

فعالیت آنتی اکسیدان‌های تام در مایع سمینال مردان نابارور سیگاری و غیرسیگاری

اباصلت حسین‌زاده کلاگر^{۱*}، مهدی پورامیر^۲ و عیسی طهماسب‌پورمرزونی^۳

پست الکترونیکی: acolagar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۱/۲۹

چکیده

مایع سمینال انسان دارای انواعی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشد که با جمع‌آوری و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در حیات و عملکرد طبیعی اسپرم‌ها اعمال می‌کنند. بنابراین، این احتمال وجود دارد که هرگونه کاهش در غلظت آنتی‌اکسیدان‌های تام منجر به اثرات عمیقی بر روی توانایی باروری مردان گردد. در این تحقیق فعالیت TAC در مایع سمینال مردان سیگاری و غیرسیگاری نابارور اندازه‌گیری شد. سپس ارتباط آن با پارامترهای اسپرمی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌های semen مردان نابارور سیگاری (n=20) و غیرسیگاری (n=17) از مراکز IVF بابل بر اساس قانون WHO جمع‌آوری گردیدند. پس از سانتریفیوژ، مایع سمینال از سلول‌های اسپرم جداسازی شد و فعالیت TAC نمونه‌ها به روش FRAP اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد بین فعالیت آنتی‌اکسیدان تام در مایع سمینال مردان و کیفیت پارامترهای اسپرمی ارتباط نزدیکی وجود داشته باشد و از طرفی این احتمال وجود دارد که فعالیت پائین TAC در مایع سمینال مردان سیگاری به عنوان یکی از مکانیسم‌های دخیل در کاهش کیفیت اسپرمی در این افراد باشد. یافته‌های این تحقیق و تحقیقات مشابه انجام شده توسط دیگر محققان نشان می‌دهد چون کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام با کاهش کیفیت اسپرم همراه است لذا احتمال دارد کاهش TAC در مایع سمینال نقش بسیار مهمی در توانایی باروری اسپرم‌ها داشته باشد و کاهش آن حیات اسپرم، مخصوصاً در مردان سیگاری را به مخاطره می‌اندازد.

واژه‌های کلیدی: ناباروری مردان، مایع سمینال، فعالیت آنتی‌اکسیدان تام (TAC)

* ۱- استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه مازندران - بابل

۲- دانشیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک - دانشگاه علوم پزشکی بابل - بابل

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دانشگاه مازندران - بابل

مقدمه

تام مایع سمینال با کاهش کیفیت سلول‌های اسپرم مرتبط باشد. تحقیقات اخیر نشان داد که سیگار بر روی کیفیت پارامترهای اسپرمی اثرات منفی اعمال می‌کند [۷-۱۲]، اما مکانیسم واقعی آن هنوز شناخته نشده. تازه‌ترین تحقیقات نشان می‌دهد که غلظت رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در مایع سمینال مردان سیگاری در مقایسه با مردان غیرسیگاری بیشتر است [۸ و ۱۵]. با توجه به تحقیقات صورت گرفته افزایش رادیکال‌های آزاد در مایع سمینال مردان سیگاری می‌تواند چند علت داشته باشد: (I) مطالعات اخیر نشان دادند که در ساختمان سیگار انواعی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل وجود دارند لذا با استعمال آن، رادیکال‌های آزاد از طریق مجاری تنفسی وارد بدن می‌شوند و علاوه بر این که سبب اثرات منفی در بافت‌های مختلف می‌شوند بخشی از آن نیز در اندام تناسلی اثرات مخرب اعمال می‌کند [۱۳ و ۱۴] (II) برخی از مطالعات نشان دادند که سیگار با افزایش عفونت در مجاری تناسلی مردان سبب تجمع و افزایش تعداد سلول‌های سفید، به عنوان منشأی برای تولید رادیکال‌های آزاد، در این ناحیه می‌شوند [۸]. (III) مطالعات دیگر نشان دادند که ترکیبات سمی موجود در سیگار با آسیب فرآیند اسپرماتوژنز منجر به ساخت اسپرم‌های نابالغ و غیر طبیعی می‌شوند. افزایش غلظت اسپرم‌های نابالغ و غیر طبیعی اولاً خود منشأ رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شوند و ثانیاً این که از طریق سیگنال‌هایی سبب فراخواندن سلول‌های سفید به آن ناحیه می‌شوند تا مورد هضم واقع شوند. این امر سبب افزایش سلول‌های سفید و لذا افزایش رادیکال‌های آزاد نیز می‌گردد [۸ و ۱۵] (IV) استعمال سیگار احتمالاً سبب کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های تام در مایع سمینال می‌گردد. این امر می‌تواند منجر به تجمع رادیکال‌های آزاد

رادیکال‌های آزاد از جمله ترکیباتی هستند که دارای یک یا چند الکترون جفت نشده می‌باشند [۱]. آن‌ها بسیار واکنش‌پذیر بوده و برای برطرف نمودن کمبود الکترون خود قادرند با ماکرومولکول‌های زیستی (قندها، لیپیدها، پروتئین‌ها و...) واکنش دهند و با اکسید نمودن آن‌ها، منجر به ایجاد وضعیت استرس اکسیداتیو در سلول‌ها گردند [۲]. رادیکال‌های آزاد از مسیرهای مختلف متابولیکی در هر سلول هوازی ساخته می‌شوند اما منشأ اصلی آن‌ها در مایع سمینال مردان سلول‌های سفید و اسپرم‌های غیرطبیعی و نابالغ می‌باشند [۳]. آن‌ها در غلظت‌های پائین نقش‌های فیزیولوژیکی مهمی نظیر القاء واکنش آکروزمی و فرآیند ظرفیت‌یابی را بر عهده دارند [۴] اما اگر غلظت آن‌ها بیش‌تر از حد متعادل گردد منجر به اثرات مخربی نظیر اکسیداسیون قندها و یا جهش در DNA می‌شوند که نهایتاً سبب مرگ زودرس سلولی می‌گردد [۵]. تمام این اثرات رادیکال‌های آزاد بستگی به حضور یا عدم حضور آنتی‌اکسیدان‌ها دارد. در واقع به همان ترتیبی که مایع سمینال مردان دارای رادیکال‌های آزاد می‌باشد دارای گروهی از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (مثل آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و ردوکتاز) و غیر آنزیمی (مثل ویتامین‌های C، E، A و...) نیز می‌باشد، که نقش مهمی در جمع‌آوری و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند [۶]. در واقع مجموعه آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی یک مایع بیولوژیکی را به طور خلاصه تحت عنوان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام^۱ (TAC) آن می‌نامند که بیان‌کننده فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آن می‌باشد [۶]. از آنجایی که آنتی‌اکسیدان‌ها نقش محوری در دفاع سلول‌ها علیه رادیکال‌های آزاد دارند، بنابراین احتمال می‌رود که کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های

1- Total Antioxidants Capacity (TAC)

تا برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های تام مورد بررسی قرار گیرند.

جدول ۱- آنالیز کیفیت پارامترهای اسپرمی و غلظت TAC در مردان سیگاری و غیرسیگاری نابارور

پارامترهای اسپرم	مردان نابارور غیرسیگاری	مردان نابارور سیگاری
تعداد نمونه	۱۷	۲۰
سن (سال)	۳۱/۴ ± ۶/۴	۳۱/۵ ± ۴/۴۶
حجم انزال (میلی‌لیتر)	۳/۶۹ ± ۱/۲۳	۳/۶۴ ± ۱/۲۶
تعداد اسپرم (×۱۰ ^۶ در هر میلی‌لیتر)	۳۱/۵۱ ± ۱۲/۴۹	۲۷/۵۸ ± ۱۱/۲۳
تعداد کل اسپرم (۱ × ۱۰ ^۶)	۱۴۲/۱۱ ± ۳/۹۷	۱۰۰/۳۳ ± ۲۴/۲۲
درصد اسپرم‌های متحرک	۳۸/۷۸ ± ۱۲/۲۲	۳۲/۲۸ ± ۱۰/۸۶
درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی طبیعی (بر اساس قانون Kruger's)	۴/۲۶ ± ۲/۱۳	۳/۱۴ ± ۲/۱۲
درصد اسپرم‌های زنده	۳۶/۴۲ ± ۱۴/۱۷	۳۲/۴۱ ± ۱۳/۲۱
غلظت TAC (میکرومولار بر لیتر)	۱۵۳۳/۵ ± ۵۲/۵۱۱	۱۳۹۹/۳۷ ± ۴۱۰/۶۵

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام مایع سمینال به روش **FRAP**: فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام مایع سمینال با کمی تغییر به روش ^۳FRAP که اولین بار توسط Benize در سال ۱۹۹۶ ابداع گردید، اندازه‌گیری شد [۱۸]. برای این منظور ابتدا نمونه‌های سمن جمع‌آوری شده در دور ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ درجه به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی (مایع سمینال) ۱۰ بار (با

در مایع سمینال و تشدید اثرات پاتولوژیکی آن‌ها بر روی اسپرم‌های می‌گردد. از آنجایی که اثرات منفی استعمال سیگار بر روی کیفیت اسپرم و خطر ناباروری حاصل از آن تا حدود زیادی اثبات شده است، احتمال می‌رود که یکی از مکانیسم‌های اثر منفی سیگار بر روی کاهش کیفیت اسپرم در مردان سیگاری تا حدودی به خاطر کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های مایع سمینال باشد. لذا به خاطر اهمیت این موضوع و نقش آنتی‌اکسیدان‌های تام در حیات و عملکرد اسپرم، هدف از تحقیق کنونی، بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام در نمونه‌های مایع سمینال مردان نابارور سیگاری و غیرسیگاری و ارتباط آن با کیفیت پارامترهای اسپرمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه: حدود ۳۷ نمونه سمن^۱ از مردان نابارور سیگاری (n=۲۰) و غیرسیگاری (n=۱۷) در مراکز IVF شهرستان بابل جمع‌آوری گردیدند. مراجعه‌کنندگان متعلق به استان مازندران و استان‌های هم‌جوار آن بودند. نمونه‌ها بعد از ۲ تا ۳ روز دوری از آمیزش در همان مراکز IVF در ظرف‌های استریل جمع‌آوری شدند.

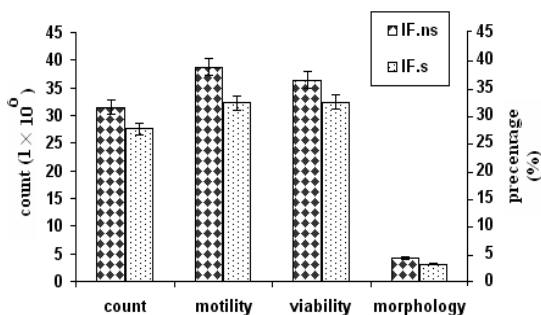
مطالعه پارامترهای اسپرم: نمونه‌های سمن تهیه شده، حدود نیم الی یک ساعت در دمای ۳۷ درجه اینکوبه شدند تا از فرم توده‌ای به فرم مایع روان تبدیل گردند. حدود ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مایع روان برای بررسی پارامترهای اسپرمی نظیر حجم سمن، حرکت اسپرم و تعداد اسپرم بر اساس استانداردهای سازمان بهداشت جهانی [۱۶] (WHO) و درصد مورفولوژی طبیعی آن بر اساس قانون کروگر^۲ مورد آنالیز قرار گرفت [۱۷] (جدول ۱). بقیه نمونه‌های انزالی سریعاً در دمای ۲۰- قرار گرفتند

1- Semen

2- Kruger's

3- Ferric Reducing of Antioxidants Power

۳۱/۴ سال بود. نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای اسپرمی که در جدول ۱ آمده نشان داد که تعداد کل اسپرم در مردان نابارور غیرسیگاری ($23/97 \pm 142/11$) در مقایسه با مردان نابارور سیگاری ($24/22 \pm 100/33$) بیش‌تر است، از طرفی درصد اسپرم‌های متحرک در مردان نابارور غیرسیگاری ($12/22 \pm 38/78$) تا حدودی بیش‌تر از مردان نابارور سیگاری ($10/86 \pm 32/28$) بود. همچنین درصد اسپرم‌هایی با مورفولوژی طبیعی و درصد اسپرم‌های زنده در مردان نابارور غیرسیگاری در مقایسه با مردان سیگاری بیش‌تر بودند (شکل ۱). نتیجه حاصل از آزمایش FRAP در این تحقیق نشان داد غلظت آنتی‌اکسیدان‌های تام (TAC) مایع سمینال در مردان سیگاری ($410/65 \pm 1399/37$) تا حدودی اما نه معنی‌دار ($p\text{-value}=0/413$) کم‌تر از مردان غیرسیگاری ($552/511 \pm 1533/95$) است.



شکل ۱- مقایسه کیفیت پارامترهای اسپرمی در مردان نابارور سیگاری (IF.S) و غیرسیگاری (IF.ns): در این نمودار پارامترهای حرکت^۲، مورفولوژی^۳ و اسپرم‌های زنده^۴ برحسب درصد، و تعداد اسپرم برحسب میلیون در میلی‌لیتر نشان داده شدند (IF.ns: Infertile nonsmoker men و IF.s: Infertile smoker men)

نسبت یک به ۱۰ در آب مقطر) رقیق شد و سریعاً برای اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری TAC یا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، از محلول‌های تازه استاندارد (شامل محلول $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) و محلول تازه FRAP [شامل بافر استات سدیم ۳۰۰mM با $pH=3/6$ ، ۱۰mM TPTZ (۶، ۴، ۲ تری ۲- پیریدیل-S- تری آزین) و ۲۰mM کلرید آهن II به ترتیب با نسبت ۱۰ (بافر استات): (۱: ۱ است)] استفاده شد. جهت آزمایش، داخل هر لوله آزمایش (بسته به تعداد نمونه‌ها) حدود ۱/۵ میلی‌لیتر محلول FRAP^۱ اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم نگه داشته شد. سپس حدود ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های رقیق شده به لوله آزمایش اضافه شد (رنگ محلول فوراً آبی شد) و مجدداً در حمام آب گرم به مدت ۱۰ دقیقه گرم گردید و بعد از این مدت، لوله‌ها از حمام خارج شدند و با صفر کردن دستگاه توسط محلول FRAP، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده شد و سپس غلظت نمونه‌ها از روی استانداردها محاسبه گردید [۱۸].

برای تعیین غلظت نمونه‌ها، از نمودار استاندارد رسم شده با نرم‌افزار Excel استفاده شد. سپس غلظت TAC بین مردان نابارور سیگاری و غیرسیگاری توسط برنامه t-test مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج

در نمونه‌های مورد استفاده تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین سن در مردان نابارور سیگاری و غیرسیگاری وجود نداشت به طوری که میانگین سنی مردان نابارور سیگاری $31/5 \pm 4/6$ سال و برای مردان نابارور غیرسیگاری $31/5 \pm 6/4$

2- Motility
3- Morphology
4- Viability

1- Ferric ion Reducing Antioxidant Power

بحث

جمله پروتئین‌های غشایی اسپرم)، قندها (از جمله قند ریبوز در DNA) و لیپیدهای غشایی سبب اختلال در حرکت، مورفولوژی و توانایی بارورسازی اسپرم‌ها می‌شوند [۲۲ و ۲۳]. از سوی دیگر کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های مایع سمینال شاید جوابگوی یکی از دلایل کاهش کیفیت اسپرم و توانایی باروری در مردان سیگاری باشد. علی‌رغم این که سیگار به عنوان یکی از عوامل اساسی تهدید کننده سلامتی و مرگ و میر شناخته شد ولی اکثر مردم به طور روزانه آن را استعمال می‌نمایند [۲۴-۲۷] و متأسفانه اکثر افراد سیگاری را جوانانی تشکیل می‌دهند که در مرحله بلوغ جنسی قرار دارند (حدود ۴۶٪ از مردان سیگاری بین ۲۰ تا ۳۹ سالگی قرار دارند [۲۷]. از طرفی دسته دیگری از افراد سیگاری را غیرسیگاری‌هایی تشکیل می‌دهند که مدام در معرض دود حاصل از استعمال دخانیات قرار دارند (مخصوصاً نوزادانی که پدر یا مادر آن‌ها عادت سیگار کشیدن دارند) [۸، ۲۹، ۳۰ و ۳۱]. مطالعه قبلی نشان داد که استعمال سیگار می‌تواند روی کیفیت پارامترهای اسپرمی مؤثر باشد [۳۲]. لذا مطالعه اثرات سیگار و ترکیبات مؤثره آن، بر روی قدرت باروری مردان می‌تواند به عنوان یکی از موضوعات اساسی در نظر گرفته شود.

اگر چه اکثر مردان سیگاری ممکن است که بدون هیچ مشکل خاصی صاحب فرزند شوند اما احتمال این که یک اسپرم غیرطبیعی (مثلاً اسپرمی که در یک یا چند ژن خاصی دچار جهش شده باشد) در بارورسازی تخمک شرکت نماید، وجود دارد و این مشکل ممکن است که در نسل‌های آینده اثرات خود را نشان دهد و سبب اثرات شدیدی در نوزادان مثل انواع سرطان و یا عدم تکامل طبیعی جنین گردد. بنابراین غلظت آنتی‌اکسیدان‌های تام در مایع سمینال مردان، مخصوصاً مردان سیگاری و افراد دچار سوء تغذیه از اهمیت خاصی برخوردار بوده و به

سلول‌های اسپرم از لحاظ حساسیت به رادیکال‌های آزاد در مقایسه با دیگر سلول‌های بدن استثناء هستند، چون غشاء پلاسمایی آن‌ها سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع^۱ می‌باشد و از طرفی سیستم دفاعی سیتوپلاسمی آن‌ها بسیار ناچیز می‌باشد چون سلول‌های اسپرم در زمان تقسیم حجم عمده‌ای از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهند [۲]. لذا سیستم آنتی‌اکسیدانی مایع سمینال به عنوان مهم‌ترین سد دفاعی اسپرم‌ها محسوب می‌شود و با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، از عملکرد اسپرم محافظت می‌کند [۱۹]. لذا هر عاملی که سبب کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های مایع سمینال گردد منجر به اختلال در تعادل آنتی‌اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد شده و بر روی عملکرد اسپرم اثر مخرب اعمال می‌کند. همان‌طور که در این تحقیق نشان داده شد (جدول ۱)، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های تام در مایع سمینال مردان سیگاری در مقایسه با مردان غیرسیگاری تا حدودی کم‌تر از مردان غیرسیگاری کم‌تر است. این موضوع شاید کاهش کیفیت اسپرم در مردان سیگاری را که در جدول ۱ آمده است، توضیح دهد. طبق تحقیقات صورت گرفته [۲۰ و ۲۱] که نشان دهنده کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع سمینال مردان سیگاری در مقایسه با مردان غیرسیگاری بودند، و تحقیق کنونی، احتمال می‌رود که یکی از مکانیسم‌هایی که سیگار بر روی کاهش توانایی باروری مردان دارد از طریق کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های مایع سمینال باشد که این اثر منجر به افزایش اثرات پاتولوژیکی رادیکال‌های آزاد مایع سمینال مردان سیگاری می‌گردد.

مطالعات نشان داد کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌های مایع سمینال موجبات اثرات پاتولوژیک رادیکال‌های آزاد را فراهم می‌کند و رادیکال‌های آزاد با آسیب پروتئینا (از

- couples, *Fertility and Sterility*, 79 (2003) 287-91.
- [8] Saleh, R.A., Agarwal, A., Sharma, R.K., Nelson, D.R. and Thomas, A.J., Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study, *Fertility and sterility*, 78, 3 (2002) 491-499.
- [9] Stillman, R.J., Rosenberg, M.J. and Sachs, B.P., Smoking and reproduction. *Fertility and Sterility*, 46 (1986) 545- 66.
- [10] Vine, M.F., Tse, C.K.J., Hu, P.C. and Truong, K.Y., Cigarette smoking and semen quality, *Fertility and Sterility*, 65 (1996) 835-842.
- [11] Said, T.M., Ranga, G. and AgarwaA, I., Relationship between semen quality and tobacco chewing in men undergoing infertility evaluation, *Fertility and Sterility*, 84, 3 (2005) 649-653.
- [12] Karagounis, C.S., Papanikolaou, N.A. and Zavos, P.M., Semen parameters compared between smoking and nonsmoking men: Smoking intensity and semen parameters. *Infertility*, 8 (1985) 373.
- [13] Pryor, W.A. and Stone, K., Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyhydrate, and peroxyhydrate. *Ann NY Acad Sci*, 868 (1993) 12-27.
- [14] Sullivan, P.D., Free radicals of benzo[a]pyrene and derivatives, *Environ. Health Perspect*, 64 (1985) 283-295.
- [15] Sofikitis, N., Miyagawa, I., Dimitriadis, D., Zavos, P., Sikka, S. and Hellstrom, W., Effects of smoking on testicular function, عنوان یکی از فاکتورهای اساسی باید به دقت مورد بررسی قرار گیرد.
- مراجع**
- [1] Church, D.F. and Pryor W.A., Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspec*, 87 (1990) 9741-5.
- [2] Agarwal, A. and Prabakaran, S.A., Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology, *Experimental Biology*, 43 (2005) 963-974.
- [3] Agarwa, A. and Saleh, A., Role of oxidants in male infertility: Rationale, significance, and treatment, *Urologic Clinics*, 29, 4 (2002) 616-627.
- [4] O'Flaherty, C., Lamirande, E. and Gagnon, C., Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine*, 1 (2006) 1-45.
- [5] Aitken, R.J. and Baker, M.A., Oxidative stress, sperm survival and fertility control, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250 (2006) 66-69.
- [6] Agarwal, A., Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 12, 5 (2006) 630-633.
- [7] Kunzle, R., Mueller, M.D., Hanggi, W., Birkhauser, M.H., Drescher, H. and Bersinger, N.A., Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile

- [23]Wong, W.Y., Thomas, C.M.G., Merkus, H.M.W.M., Zielhuis G.A., Doesburg, W.H. and Steegers-Theunissen, R.P.M., Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology, *Fertility and Sterility*, 74 (2000) 930–5.
- [24]The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine Smoking and infertility. *Fertility and sterility*, 82, 1 (2004) 62-73.
- [25]The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine Smoking and infertility, *Fertility and sterility*, 86, 4 (2006) 172-177.
- [26]Wynder, E.L. and Hoffmann, D., Smoking and lung cancer: scientific challenges and opportunities. *Cancer Res*, 54 (1994) 5284–5295.
- [27]Sun, Y., Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med*, 8 (1990) 583–599.
- [28]Langgassner, J., rauchgewohnheiten der osterreichischen Bevolkerung. *Statistische nachrichten*, 5 (1999) 319-326.
- [29]Zavos, P.M. and Zarmakoupis-Zavos, P.N., Impact of cigarette smoking on human reproduction: its effects on male and female fertility, *Technology*, 6 (1999) 9-16.
- [30]Hosseinzadeh Colagar, A., Jorsaraee, G.A. and Tahmasbpour Marzony, E., Negative effects of opiates using on male fertility. The 1st national biotechnology congress, semen quality and sperm fertilizing capacity, *J. Urol*, 154 (1995) 1030–4.
- [16]World Health Organization Mortality Statistics, *World Health Statistics Annual 1997–1999*.
[http. //www. who.int/whosis/mort](http://www.who.int/whosis/mort).
- [17]Kruger, T.F., Menkveld, R., Stander, F.S.H., Lombard, C.J., Van der Merwe, J.P. and Van Zyl, J.A., Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization, *Fertility and Sterility*, 46 (1986)1118–23.
- [18]Benzie, I.F.F., Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences, *Int. J. Food Sc. Nutr*, 47 (1996) 233–262.
- [19]Elsayed, N.M. and Bendich, A., Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke, Elsevier Science Inc, 21 (2001) 551–567.
- [20]Martini, A.C., Molina, R.L., Estofa, D., Senestrari, D., Cuneo, M.F. and Ruiz, R.D., Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality, *Fertility and sterility*, 82, 2 (2004) 374-377.
- [21]Lee, B.M., Lee, S.K. and Kim, H.S., Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, b-carotene and red ginseng). *Cancer Letters*, 132 (1998) 219–227.
- [22]Vogt, H.J., Heller, W.D. and Borelli, S., Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never smokers, *Fertility and Sterility*, 45 (1986) 106–10.

[32] Hosseinzadeh Colagar, A., Jorsaraee, G.A. and Tahmasbpour Marzony, E., Cigarette smoking and the risk of male infertility, Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (2007) 3870-3874.

15-17 Nov 2006, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran.

[31] Hosseinzadeh Colagar, A., Jorsaraee, G. A. and Tahmasbpour Marzony, E., Sperm parameters quality in cigarette smoking men", The 5th basic science conference, 8-9 Nov 2006, Azad Islamic University, Ghaemshar, I.R. of Iran.