



Araştırma Makalesi | Research Article

İDİOPATİK ERKEK FAKTÖR İNFERTİLİTESİ TANISIYLA ICSI YAPILAN HASTALARDA ANTIOKSİDAN TEDAVİNİN FERTİLİZASYON, GEBELİK VE CANLI DOĞUM ORANLARINA ETKİSİ

THE EFFECT OF ANTIOXIDANT TREATMENT ON FERTILIZATION, PREGNANCY AND LIVE BIRTH RATES IN PATIENTS WHO RECEIVED ICSI WITH THE INDICATION OF IDIOPATHIC MALE FACTOR INFERTILITY

 Hasan Yılmaz¹,  Melih Çulha¹

¹Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye.

ÖZ

Amaç: Çalışmamızda idiyopatik erkek faktör infertilitesi (erkek subfertilitesi) nedeniyle intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanan çiftlerde öncesinde kombine antioksidan kullanımının fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarına etkisini araştırmayı amaçladık.

Yöntem: 2008-2010 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı Androloji Polikliniğinde idiyopatik erkek faktör infertilitesi (erkek subfertilitesi) tanısı alan ve Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezinde ICSI tedavisi uygulanan hastalar geriye dönük olarak değerlendirildi. Bunlardan bilgilerine ulaşılabilen oligoastenospemisi olan, eşlik eden kadın faktörü olmayan ve spontan gebelik olmayan 55 hasta çalışmaya dahil edildi. Bu hastalar medikal tedavi almayan (n=31) ve günde iki kez Proxeed plus® tedavisi alan (n=24) olarak gruplandı. Semen parametrelerinde değişim ve fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranları karşılaştırıldı.

Bulgular: Her iki grupta, kadın ve erkek hasta yaşları, başlangıç ve ICSI öncesi sperm sayısı ve hareketleri benzerdi (p>0,05). Her iki grupta enjeksiyon yapılan oosit sayısı, fertilize olan oosit sayısı ve fertilizasyon oranları benzerdi (p>0,05). Her iki grupta gebelik ve canlı doğum oranlarında fark saptanmadı (p>0,05). Tedavi alan grupta ICSI öncesi sperm sayısındaki artış anlamlı değildi (p>0,05) ve sperm hareketi %50'nin altında olanların oranı değişmemiştir (p=1,000).

Sonuç: İdiyopatik erkek faktör infertilitesi nedeniyle ICSI yapılan hastalarda kombine antioksidan kullanımı ile semen parametrelerinde ve fertilizasyon, gebelik, canlı doğum oranlarında anlamlı iyileşme izlenmedi. Bulgularımızın daha iyi değerlendirilebilmesi için plasebo kontrollü ileri dönük rastgele hasta seçimi yapılmış çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan tedavi, infertilite, ICSI, IVF

ABSTRACT

Objective: We aimed to determine the effect of combined antioxidant treatment on fertilization, pregnancy and live birth rates in couples who received Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) due to idiopathic male factor infertility.

Methods: Patients who were diagnosed with idiopathic male factor infertility (male subfertility) in Kocaeli University Urology Department Andrology Outpatient Clinic between 2008-2010 and were treated with ICSI at Kocaeli University Assisted Reproduction Techniques Center were evaluated retrospectively. Of these with available records, 55 patients with oligoastenospemia, without female factor and spontaneous pregnancy were included in the study. These patients were grouped as not receiving medical treatment (n=31) and receiving Proxeed plus® treatment (n=24). Improvement on semen parameters and fertilization, pregnancy and live birth rates were compared.

Results: The mean age of both male and female patients, sperm concentration and motility at baseline and before the ICSI were similar in both groups (p>0.05). The number of injected and fertilized oocytes and fertilization rates were similar in both groups (p>0.05). There was no significant difference in pregnancy and live birth rates in both groups (p>0.05). In the treated group, the improvement in sperm concentration before ICSI was not significant (p>0.05) and also the rate of the sperm motility <50% did not change (p=1.000).

Conclusion: No significant improvement was observed in semen parameters and fertilization, pregnancy and live birth rates with the use of combined antioxidants in patients who received ICSI due to idiopathic male factor infertility. Randomized placebo-controlled prospective studies are needed.

Keywords: Antioxidant therapy, infertility, ICSI, IVF

*İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: Hasan Yılmaz, Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye.

Telefon/Phone: +90 (505) 817 81 10 e-posta/e-mail: hasanyilmazmd@gmail.com

Başvuru/Submitted: 20.05.2021

Kabul/Accepted: 04.06.2021

Online Yayın/Published Online: 30.06.2021

Giriş

İnfertilite, 12 aylık düzenli, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen klinik bir gebelik oluşturmama ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanır ve subfertilite terimiyle özdeş olarak kullanılır.¹ Genel olarak çocuk sahibi olmak için çabalayan fakat henüz çocuk sahibi olamamış çiftler için subfertilite terimi kullanılır.²

Üreme yaşındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'i çocuk sahibi olmakta problem yaşamaktadır.³ Bu çiftlerin %30'u tek başına erkek faktöründen kaynaklanırken %50'sinden fazlasında da bir erkek faktörü mevcuttur.⁴⁻⁶ İdiyopatik ciddi erkek faktör infertilitesi olan hastalarda İnVitro Fertilizasyon (IVF)/Intrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) önemli bir tedavi seçeneğidir. 1978'de IVF/ICSI ile ilk bebeğin (Louise Brown) doğmasından itibaren geçen yıllar içinde tüm gelişmelere rağmen siklus başına canlı bebek dünyaya gelme olasılığı %22 ile %25 arasındadır.⁷ Uygulanacak tedaviler ile sperm kalitesinin iyileştirilmesi IVF/ICSI sonuçlarını etkileyebilir.

Oksitativ stresin semen parametrelerini bozduğu ve erkek subfertilitesine neden olduğu bilinmektedir.⁸⁻¹⁴ Serbest oksijen radikallerinin miktarında oluşan aşırılığın sperm membranına ve sperm DNA'sına zarar verdiği, sperm hareketliliğini, döllemeyi, embriyo gelişimini etkilediği düşünülmektedir.¹⁵⁻¹⁷ Öte yandan antioksidan kullanımının semen parametrelerinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir.¹⁸

Çalışmamızda idiyopatik erkek faktör infertilitesi (erkek subfertilitesi) nedeniyle ICSI uygulanan çiftlerde öncesinde kombine antioksidan kullanımının fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarına etkisini araştırmayı amaçladık.

Yöntem

Kocaeli Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı Androloji Polikliniğinde 2008-2010 yılları arasında idiyopatik erkek faktör infertilitesi (erkek subfertilitesi) tanısı alan ve Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezinde ICSI tedavisi uygulanan hastalar geriye dönük olarak değerlendirildi. Hastaların yaşı, infertilite süresi, başlangıç sperm sayısı ve hareketi, ICSI öncesi sperm sayısı ve hareketi, enjeksiyon yapılan oosit sayısı, fertilize olan oosit sayısı, fertilizasyon oranı, gebelik varlığı, canlı doğum varlığı not edildi. Bunlardan bilgilerine ulaşılabilen, hafif-orta-ağır oligoastenospermi olan, eşlik eden kadın faktörü olmayan ve spontan gebelik olmayan 55 hasta hastalar çalışmaya dahil edildi. Bu hastalar medikal tedavi almayan (n=31) ve günde iki kez oral Proxeed plus® (L-karnitin fumarat 3450 mg, fruktoz 2000 mg, asetil L- karnitin 1000 mg, C vitamini 180 mg, sitrik asit 100 mg, koenzim Q10 40 mg, çinko 20 mg, folik asit 400 mcg, selenyum 100 mcg, B12 vitamini 3 mcg) (E-Pharma Trento S.p.A., Via Provina 2, 38123 Trento (TN) İtalya) tedavisi alan (n=24) olarak gruplandı. Proxeed plus tedavisi 6 ay olarak planlandı.

ICSI başarısı fertilizasyon oranları, gebelik ve canlı doğum oranları olarak değerlendirildi. Fertilizasyon, ICSI sonrası

16-18. saatlerde oositlerde 2-pronüklei ve 2 polar cisimcik olması durumunda normal kabul edildi. Fertilizasyon oranı, fertilize olan oosit sayısının toplam mikroenjeksiyon yapılan oosit sayısına bölünmesi ile hesaplandı. Gebelik, 5-6. haftalarda ultrasonografide fetal kardiyak aktivite saptanması olarak değerlendirildi. Semen analizi 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre değerlendirildi.¹⁹ Semen analizlerinde, sperm konsantrasyonu sayı/ml olarak ve sperm hareketi total sperm içinde hareketli spermelerin yüzdesi olarak saptandı. Toplam ileri hareketli spermelerin oranı %50'nin altında olan ve sperm sayısı 20 mil/ml'nin altında olanlar oligoastenospermi olarak değerlendirildi. Sperm sayısı 20-10 mil/ml olanlar hafif, 10-5 mil/ml olanlar orta, <5 mil/ml olanlar ağır oligospermi olarak sınıflandırıldı.¹⁹

İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21,0 programı kullanıldı. Demografik verileri değerlendirmek için tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, ortanca, çeyrekler arası aralık) kullanıldı. Verilerin normal dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi, Skewness ve Kurtosis ile değerlendirildi. Buna göre parametrik verilerin ortalamalarını karşılaştırmak için Student t testi, parametrik olmayan verilerin ortancalarının karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki kategorik verinin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanıldı. Parametrik olmayan iki bağımlı değişkenin karşılaştırılmasında Wilcoxon rank sum test kullanıldı. Kategorik bağımlı değişkenlerin oranlarında değişikliğin değerlendirilmesi için ise McNemar testis kullanıldı. p<0,05 istatistiksel anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışma kriterlerine uyan toplam 55 hastanın verileri analiz edildi. Hastaların demografik özelliklerinin ve ICSI başarısının tedavi alan ve almayan gruba göre karşılaştırılması Tablo 1'de verilmiştir. Her iki grupta, kadın ve erkek hasta yaşları, başlangıç ve ICSI öncesi sperm sayı ve hareketleri benzerdi (p>0,05). Her iki grupta hastaların büyük çoğunluğu ağır oligoastenospermi tanılı idi.

Tedavi alan ve almayan grupta enjeksiyon yapılan oosit sayısı, fertilize olan oosit sayısı ve fertilizasyon oranları benzerdi. Her iki grupta gebelik ve canlı doğum oranlarında da fark saptanmadı (p>0,05) (Tablo 1).

Tedavi almayan grupta ICSI öncesi sperm sayısı başlangıçta bakılan sperm sayısına göre anlamlı olarak artarken (Wilcoxon rank sum test, p=0,002), sperm hareketi %50' nin altında olanların oranı değişmemiştir (McNemar, p=1,000). Tedavi alan grupta ise ICSI öncesi sperm sayısındaki artış anlamlı değildi (Wilcoxon rank sum test, p=0,065) ve sperm hareketi %50'nin altında olanların oranı yine değişmemiştir (McNemar, p=1,000).

Tablo 1. Hastaların demografik özelliklerinin ve ICSI başarısının tedavi alan ve almayan gruba göre karşılaştırılması

Parametreler		Tedavi almayanlar	Antioksidan tedavi alanlar	p
Erkek yaşı, yıl	Ortalama±SS*	32,31±4,52	32,83±4,87	0,694 ^a
Kadın yaşı, yıl	Ortalama±SS	30,03±4,58	30,05±3,86	0,994 ^a
İnfertilite süresi, yıl	Ortanca (ÇAA)	4,00 (3,00-7,00)	4,00 (2,75-7,00)	0,815 ^b
Başlangıç sperm sayısı, n/ml	Ortanca (ÇAA)	2,70 (0,1-5,40)	2,45 (0,60-9,00)	0,410 ^b
Başlangıç sperm hareketi <%50, n (%)		18 (58,06)	15 (62,50)	0,420 ^c
Başlangıçta Oligoastenosperti	Hafif, n (%)	4 (12,9)	5 (20,8)	0,602 ^c
	Orta, n (%)	5 (16,1)	5 (20,8)	
	Ağır, n (%)	22 (71,0)	14 (58,3)	
ICSI öncesi sperm sayısı, n/ml	Ortanca (ÇAA)	5,00 (0,07-17,00)	7,00 (0,05-17,00)	0,805 ^b
ICSI öncesi sperm hareketi <%50, n (%)		19 (61,29)	13 (54,16)	0,779 ^c
Enjeksiyon yapılan oosit sayısı	Ortanca (ÇAA)	10,00 (4,00-13,00)	7,00 (4,00-12,00)	0,477 ^b
Fertilize olan oosit sayısı	Ortanca (ÇAA)	5,00 (3,00-9,00)	6,00 (3,00-8,50)	0,905 ^b
Fertilizasyon oranı	Ortalama±SS	64,77±23,86	76,11±19,98	0,071 ^a
Gebelik oranı, n (%)		13 (41,9)	12 (50,0)	0,551 ^c
Canlı doğum, n (%)		9 (29,03)	6 (25,0)	0,770 ^c

SS: Standart Sapma, ÇAA: Çeyrekler Arası Aralık, *Student-t Testi, ^aKi-kare Testi, ^bMann-Whitney U Testi

Tartışma

Erkek subfertilitesi sperm üretim azlığından (oligozoospermi), sperm hareket azlığından (astenosperti) veya morfoloji bozukluğundan (teratospermi) kaynaklanabilir. Fakat genelde bunların kombinasyonu görülür ki; bu durum oligoastenoteratospermi olarak adlandırılır ve erkek subfertilitesinin en sık nedeni olarak kabul edilir.²⁰ Günümüzde erkek faktör subfertilitesinin büyük bir kısmında bu duruma yol açan bir sebep bulunamaz ve idiopatik olarak adlandırılır. Erkek subfertilitesinin altında yatan faktörlerinin tanısında ve tedavisindeki kanıt azlığı ampirik yaklaşımları ön plana çıkarmıştır. Antioksidanlar bu amaçla en çok kullanılan ve araştırma yapılan tedavi ajanlarıdır.

Literatürde antioksidan tedavisinin semen parametreleri ve gebelik üzerine etkileri yoğun şekilde değerlendirilse de IVF/ICSI başarısına etkisini inceleyen az sayıda çalışma vardır. İlk defa Kessopoulou ve ark. tarafından, günde 600 mg oral E vitamini alanlarla plasebo alanlar karşılaştırılmış ve E vitamini alanların daha iyi invitro sperm fonksiyonu olduğu tespit edilmiştir.²¹ Daha sonra Greco ve ark. oksitativ sperm DNA hasarı saptanmış olan ve başarısız IVF/ICSI sonrası oral antioksidan (1 gr C vitamini ve 1 gr E vitamini) tedavisi alan ve yeniden IVF/ICSI uygulanan 38 hastanın her iki IVF/ICSI siklusunu karşılaştırdıkları çalışmalarında antioksidan tedavisi ile fertilizasyon oranları değişmese de daha fazla klinik gebelik ve implantasyon saptamıştır.²² Tremellen ve ark. 2007 yılında, 60 hastayı plasebo ve kombine oral antioksidan kullanan iki gruba randomize etmiştir. Fertilizasyon oranlarında fark izlenmemiş ancak antioksidan grubunda anlamlı oranda daha fazla gebelik elde edilmiştir (%38,5 vs %16).²³ Yakın zamanda yine Tremellen ve ark. veritabanlarındaki 657 çifti geriye dönük değerlendirdikleri çalışmalarında IVF/ICSI öncesi kombine oral antioksidan kullananların, ilaç kullanmayanlara göre gebelik ve canlı doğum oranlarının anlamlı oranda daha fazla olduğunu saptamıştır.²⁴ Joseph ve ark. ise, erkek faktör subfertilitesi nedeniyle IVF/ICSI

planlan 200 çifti, oral antioksidan tedavi alan (C vitamini, E vitamini ve çinko) ve almayan olmak üzere iki gruba ayırmıştır. IVF/ICSI yapılan 135 çifti değerlendirdiklerinde gruplar arasında gebelik ve canlı doğum açısından anlamlı fark saptanmamıştır.²⁵ Çalışmamızdaki bulgulara göre de oral antioksidan tedavi alanlarla almayanlar arasında ICSI başarısı açısından anlamlı fark saptanmadı.

Yakın zamanda Smits ve ark. tarafından, aynı grubun 2011²⁶ ve 2014'te²⁷ yayınladığı Cochrane veri tabanı gözden geçirmesi ve meta-analizinin güncellenmiş versiyonu yayımlandı.¹⁸ Ciddi metodolojik problemleri olan çalışmalar dışlanırken, dahil ettikleri çalışmaları da taraflı seçim riski açısından değerlendirilmiş. Elde ettikleri sonuçlara göre oral antioksidanlar, artan canlı doğum ve klinik gebelik oranı ile ilişkilendirilebilir. Buna göre canlı doğum için incelenen popülasyon göz önüne alındığında antioksidan kullanmak canlı doğum ihtimalini %12'den %14-26 ya yükseltir. Buna karşın taraflı seçim için yüksek riskli çalışmalar analizden çıkarıldığında, artan canlı doğum kanıtı saptanmamıştır.¹⁸

Steiner ve ark. yakın zamanda kombine oral antioksidan kullanımının semen parametrelerine, gebelik ve canlı doğuma olan etkilerini araştırmak için çok merkezli, çift-kör, rastgele, plasebo kontrollü çalışmalarını yayınladılar.²⁸ Yüksek DNA fragmentasyonu (≥%25), oligospermisi, astenospermisi veya teratospermisinden en az biri olan ve kadın faktörü olmayan 174 hasta çalışmalarına dahil edilmiş. Başlangıç semen analizlerine göre 3. ayda oligospermik 66 hastanın sperm konsantrasyonunda, kötü morfolojili 48 hastanın morfolojisinde, astenospermik 75 hastanın hareketinde, DNA fragmentasyonu ≥%25 olan 44 hastanın DNA hasarında anlamlı iyileşme saptanmamıştır. Gebelik ve canlı doğumda anlamlı fark saptanmamıştır.²⁸

Çalışmamızda oral antioksidan kullananların semen parametrelerinde anlamlı iyileşme saptanmadı. Bulgularımıza benzer şekilde Joseph ve ark. ve Steiner ve ark. da sperm sayısı ve hareketinde antioksidan tedavisi ile anlamlı iyileşme saptanmamıştır.^{25, 28} Buna karşın Smits ve ark. tarafından yayınlanan meta-analizde antioksidan

kullanımının semen parametrelerinde anlamlı iyileşme sağladığı ileri sürülmüştür.¹⁸

Çalışmamıza dahil edilen hastaların semen analizleri 2008-2010 yıllarını kapsadığı için ve bu sırada semen parametrelerinin değerlendirilmesinde WHO'nun 1999'da yayınlanan rehberi kullanıldığından sperm konsantrasyonu sınırı <20 mil/ml olarak ve hareketli sperm oranı olarak <%50 kullanılmıştır.¹⁹ Sonrasında yayınlanan rehberde bu limitler daha aşağıya çekilmiştir. Bunun yanında çalışmamızın yapıldığı tarihte kurumumuzda sperm DNA oksitativ stres testi veya sperm DNA fragmentasyonu bakılmadığından bulgulara dahil edilememiştir.

Çalışmamızda bulunan önemli kısıtlamalar ileri sürdüğümüz sonuçları etkilemektedir. Çalışma içine alınan hastaların seçimlerinde açık ve net kriterler kullanılmadığından ve çalışma için seçilen zaman aralığındaki her bir hastaya katılım için eşit şans verilemediğinden çalışmamız tarafsızlık açısından yüksek risklidir. Hastaların antioksidan tedavisine devamlılığı ve her bir hastanın tedavi aldığı süre belirtilmemiştir. Antioksidan aldıktan sonra ICSI yapılabildiği kadar geçen süre belirtilmemiştir. Çalışma geriye dönük tasarlanmıştır ve hasta sayısı verilerin tüm popülasyona genellenmesi için yeterli değildir. Çalışma sadece ICSI uygulanan hastaları içerdiğinden hastaların büyük kısmında ağır oligoastenospermi mevcuttu, bu da antioksidanların olası pozitif etkilerini sınırlandırıyor olabilir. Çalışmanın yapıldığı merkezde palpe edilebilen varikoseli olan tüm subfertil erkeklere varikoselektomi önerilmekte ve uygulanmaktadır. Buna karşın palpe edilen varikoseli olduğu halde cerrahi uygulanmamış hastalar var ise de bilgilerine ulaşılamadığından belirtilmemiştir.

Sonuç olarak, idiyopatik erkek faktör infertilitesi nedeniyle ICSI yapılan hastalarda kombine antioksidan kullanımı ile semen parametrelerinde ve fertilizasyon, gebelik, canlı doğum oranlarında anlamlı iyileşme olmadığını düşünmekteyiz. Bulgularımızın daha iyi değerlendirilebilmesi için plasebo kontrollü ileri dönük rastgele hasta seçimi yapılmış çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik standartlara uygunluk

Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulundan 27/ 12/ 2010 KAEK-1/8, Proje No:2010/7 ile onay alındı.

Finansal destek

Yazarlar çalışmada hiçbir kişi, kurum ve kuruluştan finansal destek almadığını beyan eder.

Çıkar Çatışması

Yazarlar bu çalışma ile ilgili herhangi bir kurum, kuruluş, kişi ile mali çıkar çatışması olmadığını ve yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmadığını beyan etmektedir.

Yazar Katkısı

MÇ: Orijinal fikir; MÇ: Tasarım; HY, MÇ: Veri toplanması; HY: İstatistik; HY: Literatür taraması; HY: Yazım.

Kaynaklar

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Fertility and Sterility*. 2017;108(3):393-406. doi:10.1016/j.fertnstert.2017.06.005
2. Gnath C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human Reproduction*. 2005;20(5):1144-1147. doi:10.1093/humrep/deh870
3. Evers JL. Female subfertility. *Lancet*. 2002;360(9327):151-159. doi:10.1016/S0140-6736(02)09417-5
4. Siddiq FM, Sigman M. A new look at the medical management of infertility. *The Urologic clinics of North America*. 2002;29(4):949-63. doi:10.1016/s0094-0143(02)00085-x
5. Irvine DS. Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human Reproduction*. 1998;13 Suppl 1:33-44. doi:10.1093/humrep/13.suppl_1.33
6. Winters BR, Walsh TJ. The epidemiology of male infertility. *The Urologic clinics of North America*. 2014;41(1):195-204. doi:10.1016/j.ucl.2013.08.006
7. De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, et al. ART in Europe, 2015: results generated from European registries by ESHRE. *Human Reproduction Open*. 2020;2020(1):hoz038. doi:10.1093/hropen/hoz038
8. Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1992;94(2):451-462. doi:10.1530/jrf.0.0940451
9. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1987;81(2):459-469. doi:10.1530/jrf.0.0810459
10. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *Journal of Andrology*. 1989;10(3):214-220. doi:10.1002/j.1939-4640.1989.tb00091.x
11. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*. 1992;57(2):409-416. doi:10.1016/s0015-0282(16)54855-9
12. Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertility and Sterility*. 1994;62(4):862-868. doi:10.1016/s0015-0282(16)57017-4
13. Shekarriz M, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. *Urology*. 1995;45(1):103-107. doi:10.1016/s0090-4295(95)97088-6
14. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 1993;16(3):183-188. doi:10.1111/j.1365-2605.1993.tb01177.x
15. Shimura T, Inoue M, Taga M, et al. p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. *Molecular and Cellular Biology*. 2002;22(7):2220-2228. doi:10.1128/mcb.22.7.2220-2228.2002

16. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2012;27(10):2908-1917. doi:10.1093/humrep/des261
17. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*. 2014;29(11):2402-2412. doi:10.1093/humrep/deu228
18. Smits RM, Mackenzie-Proctor R, Yazdani A, Stankiewicz MT, Jordan V, Showell MG. Antioxidants for male subfertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019;3:CD007411. doi:10.1002/14651858.CD007411.pub4
19. WHO. WHO Laboratory Manual for The Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction Cambridge University Press; 1999:126.
20. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *The New England Journal of Medicine*. 2001;345(19):1388-1393. doi:10.1056/NEJMoa003005
21. Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, et al. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertility and Sterility*. 1995;64(4):825-831. doi:10.1016/s0015-0282(16)57861-3
22. Greco E, Romano S, Iacobelli M, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Human Reproduction*. 2005;20(9):2590-2594. doi:10.1093/humrep/dei091
23. Tremellen K, Miari G, Froiland D, Thompson J. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2007;47(3):216-221. doi:10.1111/j.1479-828X.2007.00723.x
24. Tremellen K, Woodman R, Hill A, Shehadeh H, Lane M, Zander-Fox D. Use of a male antioxidant nutraceutical is associated with superior live birth rates during IVF treatment. *Asian Journal of Andrology*. 2021;23(1):16-23. doi:10.4103/aja.aja_41_20
25. Joseph T, Mascarenhas M, Karuppusami R, Karthikeyan M, Kunjummen AT, Kamath MS. Antioxidant pretreatment for male partner before ART for male factor subfertility: a randomized controlled trial. *Human Reproduction Open*. 2020;2020(4):hoaa050. doi:10.1093/hropen/hoaa050
26. Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011;(1):CD007411. doi:10.1002/14651858.CD007411.pub2
27. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014;(12):CD007411. doi:10.1002/14651858.CD007411.pub3
28. Steiner AZ, Hansen KR, Barnhart KT, et al. The effect of antioxidants on male factor infertility: the Males, Antioxidants, and Infertility (MOXI) randomized clinical trial. *Fertility and Sterility*. 2020;113(3):552-560e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2019.11.