

Rola dysmutazy nadtlenkowej i wolnych rodników w zaburzeniach płodności męskiej

The role of superoxide dismutase and free radicals in disorders of male fertility

dr n. med. Artur Wdowiak¹, Anita Wdowiak²

¹ Pracownia Technik Diagnostycznych Wydziału Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Polska

² OVUM Rozrodczość i Andrologia, Lublin, Polska

European Journal of Medical Technologies
2013; 1(1): 53-59

Copyright © 2013 by ISASDMT
All rights reserved
www.medical-technologies.eu
Published online 14.10.2013

Streszczenie

Liczne badania prowadzone w ostatnich latach podejmowały próbę wyjaśnienia patomechanizmu niektórych schorzeń koncepcją stresu oksydacyjnego. Istnieją dowody na to, że pewne stany zaburzeń męskiej płodności są związane z nadmiernym wytwarzaniem reaktywnych form tlenu.

Jakkolwiek znane jest szkodliwe działanie wolnych rodników dotyczące męskiego nasienia, to pewne procesy fizjologiczne w nim zachodzące wymagają właściwej ilości reaktywnych form tlenu. Odpowiednie stężenie reaktywnych intermediantów tlenu jest regulowane za pomocą enzymów antyoksydacyjnych, do których należy między innymi dysmutaza nadtlenkowa.

Zaburzenia równowagi w układzie oksydoredukcyjnym w ludzkim organizmie może powodować nadmierną peroksydację lipidów, destrukcję błon i organelli komórkowych, uszkodzenia enzymów i kwasów nukleinowych. Te procesy występujące w męskim układzie rozrodczym powodują osłabienie ruchu plemników, zmniejszają ich żywotność, uszkadzają materiał genetyczny plemnika, a także mogą zaburzać właściwy moment hiperaktywacji i przebieg spermatogenezy.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Artur Wdowiak
Laboratory of Diagnostic Procedures. Faculty of Nursing and Health Sciences, Medical University, Lublin, Poland
Pracownia Technik Diagnostycznych,
ul. Staszica 4/6 Lublin

Słowa kluczowe:

dysmutaza nadtlenkowa,
nasienie, niepłodność

Abstract

The problem of the lack of offspring is a phenomenon which concerns approximately 15% of married couples in Poland. In a half of the cases, the causative agent is the male factor. There is evidence that certain states of male fertility problems are associated with genetic disorders, as well as with an excessive production of reactive oxygen species. An appropriate concentration of reactive oxygen intermediates is regulated by means of antioxidant enzymes, to which belongs, among others, superoxide dismutase (SOD). The disorders of the balance in the oxidoreduction system in the human body may cause an excessive peroxidation of lipids, destruction of cellular membranes and organelles, damage to enzymes and nucleic acids. Tobacco smoking is also an agent weakening the system of the body's defence against oxidants. As a result of nicotine there occur modifications of nitrogenous bases and formation of DNA adducts. The level of natural antioxidants in blood plasma decreases (vit. C and vit. E), and there is an increase in lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in the cardiovascular system. The process of ageing is inseparably associated with the weakening of human antioxidant defence. With age, an increase occurs in the number of the DNA lesions, cholesterol deposits, lipid peroxidation, and atherosclerosis intensifies. An elevated cell membrane lipid peroxidation with age deteriorates the fluidity and functions of the cell and mitochondrial membranes. This leads to electron leakage, and disorders in energy production.

Key words:

superoxide
dismutase, semen,
infertility

Jednym z czynników utrudniających posiadanie potomstwa przez niepłodną parę jest utrata ruchliwości i żywotności plemników w nasieniu, na co wpływ mają między innymi reaktywne formy tlenu.

Reaktywne formy tlenu występują pod postacią rodników tlenowych oraz niebędących rodnikami pochodnych tlenu, takich jak nadutlenek wodoru H_2O_2 czy ozon O_3 . Wolne rodniki są cząsteczkami lub atomami zawierającymi jeden lub więcej niesparowanych elektronów na zewnętrznej orbicie. Substancje te mają właściwości paramagnetyczne, cechuje je wysoka reaktywność i krótki okres półtrwania.

Do reaktywnych form tlenu zalicza się: rodnik wodorotlenowy ($\cdot OH$), nadutlenek wodoru (H_2O_2), rodnik nadutlenkowy ($O_2\cdot^-$), anionrodnik ponadutlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik ozonowy (O_3) oraz nadutlenoazotyn ($ONOO^-$).

Ludzki organizm wytwarza wolne rodniki w warunkach fizjologicznych, a zwiększona produkcja tych substancji występuje w stanach zapalnych, scho-

rzeniach i zaburzeniach komórkowej homeostazy [3]. Podczas zachwiania równowagi pomiędzy stałą produkcją reaktywnych form tlenu a ich likwidacją w enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcjach neutralizacji i zmiatania oraz w wyniku działania antyoksydantów egzogennych powstaje szok tlenowy [6,12].

Zjawisko szoku tlenowego stanowi część patofizjologii niektórych schorzeń przewlekłych i neurodegeneracyjnych, takich jak miażdżycy, choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona. Zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją wolnych rodników a ich likwidacją mogą mieć także etiologię genetyczną, np. w zespole ataksja-teleangiektazja, zespole Blooma, niedokrwistości Fanconiego czy w zespołach Nijmegen [12,20].

Podwyższone stężenie wolnych rodników tlenowych w warunkach stresu oksydacyjnego początkowo stymuluje, a następnie może hamować aktywność enzymów antyoksydacyjnych [1,2].

Wolne rodniki są wytwarzane w procesie łańcuchowym na etapie inicjacji, biorą udział w reakcjach prolongacji i ulegają zanikowi w procesie terminacji.

Podczas reakcji inicjacji substancje niebędące wolnymi rodnikami zmieniają się w wolne rodniki na drodze fotolizy, radiolizy, sonolizy, hemolizy lub reakcji *redox* [21].

Reaktywne formy tlenu mogą wywierać zarówno dobroczynny, jak i szkodliwy wpływ na funkcje nasienia. Zależy to od ich ilości, a także od miejsca, w którym wywierają swe działanie [3,15,46].

Reaktywne formy tlenu w ejakulacie są wytwarzane zarówno przez plemniki, jak i przez leukocyty [4,22]. Związki te mogą stanowić zagrożenie dla plemników [8,9,10,24]. Spowodowane jest to faktem, iż komórki te mają dość niską aktywność enzymów ochronnych [17,18], a ich błony bogate są w reszty wielonasyconych kwasów tłuszczowych mogących łatwo ulec peroksydacji [2,3]. Uważa się, że wolne rodniki mogą zmniejszać ruchliwość plemników, upośledzać niektóre ich funkcje [5,15], a także przyczyniać się do utraty żywotności plemników podczas zamrażania i rozmrażania nasienia przechowywanego w niskich temperaturach [1,17]. Stwierdzono, że czynnik wzrostu neuronów obecny w nasieniu stymuluje plemniki do wytwarzania reaktywnych form tlenu i że stymulacja ta jest dużo większa w przypadku plemników mężczyzn niepłodnych [3].

Dla plemników najbardziej toksyczną substancją z reaktywnych form tlenu jest nadtlenek wodoru. Jego niedostateczny poziom wywołuje unieruchomienie plemników z powodu wyczerpania wewnątrzkomórkowego ATP i osłabienia fosforylacji w obrębie białek błon komórkowych. Nadmierna aktywność nadtlenu wodoru przyczynia się do peroksydacji błon komórkowych i apoptozy komórki [14,21,22].

Plemniki ludzkie w celu uzyskania zdolności do zapłodnienia komórki jajowej przechodzą szereg zmian metabolicznych dotyczących głównie błony komórkowej. Proces ten, określany mianem kapacytacji, zachodzi w drogach rodnych kobiety. W wyniku kapacytacji plemniki osiągają zdolność interakcji ze strukturami wieńca promienistego i później z osłonką przejrzystą owulującego oocytu. W wyniku kapacytacji następuje modyfikacja toru i ruchu gamet, polegająca na zwiększeniu amplitudy i krzywizny uderzenia witki oraz in-

dukcji wzmożonej siły pchania, określanej jako stan hiperaktywnej ruchliwości [2,24].

Jednym z czynników indukujących hiperaktywację i kapacytację jest anionorodnik ponadtlenkowy. Wskazują na to doświadczenia, w których poddawano plemniki działaniu układu ksantyna + oksydaza ksantynowa w obecności katalazy, usuwając nadtlenek wodoru i uzyskując silną hiperaktywację. Dysmutaza nadtlenkowa zapobiegała hiperaktywacji. Doświadczenia te dały podstawy hipotezie, że $O_2^- \cdot$ jest fizjologicznym mediatorem kapacytacji. Plemniki wytwarzają anionorodnik ponadtlenkowy prawdopodobnie dzięki aktywności błonowej oksydazy NAD(p)H, której aktywacja może być sygnałem dla kapacytacji [20].

Duże znaczenie w procesie rozrodczym ma właściwy moment kapacytacji. Przedwczesna kapacytacja zachodząca jeszcze w plazmie nasienia wywołuje wyczerpanie energetyczne plemnika i zmniejsza szansę zapłodnienia. Zachowana równowaga w układzie oksydoredukcyjnym jest czynnikiem odpowiedzialnym za właściwy moment kapacytacji. Przesunięcie tej równowagi w jedną stronę wywołuje uszkodzenie plemnika, a w stronę przeciwną może wyzwolić przedwczesną kapacytację. Jednym z czynników warunkujących zachowanie równowagi jest dysmutaza nadtlenkowa. Jej stężenie w plazmie nasienia jest podobne jak we wnętrzu plemnika [2].

Dysmutaza nadtlenkowa miedziowo-cynkowa jest homodimerem mającym 151 aminokwasów w łańcuchu podjednostki. Identyfikacja struktury podjednostek potwierdzają badania widma EPR i dane krystalograficzne. Względny stopień utleniania atomów miedzi w centrum aktywnym w stanie równowagi dynamicznej nie jest równy temu na początku reakcji, chociaż od niego zależy, co wykazały badania mechanizmu reakcji katalizowanej przez ten enzym. Może to świadczyć o nieidentyczności funkcjonalnej podjednostek.

Badania kinetyki rekonstrukcji enzymu pozbawionego Cu wykazały funkcjonalną kooperację podjednostek. Proces ten można podzielić na dwie fazy: szybkie włączanie jonów miedzi, w którym przyłączenie drugiego atomu jest ułatwione przez przyłączenie pierwszego, po którym następuje wolno postępująca oraz malejąca w miarę zbliżania się do stanu nasycenia (równego 2 atomom miedzi na cząsteczkę dimeru) rekonstrukcja

aktywności i swoistego widma EPR. Z kolei wykazano, że odległość między atomami miedzi w dimerze wynosi 34 Å, co wyklucza ich bezpośrednie oddziaływanie w akcie reakcyjnym. W świetle powyższych faktów wydaje się, że pomimo identyczności podjednostek na skutek zmian konformacyjnych wywołanych dimeryzacją powstaje konformacja optymalna dla uzyskania maksymalnej szybkości reakcji. Podjednostki wiązane są ze sobą niezwykle silnie, jednak bez udziału wiązań dwusiarczkowych, a jedynie za pomocą wiązań van der Waalsa [20].

Podjednostka erytrokuperiny zbudowana jest z ośmiu β antyrównoległych odcinków stanowiących 50% długości łańcucha i tworzących strukturę spłaszczoną baryłki. Reszta cząsteczki składa się z dwóch pętli o nieregularnej strukturze, z których jedna, dłuższa (reszty 49-84), spięta jest z beczułką mostkiem dwusiarczkowym. Centrum aktywne otoczone jest z dwóch przeciwnych stron przez te pętle i zamknięte od tyłu przez ścianę beczułki. Z czwartej strony centrum aktywne jest otwarte, co umożliwia dostęp substratu. Boczna ściana beczułki, wyznaczona przez końce łańcucha i dłuższą pętlę, tworzy miejsce oddziaływania podjednostek.

Metale centrum aktywnego odległe są od siebie o 6 Å i związane przez pierścień imidazolowy His 61 pochodzący z krótszej, nieregularnej pętli. Cynk wiązany jest jeszcze przez dwie reszty histydyny pochodzące z tej samej pętli (His 69 i 78) oraz resztę kwasu asparaginowego (Asp 81) z jednego łańcuchów, z których pochodzą też pozostałe ligandy miedzi (His 44, 46, 118). Ligandy atomu cynku tworzą w nieczynnym enzymie nieco naruszony czworościan foremny, natomiast ligandy miedzi leżą mniej więcej na jednej płaszczyźnie. Osioło, prostopadle do tej płaszczyzny w nieczynnym enzymie zajmuje miejsce woda – jako piąty ligand. Dostęp do szóstej pozycji koordynacyjnej uzupełniającej strukturę ośmiościanu jest unie możliwiony.

Badania krystalograficzne o rozdzielczości 2, 4 Å ujawniły ponadto, że w bezpośrednim sąsiedztwie atomu miedzi, odpowiednio 5, 12, 13 Å od niego, znajdują się łańcuchy boczne 3 aminokwasów zasadowych: Arg 141, Lys 120 i Lys 134, którym przypisu-

je się istotną rolę w elektrostatycznym przyciąganiu substratu. Szczególnie ważna jest guanidynowa reszta Arg 141, której modyfikacja prowadzi do niemal całkowitej inaktywacji enzymu (do 98%) [20]. Dalsze szczegółowe badania wykazały, że reszta argininy bierze udział w wiązaniu drugiego atomu nadtlenu lub drugiej cząsteczki wody w nieczynnym enzymie i odgrywa lokalną orientującą rolę. Natomiast reszty Lys 134 i w mniejszym stopniu Lys 120 kierują na odległość cząsteczkę O_2^- do centrum aktywnego. Poza miejscem wiązania substratu, w niewielkiej odległości od niego, znajduje się drugie miejsce wiązania wody w centrum aktywnym.

Porównanie sekwencji dziewięciu dysmutaz miedziowo-cynkowych pochodzących z organizmu człowieka oraz zwierząt wykazuje obecność w nich dwóch bardzo konserwatywnych rejonów, które odpowiadają pętłom tworzącym ściany kanału centrum aktywnego. Mimo że dysmutaza nadtlenkowa, jak inne kupreiny, jest białkiem kwaśnym o pH=4,8, powierzchnia tego kanału w kształcie litery Y ma wypadkowy ładunek dodatni, co powoduje przyciąganie do centrum aktywnego anionów substratu. Pętla krótsza (reszty 121-144) zawiera wiele istotnych aminokwasów wytwarzających dodatnie pole wektorowe kierujące O_2 do Cu^{2+} i Arg 141, tj. przede wszystkim reszty pary Glu 131 i Lys 134, a także Lys 120. Wszystkie ligandy metali, a ponadto reszty Cys mostka dwusiarczkowego i Arg 141, znajdują się w homologicznych pozycjach we wszystkich kupreinach. Ponadto występujące w dużych ilościach reszty glicyny, znane jako wymuszające strukturę β, znajdują się – jeżeli nie uwzględnić enzymu prokariotycznego – w ponad 80% w pozycjach homologicznych.

W związku z zawartością w dysmutazie nadtlenkowej jonów cynku i miedzi istnieje zależność pomiędzy aktywnością tego enzymu a prawidłową podażą mikroelementów w codziennej diecie [13]. Głównym źródłem cynku w diecie są produkty zbożowe (34%) oraz mięso, wędliny i ryby (33%). Absorpcja tego pierwiastka z diety waha się od 10 do 40% i ma miejsce przede wszystkim w jelicie cienkim. Główną drogą utrzymania homeostazy w przypadku tego pierwiastka jest odpowiednia absorpcja z diety re-

gulowana przez metalotioneinę – niskocząsteczkowe białko zawierające wiele grup SH, syntetyzowane w śluzówce jelita pod wpływem czynników hormonalnych. W warunkach niedoboru cynku zwiększa się jego absorpcja z diety, jak również reabsorpcja cynku wydzielanego z sokiem trzustkowym (enzymy trawienne) i żółcią do światła jelita.

Biodostępność cynku z diety zależy także od jej składu. Białko zwierzęce, niektóre aminokwasy i kwas cytrynowy ułatwiają absorpcję, natomiast żelazo niehemowe i miedź obniżają wchłanianie, współzawodnicząc o miejsca absorpcji. Przy wysokim stosunku molowym fitynianów do cynku i jednoczesnej obecności wapnia tworzą się nierozpuszczalne kompleksy, z których żaden z tych pierwiastków nie może być wykorzystany. Także obecność kwasu szczawiowego i niektórych frakcji błonnika pokarmowego obniża absorpcję cynku [7].

Miedź będąca składnikiem dysmutazy nadtlenkowej występuje w produktach zbożowych, ziemniakach, mięsie i rybach. Absorpcja miedzi z przeciętnej diety kształtuje się na poziomie 50%, przy czym pierwiastek ten wchłaniany jest głównie w dwunastnicy, a także w żołądku i jelicie grubym. Zwiększona podaż żelaza lub cynku obniża wchłanianie miedzi, ponieważ pierwiastki te współzawodniczą ze sobą o miejsca absorpcji. Fruktaza i kwas askorbinowy z uwagi na właściwości redukujące mogą powodować przekształcenie miedzi w postać trudniej absorbowanego jonu miedziawego. Organizm utrzymuje homeostazę miedzi dzięki absorpcji z przewodu pokarmowego, a także wydalaniu z żółcią [2].

Substancje spożywane w codziennej diecie obecne w warzywach, owocach, ziołach leczniczych mogą korzystnie interferować z istniejącą w komórce obroną przed szokiem tlenowym i chemicznym [16]. Podwyższona zdolność odtruwania i przeciwdziałania utleniaczom jest nabywana przez komórkę w wyniku aktywacji odpowiednich genów odpowiedzialnych za ochronę antyoksydacyjną. Ten genetyczny składnik odpowiedzi antyoksydacyjnej odkryto w regionach promotorów wielu genów indukowanych przez szok tlenowy lub stres chemiczny [9]. Kontrola genetyczna tego systemu obrony antyoksydacyjnej polega

głównie na indukcji enzymów w odpowiedzi na szok tlenowy [8].

Dzięki właściwościom przeciwutleniającym wielu roślinnych polifenoli, flawonoidów, lignanów możliwa jest bezpośrednia neutralizacja chemicznych utleniaczy, wolnych rodników, środowiskowych kancerogenów, a w wyniku tego niedopuszczenia do uszkodzeń DNA komórki [10]. Chemoprewencja jest realnym i istotnym elementem homeostazy komórkowej, a tym samym zalecane codzienne spożywanie pięciu posiłków warzywno-owocowych ma głębokie uzasadnienie. Wągowo licząc, zaleca się w sumie około 400 g warzyw i owoców dziennie (nie licząc ziemniaków), przy czym całodzienna dieta ma być lekkostrawna i urozmaicona, a proporcje produktów zgodne z tzw. „piramidą produktów żywnościowych”. Cienki wierzchołek piramidy zajmują produkty mięsne i tłuszcze zwierzęce, natomiast podstawę piramidy stanowią warzywa, owoce i produkty zbożowe. W codziennych posiłkach pobiera się około 40 niezbędnych witamin i mikroelementów.

W przypadku przekroczenia w diecie optymalnego stężenia antyoksydantów przeciwutleniacz może sam wzmacniać reakcje utleniania [25].

Dieta współczesnego człowieka cywilizacji Zachodu daleko odbiega od powyższych zaleceń. W populacji Stanów Zjednoczonych 68% dorosłych i 80% dzieci nie stosuje się do zalecanych pięciu porcji warzyw i owoców dziennie, co powoduje, że od 2 do 20% ludzi dostaje niewystarczające (poniżej 50% zalecanego dziennego pobrania) ilości ośmiu niezbędnych składników diety: witamin B₁₂, B₆, kwasu foliowego, witaminy C, E, żelaza i cynku. Skutkiem tych niedoborów pokarmowych jest uszkodzenie tlenowe DNA i przełamywanie chromosomów.

Nadmierne spożycie alkoholu etylowego stanowi również czynnik zaburzający równowagę oksydoredukcyjną w organizmie. Nadmiar etanolu uszkadza mechanizm przenoszenia glutationu GSH z cytoplazmy do mitochondriów, co wywołuje zaburzenia funkcji oddechowych mitochondriów przy zwiększonym szoku tlenowym [2]. Uszkodzenie łańcucha oddechowego i niewydolność produkcji energii w mitochondriach wywołuje utratę ich integralności,

wyciek cytochromu c i wapnia, co uruchamia apoptozę i prowadzi do śmierci komórki [6]. Apoptozie wywołanej przez czynnik niebędący utleniaczem postępującej śmierci komórkowej towarzyszy wewnętrzkomórkowe utlenianie [4]. Rozważana jest hipoteza udziału reaktywnych form tlenu w inicjacji apoptozy lub we wczesnych fazach apoptotycznej śmierci komórki. Alkohol etylowy jest także odpowiedzialny za indukcję cytochromu CYP2E1 odpowiedzialnego za zwiększone wydzielanie wolnych rodników, co wiąże się z szokiem tlenowym w komórce [22].

Palenie tytoniu jest czynnikiem osłabiającym system obrony organizmu przed utleniaczami. W wyniku objęcia nałogiem nikotynizmu następują modyfikacje zasad azotowych i tworzenie adduktów DNA. Obniża się poziom naturalnych przeciwutleniaczy w osoczu krwi (wit. C i wit. E), a następuje wzrost peroksydacji lipidów (F2-izoprostanów) w układzie krążenia. Palenie tytoniu zaburza transport i metabolizm cholesterolu, a także wywołuje uwalnianie żelaza z ferrytyny. W wyniku palenia papierosów występują modyfikacje białek: unieczynnianie grup sulfhydrylowych, tworzenie białkowych reszt karbonylowych, modyfikacje tyrozyny i tryptofanu w reakcji nitrowania z reaktywnymi formami azotu. U palaczy obniża się aktywność enzymatyczna szeregu kluczowych enzymów i wytwarzają się toksyczne kompleksy (np. GSH-akroleina) [7,13,19,23,25].

Proces starzenia jest nierozłącznie związany z osłabieniem obrony antyoksydacyjnej człowieka. Wraz z wiekiem rośnie liczba uszkodzeń DNA, złogów cholesterolowych i peroksydacji lipidów, a także nasila się miażdżyca. Podwyższona z wiekiem peroksydacja lipidów błon komórkowych pogarsza płynność i funkcje błon komórkowych i mitochondrialnych. Prowadzi to do wycieku elektronowego i zaburzeń produkcji energii [2,3].

Badania zmian aktywności z wiekiem głównego systemu ochrony przed reaktywnymi formami tlenu – dysmutazy nadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej – nie przyniosły jednoznacznych wyników (zmiany związane z wiekiem wydają się zależeć od gatunku, płci, rodzaju tkanki). Ostatnio przeprowadzone badania komórek ludzkiej skóry

i mięśni wydają się wskazywać, że wiek 60 lat jest u zdrowego człowieka granicą, której przekroczenie związane jest z niewydolnością endogennego systemu ochrony przed utleniaczami. Po 60. roku życia system ochrony nie radzi sobie ze skutkami podwyższonego szoku tlenowego, wzrasta poziom utlenionego glutationu GSSG i nadtlenków lipidowych. Aktywność dysmutazy nadtlenkowej, katalazy i peroksydazy glutationowej maleją z wiekiem.

Większość dotychczasowych doniesień naukowych sugeruje znamienny wpływ dysmutazy nadtlenkowej i wolnych rodników na proces ludzkiego rozrodu. Wiele zjawisk z tym związanych jest niewyjaśnionych i wymaga dalszych badań naukowych.

Piśmiennictwo

1. Acosta SA, Vargas ES, Cuya VM, Gonzalez RJ, Gutierrez SR. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 2013; 79: 842–6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.12.012. Epub 2013 Feb 1.
2. Aktan G, Dogru-Abbasoglu S, Kucukgergin C, Kadioglu A, Ozdemirler-Erata G et al. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril* 2012 Dec 17. pii: S0015-0282(12)02457-0. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.045.
3. Atig F, Kerkeni A, Saad A, Ajina MJ. Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *J Assist Reprod Genet* 2013 Jan 25. doi: 10.1007/s10815-013-9936-x.
4. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006; 21: 2876–2881.
5. Bungum M, Bungum L, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian J Androl* 2011; 13: 69–75. doi: 10.1038/aja.2010.73. Epub 2010 Nov 8.
6. Dobrzyńska MM, Tyrkiel E, Derezińska E, Ludwicki J. Is concentration and motility of male gametes related to DNA damage measured by comet assay? *Ann Agric Environ Med* 2010; 17: 73–7.

7. Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA. Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clin Biochem* 2009; 42: 589–94. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.11.012. Epub 2008 Dec 6.
8. Encisio M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod* 2013 Mar 22. doi: 10.1093/humrep/det077.
9. Erenpreiss J, Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl* 2008; 10: 786–90. doi: 10.1111/j.1745-7262.2008.00417.x.
10. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 2006; 8: 11–29.
11. Khadem N, Poorhoseyni A, Jalali M, Akbary A, Heydari ST. Sperm DNA fragmentation in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2012 Dec 20. doi: 10.1111/and.12056.
12. Kłuciński P, Wójcik A, Grabowska-Bochenek R, Mazur B, Hrycek A et al. Erythrocyte antioxidant parameters in workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation. *Ann Agric Environ Med* 2008; 15: 9–12.
13. Li WW, Li N, Wu QY, Xia XY, Cui YX et al. Cigarette smoking affects sperm plasma membrane integrity. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2012; 18: 1093–6.
14. Ménéz Y. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod BioMed Online* 2007; 14: 418–421. www.rbmonline.com/Article/2669 on web 28 February 2007.
15. Murawski M, Saczko J, Marcinkowska A, Chwiłkowska A, Gryboś M et al. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45 (Supp. 1): 123–126.
16. Nagy S, Johannisson A, Wahlsteen T, Ijas R, Andersson M et al. Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology* 2013 Mar 21. pii: S0093-691X(13)00064-2. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.011.
17. Omran HM, Bakhiet M, Dashti MG. DNA integrity is a critical molecular indicator for the assessment of male infertility. *Mol Med Rep* 2013 Mar 21. doi: 10.3892/mmr.2013.1390.
18. Pan F, Xu ZP, Shi L, He Z, Gong CK et al. Seminal parameters at different times of reanalysis of the normal semen samples detected in initial examination and their correlation with sperm DNA damage. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2013; 19: 63–7.
19. Panasiuk L, Mierzecki A, Wdowiak L, Paprzycki P, Lukas W et al. Prevalence of cigarette smoking among adult population in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* 2010; 17: 133–8.
20. Shamsi MB, Venkatesh S, Kumar R, Gupta NP, Malhotra N et al. Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian J Biochem Biophys* 2010; 47: 38–43.
21. Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H et al. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin Biochem* 2011; 44: 319–24. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.11.009. Epub 2010 Dec 8.
22. Tartibian B, Maleki BH. Correlation between seminal oxidative stress biomarkers and antioxidants with sperm DNA damage in elite athletes and recreationally active men. *Clin J Sport Med* 2012; 22: 132–9. doi: 10.1097/JSM.0b013e31823f310a.
23. Wu JQ, Li YY, Gao ES, Rong F, Zhou JS et al. The influence of smoking on the routine parameters of semen quality. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2012; 33: 1228–32.
24. Zelen I, Mitrović M, Jurisic-Skevin A, Arsenijević S. Activity of superoxide dismutase and catalase and content of malondialdehyde in seminal plasma of infertile patients. *Med Pregl* 2010; 63: 624–9.
25. Zhu Z, Xu W, Dai J, Chen X, Zhao X et al. The alteration of protein profile induced by cigarette smoking via oxidative stress in mice epididymis. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45: 571–82. doi: 10.1016/j.biocel.2012.12.007. Epub 2012 Dec 20.