

УДК 612.616.2

## ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И УРОВЕНЬ ТЕСТОСТЕРОНА И ЭСТРАДИОЛА В СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ МУЖЧИН С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ ПАТОСПЕРМИИ, ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННЫЙ ПОДХОД

К.Г. САВИКИНА<sup>2</sup>, С.В. ЛОМТЕВА<sup>1</sup>, А.Н. ШЕСТЕЛЬ<sup>2</sup>, К.Ю. САГАМОНОВА<sup>2</sup>, В.Н. ПРОКОФЬЕВ,  
Т.А. ШЕРЧКОВА, А.А. АЛЕКСАНДРОВА, Т.П. ШКУРАТ<sup>1</sup>

e-mail: tshkurat@sfedu.ru

<sup>1</sup>Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, пр. Стачки 194/1  
<sup>2</sup>ООО Центр репродукции человека и ЭКО, Ростов-на-Дону, ул. Бодрая, 90 «А».  
КДЛ «Наука», Россия, 344034, Ростов-на-Дону, Загорская 23а

*Исследована интенсивность свободно-радикальных процессов и уровень тестостерона и эстрадиола в семенной жидкости мужчин с нормоспермией, астенозооспермией, олигозооспермией, олигоастенозооспермией, тератозооспермией. Выявлена повышенная способность к генерации активных форм кислорода в семенной жидкости при олигозооспермии. Увеличение уровня тестостерона и эстрадиола в семенной жидкости отмечено при патоспермиях, связанных с уменьшением подвижности сперматозоидов. Положительная корреляция выявлена между интенсивностью свободно-радикальных процессов и увеличением уровня тестостерона при олигозооспермии, при этой патоспермии отмечен высокий уровень корреляции ( $r=0,8$ ) между уровнем тестостерона и эстрадиола в семенной жидкости.*

**Ключевые слова:** активные формы кислорода (АФК), люминол зависимая хемилюминесценция (ХЛ), семенная жидкость, эстрадиол, тестостерон, окислительный стресс, сперматогенез.

## THE INTENSITY OF FREE RADICAL PROCESSES AND THE LEVELS OF TESTOSTERONE AND ESTRADIOL IN SEMINAL LIQUID MEN WITH DIFFERENT TYPES OF PATIENTS PATHOSPERMIA, PERSONALIZED APPROACH

K.G. SAVICINA<sup>2</sup>, S.V. LOMTEVA<sup>1</sup>, A.N. CHASTEL<sup>2</sup>, K.Y. SAGAMONOVA<sup>2</sup>, V.N. PROKOF'EV,  
T.A. CHERTKOVA, A.A. ALEKSANDROVA, T.P. SHKURAT<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Southern Federal University, Rostov-on-Don, pr. Stachky 194/1

<sup>2</sup> Ltd. Center for Human Reproduction and IVF, Rostov-na-Donu, Bodraya, 90 «A».

<sup>3</sup> CDL «Science», Russia, 344034, Rostov-on-Don, Zagorskaya 23a

*We studied the intensity of free-radical processes and the level of testosterone and estradiol in the semen of men with normospermia, asthenozoospermia, oligozoospermia, oligoasthenozoospermia, teratozoospermia. Spotted an increased ability to generate reactive oxygen species in seminal fluid when oligozoospermia. Increased levels of testosterone and estradiol in semen noted in pathospermia associated with reduced sperm motility. A positive correlation was found between the intensity of free-radical processes and an increase in testosterone levels when oligozoospermia, at this pathospermia marked by a high correlation ( $r = 0,8$ ) between the level of testosterone and estradiol in the seminal fluid.*

**Key words:** reactive oxygen species (ROS), luminol-dependent chemiluminescence (CL), semen, estradiol, testosterone, oxidative stress, spermatogenesis.

doi:10.18522/2218-2268-2015-3-15-21

### Введение

В последние годы многочисленные исследования посвящены изучению влияния окисли-

тельного стресса, активных форм кислорода (АФК) и антиоксидантов на мужскую репродуктивную систему [Громенко, Фархутдинов, Галимов, 2006; Amaral, Ramalho-Santos, 2014; Ломтева с соавт., 2015]. Умеренные количества АФК необходимы для физиологической регуляции

© Савикина К.Г., Ломтева С.В., Шестель А.Н., Сагамонова К.Ю., Прокофьев В.Н., Шерчкова Т.А., Александрова А.А., Шкурят Т.П., 2015.

функций сперматозоидов, гиперактивации и акросомальной реакции [Aitken, Roman, 2008; Lombardo, et al. 2011]. В физиологических условиях сперма производит небольшое количество АФК, которые необходимы для оплодотворения, акросомальной реакции и капацитации. Увеличение интенсивности свободно радикальных процессов рассматриваются некоторыми авторами как ведущая экзогенная причина нарушения процессов сперматогенеза [Божедомов с соавт., 2012].

Молекулярный кислород является естественным субстратом и метаболитом аэробных форм жизни, являясь главным источником энергии, и поэтому не обладает мутагенной активностью в концентрации, не превышающей 20 %, в отличие от его интермедиаторов – активных форм кислорода [Ames et al., 1981; Гуськов, Шкурат, 1985; Halliwell, 1996; Wang et al., 2013]. Повышенная концентрация кислорода и активные формы кислорода способны индуцировать мутации в сперматогониях и сперматозоидах [Гуськов с соавт., 1990; Venkatesh et al., 2011].

Показано, что окислительный стресс может снижать подвижность сперматозоидов, а также препятствовать проникновению сперматозоидов в ооцит [Agarwal et al., 2014]. Окислительный стресс, вызванный повышением АФК или снижением уровня антиоксидантов, в семенной плазме играет важную роль в возникновении нарушений параметров спермы [Appasamy et al., 2007]. Так же известно, что более 25 % бесплодных мужчин имеют повышенный уровень АФК в семенной жидкости [Nadjarzadeh et al., 2013].

Стандартные методы диагностики мужской фертильности, такие как изучение параметров эякулята, куда входят макроскопические, микроскопические, биохимические и функциональные показатели, не всегда позволяют судить о таких причинах мужского бесплодия, как повышенная продукция АФК сперматозоидами.

Цель данной работы – провести сравнительный анализ интенсивности окислительных процессов и уровня выработанных гормонов в семенной жидкости в норме и при патоспермии.

### Методы и материалы

Обследованы 88 соматически здоровых мужчин, в возрасте от 20 до 50 лет, обратившихся в 2014 г. в Центр репродукции человека и ЭКО, города Ростов-на-Дону с проблемой бесплодия в браке и патоспермией в анамнезе. Из этого числа были исключены пациенты с азооспермией, генетическими заболеваниями, наличием вос-

палительных процессов различных этиологий, а также пациенты из пар с не доказанным женским бесплодием. Контрольная группа включала 22 здоровых мужчины с нормозооспермией и с доказанной фертильностью.

Было сформировано пять исследуемых групп: пациенты с нормозооспермией (контроль), астенозооспермией (n=28), олигозооспермией (n=26), тератозооспермией (n=20), олигоастенозооспермией (n=14). Анализ эякулята проводили в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO, 2010). Спермоплазму получали центрифугированием эякулята при 2800 об/мин в течение 10 мин.

В спермальной плазме определяли интенсивность свободно-радикальных процессов и уровень тестостерона и эстрадиола.

Для оценки окислительного статуса плазмы спермы нами был использован метод индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) в системе  $H_2O_2$ -люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион). Последний относят к химическим активаторам ХЛ, он реагирует со свободными радикалами с образованием возбужденных молекул. Люминол, не обладая побочными цитотоксическим действием и фотоэффектами, дает при окислении высокий квантовый выход [Fritzsche, De Weck; 1988] и образует широкий спектр активных форм кислорода. Исследования проведены на автоматическом хемилюминесцентном анализаторе Berthold Autolumat Plus LB 953 (Berthold Technologies, GmbH).

Методом иммуноферментного анализа определяли уровень тестостерона и эстрадиола на автоматическом иммуноферментном анализаторе «ALISEI QS» (Италия) ЦКП «Высокие технологии» ЮФУ.

Статистический анализ результатов проводили с использованием программного пакета Excel и Statistica v.6.0. Сравнение различных данных проведено с использованием критерия Стьюдента и Пирсона ( $\chi^2$ ). Различия признаков считались достоверными при 95 %-м уровне значимости ( $p < 0,05$ ). Для определения взаимосвязи явлений применялся корреляционный анализ по Спирмену с вычислением коэффициента корреляции (r).

### Результаты и обсуждение

По результатам анализа спермограмм и на основании руководства ВОЗ (WHO, 2010) нами были сформированы следующие группы:

1. Нормозооспермия (контроль) – показатели спермограммы соответствуют нормативным значениям;

2. Олигоастенозооспермия – концентрация сперматозоидов менее 15 млн/мл, подвижность А+В менее 40 %;

3. Астенозооспермия – концентрация сперматозоидов в норме, подвижность сперматозоидов А+В менее 40 %, морфология по строгим критериям Крюгера более 4 %;

4. Олигозооспермия – концентрация сперматозоидов менее 15 млн/мл, подвижность сперматозоидов А+В более 40 %;

5. Тератозооспермия – концентрация сперматозоидов в норме, подвижность сперматозоидов А+В более 40 %, морфология по Крюгеру менее 4 %.

В табл. 1 представлены результаты средних показателей концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов в исследуемых группах. Из таблицы видно, что группы достоверно различались по параметрам подвижности и количеству сперматозоидов. Увеличение количества клеток сперматогенеза в группе олигозооспермии свидетельствует о том, что созревание половых клеток в данной группе имеет незавершенный характер.

Таблица 1

Показатели концентрации, подвижности и морфологии сперматозоидов в исследуемых группах

Группы	Показатели спермограмм	Концентрация, млн/мл	Подвижность (%)				Морфология по Крюгеру (N)	Лейкоциты	Клетки сперматогенеза
			A	B	C	D			
Нормозооспермия (контроль)		39,5±6,8	35, 1±5,8	16,1±3,1	7,6 ± 2,5	40,8 ± 8,7	6,0±1,1	0,6± 0,3	0,6±0,2
Олигоастенозооспермия		7,0 ±4,1***	13,3±3,9**	13,2±5,3	11,1±4,6	62,3±9,9*	5,2±1,2	0,6±0,2	0,3±0,1
Астенозооспермия		49,1±8,8	15,1±5,1**	17,4±7,4	10,0 ±2,3	57,3 ±7,8*	4,8±0,8	0,7 ±0,3	0,7± 0,3
Олигозооспермия		10,5±2,1**	29,8±3,4	15,2±4,5	9,0±3,5	46,1±5,5	4,2±0,2	0,5±0,2	1,2±0,6*
Тератозооспермия		31,7±7,5	31,6±3,4	17,2±4,4	8,7±4,1	41,3±7,1	2,6±0,7**	0,6±0,1	0,7±0,3

### *Изучение интенсивности свободно радикальных процессов в сперме у бесплодных мужчин с различными патоспермиями*

Окислительный стресс сопровождает и/или является одним из ключевых патогенетических звеньев в развитии многих видов репродуктивной патологии. Как известно, продукция свободных радикалов и перекисное окисление липидов играют важную роль в регуляции физиологических функций семенника. Многочисленные исследования последних лет показали, что окислительный стресс различной этиологии является основной причиной тестикулярной дисфункции [Aitken, Roman, 2008, Rezvanfar et. al., 2008, Turner, Lysiak; 2008 El-Shahat, Gabr, Meki, 2009]. Окислительный стресс оказывает непосредственное влияние на процессы пролиферации и дифференцировки сперматогенных клеток, индуцирует их апоптоз, нарушает стероидогенез в клетках Лейдига, вызывает гибель эндокриноцитов путем апоптоза [Murugesan et al., 2005, Aktas et al., 2011, Cheng et al., 2012].

Динамику метаболических изменений плазмы спермы оценивали по высоте быстрой вспышки и светосумме. При этом амплитуда (высота) вспышки ХЛ (h), индуцированной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, характеризует резистентность тканей к перекисному окислению. Величина ее прямо пропорциональна окисляемости тканевых липидов и концентрации металлов переменной валентности и обратно пропорциональна содержанию природных антиоксидантов в исследуемом биосубстрате. Светосумма ХЛ (Sm) отражает скорость расходования свободных радикалов липидной природы, вследствие их взаимодействия с антиоксидантами, и обусловлена, в первую очередь, уровнем прооксидантов в системе, а влияние антиоксидантных компонентов носит вторичный характер.

В табл. 2 представлены результаты исследования люминолзависимой хемилюминесценции семенной жидкости пациентов сформированных групп. Как видно из представленных результатов, у всех мужчин с патоспермией, неза-

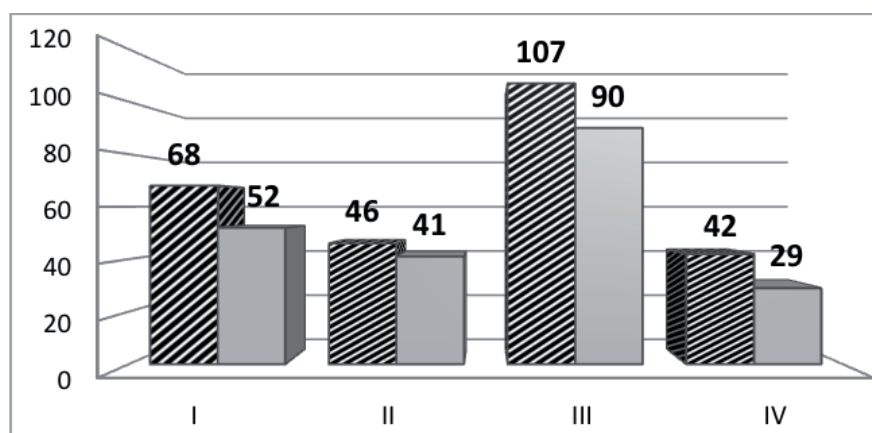
висимо от ее проявления (олигоастенозооспермия, астенозооспермия, олигозооспермия, тератозооспермия), наблюдается достоверное повышение интенсивности свободно-радикальных процессов. При этом в семенной плазме мужчин с олигоастенозооспермией и олигозооспермией высота быстрой вспышки практически в

два раза выше по сравнению с нормозооспермией и равна  $19,82 \pm 2,86$  и  $24,44 \pm 3,06$  мм соответственно. При астенозооспермии высота быстрой вспышки была достоверно увеличена на 46 %, а при тератозооспермии на 42 % по сравнению с контролем (рисунок).

Таблица 2

**Интенсивность свободно-радикальных процессов в сперме у бесплодных мужчин с различными формами патоспермии**

Исследуемые группы	Показатели хемилюминесценции эякулята			
	Высота светосуммы быстрой вспышки $H_2O_2$ -индуцированной люминолзависимой ХЛ	Достоверность по отношению к контролю (P)	Светосумма свечения за 10 сек. $H_2O_2$ -индуцированной люминолзависимой ХЛ	Достоверность по отношению к контролю (P)
Нормозооспермия (контроль)	$11,78 \pm 0,92$		$30,05 \pm 2,36$	
Олигоастенозооспермия	$19,82 \pm 2,86$	<0,02	$45,6 \pm 2,66$	<0,02
Астенозооспермия	$17,25 \pm 1,89$	<0,02	$42,37 \pm 2,68$	<0,02
Олигозооспермия	$24,44 \pm 3,06$	<0,02	$57,01 \pm 2,29$	<0,02
Тератозооспермия	$16,72 \pm 2,43$	>0,05	$38,89 \pm 2,82$	>0,05



■ светосумма быстрой вспышки

Интенсивность изменений хемилюминесценции в плазме спермы при различных видах патоспермии (% к нормоспермии): I – олигоастенозооспермия; II – астенозооспермия; III – олигозооспермия; IV – тератозооспермия

Как видно из полученных данных, если при нормоспермии индивидуальные различия в величине импульса светосуммы быстрой вспышки варьировали в пределах 7,4 – 18,8 (отн. ед. хемилюминесценции), то при астенозооспермии у отдельных пациентов значения этого показателя достигали 36,9 (отн. ед. хемилюминесценции), при тератозооспермии до 41,3 олигоастенозооспермии до 52,1; олигозооспермии до 56,4 (отн. ед. хемилюминесценции). Значительный индивидуальный размах наблюдали и при оценке светосуммы индуцированной хемилюминес-

ценции за 10 с ( $Sm_{10}$  с) при различных типах патоспермии. Так, если при нормоспермии максимальные значения  $Sm_{10}$  с не превышали уровня 59,4 (отн. ед. хемилюминесценции), то при патоспермии у отдельных пациентов этот уровень был существенно увеличен при тератозооспермии до 87,5; олигоастенозооспермии до 102,9 олигозооспермии до 118,2; при астенозооспермии – 380,1 (отн. ед. хемилюминесценции). Механизм  $H_2O_2$ -индуцированной хемилюминесценции образцов тканей основан на взаимодействии  $H_2O_2$  с прооксидантными компонентами, в первую оче-



редь с железосодержащими компонентами, что приводит к образованию активных форм кислорода, таких как: гидроксид-радикал, синглетный кислород и супероксиданион-радикал. Это может вызвать активацию свободно-радикальных процессов, ведущих к образованию перекисных радикалов, рекомбинация которых сопровождается высвечиванием кванта света. При этом амплитуда (высота) вспышки ХЛ (Н), индуцированной  $H_2O_2$ , характеризует резистентность плазмы спермы к перекисному окислению. Величина ее прямо пропорциональна окисляемости липидов и концентрации металлов переменной валентности и обратно пропорциональна содержанию природных антиоксидантов в исследуемом биосубстрате. Светосумма (Sm) хемилюминесценции за 10 с отражает скорость расходования свободных радикалов липидной природы, вследствие их взаимодействия с антиоксидантами, и обусловлена в первую очередь уровнем прооксидантов в системе, влияние антиоксидантных компонентов носит вторичный характер.

Интенсивность свободно-радикальных процессов, состояние антиоксидантной системы в первую очередь зависят от характера метаболических процессов в различных тканях. Большое значение имеют не только абсолютные величины активности про- и антиоксидантных систем, но и их соотношение между собой, а также буферная емкость антиоксидантной защиты. Агрессивные оксиданты повреждают не только ДНК/РНК соматических клеток тела, но и генетический материал гамет. Хронический окислительный стресс приводит к гипоплазии клеток Лейдига [Целуйко, 2008], являющихся главным источником выработки тестостерона. Поэтому следующим этапом нашей работы было изучение уровня тестостерона и эстрадиола в семенной жидкости у мужчин с различными типами патоспермии. В табл. 3 приведены результаты исследований уровня тестостерона (нМ/л) и эстрадиола (пг/мл) в семенной жидкости у бесплодных мужчин с различными типами патоспермии.

Таблица 3

**Уровень тестостерона (нМ/л) и эстрадиола (пг/мл) в семенной жидкости у бесплодных мужчин с различными типами патоспермии**

Исследуемые группы	Количество тестостерона и эстрадиола в семенной жидкости			
	Тестостерон, нМ/л	Достоверность по отношению к контролю, Р	Эстрадиол, пг/мл	Достоверность по отношению к контролю, Р
Нормозооспермия (контроль)	13,83±2,18		51,68±4,82	
Олигоастенозооспермия	15,27±3,73	>0,05	63,13±8,20	<0,02
Астенозооспермия	20,03±1,93	<0,01	68,40±8,41	<0,02
Олигозооспермия	12,90±1,95	>0,05	53,85±4,64	>0,05
Тератозооспермия	14,82±3,26	>0,05	50,57±5,97	>0,05

Как видно из представленных результатов, при астенозооспермии в семенной жидкости отмечено достоверное увеличение уровня тестостерона и эстрадиола, уровень эстрадиола имел тенденцию к увеличению и при олигоастенозооспермии, связанной с нарушением подвижности сперматозоидов. Увеличение уровня гормонов в семенной жидкости при других типах патоспермии не были отмечены, однако индивидуальный уровень у некоторых пациентов был значительно выше или ниже средних значений при нормоспермии.

Эстрогены традиционно рассматриваются в основном как ключевые половые гормоны, выполняющие важнейшие функции в женском организме, однако их роль в мужском организме оказывается не менее значимой, хотя и остается недостаточно изученной. До 80 % эстрогенов в организме мужчины образуются в результате ароматизации из тестостерона. Таким образом, нарушения синтеза и метаболизма тестостерона у мужчин закономерно приводят к нарушениям синтеза и метаболизма эстрогенов. Эстрогены и тестостерон обычно работают совместно,

при этом их функция иногда усиливается еще и эффектами 5 $\alpha$ -дигидротестостерона. Эстрогены поддерживают обратную связь тестикул с гипофизом и способны понижать уровень тестостерона, но без эстрогенов тестостерон оказывает лишь ограниченное влияние на половое поведение [Цицман, 2013].

Для оценки персонифицированной сопряженности свободно-радикальных процессов в семенной жидкости с уровнем выработки половых гормонов проведен корреляционный анализ, результаты которого представлены в табл. 4.

Таблица 4

**Коэффициенты корреляция (r) между исследуемыми параметрами при разных типах патоспермии**

Сравниваемые параметры Тип патоспермии	HSm/Sm	HSm/Тестостерон	Sm/Тестостерон	HSm/Эстрадиол	Sm/Эстрадиол	Тестостерон/Эстрадиол
Нормоспермия (контроль)	<b>0,93</b>	-0,02	-0,04	0,02	0,02	<b>0,6</b>
Олигоастенозооспермия	<b>0,98</b>	0,03	-0,06	0,26	0,2	0,57
Астенозооспермия	0,31	-0,3	-0,09	-0,14	0,24	0,35
Олигозооспермия	<b>0,96</b>	<b>0,7</b>	<b>0,62</b>	0,5	0,4	<b>0,8</b>
Тератозооспермия	<b>0,91</b>	-0,07	-0,2	-0,1	-0,1	0,48

Во всех исследуемых типах патоспермии, за исключением астенозооспермии, получен высокий коэффициент корреляции ( $r=0,91$  и выше) между показателями индуцированной хемилюминесценции в семенной жидкости, суммарной светосуммы свечения и высотой быстрой вспышки (HSm/Sm), что показывает высокую емкость антиоксидантных систем при нормоспермии, олигоастенозооспермии, олигозооспермии и даже тератозооспермии. Отсутствие корреляции параметров HSm/Sm, при астенозооспермии, вероятно, обусловлено различными причинами, приводящими к нарушению двигательной активности сперматозоидов. У одних индивидуумов это может быть связано с возрастанием продукции АФК, которое увеличивается в состоянии полного покоя, за счет разобщения дыхательной цепи митохондрий [Скулачев, 1971], у других снижение подвижности может быть не связано с нарушением синтеза АТФ, а вызвано целым ряд других причин. Таким образом, при астенозооспермии происходит нарушение сопряженности прооксидантных и антиоксидантных процессов, что отражается в отсутствии корреляции всех исследуемых параметров в семенной жидкости.

*Исследования выполнены в рамках проектной части госзадания Министерства образования и науки в сфере научной деятельности № 6.703.2014/К. Аналитическая работа вы-*

*полнена на оборудовании ЦКП «Высокие технологии» Южного федерального университета, грант Министерства образования и науки RFMEFI59414X0002 по теме: «Развитие центра коллективного пользования научным оборудованием “Высокие технологии” ЮФУ для эффективного участия в реализации междисциплинарных проектов по исследованию механизмов управления клеточными функциями для решения фундаментальных и прикладных задач в области биологии и медицины, в том числе регенеративной медицины».*

### Литература

Божедомов ВА, Липатова НА, Спориш ЕА, Рохликов ИМ, Виноградов ИВ. Роль структурных нарушений хроматина и ДНК сперматозоидов в развитии бесплодия. Андрология и генитальная хирургия. 2012; 3: 83–91.

Громенко ДС, Фархутдинов РР, Галимов ШН. Генерация активных форм кислорода сперматозоидами в патогенезе мужского бесплодия. 2006; 12: 1: 28.

Гуськов ЕП, Шкурят ТП. Цитогенетические последствия гипербарической оксигенации в ряду клеточных циклов лимфоцитов периферической крови человека. Генетика. 1985; 21: 8.

Гуськов ЕП, Шкурят ТП, Шиманская ЕИ, Гуськова СС. Влияние гипербарической оксигенации на соматические и генеративные клетки крыс. Цитология и генетика. 1990; 24: 2.

Ломтева СВ, Савикина КГ, Шестель АН, Сагамонова КЮ, Шкурат ТП. Окислительный стресс и мужская репродуктивная система. Валеология, 2015; 1: 59–67.

Скулачев В. П. Энергетические механизмы внутриклеточного дыхания. М.: Наука, 1971; 24.

Целуйко С. С. Влияние низкомолекулярной днк из молок лососевых рыб на семенники крыс при стрессе, вызванном низкими температурами // Дальневосточный медицинский журнал. 2008; 1.

Цицман М. Эстрогены у мужчин. Пленарная лекция. VII Международный конгресс ISSAM. М., 2013.

Agarwal A, Virk G, Ong C, & du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. The world journal of men's health. 2014; 32(1):1–17.

Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2008; 1: 115–124.

Aktas C, Kanter, M. Erboğa et al. Anti-apoptotic effects of curcumin on cadmium-induced apoptosis in rat testis. Toxicology and Industrial Health. 2011; 28: 2: 122–130.

Amaral S, Ramalho-Santos J. Free Radical Biology and Reproductive Health in Diabetes. Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. 2014; 2789–2813.

Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, & Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1981; 78(11): 6858–6862.

Appasamy M, Muttukrishna S, Pizzey AR, Ozturk O, Groome NP, Serhal P, & Jauniaux E. Relationship between male reproductive hormones, sperm DNA damage and markers of oxidative stress in infertility. Reproductive biomedicine online. 2007; 14(2):159–165.

Cheng C, Wang Q, Wang FF, Gao HB, & Zhang P. Stress induces glucocorticoid-mediated apoptosis of rat Leydig cells in vivo. Stress. 2012; 15: 1: 74–78.

El-Shahat AE, Gabr AR, Meki ES. Mehana Altered testicular morphology and oxidative stress induced by cadmium in experimental rats and protective effect of

simultaneous green tea extract. International Journal of Morphology. 2009; 27: 3: 757–764.

Fritzsche R., De Weck AL. Chemiluminescence microscopy reveals functional heterogeneity in single neutrophils undergoing oxygen burst. Eur J Immunol. 1988; 18: 817–820.

Halliwel B. Antioxidants in human health and disease. Annual review of nutrition. 1996; 16(1): 33–50.

Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. Asian J Androl. 2011; 13: 5: 690–697.

Murugesan PT, Muthusami K. Balasubramanian et al. Studies of the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)-induced oxidative damage in Leydig cells. Free Radical Research. 2005; 39: 11: 1259–1272.

Nadjarzadeh A, Mehrsai A, Mostafavi E, Gohari M, Shidfar F. The association between dietary antioxidant intake and semen quality in infertile men. Med J Islam Repub Iran. 2013; 27(4): 204–209.

Rezvanfar MA, Sadrkhanlou A. Ahmadi et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Human & Experimental Toxicology. 2008; 27: 12: 901–910.

Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. Journal of Andrology. 2008; 29: 5: 488–498.

Venkatesh S, Kumar R, Shamsi M, Dudeja S, Gupta N, Dada R. Reactive oxygen species and sperm mitochondrial DNA mutations in infertile patients. J. of Andrology. 2011; 70: 70.

Wang CY, Liu LN, Zhao ZB. The role of ROS toxicity in spontaneous aneuploidy in cultured cells. Tissue Cell. 2013; 45(1): 47–53.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5 th ed. WHO (Geneva). 2010; 270.