

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۳ شماره ۴ مهر و آبان ۱۳۹۰ صفحات ۷-۱۲

اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از کاهش گلوکاتایون القا شده با بوتیونین سولفوکسیمین در طی دوره تکاملی بر روی بیضه و پارامترهای سیمین در موش سوری

شیوا اسدیپور: دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
جعفر سلیمانی‌راد: گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، نویسنده رابط:

E-mail: Soleimanirj@yahoo.com

امیرافشین خاکی: گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
لیلا روشنگر: گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۸۹/۴/۳ پذیرش: ۸۹/۱۰/۵

چکیده

زمینه و اهداف: گلوکاتایون عمده ترین آنتی اکسیدان داخل سلولی محسوب می گردد که بعنوان اولین خط دفاعی علیه رادیکال های آزاد عمل می کند. کاهش گلوکاتایون موجب پیدایش استرس اکسیداتیو شده و تغییراتی را در مراحل تولید مثل، از گامتوژنز تا تکامل جنین ایجاد می کند. هدف از این مطالعه نشان دادن اثرات استرس اکسیداتیو ناشی از کاهش گلوکاتایون بوسیله تزریق بوتیونین سولفوکسیمین طی دوره تکاملی، بر پارامترهای سیمین و هیستولوژی بیضه در موش های نوزاد و بالغ می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۴۰ سر موش سوری ماده با ۲۰ سر موش سوری نر برای جفت گیری استفاده شدند. موشها بطور تصادفی در ۴ گروه ۱۰ تایی شامل گروه کنترل و Experimental نوزاد و بالغ تقسیم شدند. به گروه Experimental از روز دوم حاملگی به میزان ۲ mMol/kg بوتیونین سولفوکسیمین بصورت داخل صفاقی به مدت ۱۵ روز تزریق شد. بیضه نیمی از نوزادان در روز سوم بعد از تولد مورد مطالعه قرار گرفتند و اسپریماتوژنز و پارامترهای مایع سیمین در نیم دیگر نوزادان پس از رسیدن به بلوغ، بررسی شدند.

یافته ها: نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی نشان داد که در موشهای نوزاد گروه آزمایش، قطر لوله های سمینی فر نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. در موش های بالغ، تعداد سلولهای سرتولی و جمعیت سلولهای اسپریماتوژنیک در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. در مورد پارامترهای سیمین در موش های بالغ گروه آزمایش، تعداد اسپرم های با حرکت سریع نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود و تعداد اسپرم های با حرکت کند و مورفولوژی آنرمال نسبت به گروه کنترل بیشتر دیده می شد. همچنین قطر لوله های سمینی فر در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می داد.

نتیجه گیری: فرارگیری جنین در حال تکامل در معرض استرس اکسیداتیو القائی توسط بوتیونین سولفوکسیمین، می تواند باعث کاهش باروری در دوره بلوغ گردد.

کلید واژه ها: گلوکاتایون، بوتیونین سولفوکسیمین، بیضه

مقدمه

تشکیل مواد واسطه رادیکال آزاد شود (۳-۵). همچنین توانایی اکسیداسیون ضروری فسفولیپید و پروتئین های داخل غشا سلولی را دارند که منجر به تخریب سلول و مرگ می شوند. تخریب های اکسیداتیو شامل تغییر ساختار های غشای سلول، DNA و کمپارتمان های دیگر سلول می باشد (۶-۷).

در صورت تجمع گونه های اکسیژن واکنش پذیر (Reactive oxygen specieses, ROS)، شرایط استرس اکسیداتیو (Oxidative stress, OS) بعلت عدم توازن بین سیستم های اکسیدانت و آنتی اکسیدانت ایجاد می شود (۱-۲). ROS می تواند بصورت نامحدود ترکیبات مختلف سلولی را اکسید کند و منجر به

استرس اکسیداتیو ناشی از مواد اکسیدانت می‌تواند در ایجاد کانسر، آماس نوروں ها، اختلال تکاملی، پاتوفیزیولوژی نازائی مردانه و ... دخیل باشد. در مقابله با اثرات مخرب ROS ها، سلول ها از آنتی اکسیدان های درون‌زاد استفاده می‌کنند (۸-۹).

گلوپروتئین (Glutathione, GSH) بعنوان عمده‌ترین آنتی اکسیدان داخل سلولی (۱۰)، یک ملکول تیولی بیولوژیک می‌باشد که بصورت تری پپتید با وزن ملکولی پایین در سلولهای گیاهی و پستانداران به وفور یافت می‌شود (۱۱). این مولکول با داشتن گروه سولفیدریل، نوکلئوفیلی قوی (۱۲) بعنوان اولین خط دفاعی بر علیه ROS و خستگی کردن رادیکالهای آزاد عمل می‌کند (۱۳). به این ترتیب عمل آنتی اکسیدانی خود را از طریق کاهش پراکسیدهای تولید شده و یا کوآنزیم شدن با ترکیبات الکترون دوست اعمال می‌کند و باعث سم‌زدایی انواع مختلف ترکیبات زنبوبایوتیک می‌گردد (۱۳-۱۴).

کمبود GSH و دیگر آنتی اکسیدان های درون زاد، منجر به تجمع ROS و سایر مواد اکسیدانت در محیط‌های بیولوژیک می‌گردد. که می‌تواند اختلالاتی را در مراحل تولید مثل، از گامتوزن تا لانه‌گزینی، تکامل جنین و نیز برخی از پاتولوژی‌هایی که منجر به ناباروری در جنس مذکر و مونث می‌شود، ایجاد کنند (۱).

با توجه به این که اثرات شرایط استرس اکسیداتیو طی دوره تکاملی و مخصوصاً در ارگان‌های خاص بطور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است، از اینرو در این پژوهش بر آن شدیم تا تاثیر کاهش GSH ناشی از تزریق بوتیونین سولفوکسیمین (Buthionine sulfoximine, BSO) در دوره جنینی از نظر تکامل هیستولوژیک بیضه‌ها و اسپرماتوزن را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۴۰ سر موش سوری ماده با ۲۰ سر موش سوری نر با میانگین وزنی ۲۵gr - ۲۰ انتخاب و تحت شرایط استاندارد از نظر آب و غذا (با درجه حرارت حدود ۲۲ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط یکسان سیکل نوری دوازده ساعته روشنایی و دوازده ساعته تاریکی) به مدت ۲ هفته نگه‌داری شدند. چون اهداف مطالعه بررسی اثرات کاهش گلوپروتئین بر بیضه در دو مرحله نوزادی و بلوغ بود، بنابراین موش‌ها در دو گروه آزمایش شامل نوزاد و بالغ و دو گروه کنترل مربوطه مورد بررسی قرار گرفته‌اند. برای این منظور هر دو موش ماده با یک موش نر برای جفت‌گیری در یک قفس قرار گرفته و مشاهده پلاک واژینال بعنوان شروع حاملگی محسوب گردید. به نیمی از موش‌های حامله از دومین روز حاملگی مقدار ۲ mMol/kg BSO بصورت داخل صفاقی (IP) به مدت ۱۵ روز تزریق شد (۱۵). BSO بصورت پودر از شرکت پژوهان طب تهیه شد. سپس محلول تزریقی با استفاده از نرمال سالین تهیه گردید. دوز مورد استفاده بر اساس کار قبلی انجام شده (۱۶) انتخاب شد. نوزادان متولد شده از موش‌های تزریق شده، بعنوان گروه آزمایش و تزریق نشده بعنوان

گروه کنترل منظور و سپس نوزادان نر جدا و در هر گروه ۱۰ سر از نوزادان در سومین روز پس از تولد قربانی شدند و از بیضه آنها نمونه‌برداری شد و برای مطالعه هیستولوژیک آماده شد (گروه نوزاد آزمایش و کنترل) و ۱۰ نوزاد دیگر تحت شرایط استاندارد نگهداری شدند تا به دوره بلوغ برسند و سپس ضمن بررسی پارامترهای سیمین، بیضه آنها نیز تحت مطالعه هیستولوژیک قرار گرفت (گروه بالغ آزمایش و کنترل). برای مطالعه با میکروسکوپ نوری بیضه‌ها در محلول بوئن فیکسه شد و پس از قالب‌گیری در پارافین و مقطع‌گیری، با استفاده از هماتوکسیلین-ائوزین (Hematoxylin and eosin, H&E) رنگ‌آمیزی شدند.

برای مطالعه پارامترهای سیمین، دم‌اپی دیدیم با قسمت ابتدای دفران برداشته شد و به قطعات کوچک تقسیم و پس از قرار دادن در ۱ cc محیط Hams F10 برای نیم ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. سپس اسپرم‌های خارج شده از اپی دیدیم به لام نئوبار منتقل و در زیر میکروسکوپ تعداد، اسپرم‌های متحرک و نرمال و آنرمال شمارش و بصورت درصد محاسبه گردید.

جهت اندازه‌گیری قطر لوله‌های سمینی فر از نرم افزار Motic Image Plus 2.0 استفاده شد و داده‌های بدست آمده به کمک آزمون U - Mann Whitney و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS.15 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. جهت مطالعه میزان تحرک اسپرم‌ها آزمون رابطه مجذور کای استفاده شد. و برای اندازه‌گیری غلظت گلوپروتئین و تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک و سرتولی از آزمون U - Mann Whitney استفاده شد. در این مطالعه مقدار P کمتر از ۰.۰۵٪ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

بررسی میکروسکوپی بیضه در گروه کنترل نوزاد (Control newborn, NC)، نشان داد که لوله‌های بیضه بصورت توپر می‌باشند. لوله‌ها حاوی سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایای بدوی بودند. در موش‌های نوزاد گروه آزمایش (Experimental newborn, NE)، در اکثر لوله‌های سمینی فر تاخیر در تمایز دیده می‌شد و لومن لوله‌ها مشخص نبود (شکل ۱).

- بررسی بیضه در گروه کنترل بالغ (Control adult, AC) حاکی از آن بود که طناب‌های جنسی مجرادار شده و لوله‌های سمینی فر تشکیل شده بودند و سلول‌های اسپرماتوژنیک در مراحل مختلف تکاملی در آنها دیده می‌شدند.

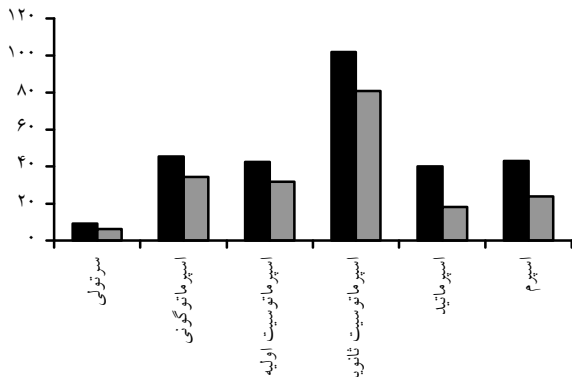
در گروه بالغ آزمایش (Experimental adult, AE)، گروهی که در آن جنین‌های در معرض ۲ mMol/kg BSO (طی دوره تکاملی) تحت مراقبت قرار گرفته و بالغ شده بودند. بررسی بیضه این موش‌ها با میکروسکوپ نوری مشخص کرد که ضخامت اپی‌تلیوم ژرمینال نسبت به گروه بالغ کنترل کاهش یافته بود (شکل ۲) و در لوله‌های سمینی فر مراحل مختلف اسپرماتوزن به علت تخریب اپی‌تلیوم قابل تشخیص نبود. تعداد سلول‌های سرتولی در لوله‌های

می‌باشد که تفاوت مشاهده شده معنی‌دار و بیانگر کاهش اسپرmatوژنیک در گروه آزمایش می‌باشد ($P < 0/01$).
- میانگین تعداد اسپرmatوسیت‌های اولیه در گروه کنترل $9/26 \pm 22/39$ و در گروه آزمایش $8/36 \pm 31/82$ می‌باشد که تفاوت مشاهده شده معنی‌دار بوده و نشان دهنده کاهش تعداد اسپرmatوسیت‌ها در گروه آزمایش می‌باشد ($P < 0/05$).

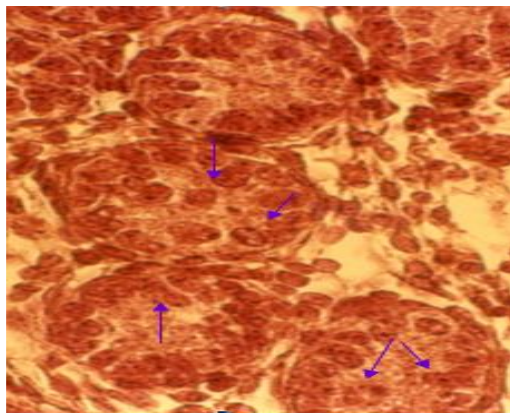
- بررسی‌های آماری نشان داد که میانگین تعداد اسپرmatوسیت‌های ثانویه در گروه کنترل $19/95 \pm 102/59$ و در گروه آزمایش $22/41 \pm 80/79$ می‌باشد. بنابراین کاهش نسبی در تعداد اسپرmatوسیت‌های ثانویه گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ولی این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).

- میانگین تعداد اسپرmatیدها در گروه کنترل $16/06 \pm 40/55$ و در گروه آزمایش $7/08 \pm 18/28$ می‌باشد که ($P < 0/01$) تفاوت مشاهده شده معنی‌دار بوده و بیانگر کاهش تعداد اسپرmatیدها می‌باشد ($P < 0/01$).

- میانگین تعداد اسپرmat‌های بالغ در گروه کنترل $20/76 \pm 43/17$ و در گروه آزمایش $9/17 \pm 23/90$ می‌باشد. که این اختلاف معنی‌دار و بیانگر کاهش تعداد اسپرmat‌ها در گروه آزمایش بود ($P < 0/01$).



نمودار ۱: مقایسه درون گروهی و بین گروهی سلولهای مورد مطالعه



شکل ۱: فتومیکروگرافی از لوله‌های سمینی فر موش گروه نوزاد آزمایش (NE).

سمینی فر گروه AE و AC مشابه بود ولی سلول‌های اسپرmatوژنیک در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود. در اپیتلیوم ژرمینال گروه AE واکوئل‌های بزرگ و کاهش فضای بین سلولی مشاهده می‌شد (شکل ۳).
جهت مطالعات هیستومورفومتریک، مقاطع ۵ میکرونی رنگ‌آمیزی شده با (H&E) مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج هیستومورفومتري

جهت محاسبه قطر لوله‌های سمینی فر در گروه‌های NC و NE در نمونه بیضه از هر موش، قطر ۲۰ لوله سمینی فر در مقطع عرضی اندازه‌گیری شد. سپس میانگین آنها تعیین گردید.

میانگین قطر لوله‌های سمینی فر در گروه نوزادان کنترل $3/02 \pm 0/18$ میکرومتر و در گروه نوزادان آزمایش $3/02 \pm 0/37$ میکرومتر می‌باشد. تفاوت مشاهده شده در میانگین قطر لوله‌های سمینی فر گروه نوزاد کنترل و آزمایش کاهش معنی‌داری را در گروه NE نسبت به گروه NC نشان می‌دهد ($P < 0/001$).

جهت محاسبه قطر لوله‌های سمینی فر در گروه‌های AC و AE، ابتدا اقطار کوچک و بزرگ لوله‌های سمینی فر در مقاطع عرضی ۲۰ لوله سمینی فر در هر موش اندازه‌گیری شد. سپس میانگین آنها تعیین گردید.

۱- اندازه‌گیری قطر لوله‌های سمینی فر در دو گروه نشان داد که در مجموع میانگین قطر لوله‌ها در گروه کنترل $25/13 \pm 1/01$ میکرومتر و در گروه آزمایش $19/77 \pm 1/35$ میکرومتر می‌باشد. تفاوت مشاهده شده در میانگین قطر لوله‌ها بیانگر کاهش معنی‌دار قطر لوله‌های سمینی فر در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($P < 0/001$).

۲- میانگین اندازه اپی‌تلیوم ژرمینال لوله‌های سمینی فر در گروه کنترل $7/12 \pm 0/21$ میکرومتر و در گروه آزمایش $10/31 \pm 0/62$ میکرومتر می‌باشد که تفاوت مشاهده شده در میانگین اندازه اپی‌تلیوم ژرمینال لوله‌ها در گروه‌های کنترل و آزمایش معنی‌دار بوده ($P < 0/001$) و اندازه اپی‌تلیوم ژرمینال لوله‌های سمینی فر در گروه آزمایش کاهش یافته است (شکل ۲).

نتایج هیستولوژیک

جهت تعیین تعداد سلول‌های اسپرmatوژنیک، تعداد این سلول‌ها در مقاطع عرضی ۱۰ لوله سمینی فر برای هر موش مورد شمارش قرار گرفتند که نتایج بدست آمده در نمودار ۱ نشان داده شده است.

- میانگین تعداد سلول‌های سرتولی در گروه کنترل $2/47 \pm 9/27$ و در گروه آزمایش $1/38 \pm 6/29$ می‌باشد که تعداد سلول‌های سرتولی در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل بطور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0/01$).

- میانگین تعداد اسپرmatوگونی‌ها در گروه کنترل $4/55 \pm 45/42$ و میانگین تعداد اسپرmatوگونی‌ها در گروه آزمایش $7/09 \pm 34/45$

تجزیه و تحلیل آماری نشان‌دهنده آن بود که درصد اسپرم‌های با حرکت کند و درجا در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل بیشتر دیده می‌شدند و این اختلاف‌ها از نظر آماری معنی‌دار می‌باشند ($P < 0/001$).

– از نظر مورفولوژی، درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی آنرمال در گروه کنترل ۲۱/۴ درصد و در گروه آزمایش ۵۳/۵ درصد بود. مقایسه آماری ارقام بدست آمده نشان داد که تفاوت در دو گروه از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/001$).

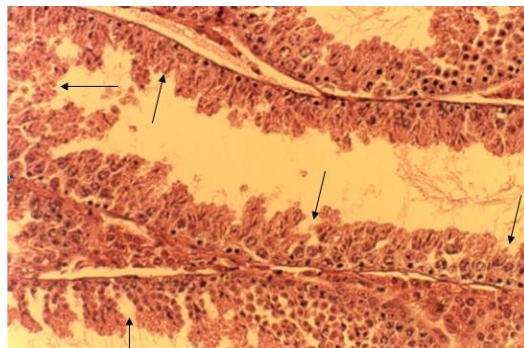
بحث

اسپرماتوزن فرایند بسیار پیچیده‌ای است که عوامل متعددی می‌تواند بر آن اثر کرده و منجر به ناباروری و یا کاهش در میزان باروری در افراد مذکر گردد (۱۶). از جمله آن عوامل، شرایط استرس اکسیداتیو می‌باشد که در صورت تجمع ROS ها، بعلاوه عدم توازن بین سیستم‌های اکسیدانت و آنتی اکسیدانت ایجاد می‌شود (۱). این عوامل همچنین در فیزیولوژی اسپرم و فرآیندهایی مثل بلوغ و ظرفیت یابی اسپرم‌ها نقش مهمی را دارند (۱۲).

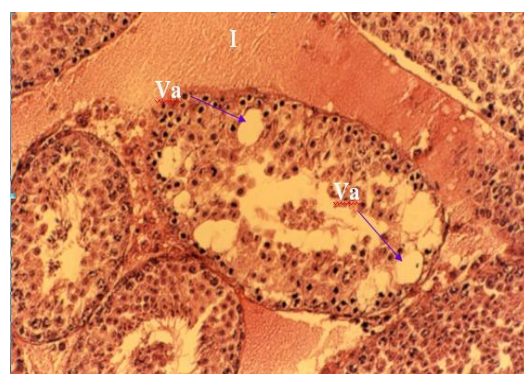
در مطالعه حاضر، اثرات تخریبی استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق BSO بر روی اپی تلیوم ژرمینال لوله‌های سمینی فر نوزادان بصورت زیر مشاهده گردید:

لوله‌های سمین فر در نوزادان تحت تاثیر استرس اکسیداتیو نسبت به گروه کنترل کمتر تمایز یافته بودند و عمدتاً بصورت توپر و اولیه دیده می‌شدند. این امر می‌تواند از اثرات استرس اکسیداتیو بر سلول‌های اسپرماتوگنیا و جلوگیری از تقسیم و تمایز آنها ناشی گردد. بررسی‌های قبلی نیز نشان داده‌اند که ROS می‌تواند بر ستر DNA و RNA در اسپرم اثر گذاشته و عملکرد میتوکندری‌های آنرا مهار کنند (۱۷-۱۸). احتمال دارد که شرایط استرس اکسیراتیو در مورد سلول‌های زایای جنسی نیز به‌همین طریق عمل کرده و تقسیمات و تمایز آنها را مختل نماید. بطوری که تعدادی از اسپرماتوگونی‌ها بر روی غشای پایه دچار آسیب شده بودند، همچنین کاهش در تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت‌های ثانویه، اسپرماتیدها و اسپرم‌های بالغ ملاحظه گردید. در حمایت از یافته‌های ما نشان داده شده که شرایط استرس اکسیداتیو، اثرات مخرب بر تکامل لوله‌های سمینی فر و پاتوفیزیولوژی نازائی در مردان دارد (۸ و ۲). همچنین نشان داده است که استرس اکسیداتیو، اسپرماتوزن را مختل کرده و منجر به ایجاد گامت‌های معیوب با کروماتین تغییر یافته (Remodel) که مخصوصاً مستعد حمله رادیکال‌های آزاد هستند می‌گردد (۱۹) و کاهش در تعداد اسپرماتوگونی‌ها، اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوآ را سبب می‌شود (۲۱-۲۰).

از دیگر یافته‌های بررسی حاضر واکوئولیزاسیون اپی تلیوم ژرمینال در گروه آزمایش و کاهش ضخامت آن در مقایسه با گروه کنترل بود. در توجیه یافته حاضر به نظر می‌رسد که واکوئل‌ها جایگاه



شکل ۲: فتومیکروگرافی از لوله‌های سمینی فر موش گروه بالغ آزمایش (AE). به کاهش اپیتلیوم ژرمینال و بهم ریختگی درون لوله‌ها توجه شود (پیکان‌ها).



شکل ۳: فتومیکروگرافی از لوله‌های سمینی فر موش گروه بالغ آزمایش (AE). واکوئل (Va)، بافت بینابینی (I).

نتایج پارامترهای سیمین

پارامترهای سیمین از قبیل تعداد اسپرم‌ها، تحرک اسپرم‌ها (سریع، آرام، درجا) و مورفولوژی آنها مورد مطالعه قرار گرفتند که نتایج بصورت زیر می‌باشند:

– میانگین تعداد اسپرم‌ها در گروه کنترل $16/67 \pm 71/50$ میلیون در میلی لیتر و در گروه آزمایش $10/86 \pm 52/50$ میلیون در میلی لیتر می‌باشد. که این اختلاف معنی‌دار می‌باشد و در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است.

– از نظر حرکت اسپرم‌ها، درصد تعداد اسپرم‌های متحرک در گروه کنترل ۷۴/۱ درصد و در گروه آزمایش ۶۲/۱ درصد بود. تجزیه و تحلیل آماری نشان‌دهنده آن بود که درصد تعداد اسپرم‌های متحرک در گروه آزمایش بطور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0/001$).

– از نظر میزان تحرک اسپرم‌ها (سریع، آرام، درجا)، درصد اسپرم‌های با حرکت سریع گروه کنترل ۸۶/۲ درصد بود ولی این میزان در گروه آزمایش به ۷۲/۷ درصد کاهش یافته بود. مقایسه آماری ارقام بدست آمده نشان داد که این کاهش معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/001$).

درصد اسپرم‌های با حرکت آهسته در گروه کنترل ۹/۴ درصد و در گروه آزمایش ۲۲/۱ درصد بود. درصد اسپرم‌های با حرکت درجا در گروه کنترل ۴/۳ درصد و در گروه آزمایش ۵/۲ درصد بود.

مکانیسم‌های مختلف شامل: تاثیر روی کانال های Ca^{++} که منجر به پراکسیداسیون غشای بیرونی (۲۵-۲۴) و کاهش ذخایر ATP اسپرماتوزوآ می‌گردد را القا می‌کند (۲۷-۲۶). در مطالعه دیگر نیز نشان داده است که با کاهش سطح گلوکوتاتیون، تحرک اسپرماتوزوآ نیز کاهش می‌یابد (۲۸).

نتیجه‌گیری

برطبق نتایج بدست آمده شرایط استرس اکسیداتیو ایجاد شده در طی دوره تکامل که با تزریق BSO و با کاهش سطح گلوکوتاتیون حاصل شده بود موجب اختلال در تکثیر و تمایز اپی تلیوم ژرمینال شده و اثرات منفی آن بر پارامترهای سیمن تا دوره بلوغ نیز ادامه می‌یابد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای تامین هزینه‌های طرح تقدیر و تشکر می‌نمایند. در ضمن این مقاله استخراج شده از پایان نامه می باشد.

References

- Agarwal A, Saleh R, Bedaiwy M. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 2003; **4**(79): 829-843.
- Mahdavi R, Faramarzi E, Seyedrezazadeh E, Mohammad-zadeh M, Pourmoghaddam M. Evaluation of Oxidative Stress, Antioxidant Status and Serum Vitamin C Levels in Cancer Patients. *Biol Trace Elem Res* 2009; **130**: 1-6.
- Floyd R. Antioxidants, Oxidative Stress, and Degenerative Neurological Disorders. *Society for Experimental Biology and Medicine* 1999; **222**: 236-245.
- Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Ann. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1999; **50**: 601-639.
- Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Cell Biology* 2003; **15**(2): 247-254.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; **30**(6): 620-634.
- Fuji J, Iuchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005; **6**: 3-43.
- Davies K. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life* 2002; **50** (4&5): 279 - 289.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 1997; **82**(2): 291-295.
- Shen HM, Yang CF, Liu J, Ong CN. Dual role of Glutathione in selenite-induced oxidative stress and Apoptosis in human hepatoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; **28**(7): 1115-1124.
- Maher P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Research Reviews* 2005; **4**: 288-314.
- Irvine S. Glutathione as a treatment for male infertility. *Reviews of Reproduction* 1996; **1**: 6-12.
- Pastroe A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinical Chemical Acta* 2003; **333**: 19-39.
- Dickinson D, Jay Forman H. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology* 2002; **64**: 1019-1026.
- Devine P, Sipes I, Hoyer P. Effect of 4-vinylcyclohexene diepoxide dosing in rats on GSH levels in liver and ovaries. *Toxicological Sciences* 2001; **62**: 315-320.
- Nudell DM, Monoski MM, Hipshultz LI. Common medications and drugs: how they affect male fertility. *Urol Clin North Am* 2002; **29**(4): 873-965.
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil. Steril* 1997; **68**: 519-524.
- Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ* 2006; **175**: 495-500.

19. Curry B, Aitken R. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & Redox Signaling* 2010; **10**: 31- 86.
20. Huang F. Melatonin pretreatment attenuates 2-bromopropane-induced testicular toxicity in rats. *Toxicology* 2008; **256**(1-2): 75-82.
21. Son H. Effects of 2-bromopropane on spermatogenesis in the Sprague–Dawley rat. *Reproductive Toxicology* 1999; **13**(3): 179-187.
22. Lacombe A. Delayed testicular aging in pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) null mice. *Biological Science* 2005; **10**: 3793-3798.
23. Wei Y-H, Lee H-C. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med* 2001; **222**: 671-682.
24. Ren D. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 2001; **413**: 603-609.
25. Sakata Y. Ca(v)2.3 (alpha1E) Ca²⁺ channel participates in the control of sperm function. *FEBS Lett* 2002; **516**: 229-233.
26. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of re-active oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med* 1999; **26**: 869-880.
27. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992; **13**: 379-386.
28. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl* 1998; **21**: 81-94.