View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by University of Kufa: UOK Journal Hosting Service

Effect of rapid freezing and thawing on Malondialdehyde concentration , abnormal sperm chromatin percent and sperm parameters of Asthenozoospermic patients

تأثير التجميد السريع والإذابة في تركيز المالون داي الديهايد و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي ومعايير النطف لمرضى وهن النطف

Hisham Qassim Mohammad Al-Nowainy / MSc. In physiology / College of Nursing / University of Kufa

Dr. Sahib Yahia Almoreshedy / Assist .Prof in Reproductive physiology / College of Medicine / University of Kufa

Dr. Wafak Gabory Mohammad / Assist .Prof in physiology / College of Medicine Practical Science / University of Karbala

hushamq.mohammed@uokufa.edu.iq

Abstract :

Objective : The study aimed to study the effect of rapid freezing and thawing on Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent and sperm parameters of Asthenozoospermic patients

Methodology : This study was performed in the laboratory of Intra cytoplasmic Injection and freezing of sperm in the fertility center of Al-Sader Medical City / Al-najaf Alashraf City during the period from May, 2012 to April 2013 , The study included 30 of Asthenozoospermic patients, the statistical analysis of this study performed by using Student's t – test and paired t – test at the level of probability 0.05

Results : the results showed that is sperm rapid freezing process of patients who were Included in the study by used sperm freezing media (Sperm Freeze) and doing the thawing processes after one month From freezing leads to a significant decreasing ($p<0.05$) In the sperm concentration, sperm progressive motility percent, sperm viability percent and normal sperm morphology percent. and a significant increasing ($p<0.05$) In The Malondialdehyde concentration and abnormal Sperm chromatin percent and no significant difference($p<0.05$) In round Cell concentration in comparison with their ranges after activation

Conclusion : It can be concluded From this study that sperm rapid freezing and thawing processes had a negative effects on the semen and sperm parameters and Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent In the all samples of study included patients .

Recommendation: Adding Anti oxidants to the sperm freezing media to decrease the negative effects of freezing and increase the sperm parameters .

Keyword : effect , rapid freezing, thawing, Malondialdehyde, chromatin, sperm parameters , Asthenozoospermic

الخلاصة :

الهدف : تهدف الدراسة الحالية إلى محاولة التعرف على تأثير عمليات التجميد السريع والإذابة في معايير المني و النطف وتركيز ألمالون داي ألالديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic

المنهجية: أنجزت هذه الدراسة في مختبر الحقن ألمجهري وتجميد النطف في مركز الخصوبة في مدينة الصدر الطبية / محافظة النجف ألاشرف ، وامتدت الدراسة من المدة أيار 2012 إلى نيسان2013 **وشملت الدراسة** 30 من مرضى وهن النطف. وكان معدل العمر (1.23 ± 33.1) سنة و أنجزت التحليلات الإحصائية الخاصة بهذه الدراسة باستخدام اختبار –ت (Student's t – test) و اختبار –ت (paired t – test) على مستوى الاحتمالية 0.05

النتائج:. أظهرت النتائج أن عملية التجميد السريع لنطف المرضى المشمولين في الدراسة باستعمال وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) ، وإجراء عملية الإذابة بعد مرور شهر واحد أدت إلى انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فرقا" معنويا" ($P<0.05$) في تركيز الخلايا الدائرية مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط .

الاستنتاجات : يستنتج من هذه الدراسة بأن عمليات التجميد السريع والإذابة للنطف تمتلك تأثيرات سلبية في معايير المني و النطف وتركيز ألمالون داي ألالديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في كل عينات المرضى المشمولين بالدراسة

التوصيات : إضافة مضادات الأكسدة لاوساط تجميد النطف لغرض التقليل من تأثيرات التجميد وتحسين معايير النطف .

المقدمة :

إن عدم الخصوبة infertility حالة مرضية تؤثر في حوالي 15% من مجموع الأزواج الذين يرغبون بالحصول على أطفال،وهي مشكلة طبية واسعة الانتشار ولها تأثيرات نفسية كبيرة، تشكل عوامل عدم الخصوبة الذكرية ما نسبته حوالي 50% من هذه الحالة ويكون حوالي 25% منها أسبابها غير مشخصة Idiopathic (Sharlip *et al*,2002) . واحد أنواع مرضى عدم الخصوبة هم وهن النطف وتعرف حالة وهن النطف بأنها الحالة التي يكون فيها النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية اقل من 50% أو إن النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية السريعة أقل من 25% خلال ساعة واحدة بعد القذف (WHO, 1999)، و إن ما نسبته % 20 من مرضى عدم الخصوبة يعانون من هذه الحالة (Curi *et al*. ,. 2003) وخلال العقود الأخيرة الماضية شهدت علاجات حالات عدم الخصوبة تطورا" ملحوظا نتيجة التقدم المستمر في تقنيات التكاثر Assisted reproduction techniques(ART)وتقنيات التعامل والتداخل الخلوي cell manipulation فأصبح المعان المرضى الذين لم تنجح معهم التداخلات الطبية مثل مرضى انعدام النطف azoospermic أو وهن النطف Asthenozoospermic يمتلكون الفرصة لان يحصلوا على الأطفال إذا أمكن الحصول على نطفة مفردة فقط لغرض استخدامها في التلقيحات داخل المختبر(Sinan *et al*,2008).. تشمل تقنيات التكاثر المعان عدداً من الطرق المختلفة للتلقيح خارج الجسم الحي In vitro fertilization (IVF) والتي تتطلب وجود كل من المشيج الذكري (النطفة) والمشيج الأنثوي (البيضة)خارج الجسم الحي لإحداث الإخصاب Fertilization في المختبر ، ونتيجة كون هذه الأمشاج ذات أعمار قصيرة وسريعة التضرر خارج الجسم ، استدعى ذلك توفير طرق لمحاولة الحفاظ على حياة هذه الأمشاج إلى الوقت الذي يتطلب فيه إجراء عملية التلقيح (Richard *et al* ,2006) وأفضل وسيلة لتحقيق هذا الهدف يكون بحفظ هذه الأمشاج باستخدام عملية التجميد (cryopreservation) والتي يتم فيها حفظ المواد البيولوجية بدرجة حرارة اقل من الصفر مثل 80 - أو 196 - م ^{0} والتي عندها التفاعلات الخلوية الكيموحيوية المسؤولة عن موت الخلايا يحد منها بصورة فعالة,و تهدف عملية التجميد أساسا"إلى محاولة الحفاظ على عيوشية الخلايا والنشاط الوظيفي بعد مدة من الحفظ بدرجة حرارة تقل عن الصفر المئوي ،حيث إن الخلايا المحفوظة بدرجة حرارة مساوية إلى 196 – درجة مئوية تحت الصفر يحدث فيها عند هذه النقطة توقف في ظاهرة النفوذ الخلوي (Cellular Diffusion) ، وكذلك خفض الطاقة الحرارية اللازمة لإتمام التفاعلات الكيمائية (Dohle *et al*. , 2007) . إن تجميد النطف والأنسجة الخصوية testicular tissue ساعد على حفظ الخصوبة بغض النظر عن السبب الذي يؤدي إلى حالة عدم الخصوبة ،وأصبحت عمليات حفظ النطف و الأنسجة الخصوية باستخدام التجميد ذات أهمية اكبر نتيجة المتطلبات البحثية وتطور التطبيقات السريرية في وسائل التكاثر المعان وبنوك المني semen banks ولغرض حفظ الخصوبة بعد التعرض للعلاجات الكيميائية والعلاجات الإشعاعية أو العمليات الجراحية ذات التأثيرات المحتملة على الخصوبة (Richard *et al* ,2006) . و إحدى تقنيات علم التجميد الحديثة ضمن هذا الحقل من علم التناسل ، طريقة تدعى "ب Vitrification والتي تعني (التحول إلى حالة شبيهة الزجاج)، وتشمل عدداً من الطرق "حورت عن الطريقة البطيئة والتي تهدف لتحقيق نفس الغاية وهي محاولة الحفاظ على الخلية من تأثيرات التبريد،تكوين الثلج الخلوي ، الجفاف والتأثيرات السامة الحادثة عند الدرجة الحرارية الواطئة ولا تحتاج التقنية إلى متطلبات خاصة لتحقيق ذلك(Naworth *et al*. ,2002) . تتضمن عملية التجميد للنطف إجراء عدد من العمليات مثل عملية تخفيف الوسط المراد تجميده بإضافة مواد كيمياوية ذات أوزان جزئية واطئة تعرف بالمواد الحافظة من ضرر التجميد Cryoprotectants Substances ، وكذلك عملية غمر المزيج في سائل النتروجين ذي درجة حرارة 196- م وعملية التدفئة والإذابة للعينات والتي تشمل بدورها عدد من العمليات من تدفئة بأسخدام الحمام المائي وإجراء عملية فصل وسط التجميد بأجراء عملية الطرد المركزي وإضافة ميديا التنشيط وغيرها (Luvoni, 2006) . يعتقد أن كل خطوة من هذه العمليات تستحث حدوث تأثيرات سلبية قد تؤدي لتوليد الضرر في كل من التركيب والوظيفة للنطف (Woods *et al*,2004) . نطف الحيوانات الثديية تكون ذات تحسسية مرتفعة إلى حالة خفض درجة الحرارة إلى ما بعد درجة انجماد الماء (صفرمْ) وذلك ناتج من الخصوصية في تركيب الأغشية البلازمية والأغشية داخل الخلوية والتي تعتبر مواقع رئيسية لحدوث الجرح الخلوي عند تجميدها (Bailey *et al*, 2003) ، لذا فان إجراء دراستنا الحالية هدفت إلى دراسة تأثير عمليات التجميد السريع والإذابة في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة والضرر في كروماتين النطف وعلاقة ذلك مع معايير النطف المتمثلة بتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشيه النطف والنسبة المئوية للنطف السوية .

المواد وطرائق العمل :

جمعت عينات السائل المنوي في وعاء Container نظيفًا وجافاً ومعقماً سعته (40) ملي لتراً وكتب اسم المريض على الوعاء ، جمع المني بطريقة الاستمناء Masturbation بعد مدة امتناع (3-5) أيام Abstinence Period ثم وضعت العينات في حاضنة بدرجة حرارة 37 مْ للسماح لها بالاماعة الطبيعية Normal Liquefaction . بعد اكتمال الاماعة التي تم تثبيت زمنها فحصت كل عينة فحصاً عيانياً و مجهرياً وسجلت معلومات ونتائج اختبارات المني والتي تشمل تركيز النطف Sperm Concentration و النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية Sperm progressive Motility و النسبة المئوية للنطف السوية Normal sperm morphology percent و النسبة المئوية لعيوشية النطف Sperm viability percent و تركيز الخلايا الدائرية Round Cell Concentration استنادا" إلى تقرير منظمة الصحة العالمية (WHO, 1999, 2010).وتم حساب تركيز المالون داي الديهايد MDA في البلازما المنوية للسائل المنوي حسب الطريقة الموصوفة في (Muslih *et al*., 2002)

وتم تقييم الضرر الحاصل في كروماتين النطف باستخدام صبغة الانلين الأزرق Aniline blue stain حسب الخطوات التالية :(Vieytes *et.al.*,2008; Sasikumar and Dakshayani,2013) حيث تم تحضير صبغة الانلين الأزرق Aniline blue stain بإذابة 5 غرام من الصبغة في 100مل من محلول الفوسفات الدارئ PBS ثم وضعت في حمام مائي مغلي لفترة قصيرة ثم تم ترشيح الصبغة ثم أضيف إليها قطرات من حامض ألخليك الثلجي لغرض الوصول إلى الأس الهيدروجيني 3.5 وتضمنت طريقة تصبيغ كروماتين النطفة الخطوات الآتية : وضعت كمية من محلول الكلوترالديهايد 3% المحضر في جار خاص ووضعت كمية من الصبغة الانيلين الأزرق المحضرة في جار آخر ، تم عمل مسحة من السائل المنوي على شريحة زجاجية وتركت في درجة حرارة الغرفة لحين الجفاف ، وضعت الشريحة الزجاجية الحاملة للمسحة في محلول الكلوترالديهايد 3% لمدة نصف ساعة لغرض التثبيت ،تم غسل الشريحة الحاملة للمسحة باستخدام محلول الفوسفات الدارئ PBS ،وضعت الشريحة الحاملة للمسحة في صبغة الانلين الأزرق لمدة 7 دقائق ونقلت الشريحة من صبغة الانلين وغسلت بالماء المقطر ثم تركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة . لوحظ في فحص الشريحة المحضر أن النطف المتضررة حدث اصطباغ في رأس النطفة باللون الأزرق والنطف غير المتضررة تكون عديمة اوقليلة الصبغة وتم حساب على الأقل 200 نطفة في كل شريحة وحددت النسبة المئوية لكروماتين النطف المتضررة Chromatin abnormality والكروماتين السوي وحسب المعادلة

$$\text{نسبة الضرر} = \frac{\text{عدد النطف ذات الكروماتين المتضرر}}{\text{عدد النطف الكلي}} \times 100$$

تم إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الغسل والنبذ وباستخدام الوسط ألزرعي IVF Medium وحسب الطريقة الموصوفة من قبل ألمرشدي (2006) ، وتم إجراء عمليات التجميد السريع والإذابة للنطف وفق الخطوات الآتية : عمليات التجميد السريع :Sperm Vitrification Processes - تم وضع 250 مايكرو لتر من العينة المنشطة والمحضرة في أنبوب التجميد الخاص Cryovials الذي حجمه 1.8 مل ، ثم تم إضافة وسط تجميد النطف Sperm Freeze بصورة تدريجية وبنسبة 1:0.7 من حجم العينة ،ويتم المزج بصورة جيدة . عُرض المزيج في أنبوب التجميد الخاص Cryovials إلى بخار سائل النتروجين على ارتفاع 20سم عن مستوى سائل النتروجين لمدة 10 دقائق، يُغمر المزيج في أنبوب التجميد الخاص Cryovials في الحوض الذي يحوي سائل النتروجين (Mohammad *et al* , ,2012)

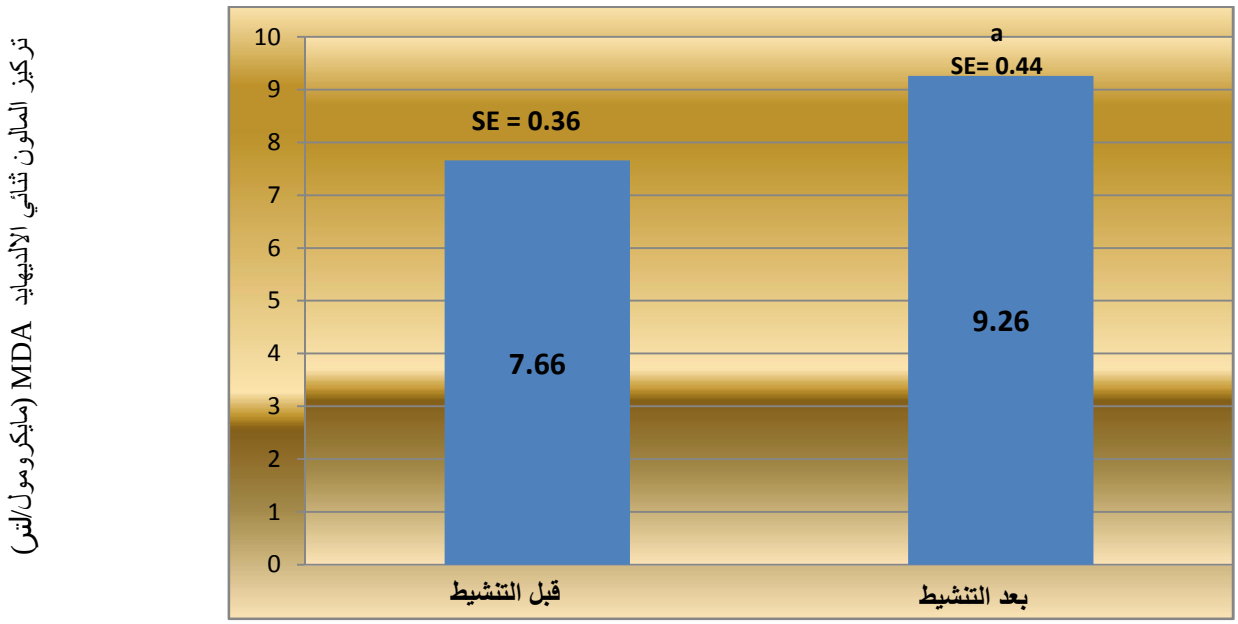
عمليات الإذابة للنطف :Sperm Thawing Processes - تم رفع أنبوب التجميد الخاص Cryovials من سائل النتروجين .وضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 37م^0 لمدة 5 دقائق ثم نقل المزيج إلى أنبوبة اختبار جديدة ، وعُرض المزيج إلى طرد مركزي بسرعة 2000 دورة/دقيقة . ثم أزيل الراشح واخذ جزء منة لغرض حساب تركيز المالون داي ألديهايد MDA ثم أضيف 250 مايكروليتر من IVF Medium إلى الراسب وتم مزجة ، ومن ثم نُقل إلى الحاضنة مع تركيز 6 % CO_2 بدرجة حرارة 37 مُ لمدة 30 دقيقة (Mohammad *et al* ,2012) ،ومن ثم تم دراسة معايير النطف والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي , أنجزت التحليلات الإحصائية الخاصة بهذه الدراسة باستخدام اختبار –ت (Student's t – test) و اختبار –ت (paired t – test) على مستوى الاحتمالية 0.05 .

النتائج : أظهرت نتائج الدراسة الحاليه الجدول (1) أن عملية تنشيط النطف أدت إلى انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة مع معدلاتها قبل التنشيط بينما لوحظ وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية وتركيز المالون داي ألديهايد MDA مقارنة مع معدلاتها قبل التنشيط .

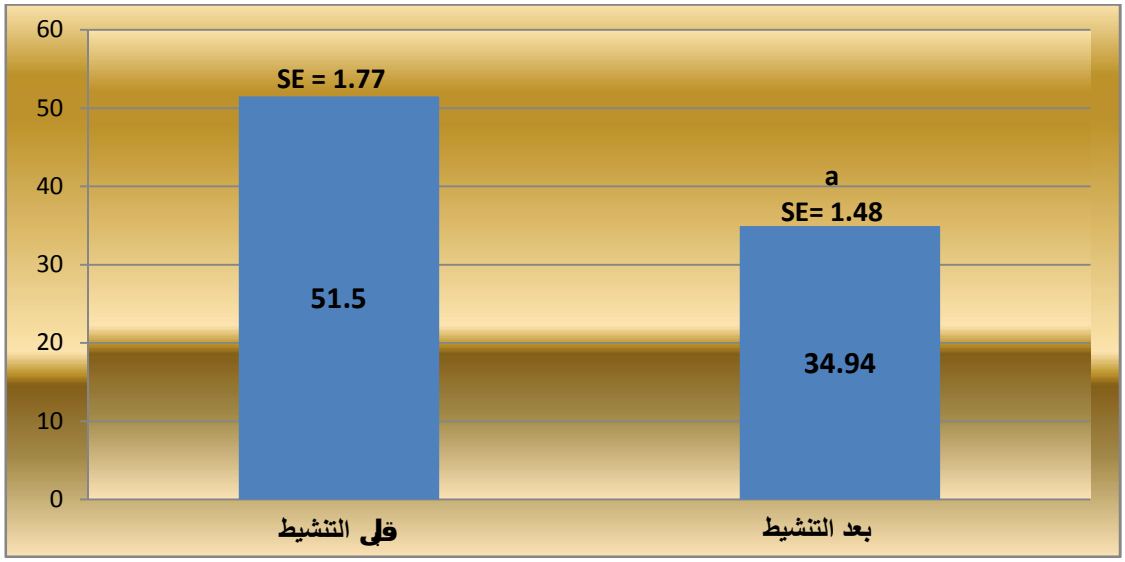
جدول (1) معايير الطف ومستوى المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل التنشيط مقارنة ببعد التنشيط لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients باستخدام تقنية الغسل والنبذ

تنشيط النطف	تنشيط النطف باستخدام الوسط (IVF) ومدة حضن 30 دقيقة	
معايير الطف	قبل التنشيط	بعد التنشيط
تركيز النطف (مليون / مل)	56.22 ± 2.70	[a] 8.93 ± 0.64
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	36.58 ± 1.006	[a] 61.06 ± 1.10
النسبة المئوية للنطف السوية (%)	32.67 ± 1.06	[a] 50.25 ± 0.93
النسبة المئويةلعيوشية النطف%	59.33 ± 1.26	[a] 75.33 ± 1.12
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	3.95 ± 0.19	[a] 2. 71 ± 0.14
تركيز المالون ثنائي الديهايد MDA (مايكرو مول/لتر)	7.66 ± 0.36	[a] 9.26 ± 0.446
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	51.50 ± 1.77	[a] 34.94 ± 1.48

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE ، عدد المرضى = 30 ، الحرف a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05)



شكل (1) تركيز المالون داي الالديهايد MDA (مايكرومول/لتر) لمرضى وهن النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الغسل والنبذ ،عدد المرضى = 30 ، الحرف a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) .



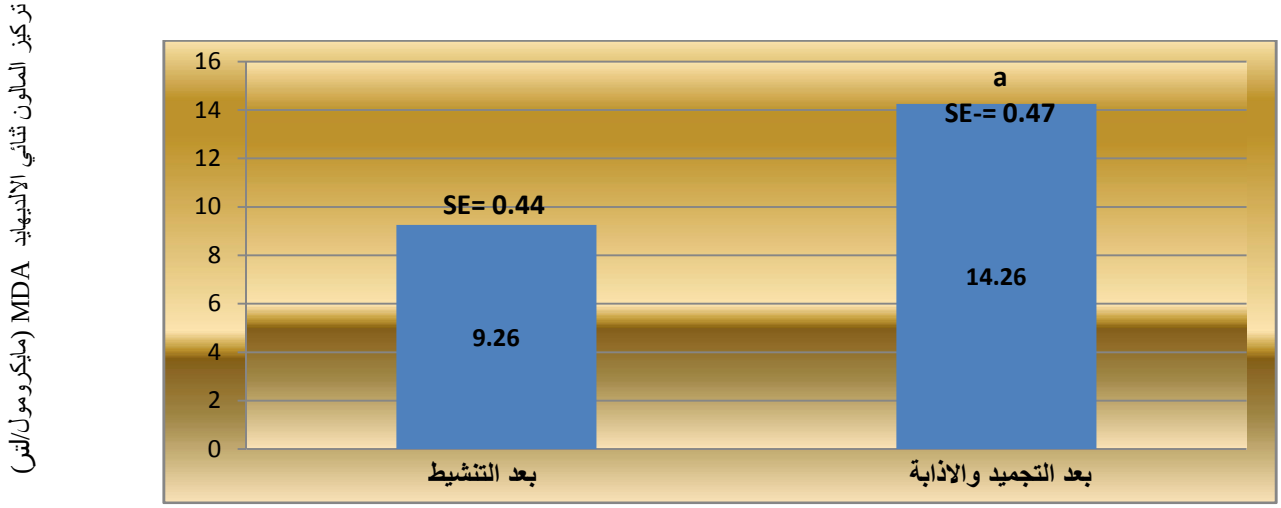
شكل (2) النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية **العسل والنبذ** . **عدد المرضى** = 30. **الحرف** a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) .

وأظهرت نتائج الدراسة الحاليه الجدول (2) أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) ، وإجراء عملية الإذابة بعد مرور شهر واحد أدت إلى **انخفاض معنوي** (P<0.05) في كل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط ، ولوحظ حدوث زيادة معنوية (P<0.05) **في معدلات كل** من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة مع معدلاتها ببعد التنشيط وكما مبين في الجدول .إما تركيز الخلايا الدائرية لم تظهر فرقا" معنويا" (P<0.05) مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط

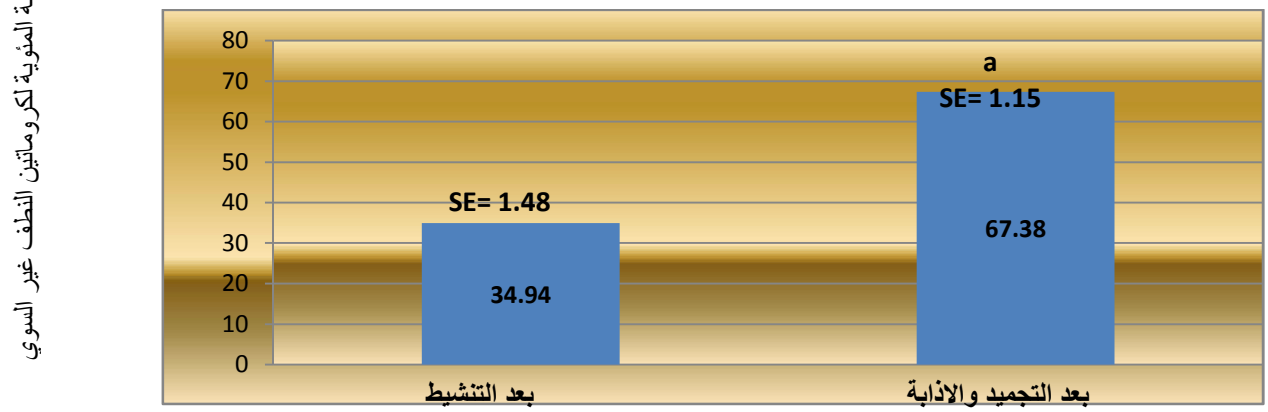
جدول (2) تأثير التجميد السريع والإذابة لمدة شهر في معايير **النطف** وتركيز المالون **داي** الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف **Asthenozoospermic patients**

تنشيط النطف **المعايير المدروسة**	تنشيط النطف باستخدام الوسط (IVF) ومدة حضن 30 دقيقة بعد التنشيط	تجميد النطف باستخدام وسط تجميد النطف(Sperm Freeze) بعد التجميد والإذابة
تركيز النطف (مليون / مل)	8.93 ï 0.64	[a] 7.80 ï 0.61
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	61.06 ï 1.100	[a] 29.14 ï 1.23
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	50.25 ï 0.93	[a] 39.87 ï 1.21
النسبة المئويةلعيوشية النطف(%)	75.33 ï 1.123	[a] 29.50 ï 0.91
تركيز الخلايا الدائرية (مليون / مل)	2.71 ï 0.14	2.40 ï 0.09
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/ لتر)	9.26 ï 0.44	[a] 14.26 ï 0.47
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	34.94 ï 1.48	[a] 67.38 ï 1.15

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE ، **عدد المرضى** = 30 ، **الحرف** a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05)



شكل (3) تأثير التجميد السريع و **الإذابة** في تركيز المالون **داي** الديهايد MDA لمرضى وهن النطف بعد مدة شهر واد التجميد .**عدد المرضى** = 30. **الحرف** a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) .



شكل (4) تأثير التجميد السريع والاذابة في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف بعد مدة شهر واحد من التجميد .**عدد المرضى** = 30. **الحرف** a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) .

المناقشة : إن لتنشيط

النطف البشرية خارج الجسم الحي لغرض استخدامها في التلقيح الاصطناعي ، أهمية كبيرة في التغلب على العديد من مشاكل السائل المنوي غير السوي وكذلك في اختزال الوقت اللازم لتمكين النطف مقارنة مع حدوث هذه العملية داخل الجسم الحي (Dugan *et al*.,1997) .وتصمم التقنيات المستخدمة في تنشيط النطف البشرية في الزجاج أو خارج الجسم بشكل يحاكي أو يقلد العمليات التي تحدث في الجسم الحي من حيث الفصل بين النطف والبلازما المنوي ، واختيار النطف ذات الحركة الطبيعية والجيدة (Yogev *et al* .,2000) . بينت نتائج الدراسة الحالية انخفاضاً معنوياً ($p< 0.05$) في تركيز النطف المسترجعة باستعمال تقنية الغسل والنبذ مقارنة بقيمها قبل التنشيط لمرضى وهن النطف ,وهذا يتفق مع ما توصلت إليه دراسات سابقة أشارت إلى أن تقنية الغسل والنبذ تعمل على تقليل عدد النطف المسترجعة (ألعبيدي ،2010). وربما يعود السبب في ذلك **إلى بقاء** النطف الميتة والنطف غير المتحركة في الحبيبية النطفية المترسبة وعدم قدرتها على الصعود إلى الجزء الاعلى من المستنبت . و بينت نتائج دراستنا الحالية انخفاضاً معنوياً ($p< 0.05$) في النسبة المئوية للنطف غير السوية مقارنة بقيمها قبل التنشيط وربما يعزى ذلك إلى أن النطف السوية هي التي تستطيع الصعود إلى الجزء الأعلى من المستنبت حيث يتم الفحص وعادة تكون مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة اقل مقارنة بالحبيبة النطفية حيث **تستقر** الخلايا الواهنة وذات الشكل غير السوي (Henkel and Schill, 2003). **وتتفق الدراسة** الحالية مع ما توصلت إليه دراسة سابقة إذ أشار العبيدي (2010) إلى إن استعمال تقنية الغسل والنبذ لتنشيط نطف المرض المصابين بوهن النطف الحاد والمعتدل يقلل من النسبة المئوية للنطف غير السوية . **كما** أظهرت نتائج الدراسة انخفاضاً معنوياً ($p< 0.05$) في تركيز الخلايا الدائرية وهذا يتفق مع ما توصلت إليه (**الحربي**،2002) حيث أشار إلى حدوث انخفاض معنوي في تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية **باستعمال** تقنيه الغسل والنبذ بقوة 2000 **دورة** /دقيقه ولمدة خمس دقائق. وربما يرجع السبب في انخفاض تركيز الخلايا الدائرية إلى أن هذه الخلايا لا تمتلك القدرة على **السباحه** إلى الأعلى بعد إجراء عملية **النبذ** . .

وبينت نتائج الدراسة الحالية الدور الواضح لجهاز النبذ في زيادة مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة حيث أظهرت النتائج زيادة معنوية في تركيز المالون **داي** الديهايد باستعمال **تقنية** الغسل والنبذ مقارنة بقيمها قبل التنشيط .

وربما يعزى ذلك إلى تأثير عملية نبذ عينات السائل المنوي في نفاذية غشاء النطف وزيادة مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة، كما إن إزالة البلازما المنوية يعني إزالة مضادات الأكسدة الموجودة في البلازما المنوية ومن ثم تؤدي تلك العوامل إلى حدوث حالة اضطراب في التوازن بين الأنواع الاوكسجينية الفعالة ومضادات الأكسدة مما يعطي فرصة اكبر لإنتاج الأنواع الاوكسجينية الفعالة من قبل النطف، وكناتج نهائي لهذه العملية يزداد تركيز المالوندای الديهايد. وتتفق نتائج دراستنا مع ما توصل إليه Twigg وجماعته (1998) والمرشدي (2006) حيث لاحظوا زيادة معنوية في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة و تركيز المالون داي الديهايد باستعمال تقنية الغسل والنبذ مقارنة بقيمها قبل التنشيط . كما بينت نتائج الدراسة الحالية حصول انخفاض معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي بعد التنشيط عند استعمال تقنية الغسل والنبذ لمرضى وهن النطف ، وقد يفسر ذلك إلى إن النطف ذات التركيب والمظهر السوي والحركة النشطة هي التي تتمكن من الصعود إلى سطح الوسط ألزرعي وغالبا ما تكون هذه النطف ذات تركيب سليم على مستوى التركيب الكروماتيني(Andrabi ,2009) .

أظهرت النتائج أن عملية التجميد السريع للنطف بأستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وإجراء عملية الإذابة بعد مرور شهر واحد في عينات مرضى وهن النطف أدت إلى حدوث انخفاض معنوي ($p<0.05$) في تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف والنسبة المئوية للنطف السوية مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط. وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع دراسات سابقة توصلت إلى حدوث انخفاض معنوي في تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف والنسبة المئوية للنطف السوية والإذابة مقارنة بقبل التجميد (and Lee sinan *et al* 2008*et al*, 2012)وذكر Hammadeh وجماعته (2001) حدوث زيادة معنوية ($p<0.05$) في تركيز المالون داي الديهايد (أو مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة) بعد عملية التجميد للنطف وأشار Fraser و Strzezek(2004) إلى إن عمليات التجميد والإذابة تؤدي إلى حدوث زيادة معنوية ($p<0.05$) في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي أو الضرر في إل(DNA) ، قد يعود سبب ذلك إلى إن عملية التجميد للنطف تتضمن إجراء عدد من العمليات مثل عملية تخفيف الوسط المراد تجميده بإضافة مواد كيمياوية ذات أوزان جزئية واطئة تعرف بالمواد الحافظة للنطف من ضرر التجميد ، وكذلك عملية غمر المزيج في سائل النتروجين ذي درجة حرارة 196- م وعملية التدفئة والإذابة للعينات والتي تشمل بدورها عدد من العمليات من تدفئة بأسخدام الحمام المائي وإجراء عملية فصل الوسط التجميد بإجراء عملية الطرد المركزي وإضافة ميديا التنشيط وغيرها (Luvoni, 2006) يعتقد أن كل خطوة من هذه العمليات تستحث حدوث تأثيرات سلبية قد تؤدي لتوليد الضرر في كل من التركيب والوظيفة للنطف (Woods *et al*,2004) ، وعند إجراء عملية التجميد للمزيج يحدث هناك عدة تغايرات في محتوى المزيج والتي تكون موثره على معايير ووظيفة النطف في داخلة والتي تتولد من الحركيات الحرارية Thermodynamic والخواص التركيبية Structural properties للأغشية البلازمية النطفية (Lin *et al* , 1993) ، حيث تستحث عملية التجميد للنطف حدوث تغايرات غشائية غير رجعية والتي تؤدي عند إجراء عملية الإذابة إلى حدوث تغيرات في فعالية البروتينات وكذلك تغايرات في القدرة النفوذيه للغشاء البلازمي للمذابات و الايونات والمواد من الخلية واليها، الأمر الذي يؤدي إلى خفض كبير في الوظيفة النطفية ، وهذه التغيرات على مستوى التركيب ألنطفي المتولدة من حالة انخفاض درجة الحرارة وزيادة البرودة يشار لها بمصطلح Cold shock (Dziekonska *et al* , 2009) . حيث إن خفض درجة الحرارة يؤدي إلى بدء طور من انتقال حالة الدهون الداخلة في تركيب الغشاء من الحالة اللينة fluid state إلى الطور الهلامي (Gel state)، وهذا الطور من التحول يحدث ضمن مدى معين من الدرجات الحرارية يعتمد على تركيب الأحماض الدهنية المكونة للغشاء (Watson ,2000) . تكون درجة حرارة انتقال الطور لهذه التغيرات متغايرة مع الأنواع الدهنية وتعتمد على تركيبهم و لا يحدث هذا الطور الانتقالي في حالة الدهون المركبة للغشاء في نفس الوقت لاختلاف أنواع الدهون، لذا سيكون هناك وجود لكل من الحالتين ضمن مدى من خفض درجة الحرارة، تميل مناطق الطور الهلالي للتجمع والاصطفاف مع بقية الدهون في الطور السائل بما يولد مناطق ارتباط (junction area) بين الطورين الدهنيين ومع البروتين والتي تكون تكون ذات بيئة تركيبية ضعيفة جداً ومعرضة للانشطار subject to fusion والتجزؤ والتحطم وكذلك عالية النفوذية للايونات permeable to ions. (Hammerstedt *et al*, 1990) . إن هذه التغايرات في طوبوغرافية الغشاء تؤدي أيضا إلى تكون حالة من استحثاث حركات إنزيمية غير خطية لقسم من إنزيمات الغشاء الأمر الذي يؤدي إلى حدوث قصور وتغاير في القدرة النفوذية الغشائية للمواد المختلفة (Dziekonska *et al*, 2009). عند حدوث عملية خفض في درجة الحرارة المعرض لها الغشاء يحدث اضطراب في التداخلات الدهنية البروتينية وكذلك قصور في العمل الانزيمي والقنوات الناقلة والمستقبلات البروتينية مما يؤدي إلى فقدان الغشاء قسم من سلامته الهيكلية والوظيفية (Medeiros *et al*, 2002) . وقد يحدث كذلك عملية إزاحة لقسم من البروتينات الغشائية مثل تلك التي تعمل في نقل الكلوكوز وخصوصاً الهيكسوز والذي يلعب دوراً مهماً في تنظيم ايض سكر الفركتوز خلال الأغشية حيث شخص حدوث إزالة لها إثناء التجميد في أغشية البلازما النطفية لدى الإنسان والكلاب والخنزير. (Dziekonska *et al*, 2009) .

إن الانخفاض الشديد لدرجة الحرارة من مدى 0 – 130-مْ ، تعمل المذابات الموجودة ضمن المحتوى المائي النطفي على خفض نقطة الانجماد للمزيج ليكون حوالي (-10 - -15مْ) أي إن عملية تكوين البلورات الثلجية للماء تطلب درجة حرارة اقل من درجة حرارة الماء المقطر (صفرمْ) عند هذه الدرجات يبدأ تكون الثلج في الوسط خارج الخلية. وهذا الثلج المتكون يزيد من تركيز المذابات مثل السكريات والاملاح والبروتينات وغيرها في الوسط.(Andrabi ,2007) . وكنتيجة لذلك يتكون تدرج جديد في الضغط الازموزي.حيث إن الماء الموجود داخل النطف يكون تحوله إلى ثلج أبطئ مما في الخارج و لذلك ينفذ الماء من داخل الخلية إلى الخارج عبر الأغشية وخصوصاً من منطقة رأس النطفة وذلك يؤدي إلى حدوث حالة من الجفاف الخلوي cellular dehydration داخل الخلايا النطفية (Andrabi , 2007, Watson, 2000) . .

وعند تكوين الثلج في المنطقة خارج الخلية والذي يرافقه زيادة حدوث في الجفاف داخل الخلية، فأن الإحداث داخل المقصورة الخلوية cellular compartment تعتمد على معدل التبريد الذي تتعرض له العينة. فإذا التجميد حدث بسرعة فان الخلايا لن تستطيع أن تجف بصورة كفؤءة لذا الماء الباقي سوف يكون ثلجاً داخل خلوي والذي يؤدي زيادة تكوينه إلى خفض فرصة حياتيه الخلية ،كما إن تكوين البلورات الثلجية داخل المقصورة الخلوية يؤدي لان تكون العضيات الخلوية معرضة إلى الخطر نتيجة احتمالية تضرر الأغشية المحيطة بها الأمر الذي يضعف من احتمالية حياتية الخلية. (Lee *et al* ,2012) . إضافة لذلك يؤدي هذا الوضع إلى حدوث تغايرات في حجم الخلية نتيجة التغايرات في حركة الماء وحدوث حالة الجفاف الخلوي إضافة إلى التأثيرات السمية التي تنتج من ارتفاع تركيز المذابات.
.

أوضحت الدراسات المتابعة لتأثيرات عمليات التجميد فوق التركيبية Ultra structural studies حدوث تأثيرات ضارة على العضيات النطفية المختلفة مثل تلك الملاحظ حدوثها في بيوت الطاقة (Nishizono *et al*,2004)، حيث إن التأثيرات المذكورة أنفا لاتقتصر على الأغشية البلازمية السايتوبلازمية فقط وإنما الأغشية المحيطة بالعضيات الخلوية المختلفة ، حيث أظهرت دراسات التجميد وجود دور سلبي على الميتوكوندريا نتيجة الجهد ألتأكسدي المتولد من خفض درجة الحرارة. (Connell *et al* ,2002) . تكون الأغشية المايتوكوندرية معرضة إلى الضرر المتولد من عملية التجميد ، والتي تؤدي إلى قصور في القدرة النفوذية الغشائية وتحرير الأنواع الاوكسجينة الفعالة بشكل كبير الأمر الذي يؤدي إلى زيادة مستوياتها في الوسط ، ونتيجة كثافة الإعداد الميتوكوندرية في الخلايا النطفية ، فمن المتوقع إن يكون هناك زيادة اكبر في مستوى الأنواع الاوكسجينة الفعالة داخل الوسط وبالمقابل تنخفض قدرة مضادات الأكسدة الدفاعية . (Said *et al* ,2010) . إن مضادات الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية الموجودة في خلايا الحيوانات الثديية ومنها خلايا النطف تكون ذات فعالية عالية في حماية الخلايا من حدوث عملية بيركسدة الدهون المتولدة من فعالية الأنواع الاوكسجينة الفعالة (Andrabi *et al* ,2009) . أوضحت الدراسات إن عملية التجميد تؤدي إلى حدوث انخفاض معنوي في مستويات كل من مضادات الأكسدة الإنزيمية وغير الإنزيمية حيث ذكرت دراسة Kumar وجماعته (2011) حدوث انخفاض معنوي في مستويات مضادات الأكسدة بعد إجراء عمليات التجميد والإذابة وحدوث زيادة في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS داخل الوسط . إن الزيادة العالية في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة وانخفاض مضادات الأكسدة ربما يؤدي إلى زيادة معدلات الموت الخلوي المبرمج في مجتمع الخلايا النطفية (Wang *et al*, 2003). و يؤدي زيادة مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS على حساب مضادات الأكسدة لحدو ث حالة الجهد ألتأكسدي oxidative stress ، وكل المكونات الخلوية للنطف مثل الدهون Lipids والبروتينات proteins والأحماض النووية Nucleic acid والسكريات sugars تكون أهداف محتملة لتأثيرات الإجهاد ألتأكسدي السامة (Said *et al* ,2010) . وتعد الدهون أكثر الجزيئات الكبيرة عرضة للخطر والتي تدخل في تركيب الغشاء البلازمي النطفي بشكل أحماض دهنية غير مشبعة PUFA والتي تحتوي على أكثر من اصرتين مزدوجة بين جزئتي الكاربون. إن وجود الآصرة المزدوجة المجاورة إلى مجموعة المثلين تجعل أصرة المثلين كاربون-هدروجين ضعيفة ونتيجة لذلك تكون ذرة الهيدروجين أكثر عرضة للانفصل . (Kumar *et al* ,2011) . يؤدي الهجوم الاجهادي إلى حدوث حالة تسمى أكسدة الدهن Lipid peroxidation والتي تمثل تحلل الأحماض الدهنية غير المشبعة في الأغشية الخلوية بواسطة سلسلة من تفاعلات التحفيز الذاتي للجذور الحرة ،إذ تبدا العملية عندما يعمل الجذر الحرعلى إزالة ايون الهيدروجين H^+ من الحامض الدهني غير المشبع ليكون مركب الجذر الحر الدهني Lipid free radical ثم يتفاعل مع الأوكسجين ليكون جذر البيروكسي الدهني lipid peroxy radical وهكذا تستمر تفاعلات انتشار السلسلة propagating التي تتوقف عند ارتباط جذرين مع بعضهما (Said *et al* ,2010) أظهرت نتائج الدراسة حدوث انخفاض معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية ، واتفقت النتائج مع دراسة العالم (Lee *et al* ,2012) ، مثل هذا الانخفاض يمكن إن يعزى إلى عدد من الأسباب منها إن عمليات التجميد استحثت حدوث ضرر في أغشية الخلايا البلازمية وفي تركيب المايتوكوندريا التي تعتبر المصدر الرئيسي للطاقة المتطلبة لإدارة الحركة الأمر الذي يؤدي إلى قصور في كل من الايض الخلوي وبقية الوظائف الخلوية مثل الحركة Die (Diekonska et al ,2009) . حيث إن الميتوكوندريا في النطف تقع على امتداد القطعة الوسطية بين الأغشية البلازمية والعواميد الغمدية التسعة مكونة طبقة تغطيها تجهز الطاقة اللازمة لحركة النطف . (Connell *et al* ,2002) . والكمية الكبيرة من الطاقة التي تجهز لحركة النطف بشكل ATP تجهز إما عن طريق عملية التحلل السكري glucolysis في السايتوبلازم أو عن طريق عملية الفسفرة التأكسدية oxidative phosphylartin الحادثة في داخل المايتوكوندريا (Dziekonska *et al*, 2009;) . وينقل ATP المتولد من عملية الفسفرة التأكسدية الحادثة في المنطقة الداخلية من الغشاء الميتوكوندريري إلى النبيبات الدقيقة micro Tubules لغرض إدارة الحركة ،لذلك القصور في فعالية الميتوكوندريا ربما يفسر الانخفاض في الحركة النطفية (Connell *et al* ,2002, Januskauskas, and Zillinskas, 2002) ,والسبب الأخر قد يكون نتيجة زيادة حدوث الضرر في الذيل النطفي المسؤول عن الحركة ،حيث ذكرت دراسة (Sinan *et al* ,2008) حدوث زيادة في ضرر الذيل النطفي عند عملية التجميد اضافة إلى إن زيادة مستويات انواع الأوكسجين الفعالة تؤثر بشكل مباشر في خفض الحركة نتيجة سلسلة من العمليات المؤكسدة للدهون الغشائية والمؤدية لفقدانه سلامته ،إضافة إلى حدوث تضرر ببروتينات المحور المؤدية إلى حدوث شلل في النطف ، كما اوضحت الدراسة إن حدوث القصور في كل من الميتوكوندريا والغشاء البلازمي ساهمت في قصور الحركة النطفية .
.

وقد يعزى سبب انخفاض الحركة إلى زيادة النسبة المئوية للخلايا غير الحية في مجتمع النطف ومن ثم انخفاض النسبة المئوية للنطف التحركة . كذلك قد تنقص الحركة بعد حدوث الجهد التاكسدي نتيجة بعض التغيرات الحادثة في عملية النقل الفعال والنفوذية الغشائية في منطقة ذيل النطفة (Silva and Gadella,2006) .
.

وأظهرت النتائج حدوث انخفاض معنوي (p<0.05) في النسبة المئوية لعيوشية النطف مقارنة بقبل التجميد ، واتفقت النتائج مع دراسة .(Muhammad ,2011) وقد يعزى ذلك إلى تاثيرات البئية الفيزيائية والكيميائية التي تعرضت لها النطف (Hammadeh *et al* ,1996)حيث إن تكوين البلورات الثلجية خارج الخلايا يعد العامل الرئيسي الذي قد يؤدي إلى الاذى الفيزيائي للنطف كذلك تكوين البلورات الثلجية داخل الخلية والذي قد يؤدي إلى ضرر في تركيب كل من الأغشية والعضيات الخلوية (Sinan *et al*,2008) .كذلك فان عملية التبادل المائي بين داخل وخارج الخلية خلال المراحل الاولية قبل التجميد عند إضافة المواد الحافظة للنطف من ضرر التجميد تؤدي إلى مرور الخلايا بسلسلة من التغايرات الحجمية من انكماش وتورم والذي يؤدي إلى فقدان سلامة الأغشية والعضيات والموت للخلايا أو السماح بنفوذية الصبغة (Medeiro *et al*,2002) . و أظهرت النتائج حدوث انخفاض معنوي (p<0.05)في النسبة المئوية للنطف السوية ,وقد يفسر ذلك نتيجة التأثيرات المتولدة من تكوين البلورات الثلجية خارج الخلية الذي يلحق الضرر في المظهر الخارجي وكذلك قد يعزى السبب إلى جريان السائل غير المسيطر عليه داخل الخلية خلال عملية الإذابة وحدوث حالة الانتفاخ الخلوي (Sinan *et al* ,2008) . كما أظهرت نتائج الدراسة حدوث زيادة معنوية (p<0.05)في تركيز المالون داي الديهايد مقارنة بقبل التجميد ,وقد يفسر ذلك نتيجة لزيادة انتاج الانواع الاوكسجينة الفعالة خلال التجميد وانخفاض القدرة الدفاعية لمضادات الأكسدة ,ومن ثم حدوث حالة الجهد التأكسدي والذي ادى إلى حدوث عملية بيروكسدة الدهن في الأغشية البلازمية والخلوية للنطف وزيادة تحللها ومن ثم زيادة في تركيز المالون داي الديهايد (MDA) الذي يعتبر احد الجزيئات الكيميائية الناتجة من سلسلة تحلل الأحماض الدهنية في عملية البيروكسدة الدهنية . ويعد المالون داي الديهايد منتجاً ثانوياً يشير إلى مدى ضراوة الجهد التأكسدي ويعد الزيادة في تركيزة كمؤشر لزيادة مستويات انواع الأوكسجين الفعالة (Hammadeh *et al*, 2001). وأظهرت نتائج الدراسة حدوث زيادة معنوية في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة بقيمها قبل عملية التجميد ، واتفقت نتائجنا مع عدد من الدراسات التي وثقت حدوث تغاير أو ضررaltered or damaged في النسبة المئوية لكروماتين النطف السوي ومنها (Fraser and Strzezek 2004, Hammadeh *et al*, 2001) . هناك ثلاثة نظريات محتملة قد تفسر الضرر في تركيب الكروماتين تشمل:خللاً في تعبئة الكروماتين النطفي defective sperm Chromatin Pachaging والحامض النووي منقوص الأوكسجين وخللاً في عملية الموت الخلوي المبرمج Apoptosis والجهد ألتأكسدي ، وإثناء عمليات التجميد تزداد حالة الجهد ألتأكسدي المتولدة من الزيادة العالية في مستويات الأنواع الاوكسجينة الفعالة وانخفاض القدرة الدفاعية لمضادات الأكسدة والذي يؤدي إلى حدوث كسر في الروابط الكروماتينية وحدوث تحطم في أشرطة الحامض النووي مقوص الأوكسجين (Fraser and Stzezek , 2004، Chohan *et al* ,2004) .إضافة إلى إن عمليات التجميد والإذابة تؤدي إلى حدوث زيادة في الموت الخلوي المبرمج (Khan *et al* ,2009). لذا فان الزيادة في كل من العاملين المذكورين ينعكس سلبا على النسبة المئوية لكروماتين النطف السوي (Fraser and Strzezek 2004).

الاستنتاجات :يستنتج من هذه الدراسة بأن عمليات التجميد السريع والإذابة للنطف تمتلك تأثيرات سلبية في معايير المني و النطف وتركيز ألمالون داي ألالديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في كل عينات المرضى المشمولين بالدراسة

التوصيات :إضافة مضادات الأكسدة لأوساط تجميد النطف لغرض التقليل من تأثيرات التجميد وتحسين معايير النطف .

المصادر :

1- **الحرمي ، نهى يعرب محمد . (2002) .** دراسة مقارنة لتقنيات تنشيط النطف في الزجاج لمرضى العقم المصابين بقلة ووهن النطف . أطروحة ماجستير ، كلية العلوم . جامعة بابل .

2- **ألعبيدي ،سماح عامر حمود (2010) .** تأثير استخدام الوسط ألزرعي Ferticult Flushing Media في تنشيط معايير النطف في الزجاج لمرضى العقم المصابين بوهن النطف. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الكوفة .

3- **ألمرشدي ، صاحب يحيى (2006) .** تأثير بيرو كسيد الهيدروجين وبعض مضادات الأكسدة في معاير النطف البشرية خارج الجسم الحي . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بابل

4- **Andrabi, S. M. H. (2007).** Fundamental principles of cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus bull spermatozoa. Mini review. Int. J. Agri. and Biol.; 9:367-369 .

5- **Andrabi, S. M. H. (2009).** Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo without cryoprotectants, Cryo Lett 23;2002:93– 102.

6- **Bailey, J.L, A. Morrie and Cormier, N. (2003).** Semen cryopreservation: success and persistent in farm species. Canadian J. Anim. Sci.; 83:393-401

7- Chohan, K. R., J. T. Griffin and D. T. Carrell.(2004). Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. Andrologia, 36: 321–326.

8- Connell, M. O. ; N. McClure. and S. E. M. Lewis, (2002)."The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function," Human Reproduction, vol. 17, no. 3, pp. 704–709.

9- Curi , S.M.; Ariagno , J. I.; Chenlo , P. H. ; Mendeluk , G. R. ; Pugliese , M. M.; Sardi , L. M. ; Repetto , H. E. and Blanco, A. M. (2003) . Asthenozoospermia : analysis of a large population arch. Androl ; 49 : 343 – 349 .

10-Dohle , G.R., Jungwirth, A., Colpi,G., Giwercman,A.,Dimer,T.,and Hargrave.(2007) . Guidelines On Male Infertility. European Association of Urology.

11- Dugan, K.J.; Shalika,S.; Smith,R.D. and Padilla, S.L. (1997) : Comparisonof synthetic serum substitute and fetal cord serum as media supplements for in vitro fertilization : aprospective, randomized study. Fertil. Steril; 67 :166-168 .

12- Dziekońska A, L Fraser, and J Strzeżek,(2009) . Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. J. Anim. and Feed Sci.; 18:638-649 .

13- Fraser, L. and Strzezek, J.(2004.). The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 and 16ºC. Folia Histochemica et Cytobiologica, 42: 49–55.

14- Hammadeh, M. E., S. Greiner., P. Rosenbaum and W. Schmidt. (2001). Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and sub fertile men after freeze-thawing procedure. J. Androl., 22: 1012–1018.

15- Hammadeh, M.E.; Al-Hassani, S.; Stieber, M.; Gauss, C.; Rosenbaum, P. ;Georg, T.; Diedrich, K. and Schmidt, W. (1996) The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic programme. Hum. Reprod., 13: 2468-2471.

16- Hammerstedt, R.H., J.K. Graham., and J.P .Nolan, (1990) . Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J. Androl.;11:73–88.

17- Henkel , R. R. and schill, W. B. (2003) . Sperm preparation for assistant reproduction biology and endocrinology ; 1 : 1 - 22 .

18- Januskauskas A, and H Zillinskas, (2002). Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. Veterinarija ir zootechnika; 17:1392-2130 .

19- Khan, D. R., N. Ahmad., M. Anzar and A. A. Channa.(2009). Apoptosis in fresh andcrryopreserved buffalo sperm. Theriogenology, 71: 872-876.

20- Kumar, R., G., Jagan. Mohanarao., Arvind and S. K. Atreja. (2011). Freeze thaw induced genotoxicity in buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa in relation to total antioxidant status. Mol. Boil. Rep., 38: 1499-1506.

21- Lee, C.Y., Lee, C.T., Wu, C.H., Hsu, C.S. and Hsu, M.I.(2012) . Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa. Andrologia. Vol 44:81-86 .

22- Lin, D.S., Connor, W.E., Wolf, D.P., Neuringer, M.,and Hachey, D.L., (1993). Unique lipids of primate spermatozoa — desmosterol and docosahexaenoic acid. J. Lipid Res. 34, 491–499.

23- Luvoni, G.C. (2006) .Gamete cryopreservation in the domestic cat,Theriogenology, 66(1):101-111.

24- Medeiros, C.M.O., F. Forell., A.T.D. Oliveria ., and J.L .Rodrigues, (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenol.; 57: 327-344 .

25- Mohammad, Baqer. Minaei., Mohammad, Barbarestani., Saeid, Nekoonam.,Abbas, Abdolvahabi., Nasrin, Takzare., Mohammad, Hossein, Asadi., Azim, Hedayatpour. and Fardin, Amidi. (2012). Effect of Trolox addition to cryopreservation media on human sperm motility. Iran J Reprod Med Vol.10. No. 2.: 99-104.

26- Muhammad, S .A. (2011). Antioxidant FortIfication Of Semen extender to improve free ability and fertility of Buffalo Bull spermatozoa. Ph. D thesis , Department of Zoology, Faculty of Sciences , Arid Agriculture University.

27- Muslih, R.K.; AL-Nimer, M.S. and AL-Zamely, O.M. (2002). The level of malondialdehyde after activation with (H2O2) and (CuSO4) and inhibition by desferoxamine and molsidomine in the serum of patients with acute myocardial infarction. National Journal of Chemistry; 5: 139-148.

28- Narowth ,F .,Isachenko ,V., Dessole , S., Rahimi,G., Farina, M.,Vargiu,N.,et al .(2002). Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants . Cryo left , 23: 93- 102 .

29- Nishizono, H., Shioda, M, Takeo, T., T Irie and N Nakagata,(2004). Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. Biol. Reprod.; 71: 973-978.

30- Richard, E., Jones, Kristin., H. Lopez, .(2006). Human Reproductive Biology , third edition . pp 437 – 440 .

31- Said, T. M. , Gaglani, A. and A. Agarwal,(2010). "Implication of apoptosis in sperm cryoinjury," Reproductive BioMedicine Online, vol. 2 4, pp. 456–462.

32- Sasikumar, S. and Dakshayani, D. (2013). Assessment of sperm DNA integrity by Toluidine blue staining technique in infertile patients and its relation to cryopreservation. Int.J.Curr. Microbiol .App. Sci ; 2(6): 280-292.

33- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, et al.(2002) . Best practice policies for male infertility. Fertil Steril; 77 : 873-82.

34- Silva ,P. F.,and Gadella ,B.M.,(2006) . Detection of damage in mammalin sperm cells. Theriogenology ,65:958-978 .

35- Sinan, Ozkavukcu; Esra, Erdemli; Ayca, Isik;Derya, Oztuna, and Sercin, Karahuseyinoglu . (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. J Assist Reprod Genet. August; 25(8): 403–411.

36- Twigg, J.; Fulton, N. and Gomez, E. (1998) : Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa : Lipid Peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. Hum. Reprod ; 13 : 1429-1436 .

37- Vieytes , A. L. ; Cisale, H. O. and Ferrari ,M. R. (2008). Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. Veterinary Record;163: 625-629.

38- Wang, X; Sharma, R.K.; Sikka, S.C.; Thomas, A.J.; Falcone, T. and Agarwal, A. (2003) Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male-factor infertility. Fertil Steril 80: 531-535.

39- Watson, P.F., (2000) . The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci.; 60:481-492.

40 - WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Sperm– Cervical Mucus Interaction, 4th ed. (1999). Cambridge, Cambridge University Press.

41- WHO, Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Sperm– Cervical Mucus Interaction, 1ST ed. (2010). Cambridge, Cambridge University Press.

42- Woods, E.J.; Benson, J.D.; Agca, Y. and Critser, J.K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology, 48:146-156.

43- Yogev, L.; Gamzu, R.; Botchan, A.; Hauser, R.; Paz, G. and Yavetz, H. (2000) . Zonapellucide binding improvement effect of different sperm Preparation techniques is not relted to changes in sperm motility characterizations. Fertil. Steril; 73 : 1120-1125.