تلفن همراه می‌تواند تولید ROS را افزایش و فعالیت کاتالاز، سوپراکسیددسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را کاهش دهد که نتیجه آن آسیب DNA می‌باشد، همانگونه که در شرایط آزمایشگاهی به وضوح نشان داده شده است [۴۱].

استعمال دخانیات

دود تنباکو شامل غلظت‌های بالا ROS شامل O_2^- و OH^- است، که در واکنش‌های فنتون^۱ برای تولید H_2O شرکت کرده و آسیب DNA را ایجاد می‌کند [۴۲]. کادمیوم و سرب مشتق شده از دود سیگار همچنین باعث شکستن رشته‌های DNA می‌شوند [۴۳] و حضور آن‌ها در مایع منی با شاخص‌های استرس اکسیداتیو در ارتباط است. بطور کلی، دود تنباکو میزان تولید ROS را در مایع منی افزایش و ظرفیت آنتی اکسیداتی آن را کاهش می‌دهد و این اثرات اساساً به دلیل وجود کادمیوم در دود سیگار می‌باشد [۴۴]. سیگار کشیدن با آسیب DNA اثری و همچنین بروز سرطان در دوران کودکی ارتباط دارد. در نتیجه در درمان ناباروری با فاکتور مردانه، عدم استعمال دخانیات توصیه می‌شود [۲۶].

سن

ناباروری مرتبط به سن با آسیب DNA مرتبط است، به طوری که ارتباط مستقیمی بین سن با قطعه قطعه شدن DNA^۲ مشاهده شده است [۴۵]. مطالعات نشان داده است که پیشرفت سن مرد با کاهش تعداد، تحرک و مورفولوژی اسپرم همراه است. همچنین

^۱ Fenton

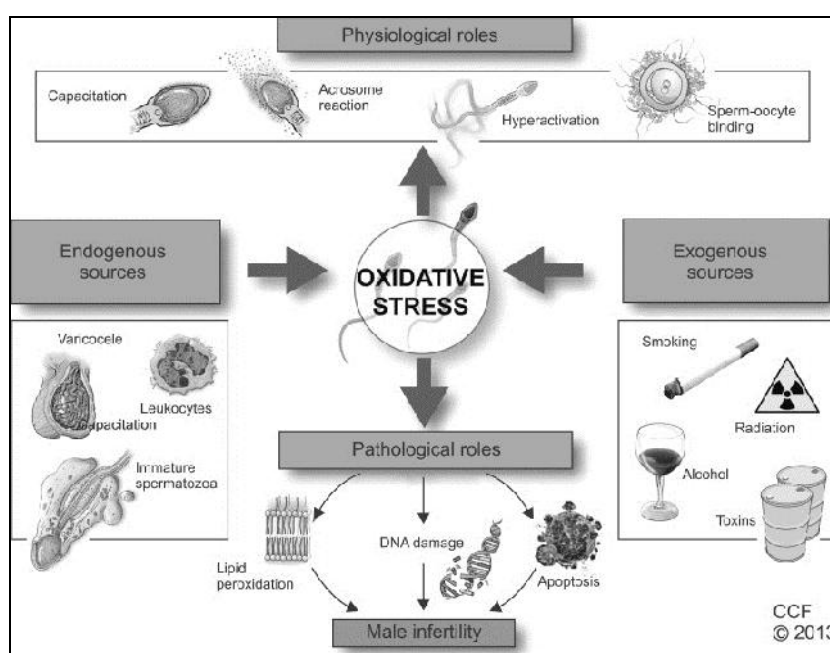
^۲ DNA Fragmentation

زیاد برای سیستم‌های تولید مثلی حیوانات و انسان‌ها سمی هستند. توکسین‌ها (شامل فلزات سنگین؛ سرب، کادمیوم، جیوه و آرسنیک) از طریق برخی مشاغل، مصرف آب و مواد غذایی آلوده یا تنفس هوای آلوده وارد بدن انسان می‌شوند و منجر به افزایش تولید ROS و تاثیر منفی بر ساختار و عملکرد اسپرم خواهند شد. همچنین باعث اختلال در اسپرماتوژنز و القاء آسیب DNA اسپرم می‌شوند [۴۸] (شکل ۲).

گزارش شده است که افزایش سن مرد با افزایش شیوع هر دو نقص ژنومی و اپی ژنومیک مرتبط است [۴۶]. به علاوه افزایش سطح ROS و احتمالاً کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی با افزایش سن در ارتباط است [۴۷].

توکسین‌ها

سرب، کادمیوم، جیوه و آرسنیک جزو فلزات سنگین بوده و ممکن است انسان بطور کاملاً اتفاقی، در معرض این فلزات قرار گیرد. این چهار فلز در مقادیر



شکل ۲. منابع مختلف درونی (لوکوسیت‌ها، واریکوسل و اسپرم نابالغ) و بیرونی (دخانبات، الکل، توکسین‌ها و امواج الکترومغناطیسی) تولید ROS و رابطه افزایش تولید ROS در اسپرم با ناباروری مردان [۱۰]

و باعث جلوگیری از اثرات آسیب استرس اکسیداتیو بیش از حد به سلول خواهد شد [۱۱]. غلظت بالایی از آنتی اکسیدان‌ها و جاروبگرها^۱ در مایع منی وجود دارد. این آنتی اکسیدان‌ها برای محافظت اسپرم از اثرات زیان آور ROS عمل می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، و سرولوپلاسمین می‌شوند. آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی شامل آلبومین، بارتوتین، L-کارنیتین، گلوتاتیون، پیروات، تاورین،

بحث

ROS داخلی می‌تواند از اسپرم‌های آسیب دیده یا ضعیف حاصل شود [۲۰]. اسپرم ناشی از اسپرماتوژنز غیرطبیعی می‌تواند ROS بیش از حد تولید کند [۴۹]. اگرچه ROS در واکنش‌های آنزیمی طبیعی تولید می‌شود ولی از آسیب سلولی آن به وسیله یک سیستم زداینده، توسط آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی جلوگیری می‌شود. این سیستم تعادل اکسیدان- آنتی اکسیدان، همزمان، تشکیل اکسیدان‌های مفید برای عملکرد عادی سلول را کنترل

^۱ Scavengers

هیپوتورین، ویتامین C، E و روی می‌باشند. گلوکاتینون مهمترین حفاظت کننده درونی سلولی در برابر ROS می‌باشد. این آنتی‌اکسیدان شامل یک گروه سولفیدریل است که به طور مستقیم رادیکال‌های آزاد را جمع‌آوری می‌کند [۵۰]. مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که تعادل خوبی از ROS و آنتی‌اکسیدان‌ها جهت ظرفیت‌یابی و نهایتاً لقاح مورد نیاز می‌باشد. H_2O_2 می‌تواند ظرفیت‌یابی و فسفریلاسیون تیروزین را در شرایط آزمایشگاهی تحریک کند، در حالی که آنزیم آنتی‌اکسیدان کاتالاز از این امر جلوگیری می‌کند [۵۱]. همچنین غلظت‌های فیزیولوژیک خاص NO باعث هیپراکتیویته (فعال‌سازی بیش از اندازه)، ظرفیت‌یابی و اتصال لایه شفاف می‌شود، در حالی که غلظت‌های بیش از حد اثرات مہاری خواهد داشت. علاوه بر این، تعادل صحیح ROS و آنتی‌اکسیدان‌ها برای تراکم کروماتین در اسپرم‌های در حال بلوغ در طول انتقال اپیدیمی مورد نیاز است. تراکم نادرست کروماتین در زمان رسیدن اسپرم به منطقه انتهایی دم اپیدیم با مورفولوژی غیرطبیعی، عملکرد نادرست اسپرم و ناباروری در ارتباط است [۲۶] که در ادامه به شرح این اثرات پرداخته می‌شود.

تأثیر استرس اکسیداتیو بر عملکرد اسپرم

یکی از اولین عملکردها که تحت تأثیر استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها قرار می‌گیرد، تحرک اسپرم است. ارتباط بین تشکیل پراکسید لیپید و حرکت اسپرم در سیستم تولید ROS بارها دیده شده است و همچنین حساسیت تحرک اسپرم به حمله اکسیداتیو را به وضوح نشان می‌دهد. مکانیسم‌های موثر در کاهش تحرک اسپرم در زمان مواجهه با استرس اکسیداتیو همچنان ناشناخته است، اما به نظر می‌رسد که هر دو آسیب اکسیداتیو به آکسونم و کاهش آدنوزین تری فسفات درون سلولی (ATP) در این روند دخیل هستند [۳]. با وجود اثرات چشمگیری که سطوح بالای ROS بر روی حرکت اسپرم دارد،

مشخص است که استرس اکسیداتیو همچنین می‌تواند در شرایطی که اسپرم دارای حرکت طبیعی است، باعث کاهش ظرفیت باروری اسپرم شود [۵۲]. در این شرایط، ظرفیت اسپرم برای اتصال با غشای تخمک دچار نقص می‌شود. از طرفی در سطوح پایین از استرس اکسیداتیو، میزان اتصال اسپرم و تخمک افزایش یافته که احتمالاً به دلیل: (۱) نقش مثبت ROS در حوادث فسفوریلاسیون تیروزین مرتبط با ظرفیت‌یابی اسپرم و (۲) اهمیت اکسیداسیون استرول در تسهیل خروج کلاسترول از غشای پلاسمایی اسپرم می‌باشد [۴۹]. با این حال، در سطوح بالاتر استرس اکسیداتیو القاء پراکسیداسیون لیپید در غشای پلاسمایی با کاهش اتصال اسپرم و تخمک در ارتباط است، که احتمالاً به دلیل القاء مستقیم آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌های درگیر در فرایند اتصال اسپرم و تخمک می‌باشد [۵۳]. این مطالعات اولیه که در آنها اساس عملکرد معیوب اسپرم که اغلب توسط استرس اکسیداتیو، القا شده و بر تحرک این سلول‌ها، یکپارچگی DNA و همچنین اتصال اسپرم با تخمک تأثیرگذار است، در بسیاری از آزمایشگاه‌های مستقل مورد تأیید است [۵۴].

استرس اکسیداتیو و لیپید پراکسیداسیون

به نظر می‌رسد، سرکوب تحرک اسپرم توسط استرس اکسیداتیو، به طور مستقیم با القاء پراکسیداسیون لیپید مرتبط است. هنگامی که ROS به اسیدهای چرب غیراشباع که در غشای اسپرم نسبت به سایر سلول‌ها به وفور یافت می‌شود، حمله می‌کند، انواع متابولیت‌های چربی از جمله رادیکال‌های پراکسیل لیپید، رادیکال‌های آلکسیل و آلدئیدهای مختلف تولید می‌شود. اضافه شدن پراکسید لیپید و آلدئیدهای لیپید به جمعیت اسپرم‌های انسانی منجر به کاهش تحرک سریع این سلول‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌شوند [۵۵]. ممکن است کاهش تحرک وابسته به مراحل باشد که در نهایت منجر به کاهش فسفوریلاسیون پروتئین آکسونمی و

نقش آپوپتوز در آسیب DNA

نظریه مطرح شده دیگر در مورد آسیب DNA اسپرم و اختلال در باروری، آپوپتوز ناموفق می‌باشد. آپوپتوز پدیده ای فیزیولوژیک است که با تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی سلول همراه و باعث هدایت سلول به سمت مرگ سلولی کنترل شده می‌شود و به عنوان مرگ سلولی برنامه ریزی شده شناخته می‌شود. در زمان عدم لقاح، بیشتر اسپرم‌ها به سمت آپوپتوز پیش می‌روند. در سلول‌های سوماتیک، آپوپتوز با تکه تکه شدن گسترده هسته ای به عنوان یک نتیجه از نوکلئاز آزاد شده از میتو کندری (از جمله اندونوکلئاز G) و یا فعال شده در سیتوزول (به عنوان مثال، کاسپاز فعال کننده DNase) مرتبط است. با این حال، اسپرم‌ها از هر نوع سلول دیگری در بیولوژی متمایز می‌شوند، به این دلیل که میتو کندری و قسمت اعظم سیتوپلاسم آن‌ها در بخش میانی اسپرم واقع شده و کاملاً از هسته جدا شده است. بنابراین حتی زمانی که آپوپتوز توسط مهارکننده کیناز PI3 فعال شده است، نوکلئاز در بخش میانی باقی مانده و نمی‌تواند به هسته نفوذ کند. در واقع، حتی در صورت القای آپوپتوز در اسپرم‌های تعلیقی انسان، DNA نمی‌تواند توسط نوکلئاز گسسته شود. تنها محصولات آپوپتوز که قادر به آسیب رساندن به DNA اسپرم هستند، ROS تولید شده توسط میتو کندری می‌باشد. میتو کندری‌ها ژنراتورهای قوی تولیدکننده ROS در اسپرم هستند و این فعالیت باعث افزایش القای اسپرم به سمت وضعیت آپوپتوزی می‌شود. در واقع تولید ROS میتو کندریای یکی از اولین نشانه‌های سلولی درگیر با آبشار آپوپتوزی می‌باشد. به همین دلیل است که به طور طبیعی بیشترین آسیب مشاهده شده در DNA اسپرم، به دلیل فرآیند اکسیداتیو است [۳].

نتیجه گیری

استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از عوامل مهم در ناباروری مردان محسوب می‌شود. استرس اکسیداتیو

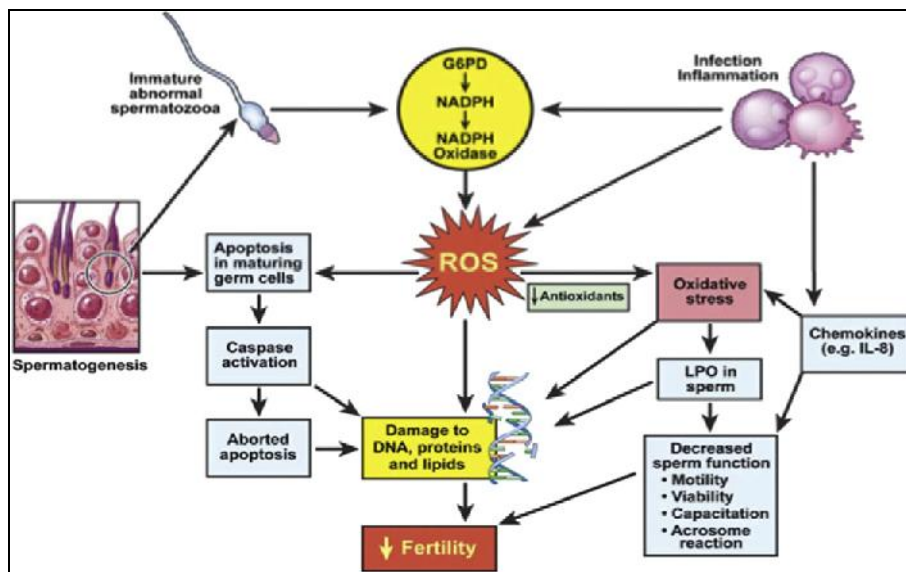
غیرمتحرک شدن اسپرم می‌شوند که هر دو با کاهش سیالیت غشا همراه است. قابل ذکر است که سیالیت غشا جهت اتصال اسپرم به غشا تخمک ضروری است [۵۶]. بنابراین اثر پراکسیداسیون علاوه بر ایجاد آسیب در ساختمان غشای چربی بر توانایی اسپرم‌ها برای شرکت در حوادث اتصال با غشا تخمک نیز تاثیر می‌گذارد [۵۵].

استرس اکسیداتیو دلیل آسیب DNA در اسپرم

پارامترهای اسپرم مانند غلظت، حرکت و مورفولوژی معمولاً برای تعیین پتانسل لقاح اسپرم استفاده می‌شوند [۵۷، ۵۸، ۵۹]. شکست یک یا دو رشته DNA می‌تواند منبع اختلاف پتانسیل تولید مثل بین مردان بارور و نابارور باشد [۳۶، ۶۰، ۶۱]. گزارش شده است که کروماتین در هسته اسپرم نسبت به استرس اکسیداتیو آسیب پذیر بوده و منجر به ایجاد تغییرات و همچنین تکه تکه شدن DNA می‌شود [۳۴، ۶۲]. استرس اکسیداتیو به عنوان عامل اصلی آسیب DNA در اسپرم شناخته شده است. در مطالعات متعدد کاهش سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی و غلظت بالای ROS در منی مردان مبتلا به آسیب DNA بالا، شناسایی شده است [۲۶]. ترمیم DNA در اسپرم محدود است و تنها در مراحل خاصی از اسپرماتوژنز اتفاق می‌افتد. هرچند، مکانیسم‌های ترمیم در جریان تراکم هسته ای در اپیدیدیم فعال نیستند، با این وجود اسپرماتوزا در اپیدیدیم و در حین انتقال در مایع منی در معرض آسیب اکسیداتیو قرار دارد. فرصت بعدی برای ترمیم DNA که گام مهمی در توسعه جنین می‌باشد توسط تخمک انجام می‌شود. با این حال، اگرچه ترکیبات DNA متاثر از استرس اکسیداتیو ممکن است توسط اووسیت قابل بازیابی باشد ولی شکست‌های یک یا دو رشته‌ای DNA ممکن است بازسازی نشوند و در نهایت می‌توانند تاثیر منفی بر باروری و نتیجه حاملگی داشته باشند [۶۳].

فرآیندهای سیگنالینگ برای اطمینان از لقاح مناسب دارند. علاوه بر این، شواهد زیادی مبنی بر اختلال قابل توجه عملکرد اسپرم به دنبال افزایش سطح استرس اکسیداتیو وجود دارد. این اختلال عملکرد اسپرم، از طریق مکانیسم‌هایی شامل ایجاد آسیب پراکسیداسیون به غشای اسپرم، آسیب DNA و آپوپتوز، منجر به ناباروری مردانه می‌شود که در شکل ۳ به اختصار نشان داده شده است [۱۰].

زمانی که غلظت ROS بیش از حد بالا باشد و یا دفاع آنتی‌اکسیدان از بین رود اتفاق می‌افتد و همچنین این شرایط با بسیاری از بیماری‌ها مرتبط است [۱۹]. افزایش غلظت ROS در مایع منی مردان نابارور دیده شده است. مطالعات نشان داده‌اند که غلظت‌های کم و کنترل شده ROS نقش مهمی در فرایندهای فیزیولوژیکی طبیعی اسپرم مانند ظرفیت‌یابی، فعال‌سازی، واکنش‌های آکروزومی و



شکل ۳. مکانیسم استرس اکسیداتیو در اسپرم انسان شامل اختلال در عملکرد اسپرم به روش‌های متفاوت و در نهایت ایجاد ناباروری در مردان [۱۱]

اگرچه مطالعات گسترده‌ای بر روی اثرات بیش از حد استرس اکسیداتیو بر سیستم تولید مثل انجام شده و مشخص گردیده که می‌تواند بر روی پارامترهای اسپرمی و ساختار کروماتین تاثیرگذار باشند ولی مطالعات بیشتری از دیدگاه ژنتیکی جهت شناخت مسیرهای ملکولی درگیر در استرس اکسیداتیو ضروری به نظر می‌رسد.

برای اطمینان از عملکرد فیزیولوژیکی مناسب و همچنین جلوگیری از آسیب پاتولوژیک اسپرماتوزوآ، ROS بایستی در سطوح مناسب باشند، و این مهم تنها با ایجاد تغییرات در شیوه زندگی، مانند توقف مصرف سیگار، محدود کردن مصرف مواد و حفظ رژیم سالم و متعادل میسر خواهد شد [۱۰].

References

- 1- Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013 Jul; 11(1): 66.
- 2- Buzadzic B, Vucetic M, Jankovic A, Stancic A, Korac A, Korac B, et al. New insights into male (in) fertility: the importance of NO. *Br J Pharmacol*. 2015 Mar; 172(6): 1455-1467.
- 3- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl*. 2014 Jan; 16(1): 31.

- 4- Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*. 1992 Feb; 57(2): 409-416.
- 5- De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod*. 1995 Oct; 10(suppl_1): 15-21.
- 6- Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*. 2006 Sep; 86(3): 503-512.
- 7- Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008 May-Jun; 14(3): 243-258.
- 8- Kumar TR, Doreswamy K, Shrilatha B. Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility. *Mutat Res*. 2002 Jan; 513(1-2): 103-111.
- 9- Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajeir N, Lucon AM, Srougi M, et al. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl*. 2007 Jul-Aug; 28(4): 613-620.
- 10- Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM, Alshahrani S, et al. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 May; 12: 33.
- 11- Ko EY, Sabanegh ES, Agarwal A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. *Fertil Steril*. 2014 Dec; 102(6): 1518-1527.
- 12- Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MG, et al. Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int J Androl*. 1999 Aug; 22(4): 236-242.
- 13- Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril*. 2000 Mar; 73(3): 459-464.
- 14- Dawson EB, Harris WA, Teter MC, Powell LC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril*. 1992 Nov; 58(5): 1034-1039.
- 15- Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, et al. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril*. 1995 Oct; 64(4): 825-831.
- 16- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod*. 1998 May; 13(5): 1240-1247.
- 17- Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Hum Reprod*. 1999 Apr; 14(4): 1028-1033.
- 18- Doshi SB, Khullar K, Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Dec; 15:10:109.
- 19- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007 Aug; 39(1): 44-84.
- 20- Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987 Nov; 81(2): 459-469.
- 21- Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996 Dec; 48(6): 835-850.
- 22- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. 2004 Feb; 70(2): 518-522.
- 23- Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Aug; 93(8): 3199-3207.

- 24- Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Mar; 216(1-2): 31-39.
- 25- Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec; 1147: 37-52.
- 26- Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2014 Jun; 28(6): 684-703.
- 27- Rengan AK, Agarwal A, van der Linde M, du Plessis SS. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012 Nov 17; 10: 92.
- 28- Choudhary R, Chawala VK, Soni ND, Kumar J, Vyas RK. Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. *Pak J Physiol*. 2010; 6(2): 54-59.
- 29- Whittington K. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl*. 1999 Aug; 22(4): 229-235.
- 30- Aziz N, Agarwal A, Lewis-Jones I, Sharma RK, Thomas AJ. Novel associations between specific sperm morphological defects and leukocytospermia. *Fertil Steril*. 2004 Sep; 82(3): 621-627.
- 31- Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM. Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility. *Fertil Steril*. 2007 Sep; 88(3): 737-740.
- 32- Will MA, Swain J, Fode M, Sonksen J, Christman GM, Ohl D. The great debate: varicocele treatment and impact on fertility. *Fertil Steril*. 2011 Mar; 95(3): 841-852.
- 33- Tavalae M, Bahreinian M, Barekat F, Abbasi H, Nasr-Esfahani MH. Effect of varicolectomy on sperm functional characteristics and DNA methylation. *Andrologia*. 2015 Oct; 47(8):904-9.
- 34- Bahreinian M, Tavalae M, Abbasi H, Kiani-Esfahani A, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Syst Biol Reprod Med*. 2015 Mar; 61(4):179-86.
- 35- Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Int J Urol*. 2012 Jun; 19(6): 538-550.
- 36- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, et al. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2005 Aug; 11(2):198-205.
- 37- Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod Biomed Online*. 2015 Jan; 30(1):14-27.
- 38- Agarwal A, Deepinder F, Sharma RK, Ranga G, Li J. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: an observational study. *Fertil Steril*. 2008 Jan; 89(1): 124-128.
- 39- Mc Gill JJ, Agarwal A. The impact of cell phone, laptop computer, and microwave oven usage on male fertility. *Male Infertility*. 2014; 161-77.
- 40- De Iuliis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One*. 2009 Jul; 4(7): e6446.
- 41- Desai NR, Kesari KK, Agarwal A. Pathophysiology of cell phone radiation: oxidative stress and carcinogenesis with focus on male reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009 Oct 22; 7:114.
- 42- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *Int J Environ Res Public Health*. 2009 Feb; 6(2): 445-462.
- 43- Hengstler JG, Bolm-Audorff U, Faldum A, Janssen K, Reifenrath M, Götte W, et al. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-

- exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*. 2003 Jan; 24(1): 63-73.
- 44- Kiziler AR, Aydemir B, Onaran I, Alici B, Ozkara H, Gulyasar T, et al. High levels of cadmium and lead in seminal fluid and blood of smoking men are associated with high oxidative stress and damage in infertile subjects. *Biol Trace Elem Res*. 2007 Winter; 120(1-3): 82-91.
- 45- Das M, Al-Hathal N, San-Gabriel M, Phillips S, Kadoch IJ, Bissonnette F, et al. High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age. *J Assist Reprod Genet*. 2013 Jun; 30(6): 843-848.
- 46- Belloc S, Hazout A, Zini A, Merviel P, Cabry R, Chahine H, et al. How to overcome male infertility after 40: Influence of paternal age on fertility. *Maturitas*, 2014 May; 78(1): 22-29.
- 47- Desai N, Sabanegh E, Kim T, Agarwal A. Free radical theory of aging: implications in male infertility. *Urology*. 2010 Jan; 75(1): 14-19.
- 48- Kasahara E, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, Tokuda M, et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biochem J*. 2002 Aug; 365(3): 849-856.
- 49- Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1998 Nov; 59(5): 1037-1046.
- 50- Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil*. 2010 Dec; 13:217-25.
- 51- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci*. 1995 May; 108(5): 2017-2025.
- 52- Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxy-alkenals in human spermatozoa: Relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl*. 1998 Apr; 21(2): 81-94.
- 53- Christova Y, James PS, Jones R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. *Mol Reprod Dev*. 2004 Jul; 68(3): 365-372.
- 54- Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2016; 28(1-2): 1-10.
- 55- Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B, Whiting S, Gharagozloo P, et al. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Mol Hum Reprod*. 2015 Jun; 21(6): 502-515.
- 56- Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004 Mar; 23(2):12.
- 57- Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. *Andrologia*. 2003 Aug; 35(4): 238-43.
- 58- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia*. 2004 Jun; 36(3): 95-100.
- 59- Tavalae M, Deemeh MR, Arbabian M, Kiyani A, Nasr-Esfahani MH. Relationship between fertilization rate and early apoptosis in sperm population of infertile individuals. *Andrologia*. 2014 Feb; 46(1): 36-41.
- 60- Nasr-Esfahani MH, Naghshizadian N, Imani H, Razavi S, Mardani M, Kazemi S, et al. Can sperm protamine deficiency induce sperm premature chromosomal condensation? *Andrologia*. 2006 Jun; 38(3): 92-8.
- 61- Tavalae M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril*. 2009 Apr; 91(4): 1119-26.

- 62- Zribi N, Chakroun NF, Elleuch H, Abdallah FB, Hamida ASB, Gargouri J, et al. Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011 Apr; 9: 47.
- 63- González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci*. 2012 Oct; 13(11): 14026-14052.