

Reaktif Oksijen Türlerinin Spermatozoon Fonksiyonları Üzerindeki Fizyolojik ve Patolojik Etkileri

Physiologic and Pathologic Effects of Reactive Oxygen Species on Spermatozoon Functions

Gaffari TÜRK^a

^aDölerme ve Suni Tohumlama AD,
Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Elazığ

Yazışma Adresi/Correspondence:
Gaffari TÜRK
Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi,
Dölerme ve Suni Tohumlama AD,
Elazığ, TÜRKİYE
gturk@firat.edu.tr

ÖZET Reaktif oksijen türleri (ROS) radikal ve radikal olmayan oksijen moleküllerinden oluşmaktadır. ROS genel anlamda bilinen patolojik etkilerinden başka hücrelerde fizyolojik etkilere de sahiptir. Patolojik etki yüksek, fizyolojik etki ise düşük düzeylerde ROS üretimi ile ilişkilidir. Aşırı ROS üretimi spermatozoonlarda lipid, protein ve karbonhidrat peroksidasyonuna, DNA hasarı ve apoptoza neden olurken düşük ROS üretimi (fizyolojik düzey) ise olgunlaşma, kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi spermatozoonların normal fonksiyonları için gereklidir. Spermatogenezde aksama, spermatozoon motilitesi ve sayısında azalma, anormal spermatozoon oranında artış ve fertilizasyon bozuklukları endojen ve egzogen kaynaklı aşırı ROS üretiminin neden olduğu spermatozoal hasarlardandır. Bu derlemede radikal ve radikal olmayan ROS, bu türlerin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri ile endojen ve egzogen ROS kaynakları hakkında detaylı bilgiler sunulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Reaktif oksijen türleri; spermatozoa; fizyolojik etki; patolojik etki

ABSTRACT Reactive oxygen species (ROS) consist of radical and non-radical oxygen molecules. ROS has also physiologic effects on the cells unlike its known pathologic effects in general. Pathologic and physiologic effects are associated with high and low levels of ROS production, respectively. While excessive ROS production causes peroxidation of lipids, proteins and carbohydrates, DNA damage and apoptosis in spermatozoa, low level of ROS production (physiologic level) is required for normal functions of spermatozoa like maturation, capacitation, hyperactivation, acrosome reaction and spermatozoon-oocyte fusion. Spermatogenic arrest, decrease in spermatozoon motility and count, increase in abnormal spermatozoon rate and fertilization failures are the damages induced by excessive ROS production originated from endogenous and exogenous sources. Detailed information about radical and non-radical ROS, their physiologic and pathologic effects on spermatozoon functions and their endogenous and exogenous sources are presented in this review.

Key Words: Reactive oxygen species; spermatozoa; physiologic effect; pathologic effect

Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics 2015;1(3):26-34

Pek çok canlı yaşamını sürdürebilmek için havadaki oksijeni (moleküler oksijen, O₂) almak zorundadır. Kullanılan toplam O₂'nin yaklaşık %90'ı vücutta elektron taşınma zinciri (solunum zinciri), %10'u ise diğer O₂ gerektiren reaksiyonlarda kullanılmaktadır. Elektron taşınma zincirinde O₂'nin yüksek oksitleyici gücü, adenosin trifosfat (ATP)'in yüksek enerjili hidrojen bağı haline dönüştürülür. O₂ iki eşleşmemiş (ortaklanmamış) elektrona sahiptir.^{1,2} Bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve biyomoleküllerle karşılaştıklarında onların yapısını oksidatif olarak değiştirebilir kapasitesine sahip moleküller "serbest radikaller" olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller elektrik yükü açısından pozitif, negatif veya nötr olabilmektedir.^{3,4}

Terminolojik açıdan serbest oksijen radikallerini ve ilişkili (radikal olmayan) türlerini tanımlamak amacıyla çok farklı tanımlar yapılmaktadır. Ancak Halliwell tarafından yapılan tanımlama daha kapsamlı gibi görünmektedir.² Halliwell reaktif oksijen türleri (ROS) tanımını kullanmayı tercih ettiğini ve bu tanımlama ile ROS'un hem radikal hem de radikal olmayan O_2 moleküllerini kapsadığını, buna bağlı olarak tüm oksijen radikallerinin ROS fakat tüm ROS'un da oksijen radikali olmadığını bildirmektedir.² Serbest oksijen radikalleri genellikle en yakınlarındaki kararlı moleküllere saldırarak onların elektronlarını çalma eğilimine girerler (Şekil 1). Saldırıya uğrayan kararlı molekül elektronunu kaybettiğinde serbest radikal haline dönüşür ve bir takım zincir reaksiyonlar başlar. Süreç başlar başlamaz serbest radikal haline dönüşen kararlı bileşik hasar verme yolağına girer ve sonuçta canlı hücrelere zarar vermeye başlar.⁵

Spermatogenesis saniyede yaklaşık 1000 spermatozoon üretebilme kapasitesine sahip yüksek derecede aktif ve tekrarlanabilen bir süreçtir. Bu işlem esnasında meydana gelen yüksek orandaki hücre bölünmeleri, germinal epitelyumun yüksek oranlarda mitokondriyal O_2 ihtiyacını doğurmaktadır. Testislerdeki zayıf damarlaşmaya bağlı düşük O_2 basıncı bu organ içerisinde O_2 için yoğun bir yarışın olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla hem spermatogenesis hem de Leydig hücre steroidogenesisi serbest radikal saldırılarına aşırı hassastır.⁶ Pek çok endojen ve egzogen faktör erkek üreme organları ve seminal sıvıda ROS seviyelerinin artmasına neden olmakta ve artan ROS'da testisteki tüm hücre tiplerine (Sertoli, Leydig, germ) değişen düzeylerde zarar vermekte ve sonuçta infertilite hatta sterilite ile sonuçlanabilmektedir.⁷⁻¹³ Bu zararlar genellikle hücrelerdeki lipid ve proteinlerin peroksidasyonu ve apoptoz şeklindedir. Spermatozoon DNA'sı somatik hücre DNA'sına göre daha sıkı (kompakt) bir yapıya sahip olmasına rağmen ROS saldırıları

sonucunda kırılmalar sıklıkla gözlenmektedir.¹⁴ Aslında ROS fizyolojik düzeylerde bir sinyal dönüştürücü olarak görev yaparak hücre içi dengenin (homeostasis) korunmasına yardım etmektedir.^{1,10} Öte yandan nötrofil ve makrofajlar tarafından sağlanan fagositosisde de görev almaktadır. Fizyolojik düzeylerdeki ROS epididimiste spermatozoonların olgunlaşma süreci, dışı genital kanalda ise kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi pek çok olayda görev almaktadır.^{10,15-17} Bu derlemede radikal ve radikal olmayan ROS, bu türlerin spermatozoon fonksiyonları üzerindeki fizyolojik ve patolojik etkileri ile endojen ve egzogen ROS kaynakları hakkında detaylı bilgiler sunulmaktadır.

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

Serbest radikal tanımına göre O_2 , bir biradikal (diradikal) olarak değerlendirilmektedir. Biradikal O_2 , radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer. O_2 yüksek derecede ROS üretme yeteneğindedir.^{1,2} ROS, radikal ve radikal olmayan oksijen moleküllerinden ibarettir.⁵ Erkek üremesinde etkili olan başlıca ROS aşağıda sıralanmaktadır.

RADİKAL ROS

Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) Radikalı

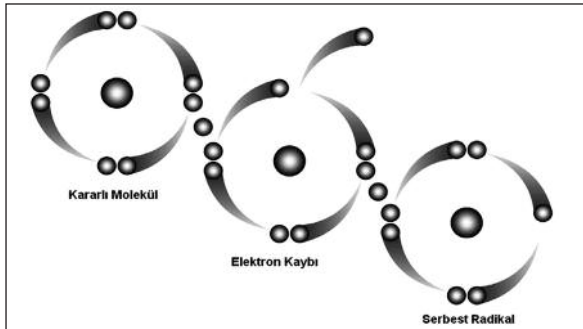
Süperoksit radikali solunum zincirinde O_2 'nin suya dönüşümü esnasında bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelen ilk ara maddedir.¹⁸ Adının süper olmasına karşın yapısında bir adet eşleşmemiş elektron bulunduğu için O_2 'den daha az radikaldir ve kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.¹⁹ Fagositosis esnasında nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz sistemi aracılığı ile üretilmektedir.²⁰ Yarılanma ömrü 1 μ saniyedir.

Hidroperoksil ($HO_2^{\cdot}$) Radikalı

Hidroperoksil radikali $O_2^{\cdot-}$ radikali ve H_2O_2 arasında ara bir radikal olup $O_2^{\cdot-}$ 'nin protonlanmış şeklidir.¹⁸

Hidroksil ($OH^{\cdot}$) Radikalı

Hidrojen peroksitten Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu oluşan $OH^{\cdot}$ çok güçlü reaktif bir oksidan radikal²¹ olup yarılanma ömrü çok kısadır (1 nano saniye). Lipid ve proteinlerin peroksidasyonundan sorumlu olan en önemli ROS, $OH^{\cdot}$ 'dir.^{22,23}



ŞEKİL 1: Serbest radikal oluşumunun şematik gösterimi (Agarwal ve ark.⁵'den uyarlanmıştır.)

Alkoksil (RO•) ve Peroksil (ROO•) Radikalleri

Lipid ve proteinler gibi organik maddelerin bozulması esnasında şekillenen O_2 kökenli radikallerdir.¹⁸ RO•'nın yarılanma ömrü 1 μ saniye, ROO•'nın ise 10 milisaniyedir.

Sülfür (RS•) Radikali

Tiyoller (indirgenmiş glutatyon gibi) protein-sülfidril gruplarını oksidasyona karşı korumak amacıyla antioksidanlar olarak değerlendirilmektedir. Ancak tiyoller karbon merkezli (C•), $O_2^{\cdot-}$, OH•, RO•, ROO• radikalleri ile ferröz demir (Fe^{++}) ve bakır (Cu^{++}) gibi geçiş metalleriyle de reaksiyona girebilmektedir. Bu durum da fonksiyonel proteinlerin kaybına yol açmaktadır.²⁴

RADİKAL OLMAYAN ROS

Singlet Oksijen (1O_2)

Biradikal O_2 'nin elektronlarından birinin enerji alarak kendi yörüngesinin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle 1O_2 oluşur. Delta ($^1O_2\Delta$) ve sigma ($^1O_2\Sigma$) olmak üzere iki şekli bulunan 1O_2 'nin, eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan bir ROS olduğu belirtilmekle birlikte $^1O_2\Sigma$ 'nin radikal, $^1O_2\Delta$ 'nin radikal olmadığı da bildirilmektedir.^{1,2,18,21} Yarılanma ömrü 1 μ saniye olan 1O_2 , mitokondriyal permeabilite geçişinin düzenlenmesi gibi hücresel fonksiyonlar da görev alabilmektedir.

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit, $O_2^{\cdot-}$ 'nin etrafındaki moleküllerden bir elektron veya O_2 'nin etrafındaki moleküllerden iki elektron alarak oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. H_2O_2 bir radikal olmasına rağmen Fe^{++} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, $O_2^{\cdot-}$ varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan OH•'ı oluşturmaktadır.²¹ Yüksüz ve zar-geçirgen bir molekül olan H_2O_2 mitokondriyal ve diğer zarlar üzerine nüfuz edebilmektedir. Fagositlerin en büyük salgı ürünü H_2O_2 'dir.²⁵

Peroksinitrit ($ONOO^-$)

Nitrik oksit ve $O_2^{\cdot-}$ 'nin etkileşimiyle geçiş metallerinin varlığında $ONOO^-$ üretilmekte ve sonuçta nitrit ve nitratlar meydana gelmektedir. Bu reaksiyona bağlı olarak proteinlerin yapıları bozulmakta ve dolayısıyla fonksiyonlarını kaybedebilmektedir.²⁶ $ONOO^-$ 'in yarılanma ömrü 30-50 milisaniyedir.

HİPOKLORÖZ ASİT (HOCl)

Enfeksiyöz ajanlara yanıt olarak aktive olmuş nötrofillerden üretilmektedir. NADPH aracılığı ile aktive olan non-spesifik peroksidaz-miyeloperoksidaz katalizörlüğünde H_2O_2 ve klorun (Cl^-) tepkimesi sonucu HOCl ve çok reaktif olan OH• radikali meydana gelmektedir.²⁷ HOCl komşu olduğu hücreler üzerine oldukça toksiktir. Biyomoleküllere ya direk olarak ya da Cl^- 'a indirgeyerek zarar vermektedir. Protein ve lipid klorinasyon reaksiyonları [klorin (Cl^-) radikalleri oluşumuna bağlı olarak], protein karbonil oluşumu, çökme ve kırılma bu kısa yaşam süreli Cl^- radikalının yan etkileridir.²⁸

Ozon (O_3)

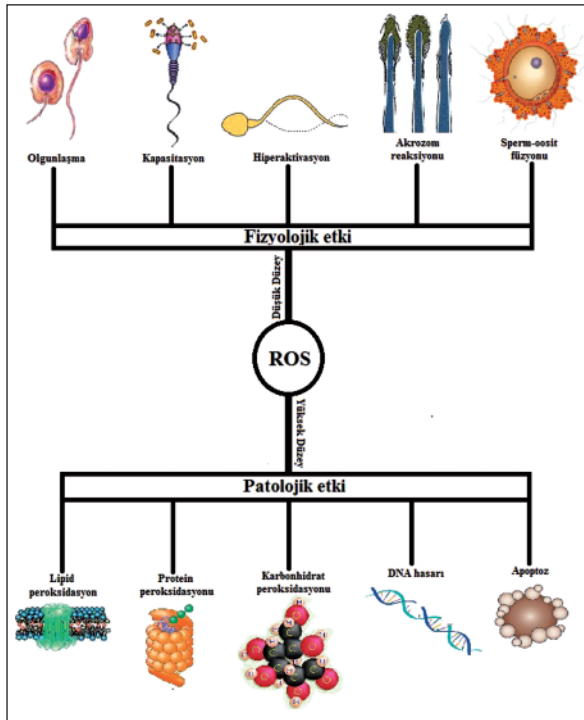
Ozon atmosferin stratosfer ve troposfer tabakalarında aerosollerle reaksiyona girerek Cl^- radikalleri oluşumuna katıldıklarından dolayı toksiktir.²⁹

ROS'UN SPERMATOZOON FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ FİZYOLOJİK ETKİLERİ

ROS'un yüksek düzeylerinin genellikle hücrelerde patolojik bozukluklara yol açtığı iyi bilinmesine rağmen gerçekte fizyolojik düzeyleri ise somatik hücrelerde olduğu gibi spermatozoon fonksiyonlarının düzenlenmesinde de önemli görevlere sahiptir. ROS spermatozoonların karışık biyokimyasal yapısında sinyal dönüştürücüler olarak önemli görevler üstlenmektedir. Olgunlaşma, hiperaktivasyon, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi olaylarda ROS'un olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Şekil 2).^{10,15-17,30,31}

SPERMATOZOON OLGUNLAŞMASI

Seminifer tubul lümenine atılan (spermiasyon) hiçbir spermatozoonun hareket (motilite) ve fertilizasyon yeteneği yoktur. Spermatozoonlar testisten duktuli efferentesler aracılığıyla çıkarak kaput epididimise girip korpustan da geçtikten sonra motilite ve fertilite yeteneği kazanmaktadır. Epididimisten geçişleri esnasında spermatozoonlar olgunlaşırlar ve bu geçiş süresi türlere göre farklılık göstermekle beraber 1-2 hafta arasında değişmektedir.³² Epididimal geçiş esnasında spermatozoonların nükleuslarının sıkı bir hal alması (nüklear kondensasyon) ile yüzey moleküllerinin varlığı ve dağılımında meydana gelen değişimler ise diğer olgunlaşma ölçütleridir.³³ Spermatozoonlar koruyucu ve tamir sistemlerinden yoksun oldukları için genetik bütünlüğün korunması amacıyla kromatin yapıları diğer somatik hücreler ve oositlere göre çok daha sıkı ve stabil bir şekildedir.³⁴ Spermiyogenesis esnasında kromatindeki his-



ŞEKİL 1: ROS'un spermatozoon fonksiyonları üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi.

ton tanecikleri protaminler olarak adlandırılan basit proteinler ile yer değiştirmektedir. Protaminlerde yer alan çok sayıdaki sistein artıkları kauda epididimisteki hafif oksidatif koşullar altında disülfid bağlarına dönüşmektedir. Oluşan disülfid bağları da çekirdek DNA'sının daha sıkı ve stabil olmasını sağlamaktadır.³⁵⁻³⁷ Diğer bir teoriye göre fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PHGPx), nüklear proteinlerdeki tiyol gruplarını glutatyon indirgemek için alternatif indirgeyiciler olarak kullanabilmektedir. ROS tarafından üretilen lipid peroksitler, nüklear proteinlerde oksidasyonun başlatılması ve nüklear kondensasyonun kolaylaştırılması amacıyla PHGPx için substrat sağlayabilmektedir.³⁸ Öte yandan ROS spermatozoonun en önemli enerji kaynağına koruma sağlayan mitokondriyal membranda da değişikliklere neden olmaktadır. Olgun bir spermatozoon mitokondriyumunu saran ve "mitokondriyal kapsül" olarak adlandırılan bir membrana sahiptir. Spermatogenesis esnasında H₂O₂ gibi peroksitler PHGPx'in oksidasyonu aracılığıyla bu kapsülün şekillenmesini indüklemektedir. Oksidasyon şekillenir şekillenmez bir selenoenzim olan PHGPx, selenadisülfid bağını meydana getirmek için kapsülün indirgenmiş protein tiyol grupları ile reaksiyona girebilen bir aracılığı oluşturmaktadır.³⁰

KAPASİTASYON VE HİPERAKTİVASYON

Ejaküle edilmiş spermatozoonun in vitro veya dışı genital

kanalda in vivo seminal plazma unsurlarından arınması olarak adlandırılan kapasitasyon, olgunlaşma sürecinin son safhasıdır.³² Kapasitasyon işlemi sonucu spermatozoon fertilizasyon için gerekli aşamalar olan hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu safhalarına ulaşmaktadır. In vitro ve in vivo gerçekleştirilen kapasitasyon ve hiperaktivasyonun biyokimyasal mekanizmalarında pek çok faktör etkili olmasına rağmen en etkili faktörlerin; (i) membran kolesterolünün kaybı, (ii) membran hiperpolarizasyonuna neden olan bikarbonat, kalsiyum (Ca⁺⁺) ve diğer küçük iyonların akışı ve (iii) pH, siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve protein fosforilasyonundaki artışın olduğu bildirilmektedir.³⁰ Kapasitasyonun başlangıç safhalarında hücre içi Ca⁺⁺ ve cAMP düzeyleri artmakta, ROS üretimi başlamakta ve sonuçta çok güçlü bir motilite olarak tanımlanan hiperaktivasyon gerçekleşmektedir.³⁹ Hiperaktif spermatozoonlarda hiperaktif olmayanlara göre doğrusal bir motilite gözlenmemekle birlikte kuyruk hareketleri geniş bir alanı kapsayacak şekilde ve asimetrik olup baş kısmı bir yandan diğer yana yer değiştirmektedir. Hiperaktivasyon cAMP aracılığıyla sinyal dönüştürücü kaskadına dayanmaktadır. Çünkü cAMP düzeyindeki artış protein kinaz A (PKA) aktivasyonunu uyarmakta, uyarılan PKA'nın indüklediği tirozin kinazlar tirozin fosforilasyon düzeyinin yükselmesine ve yükselen tirozin fosforilasyon düzeyleri ise spermatozoonların kapasitasyon ve hiperaktivasyonunu başlatmaktadır.^{15,17} Öte yandan hücre içi Ca⁺⁺ ve bikarbonat iyonlarında görülen artışın adenil siklaz enzim aktivitesini aktive ettiği, aktive olan adenil siklaz'ın ATP'yi cAMP'ye çevirdiği ve buna bağlı olarak PKA ve tirozin fosforilasyon düzeylerindeki artışla birlikte kapasitasyonun şekillendiği de bildirilmektedir.¹⁰ ROS'un özellikle de O₂⁻ ve H₂O₂'nin fizyolojik konsantrasyonları cAMP sentezini uyarak, protein tirozin fosfatazları (fosforilasyonu inhibe eden enzim) inhibe ederek ve adenil siklaz ile tirozin kinazı aktive ederek spermatozoon kapasitasyonunu uyarmaktadır.¹⁵

AKROZOM REAKSİYONU

Hiperaktif motilite spermatozoonu kumulus ooforus'a doğru yönlendirdiği zaman kapasite olmuş spermatozoon zona pellusida'ya bağlanmakta ve proteolitik enzimlerin dışarıya salınmasını sağlamaktadır. Akrozom reaksiyonu sonucu zona pellusida'nın hücre dışı matrisinde gözenekler açılmakta ve spermatozoonun bu bariyere tutunarak oosit içerisine girişine izin vermektedir.³² Akrozom reaksiyonunun biyokimyasal mekanizmasında da kapasitasyon ve hiperaktivasyona benzer şekilde tirozin proteinlerinin fosforilasyonu, Ca⁺⁺ akışı, adenil siklaz, cAMP ve PKA aktivitelerinde gözlenen moleküler olaylar şe-

killenmektedir. ROS spermatozoonların zona pellusida'ya karşı affinitelerini baş kısmının apeksinde bulunan üç plazma membran proteininin (spermadezin, P47 ve fertilin β) fosforilasyonu aracılığıyla artırmaktadır.¹⁰ Düşük konsantrasyonlardaki $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'nin akrozom reaksiyonu üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bildirilmektedir.^{40,41}

SPERMATOZOON-OOSİT FÜZYONU

Spermatozoon zona pellusida'yı geçtikten sonra oosit içine girer (spermatozoon-oosit füzyonu) ve oositle birleşir. Füzyon olayı ise başarılı bir fertilizasyon ile sonuçlanmaktadır. Spermatozoon membranının yüksek derecede akışkanlığı uygun bir füzyonun meydana gelmesi için gereklidir.³² Spermatozoon membranının bir dereceye kadar akışkanlığı, ihtiva ettiği fazla miktardaki doymamış yağ asitleri ile sağlanmaktadır. İnsan spermatozoonları ile yapılan çalışmalarda ROS'un kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu esnasında spermatozoon membranının akışkanlığını artırarak spermatozoon-oosit füzyonunu indüklediği bildirilmektedir.⁴² Kapasitasyon esnasında, ROS fosfotirozin fosfatazları inhibe ederek spermatozoon membranındaki fosfolipidlerin trigliserol tabakasından ikincil yağ asitlerini parçalayan fosfolipaz A_2 'nin defosforilasyon ve deaktivasyonunu önlemekte ve dolayısıyla spermatozoon-oosit füzyonunu indüklemektedir.¹⁰

ROS'UN SPERMATOZOON FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ PATOLOJİK ETKİLERİ

Fizyolojik olarak spermatozoon fonksiyonları üzerinde düşük düzeylerde önemli görevlere sahip olan ROS, organizmada antioksidan savunma sistemlerine ait enzim ve substratların üzerindeki düzeylere ulaştığında patolojik etki göstermektedir. Patolojik düzeylere ulaşan ROS somatik hücrelerde olduğu gibi spermatozoonlarda da önemli hasarlara yol açmaktadır. Spermatozoonlarda oluşan hasarların düzeyi de hücrelerin ROS'a maruz kalma süresine, miktarına ve tipine göre değişmektedir.¹⁰

LİPİD PEROKSİDASYON

Pek çok türün spermatozoon plazma mebranı bilayer tabakası içerisine yerleşmiş olan lipidlerin asimetrik diziliminden ibarettir. Memeli ve kanatlı spermatozoonlarının lipid bileşimi somatik hücrelerinkinden çok farklı bir yapıdadır. Somatik hücrelere göre spermatozoonların plazma membranı yüksek düzeylerde fosfolipidleri, steroller, doymuş ve çoklu doymamış yağ asitlerini ihtiva etmektedir. Plazma membranının lipid bilayer tabakasının akışkanlığından sorumlu olan lipidlerin, spermatozoonların epididimal olgunlaşmasından dışı ge-

nital kanalda kapasitasyon süreci boyunca kompozisyonunda pek çok değişiklik meydana gelmektedir.^{43,44} Membran akışkanlığı dışında, spermatogenesis ve spermatozoon olgunlaşmasının düzenlenmesi, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi olaylarda da membrandaki lipidlerin aktif rolleri bulunmaktadır.⁷ Çoklu doymamış yağ asitleri spermatozoon membranının fonksiyonu açısından diğer lipidlere göre daha etkilidir. Çoklu doymamış yağ asitlerinden dokosaheksaenoik asitin membran akışkanlığı ve spermatogenesisin düzenlenmesinde büyük bir role sahip olduğu bildirilmektedir.¹¹

Lipid peroksidasyon ROS'un bir hücrenin membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin karbon-karbon çift bağlarından elektron çalması olarak tanımlanmakta olup başlangıç, yayılma ve bitiş safhaları olmak üzere 3 aşamaya ayrılmaktadır. Başlangıç safhasında ROS çoklu doymamış yağ asitlerinin asil zincirlerine saldırarak bisallilikmetilen (CH_2) grubundan bir hidrojen atomunu ayırır. Çünkü yağ asitlerinde bulunan çift bağların metilen grubuna yakın olması, metilen karbon-hidrojen bağlarını zayıf bir hale getirmekte ve hidrojen atomunun ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Hidrojen atomunun ayrılmasıyla karbon bağında bulunan ve eşleşmemiş elektron taşıyan lipid radikali [alkil radikali ($\cdot CH$)]'nin O_2 ile reaksiyona girmesiyle $ROO\cdot$ açığa çıkar. Yayılma aşamasında $ROO\cdot$ komşu doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomu ayrıştırarak lipid hidroperoksit ($ROOH$) radikalini oluşturur. Süpürücü sistemlerin olmadığı ancak geçiş metallerinin bulunduğu bir ortamda $ROOH$, $RO\cdot$ veya $ROO\cdot$ 'yu üreterek peroksidasyon işleminin hızlanmasına neden olur. Bunun sonucu alkol, keton, aldehit ve eterlerin ayrışması kolaylaşır. Bu safhanın son ürünleri ise malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinoneal'dir. Bitiş safhasında ise ya radikal-radikal etkileşimi ile ya da radikal süpürücü enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların devreye girmesiyle lipid peroksidasyon sona erer. Yukarıda bahsedilen zincir reaksiyonu için $OH\cdot$ lipid peroksidasyonu başlatan temel radikal olmasına rağmen $O_2^{\cdot-}$ radikali ve H_2O_2 lipid peroksidasyonu başlatma gücüne sahip değildir.⁴⁵ Bununla birlikte $O_2^{\cdot-}$ radikalinin ferrik demir (Fe^{+++})'i Fe^{++} 'e indirgeyerek ya da sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek $RS\cdot$ oluşturabileceği, Fe^{++} 'nin oksidasyonda bir katalizör olarak, $RS\cdot$ 'nin de farklı mekanizmalarla lipid peroksidasyonu başlatabildiği bildirilmektedir.⁴⁶ Spermatozoon membranındaki önemli lipidlerden biri olan kolesterol de çoklu doymamış yağ asitlerine benzer mekanizmalar ile peroksidasyona uğrayabilmektedir.^{47,48} ROS saldırılarının neden olduğu membran lipid hasarı, lipid peroksidasyonun son ürünü

olan MDA ve 4-hidroksinoneal düzeylerindeki değişikliklerle ölçülmektedir.^{5,10}

Spermatozoon membranının %50'si dokosaheksaenoik asitten oluşmakta olup bu yağ asidinin her bir molekülünde 6 doymamış çift karbon bağı bulunmaktadır. Dolayısıyla spermatozoon membranı ROS saldırılarına karşı aşırı duyarlı olup lipid peroksidasyon sonucu yağ asitlerinin yaklaşık %60'ı kaybolmakta ve spermatozoonlarda çeşitli zararlar meydana gelmektedir. Mitokondriyal ATP azalması, DNA hasarı, spermatozoon motilite kayıpları, spermatogenezde aksama, spermatozoon sayısında azalma, anormal spermatozoon sayısında artış ve fertilizasyon bozuklukları gibi pek çok hasar ROS'un aşırı üretiminin neden olduğu lipid peroksidasyon sonucu spermatozoonlarda görülen bozukluklardır.¹⁰ Hatta çok aşırı durumlarda spermatogenez tamamen durabilmektedir.⁷ Lipid peroksidasyon glukoz-6-fosfat-dehidrogenaz (G6PD) enzim aktivitesini inhibe ederek de spermatozoon motilitesinde azalmalara sebebiyet vermektedir. Spermatozoonlarda temel enerji kaynağı olarak fruktoz kullanılmasına rağmen, G6PD de NADPH'nin sentezi ve oksidasyonu aracılığıyla glukoz akışını kontrol ederek spermatozoonlar için ATP üretmektedir.¹³ G6PD enzim eksikliğinde sodyum-potasyum-magnezyum ATPaz enzim aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak iyonların hücre içi konsantrasyonları değişebilmektedir. Hücre membranındaki fosfolipidler sodyum-potasyum-magnezyum ATPaz'ın fonksiyonu için gerekli olup, ancak lipid peroksidasyon sonucu fosfolipidlerin yapısının bozulmasıyla bu enzim sistemi inhibe olabilmektedir.⁴⁹ Öte yandan diğer bir hipoteze göre yüksek düzey H₂O₂ hücre mebranını geçen ve hücre içerisinde NADPH aracılığıyla glukoz akışını kontrol eden G6PD inhibisyonunu indüklemektedir. G6PD'nin inhibisyonu NADPH'nin hücre içi kullanılabilirliğinde azalmaya yol açmakta ve beraberinde okside olmuş glutatyon birikimine neden olmaktadır. Bu durum ise spermatozoonların antioksidan savunma sistemlerini zayıflatarak membran lipidlerinin perokside olmasına ve dolayısıyla motilite kayıplarına sebebiyet vermektedir.⁹

PROTEİN VE KARBONHİDRAT PEROKSİDASYONU

Proteinler spermatozoon ve seminal plazmanın yapısına katılan en büyük bileşenlerdir. Ayrıca spermatozoonların pek çok fonksiyonundan sorumlu olan enzimler ve reseptörler de proteinlerdir.¹³ Bir proteine bir fosfat grubunun bağlanmasıyla (fosforilasyon), o protein aktifleşmesine rağmen bağlanan fosfat grubunun proteinlerden ayrılmasıyla (defosforilasyon) da inaktifleşmekte ve bu iki olayla da yapısında biçim değişikliği olmaktadır. Protein kinaz ve fosfataz denen enzimler bu düzenleme sürecinin fos-

forilasyon ve defosforilasyon kısımlarında rol oynarlar. Hücrelerde protein fosforilasyonu genellikle post-translasyonel dönemde şekillendiği için spermatozoonlarda bu olay spermatogenezden ziyade fertilizasyon için gerekli olan kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu esnasında genellikle meydana gelmektedir. Spermatozoonların da dâhil olduğu ökaryotik hücrelerde genellikle serin, treonin ve tirozin amino asitlerinin kalıntılarında fosforilasyon meydana gelmektedir.⁵⁰ Bireysel amino asitler ROS'un neden olduğu peroksidasyona karşı farklı hassasiyetlere sahiptir. Du ve Gebicki proteinlerin OH⁻ radikallerinin saldırılarına karşı lipidler ve DNA'dan daha duyarlı olduğunu ve ROS'un hücredeki primer hedefinin proteinler olduğunu bildirmektedir.⁵¹ Bununla birlikte proteinlerin peroksidasyonunun lipid ve DNA hasarına yol açıp açmadığı ya da lipidlerin peroksidasyonu ile DNA oksidasyonunun proteinlerin peroksidasyonundan bağımsız şekillenip şekillenmediği hala tartışma konusudur. OH⁻ radikalleri çapraz bağlanmalar yaparak proteinlerin kovalent olarak modifiye olmasına ve sonuçta kümelenmesine (agregasyon) neden olmaktadır.⁵¹ Modifiye olmuş proteinler de ya proteozomlar ya da lizozomlar tarafından proteolize duyarlı bir konuma getirilmektedir. Taşıyıcı veya kanal proteinleri ROS saldırılarına maruz kaldığında hücre membranındaki iyonların yapısı değişmekte dolayısıyla o hücrenin fonksiyonu zarar görmektedir.¹⁸ Spermatozoonlardaki proteinler ile protein kinazlar ve fosfatazların varlığı, bunların spermatozoon kapasitasyonu, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonundaki rollerinin önemli göstergesidir. Ancak bu proteinler arasında spermatozoonlar için tirozin ve tirozin fosforilasyonu diğerlerine göre çok daha önemlidir. OH⁻ radikalının saldırısı ile okside olan tirozin kalıntıları, proteinler arasında çapraz bağlanmayı indükleyerek proteininin biçiminde değişikliğe neden olmaktadır. Çapraz bağlanma sonucu bitirozin oluşmaktadır. Bitirozin ise tirozin fosforilasyonunu azaltarak tirozin kinaz aracılıklı sinyal transdüksiyon mekanizmalarını önlemektedir.⁵¹ Spermatozoonlarda proteinlerin özellikle de tirozin amino asidinin yüksek düzeylerde OH⁻ radikali ile okside olmasına bağlı olarak azalan protein fosforilasyonu sonucu kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gibi olaylar aksamakta ve döl verimi oranları düşmektedir.

Karbonhidratlar lipid ve proteinlere göre ROS saldırılarından daha az zarar görmekte veya bu saldırılara daha az maruz kalmaktadır. ROS karbonhidrat polimerleri ile reaksiyona girerek kırılmalarına neden olmaktadır. ROS ayrıca spermatozoonlarda yüzey reseptörlerini değiştirebilen membran glikoproteinlerini de olumsuz etkileyebilmektedir. Karbonhidrat ve amino asitlerden oluşan

glikoproteinlerdeki değişiklik fertilizasyon esnasında spermatozoonların zona pellusida'ya bağlanmasını engelleyebilmektedir.¹³

DNA HASARI

Spermatozoonun çekirdek hacmi somatik hücrelerin çekirdeğine göre küçük bir yapıya sahip olduğu için çekirdek DNA'sının sarmallanması somatik hücrelerden oldukça farklıdır. Spermiyogenesis esnasında spermatidin kromatin yapısı tam anlamıyla yeniden düzenlenmekte ve çekirdek DNA'sı protaminler olarak adlandırılan küçük proteinler tarafından sarılarak yeniden paketlenmektedir. Protamin sarılması DNA'yı bastırarak sıkıştırmakta ve böylece DNA'nın spermatozoonun küçük hacimli çekirdeğinin içerisine tamamen yerleşmesini sağlamaktadır. Spermatogenesisin bu safhasında spermatid DNA'sındaki histon proteinleri protaminlerle yer değiştirmektedir. Protaminler histonların yaklaşık yarısı büyüklüğünde basit proteinler olup güçlü bir DNA bağlanmasını sağlayan arjininlerden zengindir. Spermatozoon çekirdek DNA'sının somatik histonlar yerine protaminler ile sarmallanması, DNA'yı önemli derecede sıkılaştırmakta dolayısıyla DNA hasarına yol açan ajanların geçişini azaltmaktadır. Protaminler ayrıca protamin içi ve protaminler arası çapraz bağlanmaları sağlayan çok sayıda sistein artıklarını da içermektedir.^{14,52,53} DNA'daki iğ iplikçiklerinin protamin molekülleri tarafından sıkı bir şekilde sarılması ve DNA halkalarının da disülfid bağları ile çapraz bağlanması, spermatozoon çekirdeğindeki olgunlaşmanın son safhası ve epididimal geçiş esnasında çekirdek stabilitesinin daha da fazla artırılmasını sağlamaktadır.⁵⁴ Tüm bu etkileşimler spermatozoonun çekirdek DNA'sını çok sıkı bir ökar-yotik DNA haline getirmek için tasarlanmıştır. Bu sıkılaşma ve stabilizasyon spermatozoonun çekirdek genomunu ROS saldırılarına karşı korumak açısından oldukça önemlidir.

Spermatozoonun mitokondriyal DNA'sı çekirdek DNA'sında olduğu gibi histon ve protamin proteinleriyle sarılı olmadığı gibi çok sıkı bir yapıya da sahip değildir. Mitokondriyal kompleks I (NADH/ubiquinon oksidoredüktaz), III (Ubiquinon/sitokrom C oksidoredüktaz) ve IV (sitokrom oksidaz)'ün esas proteinleri mitokondriyal DNA tarafından kodlanmaktadır. İç mitokondriyal membrana yerleşmiş olan bu kompleksler elektron taşınma zincirinin temel yapısını oluşturmaktadır. Mitokondriyal kompleks III'ün ROS'un en büyük kaynağı olduğu iddia edilmektedir. Öte yandan mitokondriyumların da spermatozoonlar tarafından üretilen $O_2^{\cdot-}$ radikalinin sorumlusu olduğu bildirilmektedir. Bu durum

spermatozoonun mitokondriyal DNA'sının çekirdek DNA'sına göre ROS saldırılarına karşı çok daha duyarlı olduğunu göstermektedir.^{55,56}

Seminal plazmadaki antioksidanların mevcudiyeti ve DNA'nın sıkı yapıda olması, spermatozoonun çekirdek DNA'sının ROS saldırılarına karşı korunduğu teorisine rağmen yine de ROS'un ve apoptosisin DNA hasarlarına neden olduğu ve bu hasarların da erkek infertilitesinde önemli bir yer tuttuğu bildirilmektedir.^{10,57} DNA molekülünü oluşturan nükleotidlerden her biri fosforik asit, deoksiriboz ve organik bazları [pürin (adenin ve guanin) ve pirimidin (timin (urasil) ve sitozin)] ihtiva etmektedir. Nükleotidler de birbirlerine fosfodies-ter bağları ile bağlıdır. DNA bazları, fosfodies-ter bağları ile bağlıdır. DNA bazları, fosfodies-ter bağları ve deoksiriboz ROS saldırılarına karşı duyarlı olup, lipid RO' ve ROO' radikalleri özellikle guanin'e, OH' ise tüm bazlara saldırabilmektedir.^{13,31,58} Yüksek ROS düzeyleri spermatozoon DNA'sında organik bazların oksidasyonuna, tek ve çift iğ ipliklerinin kırılmasına ve kodonlarda silinmelere neden olarak çekirdek DNA'sına zarar vermektedir.^{10,13,31} Y-kromozomlu spermatozoonların yapısının farklı olması ve DNA çift bağ kırıklarını tamir mekanizmasına sahip olmamasından dolayı erkek spermatozoonlar X-kromozomlu dişi spermatozoonlara göre DNA hasarına çok daha duyarlıdır.^{56,58} Spermatogenesisin farklılaşma ve olgunlaşma (epididimal geçiş de dâhil) süreçlerine ulaşmamış spermatojenik hücreler genellikle hasarlı DNA bazlarını ve nükleotidleri tamir edebilme yeteneğine sahiptirler. Ancak epididimisteki olgun ya da ejaküle edilmiş spermatozoonlar oosit ile fertilizasyon şekilleninceye kadar DNA'larındaki hasarları tamir etme kabiliyetinde değildir.¹³ Hasar derecesi düşük DNA'lı spermatozoonlar fertilizasyonun ilk bölünme safhalarında oosit-tamir-mekanizmaları tarafından tamir edilmektedir. Fakat spermatozoondaki DNA hasarı büyükse oosit tarafından tamir edilememektedir.⁵⁶ Çekirdek DNA'sında meydana gelen zararlar sonucunda da spermatogenesisde aksama, spermatozoon sayısında azalma, anormal spermatozoon oranında artış ve fertilizasyon bozuklukları gibi problemler ortaya çıkmaktadır. Öte yandan mitokondriyal DNA'da meydana gelen mutasyonlar, mitokondriyal ATP metabolizmasında hasara neden olduğu için yüksek düzeyde mutant mitokondriyal DNA'ya sahip spermatozoonların motiliteleri düşük düzeyde kalmaktadır.^{59,60}

APOPTOZ

Apoptoz, embriyonik gelişim, doku homeostasisi ve hücre farklılaşması gibi işlemler esnasında meydana

gelen ve programlı hücre ölümü olarak adlandırılan normal fizyolojik bir olaydır. Apoptoz ile yaşlanmış hücreler elimine edilmektedir. Erkek üreme sisteminde ise fizyolojik apoptoz anormal gelişim gösteren ve yaşlanan spermatojenik hücrelerin eliminasyonunu sağlayarak bu tip hücrelerin aşırı üretimini engellemektedir. Bunun dışında testis içerisindeki hücre üretim dengesini korumaktadır. Ancak çeşitli endojen ve egzogen faktörler fizyolojik apoptozu patolojik bir hale dönüştürebilmekte ve buna bağlı olarak sağlıklı hücrelerin de apoptoza girmelerine neden olmaktadır. Apoptozun hücrel mekanizması tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Buna rağmen aşırı ROS üretimi spermatozoonun iç ve dış mitokondriyal membranlarının yapısını bozarak mitokondriumlardan sitokrom C salınımını stimüle etmekte, bu da kaspaz kaskadını (özellikle kaspaz-3 ve -9) aktive ederek sonuçta apoptoza neden olmaktadır. ROS düzeyleri ile kaspaz aktivitesi arasında pozitif bir ilişki bulunmakta olup aşırı ROS üretiminin neden olduğu DNA hasarı da apoptozu hızlandırmaktadır. Aşırı ROS üretimi sonrası şekillenen apoptoza bağlı olarak özellikle spermatozoon sayısı ve motilitesinde düşüşler gözlenmektedir.^{9,61}

■ AŞIRI ROS ÜRETİMİNE NEDEN OLAN ENDOJEN VE EGZOJEN KAYNAKLAR

Sperma olgun ve olgunlaşmamış spermatozoonları, spermatogenezdeki spermatidleri, epitel hücrelerini ve lökositleri ihtiva etmektedir. Bunların arasında lökositler (nötrofil ve makrofajlar) ile olgunlaşmamış spermatozoonlar en önemli endojen ROS kaynaklarıdır. Genellikle prostat ve seminal bezden köken alan lökositler patojenlerle savaş halinde bulunduklarından dolayı yüksek düzeyde ROS üretmektedirler. Özellikle enfeksiyon durumlarında lökositler NADPH sistemi aracılığıyla çok aşırı düzeyde ROS üretilmesine yol açmaktadır. Lökositler olgunlaşmamış spermatozoonlara göre 1000 kat daha fazla ROS üretebilmektedir. Bir ml spermada 1 milyondan daha fazla lökosit bulunması lökositospermi olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyon sonucu lökositler tarafından üretilen aşırı ROS düzeyleri spermatozoon

fonksiyonlarına özellikle motiliteye zarar vermektedir.

Erkek gamet hücreleri pahiten spermatositlerden kauda epididimisteki olgun spermatozoonlara kadar farklılaşmanın çeşitli safhalarında ROS üretme potansiyeline sahiptir. Spermatozoonlar; i) plazma membran düzeyinde NADPH oksidaz sistemi ve ii) mitokondriyumlar düzeyinde NADPH'a bağımlı oksido-redüktazlar aracılığıyla ROS üretmektedir. Öte yandan normal spermatogenesis esnasında sitoplazmik damlacık spermatozoonlardan ayrılmakta ve böylece olgun spermatozoon spermiasyonla tubul lümenine atılmaktadır. Eğer spermatogenezde bir aksama meydana gelirse sitoplazmik damlacıklar tam anlamıyla spermatozoonlardan ayrılamamakta ve bu hücreler olgunlaşmamış veya fonksiyonel olarak hasarlı spermatozoonlar olarak kabul edilmektedir. Sitoplazmik damlacık ROS için NADPH aracılığıyla elektron sağlamakta ve sonuçta ROS düzeylerinde artış gözlenmektedir.^{9,10}

İlaçlar, sigara ve alkol kullanımı gibi yaşam tarzı faktörleri; radyasyon, endüstriyel ve zirai artıklar gibi çevre kirliliği faktörleri ile genel enfeksiyonlar, diyabet ve kanser gibi sistemik patolojiler de erkek üreme sisteminde yüksek düzeylerde ROS üretimini tetikleyen önemli egzogen kaynaklardır.⁶²

■ SONUÇ

Bu derlemede incelenen literatürler ışığında; radikal ve radikal olmayan ROS'un düşük düzeyleri spermatozoonların olgunlaşması özellikle de fertilizasyon öncesi gerekli olan kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon-oosit füzyonu gibi olayların fizyolojik mekanizmalarının düzenlenmesinde olumlu yönde önemli katkı sağlamaktadır. Ancak endojen ve egzogen faktörlerden kaynaklanan yüksek düzeyde ROS üretimi patolojik olarak spermatozoonlardaki lipid, protein ve karbonhidratların peroksidasyonu, DNA hasarı ve apoptoz düzeylerini artırarak spermatozoon üretimi ve fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemekte ve dolayısıyla dölverimini düşürmektedir.

■ KAYNAKLAR

1. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1):47-95.
2. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141(2):312-22.
3. Akpoyraz M, Durak İ. [Biological effects of free radicals]. *Ankara Tıp Mecmuası* 1995;48:253-62.
4. Delibaş N, Özcanakaya R. [Free radicals]. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 1995;2(3):11-7.
5. Agarwal A, Cocuzza M, Abdelrazik H, Sharma RK. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. In: Popov I, Lewin G, eds. *Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment*. Kerala-India: Transworld Research Network; 2008. p.195-218.
6. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev* 2008;1(1):15-24.
7. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:12.
8. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18(3):325-32.

9. Maneesh M, Jayalekshmi H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian J Clin Biochem* 2006;21(2):80-9.
10. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol* 2010;48(5):425-35.
11. Ogbuewu IP, Aladi NO, Etuk IF, Opara MN, Uchegbu MC, Okoli IC, et al. Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. *Res J Vet Sci* 2010;3(3):138-64.
12. Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. [DNA damage of sperm]. *FÜ Sağ Bil Derg* 2006;20(1):85-95.
13. Saraswat S, Kharche SD, Jindal SK. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Iranian J Appl Anim Sci* 2014;4(2):247-55.
14. Türk G. [Adverse effects of chemotherapeutics on male reproductive system, and protective strategies]. *Marmara Pharmaceut J* 2013;17(2):73-92.
15. Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 2004;10(5):387-99.
16. Hammad ME, Filippou AA, Hammad MF. Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *Int J Fertil Steril* 2009;3(3):87-110.
17. Pourouva J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol (Oxf.)* 2010;198(1):15-35.
18. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74(1):139-62.
19. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995;64(1):97-112.
20. Koca N, Karadeniz F. [Production mechanisms of free radical and antioxidant defence systems in the body]. *Gıda Mühendisliği Dergisi* 2003;32-7.
21. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219(1):1-14.
22. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* 2000;25(10):502-8.
23. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* 2001;106(1):62-70.
24. Sparrow CP, Olszewski J. Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transition metal ions. *J Lipid Res* 1993;34(7):1219-28.
25. Whittington K, Ford WC. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl* 1999;22(4):229-35.
26. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;268(5 Pt 1):L699-722.
27. Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Arch Biochem Biophys* 1995;323(1): 120-6.
28. Peskin AV, Winterbourn CC. Histamine chloramine reactivity with thiol compounds, ascorbate, and methionine and with intracellular glutathione. *Free Radic Biol Med* 2003;35(10):1252-60.
29. Broadbent P, Creissen G, Wellburn FA, Mullineaux PM, Wellburn AR. Biochemical effects of tropospheric ozone in transgenic plants. *Biochem Soc Trans* 1994;22(4):1020-5.
30. Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 2004;216(1-2):47-54.
31. Tvrdá E, Knazicka Z, Bardos L, Massanyi P, Lukac N. Impact of oxidative stress on male fertility-A review. *Acta Vet Hung* 2011;59(4):465-84.
32. Bearden HJ, Fuquay JW, Willard ST. *Applied Animal Reproduction*. 6th ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River; 2004.
33. Moore HDM. Contribution of epididymal factors to sperm maturation and storage. *Andrologia* 1998;30(4-5):233-9.
34. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13(7):1864-71.
35. Saowaraw W, Panyim S. The formation of disulfide bonds in human protamines during maturation. *Experientia* 1979;35(2):191-2.
36. Rousseaux J, Rousseaux-Prevost R. Molecular localization of free thiols in human sperm chromatin. *Biol Reprod* 1995;52(5):1066-72.
37. Aitken RJ, Ryan AL, Baker MA, McLaughlin EA. Redox activity associated with maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 2004;36(8):994-1010.
38. Aitken RJ, Vernet P. Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *J Reprod Fertil* 1998;53(Suppl S3):109-18.
39. Aitken RJ. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 1997;3(3):169-73.
40. de Lamirande E, Tsai C, Harakat A, Gagnon C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* 1998;19(5):585-94.
41. O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* 2006;41(4):528-40.
42. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci* 1995;108(Pt 5):2017-25.
43. Surai PF, Fujihara N, Speake BK, Brillard JP, Wishart GJ, Sparks NHC. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. *Asian-Aust J Anim Sci* 2001;14(7):1024-50.
44. Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 2007;77(2): 190-201.
45. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995;42(3):334-46.
46. Gutteridge JMC, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol* 1989;2(2): 195-256.
47. Peng SK, Morin RJ. Effects on membrane function by cholesterol oxidation derivatives in cultured aortic smooth muscle cells. *Artery* 1987;14(2):85-99.
48. Sevanian A, Seraglia R, Traldi P, Rossato P, Ursini F, Hodis H. Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas- and high- performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 1994;17(5):397-409.
49. Tamer L, Ünal B, Aksoy K. [Erythrocyte membrane Na⁺-K⁺ / Mg⁺⁺ adenosine 5'-Triphosphatase, erythrocyte superoxide dismutase and plasma malondialdehyde levels in case of glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme deficiency]. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1998;23(3):114-8.
50. Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* 2004;2:75.
51. Du, J, Gebicki JM. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(11):2334-43.
52. Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000;45(3):215-25.
53. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991;44(4):569-74.
54. Loir M, Lanneau M. Structural functions of the basic nuclear proteins in ram spermatids. *J Ultrastruct Res* 1984;86(3):262-72.
55. Venkatesh S, Deecaraman M, Kumar R, Shamsi MB, Dada R. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian J Med Res* 2009;129(2):127-37.
56. Dinesh V, Shamsi MB, Dada R. Supraphysiological free radical levels and their pathogenesis in male infertility. *Reprod Syst Sex Disord* 2012;1(4):114, (1-15).
57. Aitken RJ, De Iulius GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2010;16(1):3-13.
58. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001;122(4): 497-506.
59. Chinney PF, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease. *Mol Med Today* 2000;6(11):425-32.
60. Spiropoulos J, Turnbull DM, Chinnery PF. Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Hum Reprod* 2002;8(8):719-21.
61. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2005;95(4):503-7.
62. Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil (Camb.)* 2010;13(4):217-25.