

بررسی اثر آنتی اکسیدان ها بر کیفیت اسپرم منجمد- خوب شده با روش انجماد سریع

مریم نظم بجنوردی* (M.Sc.) منصوره موحدین⁺ (Ph.D.)
سعید امانپور^{***} (Ph.D.) هاتف قاسمی حمیدآبادی^{****} (M.Sc.)

چکیده

سابقه و هدف: حفاظت اسپرم در مقابل واکنش های اکسیداتیو طی انجماد توسط آنتی اکسیدان ها انجام می شود. هدف تحقیق حاضر بررسی تاثیر آنتی اکسیدان های ویتامین E و C بر پارامترهای اسپرم انسانی پس از انجماد سریع می باشد. **مواد و روش ها:** از تعداد ۸۰ مرد مراجعه کننده به مرکز ناباروری ولی عصر استفاده شد این افراد ابتدا به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول افرادی که الیگواسپرما (Oligospermia) و گروه دوم مردانی که از نظر معیارهای WHO طبیعی بودند. در نهایت هر گروه به ۲ زیرگروه ۲۰ نفره دیگر که شامل ۱- گروهی که آنتی اکسیدان آلفاتوکوفرول (ویتامین E) با غلظت های ۲، ۵ و ۱۰ میلی مولار دریافت کردند ۲- گروهی که فقط آنتی اکسیدان اسید اسکوربیک (ویتامین C) با غلظت های ۲، ۴ و ۱۰ میلی مولار دریافت کردند. ویتامین E با غلظت های فوق در اتانول ۲ درصد حل شده و سپس به محیط کشت (Medium) اضافه شد و ویتامین C نیز با غلظت های ذکر شده به محیط کشت اضافه شد. مایع سمن (Semen) از نظر پارامترهای اسپرم (غلظت، مورفولوژی، تحرک و میزان زنده ماندن) ارزیابی شد. نمونه ها توسط نیتروژن مایع منجمد و سپس ذوب شدند بعد از سانتریفوژ به نمونه ها ویتامین E و ویتامین C اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس مجدداً از نظر پارامترهای اسپرم آنالیز شدند. داده ها با استفاده از آزمون ANNOVA آنالیز شدند.

یافته ها: در افراد طبیعی افزودن ویتامین E با غلظت های ۱۰ و ۲ میلی مولار باعث افزایش درصد تحرک، حرکت پیش رونده و میزان درصد زنده ماندن اسپرم شد که در مورد درصد حرکت پیش رونده و میزان درصد زنده ماندن، این افزایش معنی دار بود. در افراد الیگواسپرما همین افزایش مشاهده شده اما در مجموع تفاوت معنی دار نبود. اسید اسکوربیک بر هیچ یک از پارامترهای اسپرم تاثیر معنی داری نداشت.

استنتاج: با توجه به افزایش معنی دار میزان زنده ماندن و تحرک خطی اسپرم پس از افزودن ویتامین E و اهمیت این مسأله در افزایش لقاح؛ لذا می توان اثرات منفی انجماد را با افزودن ویتامین E کاهش داد.

واژه های کلیدی: آلفاتوکوفرول، اسید اسکوربیک، تحرک، مورفولوژی

⁺مؤلف مسئول: دکتر منصوره موحدین - تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی E-mail: mansoureh@modares.ac.ir

* کارشناس ارشد علوم تشریح، مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر دانشگاه علوم پزشکی تهران

** دکترای تخصصی علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

*** دکترای تخصصی جراحی دامپزشکی، مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر دانشگاه علوم پزشکی تهران

**** کارشناس ارشد علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۶/۱۲/۲۶ تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۸

مقدمه

سلول‌هایی که تنفس هوازی دارند مواد و آنزیم‌های لازم جهت واکنش‌های اکسیداتیو را دارا هستند ولی با این وجود درصد آنزیم‌های آنتی اکسیدان در اسپرم نسبتاً پایین است و در نتیجه این سلول‌ها مستعد واکنش‌های اکسیداتیو می‌باشند (۱ تا ۳).

طی حفاظت انجمادی (Cryopreservation)، مایع سمن (Semen) در معرض شوک سرمایی و فشار اسمزی قرار می‌گیرد و در نتیجه میزان اکسیداسیون غشا به واسطه درصد بیشتر واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این امر نهایتاً زنده ماندن (viability) و عمر اسپرم را کاهش می‌دهد (۴ تا ۶). تحقیقات نشان می‌دهد که میزان لقاح پس از حفاظت انجمادی اسپرم به واسطه عملکرد نامناسب غشا آن به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۷ تا ۹). همچنین حفاظت انجمادی منجر به تغییرات DNA، سیتواسکلت اسپرم، مهار اتصال اسپرم به تخمک و تخریب آکسونم اسپرم شده که منجر به کاهش تحرک آن می‌شود (۱۰ تا ۱۳). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که محافظت از غشای پلاسمایی اسپرم در مقابل واکنش‌های اکسیداتیو طی حفاظت انجمادی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها انجام می‌شود، در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش تشکیل رادیکال آزاد اکسیژن شرایط سلولی را طوری تغییر می‌دهند که تحرک اسپرم حفظ شود (۱۴ تا ۱۶). در زمینه تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر پارامترهای اسپرم پس از انجماد تا کنون اقدامات متعددی صورت گرفته است. به طور مثال Breininger در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که آلفاتوکوفرول پارامترهای کیفی اسپرم گراز نظیر تحرک آن را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد و از واکنش‌های اکسیداتیو ناشی از حفاظت انجمادی اسپرم جلوگیری می‌کند (۱۷).

نتایج دیگر نیز نشان داد که آلفا توکوفرول باعث تحرک و افزایش viability اسپرم می‌شود، همچنین

اثرات این ماده نسبت به غلظت آن متفاوت است به طوری که غلظت بالای آلفاتوکوفرول اثرات اکسیداتیو ولی غلظت‌های پایین آن اثرات آنتی‌اکسیداتیو دارد (۱۸). Sreegith و همکارانش درصد اکسیداسیون غشا و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را در اسپرم گاو و بوفالو طی انجماد مورد ارزیابی و مقایسه قرار دادند (۱۹). فعالیت آنزیم malondialdehyde که معیار اکسیداسیون غشا اسپرم است افزایش مشخصی یافته بود اما فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌ها طی انجماد در اسپرم کاهش یافت. فعالیت این آنزیم‌ها در اسپرم گاو بیشتر از اسپرم بوفالو بود. همچنین میزان تحرک و زنده ماندن اسپرم بوفالو کمتر از اسپرم گاو بود بنابراین فعالیت کم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در اسپرم بوفالو احتمالاً به واسطه اکسیداسیون زیاد غشا بوده که خود ناشی از واکنش اکسیداتیو زیاده‌تری در مقایسه با اسپرم گاو طی انجماد است (۱۹).

Pena و همکارانش تاثیر آنتی اکسیدان‌ها را در انجماد اسپرم خوک مورد ارزیابی قرار دادند. یافته‌های آنها نشان داد که تحرک اسپرم با حضور ویتامین E افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد (۲۰).

Cerolini و همکارانش ثابت کردند که افزودن آلفاتوکوفرول و ویتامین E از اثرات واکنش‌های اکسیداتیو اسپرم خوک طی انجماد جلوگیری به عمل می‌آورد (۲۱). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که اضافه کردن آنتی اکسیدان‌ها طی انجماد اسپرم وابسته به غلظت آن است (۲۲). Dalvet نیز اثرات ویتامین E و اسید اسکوربیک بر روی اسپرم گاو طی انجماد را مورد ارزیابی قرار داد و اعلام کرد که افزودن ویتامین E درصد لقاح را افزایش می‌دهد (۲۳).

علی‌رغم تمامی این تلاش‌ها به‌علت محدودیت‌هایی که در زمینه منابع انسانی از جمله تهیه و نگهداری نمونه

و تکرار دوره‌های درمانی IVF مطرح است اطلاعات جامعی در خصوص تاثیر آنتی اکسیدان‌ها بر حفظ پارامترهای اسپرم انسانی پس از انجماد سریع وجود ندارد و نکات مبهم زیادی در این خصوص وجود دارد. لذا هدف تحقیق حاضر بررسی تاثیر آنتی اکسیدان‌های ویتامین E و ویتامین C بر پارامترهای اسپرم انسانی پس از انجماد سریع می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از تعداد ۸۰ مرد مراجعه کننده به مرکز ناباروری ولی عصر استفاده شد، این افراد ابتدا به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول افرادی که الیگواسپرμία (غلظت اسپرم ≤ 20) بوده و پس از ۲ سال زندگی مشترک صاحب فرزند نشده بودند و گروه دوم مردانی که از نظر معیارهای WHO طبیعی بودند (۲۴). در نهایت هر گروه به ۲ زیرگروه ۲۰ نفره، شامل:

- ۱- گروهی که آنتی اکسیدان آلفاتوکوفرول (ویتامین E) با غلظت‌های ۲، ۱ و ۵ میلی مولار دریافت کردند.
- ۲- گروهی که فقط آنتی اکسیدان اسید اسکوربیک (ویتامین C) با غلظت‌های ۲، ۱ و ۴ میلی مولار دریافت کردند. ویتامین E با غلظت‌های فوق در اتانول ۲ درصد حل شده و سپس به محیط کشت (Medium) اضافه شد و ویتامین C نیز با غلظت‌های ذکر شده به محیط کشت اضافه شد.

سپس مایع منی مورد ارزیابی اولیه از نظر پارامترهای اسپرم (غلظت، مورفولوژی، تحرک و میزان زنده ماندن) واقع شدند، قرار گرفتند. تحرک اسپرم به ۳ درجه شامل: درجه ۱: حرکت درجا، دورانی و با سرعت کم، درجه ۲: خطی با سرعت کم، درجه ۳: خطی، پیش‌رونده و سریع تقسیم شدند. همچنین جهت ارزیابی میزان زنده ماندن از رنگ آمیزی حیاتی اِئوزین B استفاده شد.

به منظور انجماد مایع منی، نمونه‌ها به نسبت ۱:۱ با مدیوم ضدیخ (Global U.S.A) مخلوط شده و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، سپس یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد و پس از آن به نیتروژن مایع منتقل شدند و به مدت یک روز در آن نگهداری شدند.

نمونه‌های منجمد شده جهت ذوب از تانک نیتروژن مایع خارج شده و پس از ۲۰ ثانیه تعادل در هوای آزمایشگاه در آب ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند تا کاملاً ذوب شوند. سپس به آن محیط کشت Ham's F10 با آلبومین ۱۰ درصد اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰ g سانتریفوژ شد تا ضدیخ آن خارج شود. پس از افزودن آنتی اکسیدان مورد نظر (و یا بدون آن) نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و سپس مجدداً از نظر پارامترهای اسپرم آنالیز شدند. داده‌های تحقیق حاضر با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون ANOVA آنالیز شدند و سطح اختلاف معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در گروه اول افرادی که الیگواسپرμία (غلظت اسپرم ≤ 20) بودند افزودن آنتی اکسیدان آلفاتوکوفرول (ویتامین E) با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی مولار باعث افزایش پارامترهای اسپرم نظیر تحرک و حرکت پیش‌رونده و همچنین میزان زنده ماندن در مقایسه با گروه کنترل شد که تنها در میزان درصد زنده ماندن این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$) ولی افزودن آنتی اکسیدان آلفاتوکوفرول تأثیر معنی‌داری بر میزان درصد مورفولوژی نداشت (جدول شماره ۱).

همچنین بیشترین افزایش با غلظت ۲ میلی مولار ویتامین E در مقایسه با غلظت‌های ۱ و ۵ میلی مولار ویتامین E مشاهده شد و غلظت ۵ میلی مولار تأثیر

معنی داری بر هیچ یک از پارامترهای اسپرم نداشت (جدول شماره ۱).

درافراد الیگواسپرمیا گروهی دیگر که آنتی اکسیدان اسید اسکوربیک (ویتامین C) دریافت کردند هیچ یک از پارامترهای اسپرم نظیر مورفولوژی، تحرک و حرکت پیش رونده و همچنین میزان زنده ماندن در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی داری را از نظر آماری نشان نداد (جدول شماره ۲).

در (گروه دوم) افرادی که از نظر معیارهای WHO طبیعی بودند افزودن آنتی اکسیدان آلفاتوکوفرول (ویتامین E) با غلظت های ۲۱ میلی مولار باعث افزایش تحرک

و حرکت پیش رونده و همچنین زنده ماندن اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد که به استثنا تحرک این افزایش را از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$) ولی تأثیر معنی داری بر مورفولوژی نداشت (جدول شماره ۳).

گروهی دیگر از افراد طبیعی که آنتی اکسیدان اسید اسکوربیک (ویتامین C) با غلظت های ۲۱ میلی مولار دریافت کردند هیچ یک از پارامترهای اسپرم نظیر مورفولوژی، تحرک و حرکت پیش رونده و همچنین زنده ماندن در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی داری را از نظر آماری نشان نداد (جدول شماره ۴).

جدول شماره ۱: بررسی تاثیر افزودن ویتامین E بر پارامترهای اسپرم انسانی در افراد الیگواسپرمیا

گروه	درصد تحرک (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد حرکت پیش رونده (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد مورفولوژی طبیعی (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد میزان زنده ماندن (انحراف معیار $\pm$ میانگین)
ویتامین 1 میلی مولار	31.5 ± 6.70	13.75 ± 6.25	15 ± 4.58	$a \ 37.25 \pm 5.49$
ویتامین 2 میلی مولار	$a \ 32.5 \pm 6.58$	$a \ 14.75 \pm 5.95$	16.25 ± 5.34	$a \ 40 \pm 4.58$
ویتامین 5 میلی مولار	29 ± 6.99	12 ± 5.93	14.25 ± 4.94	36.5 ± 5.15
کنترل ویتامین E	29.25 ± 6.54	11.75 ± 7.12	16 ± 7.18	35.5 ± 5.59

a: وجود افزایش معنی دار با گروه کنترل ویتامین E

جدول شماره ۲: بررسی تاثیر افزودن ویتامین C بر پارامترهای اسپرم انسانی در افراد الیگواسپرمیا

گروه	درصد تحرک (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد حرکت پیش رونده (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد مورفولوژی طبیعی (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد میزان زنده ماندن (انحراف معیار $\pm$ میانگین)
ویتامین 1 میلی مولار	26.25 ± 6.25	8.5 ± 5.15	18.75 ± 5.09	31.5 ± 6.70
ویتامین 2 میلی مولار	24.75 ± 7.51	9.25 ± 6.12	18 ± 5.93	29.75 ± 8.95
ویتامین 4 میلی مولار	22.75 ± 6.38	5.5 ± 3.20	15.30 ± 6.04	31 ± 8.82
کنترل ویتامین C	25.50 ± 7.93	7.25 ± 5.25	18 ± 6.56	31 ± 8.82

جدول شماره ۳: بررسی تاثیر افزودن ویتامین E بر پارامترهای اسپرم انسانی در افراد طبیعی

گروه	درصد تحرک (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد حرکت پیش رونده (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد مورفولوژی طبیعی (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	درصد میزان زنده ماندن (انحراف معیار $\pm$ میانگین)
ویتامین E 1 میلی مولار	62.25 ± 13.99	$a \ 30.75 \pm 15.99$	24.75 ± 7.69	70 ± 13.17
ویتامین E 2 میلی مولار	64 ± 13.33	$a \ 25.75 \pm 13.5$	7.82 ± 25.75	$a \ 72.25 \pm 11.05$
ویتامین E 5 میلی مولار	59.25 ± 14.35	18.75 ± 10.37	23.25 ± 8.62	69 ± 14.01
کنترل ویتامین E	60 ± 14.23	17.75 ± 11.86	24.50 ± 9.16	68.25 ± 13.88

a: وجود افزایش معنی دار با گروه کنترل E

جدول شماره ۴: بررسی تاثیر افزودن ویتامین C بر پارامترهای اسپرم انسانی در افراد طبیعی

گروه	درصد تحرک (انحراف معیار $\pm$ میلین)	درصد حرکت پیشرونده (انحراف معیار $\pm$ میلین)	درصد مورفولوژی طبیعی (انحراف معیار $\pm$ میلین)	درصد میزان زنده ماندن (انحراف معیار $\pm$ میلین)
ویتامین C 1 میلی مولار	$53/25 \pm 19/28$	$15/25 \pm 9/24$	$22/50 \pm 7/16$	$61/75 \pm 16/95$
ویتامین C 2 میلی مولار	$52 \pm 17/87$	$13/25 \pm 7/82$	$22 \pm 7/16$	$59/75 \pm 15/93$
ویتامین C 4 میلی مولار	$50/50 \pm 16/13$	$11/25 \pm 7/23$	$20 \pm 6/48$	$57/25 \pm 14/90$
کنترل ویتامین C	$52/50 \pm 18/53$	$13/75 \pm 9/85$	$22/25 \pm 7/69$	$61/50 \pm 16/23$

بحث

انجماد اسپرم با ایجاد شوک سرمایی باعث کاهش تحرک اسپرم، یکپارچگی غشا و آکروزوم و عملکرد میتوکندری می‌شود (۲). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی مانند ویتامین E و آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب مانند ویتامین C در کاهش رادیکال‌های آزاد نقش موثری دارد (۱۷). از آنجایی که پارامترهای اسپرم بر میزان لقاح موثر است لذا به نظر می‌رسد که آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش رادیکال‌های آزاد و کاهش اثرات منفی شوک اکسیداتیو و همچنین بهبود پارامترهای اسپرم از اهمیت بالینی در تکنیک‌های ART برخوردار است (۱۷). تا کنون تعدادی از آنتی‌اکسیدان‌ها بر کاهش اثرات شوک سرمایی انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف بررسی شده است ولی با این وجود گزارشات محدودی در زمینه تاثیر آنها بر پارامترهای اسپرم انسان وجود دارد (۱۸). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن ویتامین E بر قدرت تحرک و به ویژه حرکت پیش‌رونده و میزان زنده ماندن اسپرم موثر است در واقع آنتی‌اکسیدان‌ها مانند آنزیم‌های Glutathione peroxidase، Superoxide dismutase، Glucose-6-phosphate dehydrogenase با تجزیه آنیون‌های سوپراکساید، هیدروژن پراکساید و لیپید پراکساید، از ایجاد آسیب به غشا اسپرم و کاهش پارامترهای آن جلوگیری می‌کنند البته این امر موید گزارشات قبلی است و نشان می‌دهد که ویتامین E

تحرک اسپرم کراز را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد و از صدمات ناشی از انجماد اسپرم جلوگیری می‌کند (۱۷). همچنین نتایج دیگر نیز نشان می‌دهد که آلفاتوکوفرول باعث تحرک و افزایش زنده ماندن اسپرم می‌شود علاوه بر این اثرات این ماده نسبت به غلظت آن متفاوت است به طوری که غلظت بالای آلفاتوکوفرول اثرات اکسیداتیو ولی غلظت‌های پایین آن اثرات آنتی اکسیداتیو دارد (۱۸).

محققین دیگر نیز نشان دادند که آلفاتوکوفرول پارامترهای کیفی اسپرم نظیر تحرک آن را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد و از واکنش‌های اکسیداتیو ناشی از حفاظت انجمادی اسپرم جلوگیری می‌کند (۱۹، ۱۷).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اضافه کردن ویتامین C (اسید اسکوربیک) بر پارامترهای اسپرم تاثیر چندانی ندارد که این یافته با نتایج Jousef و همکارانش در سال ۲۰۰۳ که افزایش قدرت تحرک، بلوغ و زنده ماندن اسپرم را پس از افزودن اسید اسکوربیک خرگوش اعلام کرده بودند (۲۳) متضاد است و یا با گزارش Salem و همکارانش مبنی بر اثرات مثبت افزودن اسید اسکوربیک بر مایع منی (سمن) خرگوش مغایرت دارد (۲۵). در تحقیق حاضر افزودن ویتامین E در مقایسه با ویتامین C افزایش معنی‌داری را بر پارامترهای اسپرم نشان می‌دهد که این مسئله می‌تواند به این علت باشد

شرایط مناسب برای حفظ پارامترهای اسپرم پس از انجماد یافت. در تحقیق حاضر با توجه به افزایش معنی دار درصد میزان زنده ماندن و تحرک خطی اسپرم پس از افزودن ویتامین E و اهمیت این مسأله در افزایش لقاح می توان اثرات منفی انجماد را بر پارامترهای اسپرم کاهش داد هر چند که در این زمینه به تحقیقات بیشتری نیاز است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران از تصویب و حمایت مالی طرح تحقیقاتی فوق مراتب تشکر و قدردانی را اعلام می دارد.

که ویتامین E محلول در چربی می باشد و می تواند از غشا اسپرم عبور کند و در نتیجه تاثیر مستقیم و بیشتری را در حذف رادیکال های آزاد در مقایسه با ویتامین C که محلول در آب است و نفوذپذیری کمتری نسبت به ویتامین E در عبور از غشا دارد نشان می دهد (۲۵،۲۲).

در مجموع حفظ پارامترهای اسپرم پس از مراحل انجماد به طور قطعی بر میزان موفقیت لقاح موثر است از طرفی بقای اسپرم و پارامترهای آن پس از انجماد به فاکتورهای متعددی از جمله عناصر محیط کشت بستگی دارد. در راستای این امر استاندارد کردن محیط کشت آزمایشگاهی و ایجاد شرایط اپتیمم برای حفظ پارامترهای اسپرم مهمترین مسأله است؛ لذا ضروری به نظر می رسد تا مواد مکمل را در جهت ایجاد

Reference

1. Foot RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 3-23.
2. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I. Free radicals antioxidants enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim* 2000; 293: 53-62.
3. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60: 81-92.
4. Parks JE, Gaham J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992; 38: 209-222.
5. Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2001; 59: 451-458.
6. Yue HX, Li P, Jiang M, Lin L, Xu KH. Influence of cryopreservation with glycerol and freezing-thawing procedures on the motility of human sperm. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2005; 11: 204-206.
7. Hallak J, Sharma RK, Wellstead C, Agarwal A. cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *Int J Fertil Women M* 2000; 45: 38-42.
8. Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes. *J Androl* 1992; 13: 368-378.

9. Hsieh YY, Sun YL, Chang CC. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J Clin Lab Anal* 2002; 16: 127-131.
10. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in Definning the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9: 367-376.
11. Kim JG, Parthasarathy S. Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16: 235-239.
12. Psqualott FF, Sharma PK, Nelson DR. Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000; 73: 459-464.
13. Aitken R.A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 19-23.
14. Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. *Urol* 2000; 55: 922-926.
15. Gonagle L, Goldstein M, Feldschuh J, Foote R. The influence of cryoprotective media and processing procedure motility and migration of freeze-thawed human sperm. *Asian J Androl* 2002; 4: 137-141.
16. Stanic P, Tandra M, Sonicki A, Sumunic V. Comparison of protective techniques for cryopreservation of human semen. *J Obstet Gyn Reprod Biol* 2000; 91: 65-70.
17. Breinger E, Beorlegui N, Flaherty C, Beconi M. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 2005; 63: 2126-2135.
18. Brezezinska E, Slebodzinski A, Pietras B, Wiczork G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar seminal plasma. *Biol Trace Elem Res* 1995; 47: 69-74.
19. Sreegith JN, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SP, Chaudhary. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim Reprod Sci* 2005; 287: 1-9.
20. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez H. Concentration to enhance Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 85-98.
21. Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reprod* 2001; 121: 395-407.
22. Upeti GC, Jensen K. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 1997; 48: 269-278.

23. Jousef MI, Abdallahe GH, Kamel KI. Effect of ascorbic acid and vitamin E Supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod Sci* 2003; 76: 99-111.
24. Wiley J. *Embryos, genes and birth defects*. Thorogood P. Bookcraft Ltd, USA 1996; 10-17.
25. Sillo-Seidl G. Treatment of oligospermia by freezing and concentrating semen. *Int J Fertil* 1972; 17(4): 183-184
26. Salem MH, Kamel KL. Protective role of ascorbic acid concentration to enhance sperm quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B1. *Toxicology* 2001; 162: 209-218.

Archive of SID