

STRESS OXYDATIF ET INFERTILITÉ MASCULINE : PREMIERS RÉSULTATS DE L'EXPÉRIENCE ALGÉRIENNE PILOTE À L' HMRUO/2°RM.

F. Haiba, K. Kerboua, N. Ait Hami, L.Benmahdi
Projet de l'Assistance Médicale à la Procréation, HMRUO, Algérie

Résumé

Alors que l'infertilité masculine est impliquée dans 50% des cas d'infertilité, aucune cause ne peut être diagnostiquée chez environ 25% de ces hommes. Ceci est communément indiqué par «l'infertilité idiopathique» et est liée par plusieurs études au stress oxydatif en raison de l'effondrement des défenses antioxydantes protectrices du pouvoir fertilisant des spermatozoïdes chez ces patients. La présente étude visait à évaluer la relation entre la qualité du sperme analysée en terme de peroxydes lipidiques totaux TP, la capacité antioxydante totale TAC et la lipocaline des neutrophiles gélatinase-associée Lcn-2 dans l'infertilité idiopathique. Le plasma séminal et sanguin de 44 sujets, comprenant des sujets fertiles et infertiles ont été évalués pour les TP par le malondialdéhyde assay (MDA), la TAC par le dosage de l'oxygène réactif absorbance capacité (ORAC) et finalement la Lcn-2 par un dosage immunofluorimétrique. Nous trouvons que la Lcn-2 est plus élevée chez les hommes infertiles que les témoins mais pas significative statistiquement ($p = 0,098$). Cependant, les MDA spermatiques étaient 1,7 fois élevés ($p = 0,000$), tandis que le TAC était 1,79 fois plus faible ($p=0,003$) chez les infertiles que les fertiles sans aucune corrélation avec les spermogrammes correspondants. Nous avons constaté une forte corrélation entre la diminution de la TAC plasmatique et l'augmentation des MDA spermatiques ($r = -0,753$, $p = 0,000$); ainsi, avons-nous déterminé une valeur seuil ORAC de 1,035 m mol Eq AA /L associée à une toxicité spermatique par les MDA (Se = 100%, Sp= 94,4%; AUC = 0,965, $p = 0,000$). En conclusion, les taux élevés de MDA spermatiques et le niveau faible de la TAC jouent un rôle important dans l'étiologie de l'altération du sperme dans l'infertilité idiopathique. L'ORAC plasmatique pourrait être un bio-marqueur utile pour l'évaluation des dommages oxydatifs spermatiques et le suivi d'une éventuelle thérapie anti-oxydante.

Mots clés: l'infertilité idiopathique, ORAC, Lcn-2, malondialdéhyde, spermogramme, bio-marqueur, stress oxydatif.

Abstract:

Male infertility is a factor in 50% of cases but no cause can be diagnosed in approximately 25% of infertile males, which is termed 'idiopathic infertility' and linked by several studies to oxidative stress as a result of the reduced antioxidant capacity. The present study aimed to assess the relationship between semen quality analyzed in term of total lipid peroxides, the total antioxidant capacity and plasmatic neutrophil gelatinase associated Lipocalin Lcn-2 in idiopathic infertility. Seminal and blood plasma of 44 subjects including fertile and infertile men were evaluated for the total peroxide lipids by malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TAC) by Oxygen reactive absorbance capacity (ORAC) assay and Lcn-2 by immunofluorimetric assay. Plasmatic Lcn-2 was higher in infertile than control men but not statistically significant ($p=0,098$). However, seminal MDA was 1.7 fold higher ($p=0,000$) while TAC was 1.79 fold lower ($p=0,003$) in infertile men than fertile men without any correlation with sperm parameters. We found a strong correlation between the increasing of plasmatic TAC and MDA in seminal plasma ($r = -0,753$; $p=0,000$); thereby, we have determined an ORAC cut-off of 1,035 m mol ascorbic acid eq /l associated with sperm toxicity by MDA (sensitivity=100%, specificity=94,4%; AUC=0,965, $p=0,000$). Elevated seminal plasma MDA, and low TAC may have significant role in the etiology of sperm abnormality, and the plasmatic ORAC rather than plasmatic Lcn-2 is the useful biomarker to assess sperm oxidative damage. This may be exploited as a biomarker of an antioxidant therapy.

Key words: Idiopathic infertility, ORAC, Lcn-2, malondialdehyde, sperm parameters, oxidative stress biomarker.

1. INTRODUCTION

L'infertilité masculine est une affection relativement commune qui touche environ un homme sur 20. Alors que plusieurs situations peuvent la causer comme les problèmes obstructifs, hormonaux, immunologiques et la varicocèle ; des causes identifiables ne peuvent pas être trouvés dans plus de 25% des cas, et qui sont indiqués par l'infertilité idiopathique dont l'une des causes majeures est le stress oxydatif (SO), qui non seulement perturbe l'intégrité de l'ADN des spermatozoïdes, mais aussi limite le potentiel de fertilisation de ces cellules. La notion évoquant le SO comme facteur dans l'étiologie de l'infertilité masculine dans notre espèce a été avancé de façon indépendante par Aitken et Clarkson et Alvarez et al. en 1987.

La présence d'acides gras polyinsaturés (PUFA) dans les membranes des spermatozoïdes et la grande affinité des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à leurs structures jouent un rôle important

dans le maintien de la balance oxydant-antioxydant pendant leurs fonctions normales. Un déséquilibre en faveur de l'oxydation provoque des anomalies structurales des spermatozoïdes et une réduction de la capacité de conjugaison spermatozoïdes-ovocytes, ce qui entraînerait une réduction du taux de la fécondation. Lorsque les ROS attaquent les PUFA au niveau la membrane cellulaire, elles déclenchent une cascade de réactions chimiques appelées la chaîne de peroxydation lipidique où un composé porteur d'un électron non apparié réagira avec un autre composé pour produire un électron non apparié, de telle manière que "un radical engendre un radical". Ces réactions se déroulent en trois étapes principales; initiation, propagation et résiliation. L'un des produits intermédiaires de ces réactions est le malondialdéhyde (MDA) qui se fixe sur les bases de l'ADN et les endommage. Ce sous-produit a été utilisé comme bio-marqueur pour surveiller le degré de la peroxydation et des dommages subis par les spermatozoïdes par plusieurs scientifiques.

Le H₂O₂ est considéré comme l'inducteur classique de ces réactions dans plusieurs pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, l'inflammation, le diabète, le vieillissement et l'infertilité masculine. Seulement que le SO lui-même induit l'expression de la Lcn-2, un facteur cyto-protecteur contre la toxicité du radical H₂O₂ et qui est associée à l'expression de la superoxyde dismutase 1, 2 et de l'hème oxygénase-1 (HO-1), une molécule bien connue pour sa capacité antioxydante. La Lcn-2 ou la lipocalin-2, également connue sous le nom neutrophile lipocaline associée à la gélatinase (NGAL), est une protéine de 25-kDa, membre de la superfamille lipocaline et sécrétée essentiellement par le système immunitaire en particulier les polynucléaires. Ces derniers, qui représentent 50 à 60 % des leucocytes séminales, peuvent être activés en réponse à différents stimuli tels que l'infection et l'inflammation et produire jusqu'à 100 fois de quantité de ROS par rapport aux leucocytes non-activés. Les dommages des ROS produits par ces cellules sur les spermatozoïdes, se produisent si les concentrations des leucocytes spermatiques sont anormalement élevées, comme dans le cas de la leukocytospermie ou si le plasma séminal est éliminé lors de la préparation des spermatozoïdes pour ART.

Nous précisons que les spermatozoïdes sont protégés contre les ROS par les antioxydants qui piègent les ROS produites par ces leucocytes ce qui évite la fragmentation de l'ADN, améliore la qualité du sperme chez les fumeurs, réduit les cryo-lésions de spermatozoïdes et par conséquent améliore les résultats des techniques de reproduction assistée (ART). Trois systèmes antioxydants différents jouent des rôles importants et interdépendants assurent cette protection chez l'homme: les antioxydants alimentaires, les antioxydants endogènes, et les protéines liant les métaux; rassemblées sous le fameux terme de la TAC dont plusieurs techniques ont été développées pour sa mesure y compris l'ORAC.

Pendant la dernière décennie, il ya eu une croissance phénoménale des connaissances sur la reproduction masculine, la fonction des spermatozoïdes et le développement d'outils de diagnostic et de modalités de traitement, mais aucune étude jusqu'à présent n'a évalué l'implication du SO dans l'infertilité masculine chez la population algérienne.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

En raison de la nature de l'étude, un consentement écrit a été obtenu des sujets sains et infertiles. Ce travail a été réalisé dans l'unité d'immunologie de l'hôpital HMRUO.

Sujets: Cette étude prospective inclus 35 patients masculins consécutifs participant à la consultation andrologique pour l'assistance médicale à la procréation. Au début, le Professeur F. HIBA vérifie l'historique médical complet avec examen clinique des caractères sexuels secondaires et les

malformations génitales congénitales et / ou acquises du mari et la femme. Huit hommes appariés selon l'âge ayant un enfant dans l'année précédente et ayant le nombre de spermatozoïdes plus de 20 millions / ml avec la mobilité plus de 50% de progression en flèche ont été choisis parmi le personnel militaire de l'hôpital, et sont considérés comme groupe témoin fertile selon les critères l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) [1].

Le profil hormonal de chaque patient a été étudié, y compris la FSH, la LH, la testostérone, et la prolactine. Dans les cas où des malformations supplémentaires ont été soupçonnés et l'examen physique était insuffisant ou suspect du scrotum, transrectale et / ou échographie abdominale ont été réalisés. Des cas d'infertilité liés à des causes connues, telles que la varicocèle, les pathologies hormonales et / ou obstructives ont été exclus de l'étude. D'autres sujets ont été exclus s'ils avaient été stériles pour moins de 1 an et le reste était considérés comme infertiles idiopathiques.

Les échantillons du sperme: Ils ont été collectés et analysés comme décrit ci-dessous. Deux échantillons de sperme ont été prélevés à partir de chaque patient à un intervalle compris entre 1 et 3 semaines. Quand un écart de 20% dans la concentration de spermatozoïdes, la mobilité et / ou de la morphologie est trouvé entre les deux échantillons, un troisième échantillon est prélevé. Les spermés ont été produits par masturbation et recueillis dans des récipients en verre propres après au moins trois jours d'abstinence. Des aliquotes de sperme liquéfié ont été centrifugées à 4000 rpm pendant 20 min et leurs surnageants ont été stockés à -35 ° C afin de mesurer leur TAC et TP.

Les échantillons de sang: Les participants avec 10-12 h de jeûne, ont été placés dans une position en décubitus et des échantillons d'environ 5 cm³ ont été retirés d'une veine du coude dans des tubes à héparines. Tous les échantillons de sang ont été prélevés dans la matinée entre 8:00 à 10:00 heures. Ensuite ils ont été immédiatement centrifugés à 3000 rpm, pendant 10 min. Le plasma séparé et stocké à -35 ° C jusqu'à l'analyse de leurs TAC, TP et Lcn-2.

Le spermogramme: Le volume de l'éjaculat (ml), la concentration du sperme ($\times 10^6$ / ml), la mobilité en avant (%), et la morphologie (% de formes atypiques) ont été réalisés selon les critères de l'OMS 2010 [1] après la liquéfaction du sperme. Les échantillons ont été placés à 37 ° C et analysés dans un délai de 2 h, par le même biologiste.

L'évaluation de la TAC: la TAC des plasmas séminaux et sanguins a été mesuré par la technique ORAC avec une dilution calculée selon un protocole mis au point par le Dr. K.KERBOUA. L'analyse ORAC a été réalisée sur le Victor²D du Perkin Elmer avec des filtres de la fluorescence (Ex: 485 nm; Em: 520 nm). Dans le mélange finale de d'essai (200 µl de volume total) Na-Fluorescéine (12, 5 nM) a été utilisé en tant que cible d'attaque des radicaux libres, avec APPH et H₂O₂-Cu²⁺ (H₂O₂ à 0,3%; CuSO₄ x

5H2O2, 0,9 mM) comme générateur de radicaux libres. Les échantillons ont été thermostatés et le spectrofluorimètre a été programmé pour enregistrer la fluorescence de FL toute les 30 secondes pendant 35 minutes. Toutes les mesures de fluorescence ont été exprimées par rapport à la lecture initiale. Les résultats définitifs ont été calculés en utilisant les différences de surfaces sous les courbes de décroissance FL entre le blanc et un échantillon et exprimés en millimoles d'équivalent d'acide ascorbique par litre.

Les peroxydes lipidiques totaux: les niveaux de MDA sanguins et spermatiques ont été mesurés par la méthode à l'acide thiobarbiturique avec formation d'un produit de couleur rose, qui peut être mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 532 nm et exprimé en mmol H2O2/l [2].

La lipocaline associée à la gélatinase neutrophile plasmatique: La Lcn-2 a été évaluée par la technique immuno-Fluore-chromaographie du Triage NGAL en utilisant la plate-forme Triage® mètres, Biosite International Sarl, Morges Suisse, pour détecter spécifiquement la NGAL humaine. Le dosage a été effectué selon le protocole du fabricant. En bref, 250 ul de l'échantillon est appliqué dans le dispositif qui sera insérer dans le Triage Meter Pro et le résultat est imprimé directement en quinze minutes rapporté en ng / ml.

L'Analyse statistique: Elle a été effectuée par Statistical Package for Social Sciences, SPSS, version 20, Chicago, SPSS, Inc. Les résultats ont été rapportés en moyenne ± SD. Les comparaisons entre les deux groupes ont été testées par des tests t de Student pour échantillons indépendants non appariés car les variables ont distribution normale. Un intervalle de confiance de 95% a été utilisé. Les corrélations entre deux variables continues ont été évaluées à l'aide des coefficients de Pearson. Les courbes ROC ont été utilisés pour déterminer les valeurs seuils avec une sensibilité et une spécificité donnée. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Cependant, les valeurs moyennes de TAC et TP pour les plasmas sanguins ne sont pas significativement différents entre les groupes de

patients et de contrôles. Les différences statistiquement significatives entre les hommes

3. Résultats Sept patients sur 35 patients infertiles ont été exclus de l'étude. Les raisons de l'exclusion sont résumées dans le tableau 1. L'étude a inclus 28 patients diagnostiqués selon les critères de l'infertilité idiopathique. L'âge moyen du groupe de patients infertiles idiopathique et le groupe témoin était $31,03 \pm 4,94$ (intervalle : 21-39) et $31,30 \pm 3,95$ (intervalle : 22 - 40) ans, respectivement. Les différences entre les groupes n'étaient pas statistiquement significatives.

Les spermogrammes des groupes de patients et de contrôle sont indiqués dans le tableau 2. La concentration de spermatozoïdes ($\times 10^6$ / ml), le pourcentage de la mobilité (a + b), le pourcentage de formes normales, et le volume (cc) dans le groupe de patients étaient significativement plus faible que dans le groupe témoin.

Les valeurs moyennes de la TAC et des TP spermatiques et sanguins sont présentées dans le tableau 3 pour les groupes d'étude et de contrôle. Dans les deux groupes, la TAC était significativement plus élevée (environ 8 à 9 fois plus) dans le plasma séminal par rapport au plasma sanguin et les MDA étaient plus faibles dans le plasma séminal par rapport au plasma sanguin. Les différences entre le plasma séminal et le plasma sanguin en fonction des valeurs moyennes de TAC et TP étaient statistiquement significatives dans les deux groupes. Les niveaux de MDA séminal ($1,31 \pm 0,03$) était 1,7 fois plus élevés ($p = 0,000$) chez les sujets infertiles que les fertiles ($0,77 \pm 0,06$)

alors que les niveaux séminaux de la TAC ($1,48 \pm 2,03$) étaient significativement plus faible ($p = 0,003$) chez les hommes infertiles que les fertiles ($2,66 \pm 1,02$). La Lcn-2 plasmatique ($62,53 \pm 8,02$) est plus élevée chez les hommes infertiles que le groupe témoin ($50,31 \pm 12,3$), mais pas d'une valeur statistiquement significative ($p=0,098$).

Nombre de patients	Raison de l'exclusion
1	Agrégation de sperme (auto-immunité)
3	Varicocèle
1	Raisons hormonales
1	Raisons obstructives
1	Autre (âge, facteur féminin, infection urinaire, etc)

Tableau 1. Raisons d'exclusion pour cette étude

infertiles et fertiles sont indiquées dans le tableau 4, ainsi que leurs valeurs significatives.

Une corrélation négative a été trouvée entre TP spermatique et TAC sanguin ($r = -0,753$, $p = 0,000$). Figure 1a. Neuf patients ont approximativement une quantité minimale de MDA + SD calculé dans le groupe de contrôle avec une valeur de l'ORAC très élevée.

En utilisant les courbes ROC, nous avons calculé une valeur seuil ORAC de 1,035 pour prédire la qualité du avec un 100% de sensibilité et 94,4% de spécificité (AUC = 0,965, $p = 0,000$). Figure 1b.

4. DISCUSSION:

Comme prévu, les résultats des spermogrammes des sujets infertiles (nombre de spermatozoïdes,

	Patients	Contrôles	p
Concentration (x106/ml)	22,19±10,0	49,26±10,86	0,005
Mobilité (a+b) (%)	37,53±12,76	55,06±6,25	0,009
Morphologie (%)	50,05±18,15	59,16±7,65	0,023
Volume (cc)	2,93±0,51	3,90±0,87	0,015
pH	8,83±0,35	7,15±0,32	0,11

Tableau 2. Caractéristiques spermatisques des groupes de patients et de contrôle infertiles idiopathiques. p; test t de Student pour échantillons indépendants.

Paramètres		Sperme	Sang	p₁
TAC	G1	1,48±2,03	0,22±0,02	0,003
(mmol AA equiv./l)	G2	2,66±1,02	0,3±0,14	0,009
	p₂	0,003	0,505	
Lcn-2 (ng/ml)	G1	TNA	62,53±8,02	ND
	G2	TNA	50,31±12,3	ND
	p₂	ND	0,098	
MDA(mmol H ₂ O ₂ /l)	G1	1,31±0,03	1,38±0,08	0,020
	G2	0,77±0,06	1,07±0,63	0,003
	p₂	0,000	0,411	

Tableau 3. Les valeurs spermatisques et sanguins de la TAC, MDA et Lcn-2 chez les patients infertiles et témoins .G1: patients, G2: control, TNA: test non adapté pour l'analyse séminale, ND : non disponible. **p₁**, test t de Student pour échantillons indépendants. **p₂**, t-test de Student pour les échantillons appariés.

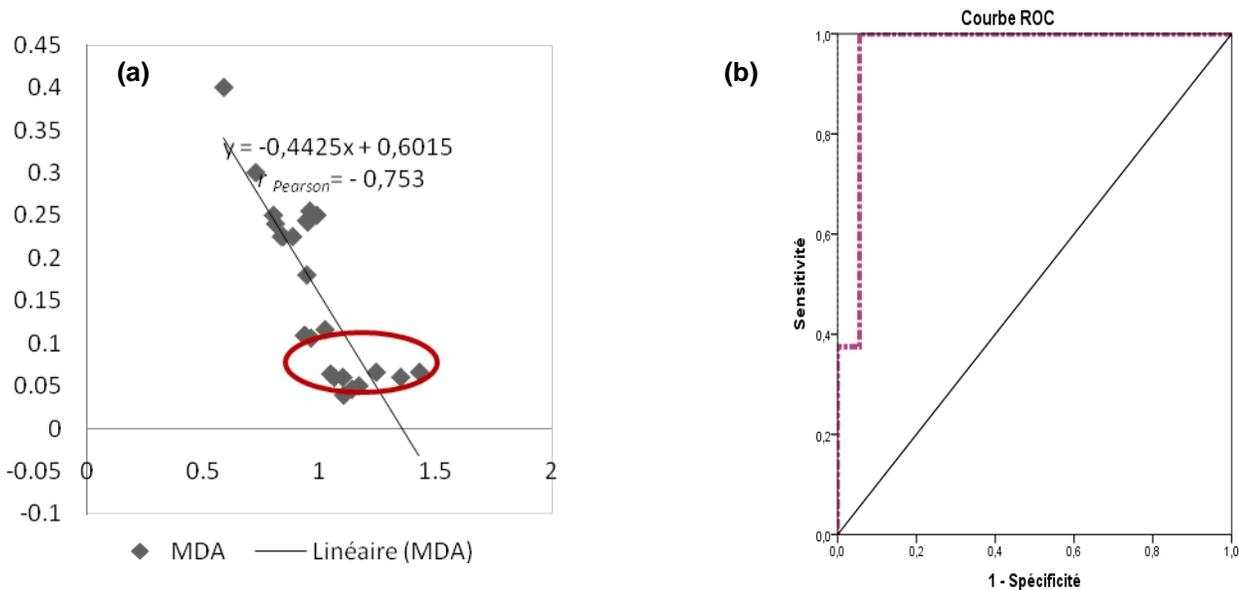


Figure 1: (a) Corrélation entre les MDA spermatisques et la TAC sanguine chez les hommes infertiles; (b) la détermination de la valeur seuil de l'ORAC par les courbes ROC.

mobilité, viabilité et morphologie) étaient significativement plus faibles chez les patients infertiles que ceux des sujets fertiles de contrôle (Tableau 3). Les principales défenses antioxydantes spermatisques sont la SOD, la CAT, la GPx, la Vit-C, la Vit-E et le zinc représente la TAC [3] qui joue également un rôle

important dans le développement testiculaire, la spermatogenèse et la mobilité des spermatozoïdes [4]. Lors d'une éventuelle défaillance de la TAC, les principales réactions pro-oxydantes qui peuvent interagir avec les structures du spermatozoïde sont la réaction en chaîne des lipides conduisant à la génération des TP. Le statut oxydatif (SSO)

spermatique et sanguin comprend l'évaluation des molécules anti-oxydantes et pro-oxydantes mais beaucoup de ces molécules ne peuvent pas être mesurées individuellement ; et comme la mesure est très coûteuse, la TAC et les TP sont plus utiles pour l'évaluation du SO [5,6]. Le test ORAC et la mesure des MDA sont les plus adaptés pour évaluer la TAC utilisant des radicaux hydroxyles et pour évaluer les TP respectivement. Dans la présente étude, nous avons trouvé que les MDA sont plus élevées de 1,7 fois chez les infertiles par rapport aux hommes fertiles mais cette augmentation ne corrèle pas avec le nombre de spermatozoïdes, la mobilité ou la morphologie. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Suleiman et al. [7] qui a démontré que la concentration de MDA séminale n'était pas liée à la concentration et la mobilité des spermatozoïdes. Pasqualotto et al. a également montré que la concentration des MDA spermatiques est associée négativement avec les ROS, à l'exception de l'infertilité idiopathique [8]. Nos résultats sont différents de l'étude qui rapporte que des concentrations élevées de MDA dans le groupe de patients oligozoospermiques et azoospermiques [9]. Vue ces études contradictoires, il est difficile d'établir la valeur clinique de la mesure du SSO dans la pratique médicale car il n'est pas clairement établi si les niveaux élevés de ROS sont une cause ou une conséquence des anomalies des spermogrammes et de la défection des spermatozoïdes [10]. Cependant, nos résultats suggèrent que le SO n'est pas associé à des anomalies spermatiques évaluées selon les critères 2010 de l'OMS, car il peut compromettre la capacité fécondante des spermatozoïdes sans perturber les spermogrammes et en particulier la mobilité [11, 12]. Cette théorie est renforcée par une étude plus récente proposant le SSO comme un marqueur indépendant de l'infertilité masculine, indépendamment du fait que ces patients ont des spermogrammes normaux [13]. Nous avons trouvé que la TAC séminale est significativement plus faible chez les infertiles par rapport aux hommes fertiles par 1,79 fois, ce qui est en accord avec plusieurs études de Pasqualotto qui avaient montré que les sujets témoins avaient des valeurs de TAC séminales plus élevée d'au moins 1,41 fois que celles observées chez les hommes infertiles [14, 15]. Contrairement à certaines études, nous avons constaté que la TAC réduite n'est pas associée à des spermatozoïdes morphologiquement anormaux [16-21] ou une déficience de la mobilité [22-24], souvent retrouvés dans l'infertilité idiopathique. En outre, il a été rapporté que la Lcn-2 agit comme un facteur cyto-protecteur contre le stress cellulaire médié par le H₂O₂, l'initiateur de la chaîne séminale de peroxydation lipidique [25]. Nous avons trouvé la Lcn-2 sanguine plus faible dans le groupe de contrôle que les hommes infertiles, mais sans aucune relation avec les MDA séminale. Cette conclusion rentre dans le cadre

des controverses qui existent également entre la leucocytospermie, principales sources de ROS et NGAL dans l'éjaculat humain [21], et la qualité du sperme et qu'on ne peut pas expliquer par les théories actuelles.

Il est évident que le SO limite le potentiel de la fertilisation des spermatozoïdes suite à des dommages sur les protéines et les lipides de leurs membranes [8,26,27] par des réactions chimiques qui créent de petites molécules aldéhydes lipidiques électrophiles tels que les MDA qui à leur tour se cumulent et déclenche la production de ROS mitochondriales [28]. Suivre le niveau des MDA spermatiques semble être un bio-marqueur utile des dommages oxydatifs mais qui est limité par des obstacles d'ordre pratique dans nos laboratoires. La corrélation négative entre la TAC sanguine et les MDA spermatiques indique que les antioxydants sont utilisés pour détoxifier les ROS en excès et fournit la preuve que les niveaux diminués de la TAC plasmatique sont associés à la baisse de la qualité des spermatozoïdes par les MDA. Il nous permet de suivre la qualité des spermatozoïdes par une seule prise de sang ce qui est très intéressant dans l'évaluation des approches thérapeutiques.

Finalement la Lcn-2 ou la NGAL ne pourrait pas être considérée comme un facteur de protection contre l'infertilité idiopathique. Sachant que les critères de spermogramme subissent des mises à jour continues, nous suggérons que la version 2010 des critères de l'OMS ne peut pas être étudiée avec le SSO spermatique dans cette population étudiée plutôt que de favoriser la piste de l'absence de toute association entre SO et paramètres spermatiques. A condition que ces résultats actuels soient confirmés dans un plus grand échantillon de l'infertilité masculine, on peut renforcer la preuve soutenant l'utilisation des antioxydants systémiques pour diminuer le stress oxydatif et améliorer la qualité du sperme et l'infertilité masculine en conséquence. En perspectives, l'utilisation thérapeutique des antioxydants dans le traitement de l'infertilité masculine doit être étudiée de façon approfondie en utilisant les bio-marqueurs proposés récemment à travers des séries des essais cliniques mettant en exergue les taux de réussite des conceptions spontanées et médicalement assistées.

Références:

1. WHO. World Health Organization. Manual for the Standardised Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male, Cambridge University Press, Cambridge, 2010.
2. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1990;186:421-31.
3. Hammad ME, Al Hasani S, Rosenbaum P, Schmidt W, Fischer Hammad C. Reactive oxygen species, total antioxidant concentration of seminal

plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF.

4. H.H. Sandstead, A.S. Prasad, A.R. Schulert, Farid Z, Miale A Jr, Bassilly S, Darby WJ. Human zinc deficiency, endocrine manifestations and response to treatment, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1967, 20, 422-42.
5. Harma M, Harma M, Erel O. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* 2003; 133: 563-66.
6. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinic Biochem* 2004; 37: 112-19
7. S.A. Suleiman, M.E. Ali, Z.M. Zaki el-Malik EM, Nasr MA, Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J. Androl.*, 1996, 17, 530-537.
8. Pasqualotto FF, Sharma RK, Pasqualotto EB, Agarwal A. Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urol Int* 2008; 81: 263-70.
9. H.Nabil, A. L. Moemen and M. H. Abu E, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2008, 2, 3, 773-778.
10. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S: What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*. 2006; 67: 2-8.
11. Wishart GJ. Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. *J Reprod Fertil* 1984; 71: 113-8.
12. 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.
13. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ Jr, Alvarez JG, Sikka SC: Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*. 2006; 86: 878-85.
14. F.F. Pasqualotto, R.K. Sharma, D.R. Nelson, A.J. Thomas and A. Agarwal, Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil. Steril*, 2000, 73, 459-464.
15. Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A: Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl*. 2001; 22: 316-22.
16. Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, Lee YS, Tsai HD, Lin CS. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 127-31.
17. Y.Y. Hsieh, C.C. Chang, C.S. Lin., Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility *Int. J. Biol. Sci.*, 2006, 2, 23-29.

18. Fraczek M, Szkutnik D, Sanocka D, Kurpisz M. Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. *Ginekol Pol* 2001;72:73-9
19. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-16.
20. Alkan I, Simşek F, Haklar G, Kervancioğlu E, Ozveri H, Yalçın S, Akdaş A. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 1997; 157: 158-59.
21. Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohi J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl* 2004; 6: 59-65.
22. Khosrowbeygi A, Zarghami N, Deldar Y. Correlation between Sperm Quality Parameters and Seminal Plasma Antioxidants Status. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2004;2(2):58-64.
23. Koca Y, Ozdal OL, Celik M, Unal S, Balaban N. Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men. *Archives of Andrology*. 2003;49:355-59
24. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. The Reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Human Reproduction*. 1999;14:2801-07
25. AM, Yaghami P, Gharehbaghian A, et al. Lipocalin 2 acts as a cytoprotective factor against cisplatin toxicity, an in vitro study. *Daru* 2008;16:106 – 111.
26. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008; 14: 243-58.
27. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *J Reprod Fertil* 2004; 16: 581-88.
28. Aitken RJ, Whiting S, De luliis GN, McClymont S, Mitchell LA et al. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2012; 287:33048-6