

Effect of Low-Level Laser Therapy on the Nrf2/Keap1 Pathway in NMRI Mice with Testicular Torsion

Mohammad Bayat¹,
Mahsa Soltani²,
Ruhollah Torabi²,
Maryam Baazm³,
Mitra Barzroodi¹

¹ PhD in Anatomical Sciences, Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

² MSc in Anatomical Sciences, Students Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

³ PhD in Anatomical Sciences, Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received April 4, 2024; Accepted August 31, 2025)

Abstract

Background and purpose: Testicular torsion (TT) is a urological emergency characterized by twisting of the spermatic cord, which reduces blood flow and leads to testicular ischemia. Low-level laser therapy (LLLTT), an emerging therapeutic approach, may enhance mitochondrial energy production and activate immune responses. The aim of this study was to investigate the effect of LLLTT on the protective Nrf2/Keap1 pathway in the testes of NMRI mice with testicular torsion.

Materials and methods: In this experimental study, male NMRI mice were randomly divided into four groups (six mice per group): control (Cont), laser (L), torsion (T), and combined torsion and laser (T&L). Both testes were rotated 720 degrees counterclockwise for 2 hours and then returned to their original positions. Laser treatment (808 nm, 0.03 J/cm², 1 min per session) was applied for 21 days, three sessions per week. MDA and TAC levels, as well as Nrf2 and Keap1 gene expression, were measured by real-time PCR.

Results: In the testicular torsion group, a significant increase in MDA levels and a decrease in TAC were observed ($P < 0.001$). Low-level laser therapy significantly increased the expression of Nrf2 ($P < 0.001$) and Keap1 ($P < 0.01$) genes, reduced MDA levels, and elevated TAC levels ($P < 0.001$).

Conclusion: Low-level laser therapy administered for three weeks following testicular detorsion may reduce oxidative stress and upregulate genes in the Nrf2/Keap1 pathway in mice, and thus could serve as an adjunctive therapy to mitigate testicular torsion-induced injuries.

Keywords: LLLTT, MDA, TAC, Keap1, Nrf2, testicular torsion

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (249): 101-107 (Persian).

Corresponding Author: Mitra Barzroodi pour - School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran (E-mail: m.barzroodipour@arakmu.ac.ir)

بررسی اثر لیزر درمانی کم توان بر مسیر *Nrf2/keap1* در موش‌های نژاد NMRI، با پیچ خوردگی بیضه

محمد بیات^۱
مهسا سلطانی^۲
روح الله ترابی^۲
مریم باعزم^۳
میترا برزودی پور^۱

چکیده

سابقه و هدف: پیچ خوردگی بیضه یک وضعیت اورژانسی در ارولوژی است که با پیچش طناب اسپرماتیک و کاهش خونرسانی، منجر به ایسکمی بافت بیضه می‌شود. لیزر درمانی با توان کم به عنوان یک روش نوین، می‌تواند تولید انرژی میتوکندری را افزایش دهد و پاسخ ایمنی را فعال کند. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر لیزر کم توان بر مسیر حفاظتی *Nrf2/Keap1*، در بیضه موش‌های NMRI با پیچ خوردگی بیضه، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، موش‌های نژاد NMRI به طور تصادفی به ۴ گروه (هر گروه ۶ سر)، کنترل (Cont)، لیزر (L)، پیچ خوردگی بیضه (T) و پیچ خوردگی بیضه و لیزر (T&L)، تقسیم شدند. هر دو بیضه به مدت ۲ ساعت به میزان ۷۲۰ درجه خلاف جهت عقربه‌های ساعت چرخانده شده و سپس به موقعیت اولیه خود بازگردانده شدند. درمان با لیزر (۸۰۸ نانومتر، ۰/۰۳ J/cm²، ۱ دقیقه) به مدت ۲۱ روز، ۳ جلسه در هفته اعمال شد. سطوح MDA، TAC و بیان ژن‌های *Nrf2* و *Keap1* با استفاده از real-time PCR اندازه گیری شدند.

یافته‌ها: افزایش سطح MDA و کاهش TAC به طور معنی داری ($P < 0/001$) در گروه پیچ خوردگی بیضه دیده شد. درمان با لیزر کم توان به طور معنی داری موجب افزایش بیان ژن‌های *Nrf2* ($P < 0/001$) و *Keap1* ($P < 0/001$) و کاهش سطح MDA و افزایش سطح TAC ($P < 0/001$) شده است.

استنتاج: درمان با لیزر کم توان به مدت ۳ هفته پس از جراحی واپیچش بیضه احتمالاً با کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش بیان ژن‌های مسیر *Nrf2/Keap1* در موش‌ها، می‌تواند به عنوان روشی مکمل در کاهش آسیب‌های پیچ خوردگی بیضه مؤثر باشد.

واژه های کلیدی: *Nrf2*، *Keap1*، TAC، MDA، LLLT، پیچ خوردگی بیضه

Email: m.barzoodipour@arakmu.ac.ir

مؤلف مسئول: میترا برزودی پور- اراک: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۱. دکترای تخصصی علوم تشریحی، استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۲. کارشناسی ارشد علوم تشریحی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳. دکترای تخصصی علوم تشریحی، استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۱/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۶/۹

مقدمه

پیچ خوردگی بیضه (Testicular Torsion) یک وضعیت اورژانسی اورولوژیکی است که با چرخش بیضه، قطع خونرسانی و ایسکمی بافت بیضه همراه است و در مردان زیر ۲۵ سال با شیوع ۱ در ۴۰۰۰ رخ می‌دهد (۱، ۲). جراحی واپیچش، جریان خون را باز می‌گرداند اما موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، التهاب، آسیب ایسکمی-ریپرفیوژن (I/R: Ischemia-Reperfusion) و آپوپتوز می‌شود (۳-۵). در پاسخ استرس اکسیداتیو، *Nrf2* (Nuclear factor erythroid 2-related factor2) پروتئین Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein) جدا شد، با فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند همواکسیژناز ۱ (HO-1) و کیتون اکسیدوردوکتاز ۱ (NQO1) باعث محافظت سلولی می‌شود. فعال‌سازی مسیر *Nrf2* نقش مهمی در کاهش آسیب بیضه و حفظ عملکرد آن دارد (۶، ۷). درمان‌های کمکی مانند استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها، روش‌های فیزیکی هم‌چون لیزر درمانی با توان کم (LLLT: low-level laser therapy) با طول موج ۶۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر، با تحریک فرآیندهای فتوشیمیایی و زنجیره تنفسی میتوکندری، رونویسی ژن‌های مرتبط با واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی توسط فاکتورهای *Nrf2*، *NF-κB* و *AP-1* آغاز می‌کند (۸-۱۰). LLLT با تأثیرات ضد التهابی، کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود ترمیم بافتی، رویکردی مفید در کاهش آسیب I/R شناخته شده است (۱۱-۱۴). مطالعه حاضر با تمرکز بر فعال‌سازی مسیر *Nrf2/Keap1* توسط LLLT، یک روش درمانی مکمل همراه جراحی، برای کاهش عوارض پیچ خوردگی بیضه می‌باشد که در تحقیقات پیشین کم‌تر به آن پرداخته شده است. این رویکرد می‌تواند نشان‌دهنده اثرات حفاظتی و بیولوژیک LLLT بر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از I/R در باروری باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، ۲۴ موش نر بالغ NMRI (وزن ۲۰-۲۵ گرم) تحت شرایط استاندارد با رعایت

دستورالعمل‌های اخلاقی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک (IR.ARAKMU.AEC.1403.017) به ۴ گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، پیچ خوردگی بیضه (T) و پیچ خوردگی بیضه و لیزر (T&L) (هر گروه ۶ سر) تقسیم شدند. پس از برش شکمی استریل، هر دو بیضه ۷۲۰ درجه خلاف جهت عقربه‌های ساعت چرخانده و پس از ۲ ساعت واپیچش انجام شد (۱۵). اولین تابش لیزر (۸۰۸ نانومتر، 0.3 J/cm^2 ، ۱ دقیقه) بلافاصله روی هر دو بیضه گروه پیچ خوردگی و لیزر اعمال شد. LLLT سه جلسه در هفته، هر جلسه ۱ دقیقه، به مدت ۲۱ روز ادامه یافت (۱۶). با بیهوشی عمیق و آسان‌کشی، بیضه‌ها خارج شدند. بیضه چپ برای بررسی بیان ژن و بیضه راست برای اندازه‌گیری MDA (مالون دی‌آلدئید) و TAC (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA بیان ژن‌های *Nrf2* (پرایمر 5'CACATCCAGACAGACACCAG3' و 3'TATCCAGGGCAAGCGACTC5') و *Keap1* (پرایمر 5'GTGGGCGAGAAGTGTGTCC3' و 3'GTGGGCGAGAAGTGTGTCC3') و *GAPDH* (پرایمر 5'AGCAAGGACACTGAGCAAGAG3' و 3'GCAGCGAACTTTATTGATGGT3') با Real-time polymerase chain reaction (Realtime-PCR) بررسی و سنجش میزان بیان نسبی ژن‌ها با روش $\Delta\Delta\text{CT}$ محاسبه شد (۱۷).

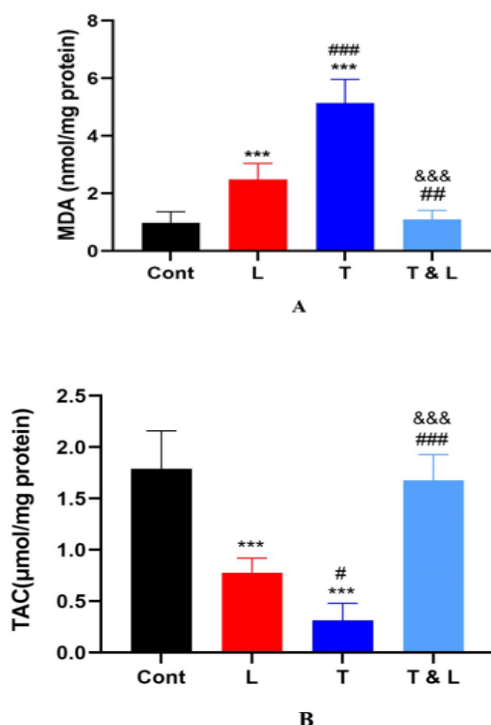
استرس اکسیداتیو بافت بیضه، با اندازه‌گیری MDA (کیازست) به روش واکنش تیوباربتوریک اسید (کیازست) (nmol/mg protein) (TBA) و TAC (کیازست) با روش FRAP (μmol/mg protein) بررسی شد (۲۱-۱۸). آنالیز آماری با نرم افزار Graph Pad Prism10 انجام و داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شدند. نرمال بودن با آزمون شاپیرو-ویلک تایید و مقایسه میانگین گروه‌ها با One-way ANOVA صورت گرفت. در صورت معنی‌داری، آزمون توکی برای مقایسه زوجی استفاده شد. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها و بحث

بیان ژن‌های Nrf2 و Keap1

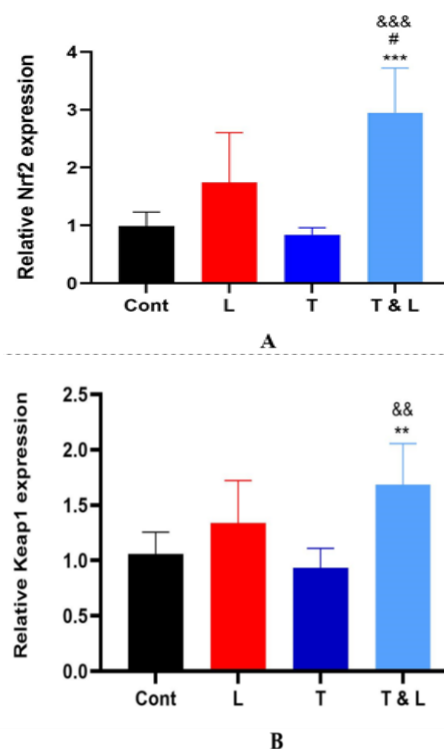
در گروه پیچ خوردگی بیضه و لیزر افزایش معنی‌دار ژن Nrf2 نسبت به گروه‌های کنترل و پیچ خوردگی بیضه ($P < 0/001$) و لیزر ($P < 0/05$) مشاهده شد (تصویر شماره ۱، A). بیان ژن Keap1 در گروه پیچ خوردگی بیضه و لیزر، در مقایسه با گروه‌های کنترل و پیچ خوردگی بیضه افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/01$ ، تصویر شماره ۱، B).

تصویر شماره ۲، A) و سطح TAC نسبت به کنترل ($P < 0/001$) و لیزر ($P < 0/05$) کاهش داشت (تصویر شماره ۲، B). در گروه پیچ خوردگی بیضه و لیزر، MDA نسبت به گروه‌های لیزر ($P < 0/01$) و پیچ خوردگی بیضه ($P < 0/001$) کاهش معنی‌دار (تصویر شماره ۲، A) و TAC، افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های لیزر و پیچ خوردگی بیضه نشان داد ($P < 0/001$ ، تصویر شماره ۲، B).



تصویر شماره ۲: A: سطح MDA و B: TAC در گروه‌های مورد آزمایش، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، پیچ خوردگی بیضه (T)، پیچ خوردگی بیضه و لیزر (T&L)، * معنی‌داری با گروه کنترل، # معنی‌داری با گروه لیزر، & معنی‌داری با گروه پیچ خوردگی بیضه، & معنی‌داری با گروه لیزر، & معنی‌داری با گروه پیچ خوردگی بیضه، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است.

مطالعه حاضر نشان داد که پیچ خوردگی بیضه باعث کاهش غیر معنی‌دار بیان ژن Nrf2، کاهش ظرفیت TAC و افزایش MDA در بافت بیضه می‌شود، در حالی که LLLT به‌طور معنی‌داری باعث افزایش بیان Nrf2 و TAC و کاهش MDA گردید.



تصویر شماره ۱: A: میزان بیان ژن‌های Nrf2 و B: Keap1 در گروه‌های مورد آزمایش، گروه کنترل (Cont)، لیزر (L)، پیچ خوردگی بیضه (T)، پیچ خوردگی بیضه و لیزر (T&L)، * معنی‌داری با گروه کنترل، # معنی‌داری با گروه لیزر، & معنی‌داری با گروه پیچ خوردگی بیضه، مقادیر به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین بیان شده است.

بررسی سطح MDA و TAC

در گروه پیچ خوردگی بیضه سطح MDA نسبت به کنترل و لیزر به‌طور معنی‌داری افزایش ($P < 0/001$ ،

ظرفیت آنتی اکسیدانی بافت بیضه و فعال سازی مسیر Nrf2/Keap1 را افزایش می دهد که به کاهش آسیب های ناشی از ROS و استرس اکسیداتیو و بهبود عملکرد بیضه کمک می کند (۶، ۲۹). LLLT با جذب توسط میتوکندری ها، تولید ATP را افزایش و ROS را کاهش می دهد، فاکتورهای رونویسی، ژن های ترمیم و آنتی اکسیدان ها را فعال کرده، رگرایی را تحریک و با کاهش التهاب به بهبود بافت کمک می کند (۳۱-۲۹). در مطالعه حاضر، LLLT احتمالاً با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی سطح MDA را کاهش داده و از آسیب غشای سلول ها جلوگیری می کند (۳۰). LLLT علاوه بر کاهش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و مهار آپوپتوز القا شده در اثر هیپوترمی بیضه (۳۲)، زمانی که به مدت ۳ هفته پس از جراحی پیچ خوردگی بیضه استفاده شود، با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن های مسیر Nrf2/Keap1، در کاهش آسیب های اکسیداتیو نقش موثری ایفا می کند. با این حال، برای تأیید اثر بخشی و ایمنی آن، مطالعات بیش تری مورد نیاز است.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر بر اساس طرح تحقیقاتی مورد تأیید معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است. از همکارانی که ما را در این پژوهش یاری کردند، قدردانی می شود.

پیچ خوردگی بیضه، منجر به کاهش خونرسانی و ایجاد ایسکمی در بافت بیضه می شود (۲۲). بازگرداندن جریان خون، از طریق واپیچش باعث تولید انبوه رادیکال های آزاد اکسیژن می شود که به آسیب بافتی، تخریب پروتئین ها و DNA و اختلالات هورمونی می انجامد (۲۳، ۲۴). هم چنین، ROS باعث آغاز پراکسیداسیون لیپیدی در غشای سلولی و اختلال عملکرد سلولی می شود. مسیر تنظیمی Nrf2/Keap1 با کنترل بیش از ۲۰۰ ژن محافظ، نقش حیاتی در مقابله با استرس اکسایشی و حفظ سلامت سلولی دارد (۲۵، ۲۶).

در مطالعه حاضر، پس از پیچ خوردگی بیضه، بیان ژن Nrf2 کاهش یافت که معنی دار نبود، در حالی که مطالعات پیشین در مدل های حیوانی I/R کاهش بیان Nrf2 و آنزیم های HO-1 و NQO1 را گزارش کرده اند (۲۷). استرس اکسیداتیو ناشی از پیچ خوردگی بیضه، سطح پروتئین های آنتی اکسیدانی محافظتی را کاهش می دهد (۲۲). افزایش رادیکال های آزاد موجب آسیب غشای سلول ها و تولید محصولات پراکسیداسیون مانند MDA به عنوان شاخص آسیب اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی می شود (۲۸). در گروه پیچ خوردگی بیضه، سطح MDA افزایش و سطح TAC بطور معنی داری کاهش یافت که احتمالاً ناشی از غیر فعال شدن آنزیم های آنتی اکسیدانی از طریق آسیب به گروه های سولفیدریل فعال است (۲۲).

مطالعه حاضر نشان داد که LLLT با افزایش بیان ژن Nrf2 و سطح TAC در گروه پیچ خوردگی بیضه،

References

- Guazzone VA, Lustig L. Varicocele and testicular cord torsion: immune testicular microenvironment imbalance. *Front Cell Dev Biol* 2023; 11: 1282579. PMID: 38099296.
- Bašković M, Jurišić D, Štifter S, Vuković P, Šuran J, Tvrdeić A, et al. Astaxanthin Relieves Testicular Ischemia-Reperfusion Injury Immunohistochemical and Biochemical Analyses. *J Clin Med* 2022; 11(5): 1284.
- Chen S, Li Y, Zhang Y, Wang J, Liu H. Protective effect of ligustrazine on oxidative stress and apoptosis following testicular torsion in rats. *Sci Rep* 2023; 13(1): 20395. PMID: 37990048.

4. Xu LZ, Chen Y, Wang Y, Li J, Zhang Y. Oleuropein attenuates testicular ischemia-reperfusion by inhibiting apoptosis and inflammation. *Tissue Cell* 2022; 78: 101876.
5. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17(11): 1391-1401. PMID: 22064429.
6. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2013; 53: 401-426. PMID: 23294312.
7. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 2017; 86: 715-748. PMID: 28441057.
8. Li ZM. Role of antioxidants in preventing testicular ischemia-reperfusion injury: a narrative review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2022; 26(24). PMID: 36591825.
9. Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B* 2017; 170: 197-207. PMID: 28441605.
10. Abdel-Magied N, Elkady AA, Abdel Fattah SM. Effect of low-level laser on some metals related to redox state and histological alterations in the liver and kidney of irradiated rats. *Biol Trace Elem Res* 2020; 194(2): 410-422. PMID: 31313245.
11. Costa Carvalho JL, de Lima FM, de Melo M, do Nascimento Santos L, de Brito Galvão JF, Albertini R, et al. The chemokines secretion and the oxidative stress are targets of low-level laser therapy in allergic lung inflammation. *J Biophotonics* 2016; 9(11-12): 1208-1221. PMID: 27649282.
12. Espey BT, Tardif S, Halvaei I, Aitken RJ, Drevet JR, Kothari S, et al. Effects of pulsed-wave photobiomodulation therapy on human spermatozoa. *Lasers Surg Med* 2022; 54(4): 540-553. PMID: 33792933.
13. Gerace E, Landucci E, Scartabelli T, Moroni F, Pellegrini-Giampietro DE, Mannaioni G, et al. NIR laser photobiomodulation induces neuroprotection in an in vitro model of cerebral hypoxia/ischemia. *Mol Neurobiol* 2021; 58(10): 5383-5395. PMID: 34319540.
14. Abdelkader AM, El-Sherbiny M, El-Magd MA, El-Sherbiny EM, El-Said KS. Comparative Efficacy of Ultrasound and Laser Therapy in Modulating Inflammatory Markers in a Rat Model of Testicular Inflammation. *J Lasers Med Sci* 2025; 16: e4. PMID: 40330511.
15. Fard NM, Shokoohi M, Rastgar Rezaei Y, Niazi V, Niazi V, Moghimian M. Nanocurcumin decreases nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing 3 complex expressions in an experimental testicular torsion model. *Int J Fertil Steril* 2024; 18(4): 411-420. PMID: 39564834.
16. Rezaei F, Ghasemian F, Shokoohi M, Abtahi-Eivary SH, Rakhshan K, Haghani K, et al. Photobiomodulation therapy improves spermatogenesis in busulfan-induced infertile mouse. *Reprod Sci* 2021; 28(12): 3456-3465.
17. Hemati U, Shokoohi M, Khaki A, Khaki AA, Shoorei H. The effect of curcumin on NRF2/Keap1 signalling pathway in the epididymis of mouse experimental cryptorchidism. *Andrologia* 2022; 54(10): e14532.
18. Esterbauer H, Zollner H. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 1989; 7(2): 197-203. PMID: 2680787.
19. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and

- 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421. PMID: 2233308.
20. Sohrabipour S, Sharifi MR, Sharifi M, Talebi A, Kharazinejad E. The role of flaxseed and vitamin E on oxidative stress in prepubertal rats with experimental varicocele: An experimental study. *Iran J Reprod Med* 2013; 11(6): 459-466. PMID: 24639779.
 21. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38(12): 1103-1111. PMID: 16214125.
 22. Abdelzaher WY, Ahmed AF, El-Tahawy NFG, Ali FEM, El-Sayed NM. Idebenone regulates sirt1/Nrf2/TNF- α pathway with inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in testicular torsion/detorsion in juvenile rats. *Hum Exp Toxicol* 2022; 41: 09603271221102515. PMID: 35593271.
 23. Salmasi AH, Beheshtian A, Payabvash S, Demehri S, Ebrahimkhani MR, Karimzadeh A, et al. Effect of morphine on ischemia-reperfusion injury: experimental study in testicular torsion rat model. *Urology* 2005; 66(6): 1338-1342. PMID: 16360480.
 24. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z, Ozkan OV, Duran N. Protective effect of thymoquinone in experimental testicular torsion. *Urol Int* 2010; 85(4): 461-465. PMID: 20628240.
 25. Nadi Z, Shabani R, Hosseini SA. Effect of Resistance and Endurance Trainings on Nrf2/Keap1 Signaling Pathway in Testicular Tissue of Type 2 Diabetic Rats. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2022; 32(214): 24-34.
 26. Done AJ, Traustadóttir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol* 2016; 10: 191-199. PMID: 27770706.
 27. Onishi A, Kato T, Yamaguchi K, Kondo Y, Takeuchi M, Kishikawa N, et al. Dimethyl Fumarate Protects Rats against Testicular Ischemia-Reperfusion Injury. *Andrologia* 2023; 2023: 7086044.
 28. Len JS, Koh WSD, Tan SX. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Biosci Rep* 2019; 39(8): BSR20191601. PMID: 31371631.
 29. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys* 2017; 4(3): 337-361. PMID: 28748217.
 30. Parvin A, Shokoohi M, Aboutaleb N, Niazi V, Soltani M. The effects of photobiomodulation on the improvement of sperm parameters: A review study. *Photochem Photobiol* 2024; [volume (issue)]: [page numbers].
 31. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng* 2012; 40(2): 516-533. PMID: 22045511.
 32. Hasani A, Shokoohi M, Niazi V, Arabpoor Z, Rasti M, Abshenas J, et al. Photobiomodulation restores spermatogenesis in the transient scrotal hyperthermia-induced mice. *Life Sci* 2020; 254: 117767.