پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، ویژه نامه ۱، زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۳۰ تا ۳۵

مقاله اصلی
(Original Article)

اثرات آنتی اکسیدان ملاتونین بر پارامتر های حرکتی، میزان گونه های فعال اکسیژن (ROS) و مالون دی آلدهید (MDA) در اسپرم منجمد شده انسانی

محمدحسن کریم‌فر[۱]، فیروزه نیازوند[۱]، رضا شیرازی[۱و۲]، محمدرضا حافظی[۳]، سالار بختیاری[۴*]، شیوا کلانتری[۵]

[۱] گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
[۲] گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
[۳] گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
[۴] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
[۵] مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *طی فرایند انجماد اسپرم در نتیجه تولید گونه‌های فعال اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی به اسپرم دچار آسیب اکسیداتیو شده که احتمالاً این آسیب دلیل اصلی کاهش پارامترهای حرکتی آن می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی آثار افزودن آنتی اکسیدان ملاتونین با دوزهای مختلف بر استرس اکسیداتیو و پارامترهای حرکتی اسپرم منجمد شده انسانی بود.*

روش بررسی: *مایع منی ۱۳ نفر که دارای اسپرم طبیعی بودند، جمع آوری گردید. هر نمونه به ۶ قسمت مساوی تقسیم شد و قسمتی به عنوان نمونه تازه قبل از انجماد، قسمتی دیگر برای انجماد با محیط شستشوی اسپرم سانتریفیوژ و شسته شده و به یک بخش بدون آنتی اکسیدان، چهار بخش دیگر با آنتی اکسیدان ملاتونین در دوز های ۱، ۰/۱، ۰۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی مولار با روش انجمادآهسته منجمد شد. تحرک با استفاده از سیستم کامپیوتری و برنامه های ویژهٔ CASA، همچنین رادیکال های آزاد اکسیژن و مالون دی آلدهید با استفاده از کیت ELISA اندازه گیری شد. در انتها با استفاده از آزمون آماری ANOVA نتایج ارزیابی شد.*

یافته‌ها: *فرآیند انجماد کاهش پارامترهای حرکتی کلاسیک اسپرم را به دنبال داشت و افزودن آنتی اکسیدان ملاتونین باعث کاهش میزان رادیکال های آزاد اکسیژن و مالون دی آلدهید شد و دیده شد افزودن ملاتونین تنها با دوز ۰/۰۱ میلی مولار می تواند سبب بهبود تحرک اسپرم پس از انجماد شود.*

نتیجه‌گیری: *افزودن آنتی اکسیدان ملاتونین مانع تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین مانع فرایند لیپید پراکسیداسیون غشای اسپرم طی فرایند انجماد شده و تنها دوز ۰/۰۱ میلی مولار آن قدرت تحرک اسپرم را بهبود می‌بخشد.*

واژگان کلیدی: *رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مالون دی آلدهید، موتیلیتی، حفاظت انجمادی، ملاتونین.*

مقدمه

حفاظت انجمادی (Cryopreservation) گامت، شامل در معرض قرار دادن ابتدایی گامت‌ها با مواد محافظ انجماد، کاهش دما به زیر صفر درجه سانتیگراد، ذخیره، ذوب و سرانجام حذف ماده محافظ انجماد و بازگشت به حالت طبیعی فیزیولوژیکی گامت است. منجمد سازی اسپرم انسانی به طور گسترده‌ای در برنامه‌های تلقیح مصنوعی و باروری آزمایشگاهی برای نگه داری گامت نر و فراهم آوردن شانسی برای باروری‌های بعدی به کار می‌رود؛ به عنوان مثال در درمان بدخیمی (۱)، شیمی درمانی سیتوتوکسیک، رادیوتراپی و بعضی از انواع

آدرس نویسنده مسئول: ایلام، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی، سالار بختیاری (**e-mail:** bakhtiyari-s@medilam.ac.ir)

درمان‌های جراحی که ممکن است منجر به یک نقص تستیکولار و یا اختلال در سیستم عملکرد انزالی شود، انجماد اسپرم‌ها قبل از شروع درمان امیدی برای باروری بعدی بیماران را فراهم می‌کند (۲). در افراد اهداکننده اسپرم استفاده از سیمن فریز شده اجازه بررسی جزئیات افراد اهدا کننده از نظر وجود عفونت هایی مانند HIV وHBS را فراهم می‌آورد (۳). همچنین برای تکرار اعمال جراحی از قبیل MESA (Microsurgical Epididymal sperm aspiration) و TESE (testicular sperm extraction) که به عنوان اعمال جراحی در درمان آزوسپرمی استفاده می‌شود، می‌توان از منجمد کردن اسپرم استفاده نمود. علیرغم پیشرفت‌های زیادی که در زمینه انجماد اسپرم صورت گرفته است، میزان تحرک و بقای اسپرم‌ها پس از فرایند انجماد-ذوب به طور چشمگیری کاهش می‌یابد. یک راهکار مناسب برای بهبود کیفیت اسپرم منجمد شده افزودن مواد مختلف از جمله آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد (۴).

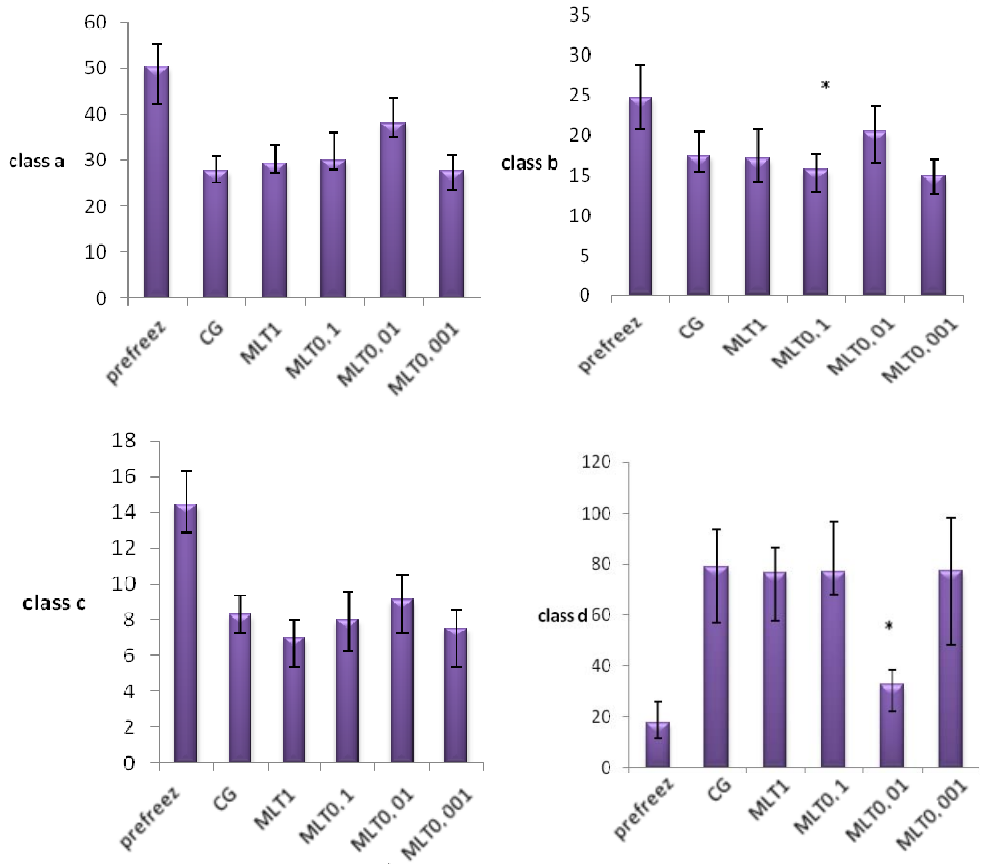
فرایند انجماد اسپرم با تشکیل گونه‌های فعال اکسیژنی (ROS)، استرس و آسیب‌های اکسیداتیوی همراه بوده که از عوامل مهم در کاهش تحرک و باروری اسپرم در طول نگهداری منی (Semen) محسوب می‌شوند (۵ و ۶). طی حفاظت انجمادی، مایع منی در معرض شوک سرمایی و فشار اسمزی قرار گرفته و در نتیجه میزان اکسیداسیون غشاء به واسطه درصد بیشتر واکنشهای اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این امر نهایتاً تحرک و عمر اسپرم را کاهش می‌دهد (۷). از آنجایی که پارامترهای اسپرم بر میزان لقاح مؤثراست لذا به نظر می‌رسد که آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش رادیکال‌های آزاد وکاهش اثرات منفی شوک اکسیداتیو و همچنین بهبود پارامترهای اسپرم در تکنیک‌های ART از اهمیت کلینیکی برخوردار است (۸).

ملاتونین یکی از ترشحات غده اپی‌فیز است که در تنظیم برخی پدیده‌های فیزیولوژیک مؤثر می‌باشد. ملاتونین قدرت برداشت و خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد شامل رادیکال‌های هیدروکسیل، پراکسیل و آنیون های پراکسی نیترات را دارا می‌باشد. همچنین در محیط *In vivo* در انسان ها دیده شده است که ملاتونین میزان آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از ROS به میتوکندری‌های اسپرم را کاهش می‌دهد (۹). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله ملاتونین طی انجماد اسپرم وابسته به غلظت است (۱۱،۱۰). علیرغم تمامی تلاش‌ها به علت محدودیت‌هایی که در زمینه منابع انسانی از جمله تهیه و نگهداری نمونه مطرح است، نکات مبهم زیادی در خصوص تاثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر حفظ پارامترهای اسپرم انسانی پس از انجماد وجود دارد. لذا در تحقیق حاضر تاثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌اکسیدان ملاتونین بر میزان ROS، MDA و همچنین پارامترهای اسپرم انسانی پس از انجماد بررسی شد.

مواد و روشها

در این مطالعه، از ۱۳ مرد بارور با تراکم اسپرم بیشتر از ۲۰ میلیون در میلی لیتر پس از ۳-۲ روز خودداری از مقاربت، نمونه منی دریافت شد. به منظور مایع شدن نمونه‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از تبدیل منی به حالت مایع، بر اساس معیارهای سازمان جهانی (۱۹۹۹) از نظر حجم، تحرک و مورفولوژی توسط دستگاه سیمن آنالیزور آنالیز شد (۱۲). تحرک اسپرم به ۴ درجه تقسیم شد: ۱) درجه ۱ (کلاس a): حرکت خطی، پیش رونده و سریع؛ ۲) درجه ۲ (کلاس b): حرکت خطی با سرعت کم؛ ۳) درجه ۳ (کلاس c): حرکت درجا، دورانی و با سرعت کم؛ درجه ۴ (کلاس d): فاقد هر گونه حرکت.

سپس نمونه هر فرد به ۶ قسمت مساوی تقسیم شد: نمونه‌ای از اسپرم‌ها به صورت تازه (Fresh) تجزیه و تحلیل شد و در معرض آنتی‌اکسیدان قرار نگرفت. نمونه‌ای از اسپرم‌ها پس از شستشو در محیط انجمادی بدون ملاتونین، باقیمانده نمونه جهت انجماد با دوزهای ۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ میلی مولار ملاتونین در نظر گرفته شد. پس از ترکیب شدن نمونه منی با محیط شستشوی اسپرم (SAGE, USA)، سانتریفیوژ (Hettich, 5000g) انجام شد. پلاک سلولی تشکیل شده مجددا با محیط شستشوی اسپرم ترکیب گردید و سپس برای گروه‌های آزمایشی مورد نظر نسبت ۱:۰/۷ از سوسپانسیون سلولی: محیط انجماد اسپرم، به آرامی و به صورت قطره به قطره ترکیب شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد و در نهایت به درون تانک نیتروژن مایع منتقل شدند. بعد از دو هفته نمونه ها خارج و ذوب شدند. برای ذوب کردن نمونه‌ها کرایوتیوب‌ها از تانک نیتروژن خارج شده، به مدت ۱ تا ۲ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس ۵-۲ دقیقه درون بن ماری ۳۷ در جه سانتیگراد نگه داشته شدند. نمونه‌ها به مدت ۷ دقیقه با دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد. سپس محیط شستشوی اسپرم اضافه و همان آنالیز قبل از انجماد انجام شد. مجددا به همان ترتیب سانتریفیوژ انجام گردید و پس از



شکل ۱- مقایسه موتیلیتی اسپرم‌ها در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف ملاتونین، کنترل انجماد و گروه قبل از انجماد. اختصارها: Prefreez= گروه قبل از انجماد؛ CG= گروه کنترل انجماد؛ CG= گروه کنترل انجماد؛ MLT1= گروه تیمار شده با ملاتونین ۱mM؛ MLT0.1= گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۱ mM؛ MLT0.01= گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۰۱ mM؛ MLT0.001= گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۰۰۱ mM؛ *: P<۰/۰۵.

شستشوی پلاک تشکیل شده با محلول PBS نمونه‌ها روی یخ منتقل شد و لیز کردن سلول‌ها با دستگاه سونیکاتور (BanDelin) انجام شد.

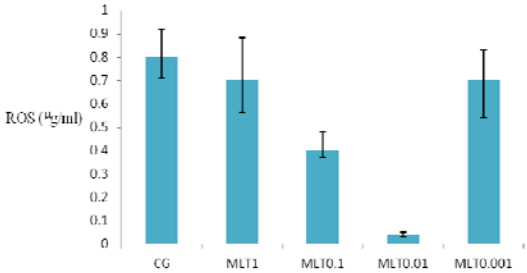
سنجش رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS): این سنجش با استفاده از کیت ELISA (Blue Gene) انجام شد. مطابق دستورالعمل کیت عمل شد و در نهایت مقدار جذب نوری (OD) نمونه‌ها توسط دستگاه فتومتر خوانده شد. با رسم نمودار OD استانداردها در مقابل غلظت‌های استاندارد موجود، غلظت‌های ROS بر حسب µg/ml محاسبه گردید.

سنجش مالون دی آلدهید (MDA): مقادیر MDA به عنوان شاخص فعالیت لیپید پراکسیداز (LPO) در نمونه‌های اسپرم با استفاده از کیت تیوباربیتوریک اسید (cayman) و بر اساس روش رائو و همکارانش اندازه‌گیری شد (۱۲). کمیت مواد واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید با رسم نمودار OD استانداردها در مقابل غلظت‌های استاندارد موجود، بر حسب nmol/lit محاسبه گردید.

آنالیز آماری: نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شدند. میانگین گروه‌ها با استفاده از آنالیز یک طرفه واریانس (ANOVA) و Post hoc-Tukey تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر P <۰/۰۵ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. بررسی همبستگی بین MDA و تحرک اسپرم و همچنین بین ROS و تحرک اسپرم با استفاده از آنالیز ضریب همبستگی اسپیرمن انجام شد.

یافته‌ها

شکل ۱ نشان دهنده میانگین درصد تحرک کلاس‌های مختلف اسپرم و سطح معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی است. با بررسی روی این اختلاف‌ها، مشخص شد که درصد تحرک اسپرم‌های تازه (Fresh) با تمام گروه‌ها، اختلافی معنی‌دار (P<۰/۰۵) دارد. اگرچه میزان درصد تحرک پس از انجماد کاهش یافته ولی پس از استفاده از آنتی اکسیدان ملاتونین در محیط انجمادی، میزان درصد تحرک نسبت به گروه کنترل انجماد (CG freeze) بهبود یافته است. این بهبودی به طور معنی‌داری به ویژه در گروه ملاتونین ۰/۰۱ میلی مولار قابل مشاهده بود. در کلاس‌های a، b و c و گروه کنترل انجماد کاهش قابل ملاحظه‌ای و در کلاس d افزایش معنی‌داری نسبت به گروه قبل از انجماد (Prefreeze) مشاهده گردید (P<۰/۰۵).



شکل ۲- میانگین غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) گروههای با محیط انجمادی حاوی دوزهای مختلف ملاتونین و گروه بدون ملاتونین. CG= گروه کنترل انجماد؛ MLT1= گروه تیمار شده با ملاتونین ۱ mM؛ MLT0.1 = گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۱ mM؛ MLT0.01= گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۰۱mM؛ MLT0.001= گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۰۰۱ mM؛ *: P<۰/۰۵.

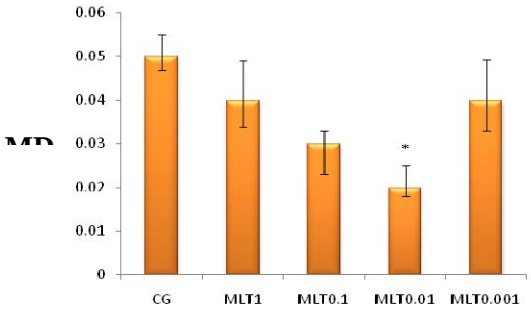
در کلاس‌های a و c بین گروه‌های انجمادی و گروه کنترل انجماد تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). پس از تیمار با غلظت‌های افزایشی ملاتونین، کلاس b به طور متناسب افزایش یافت، اما این افزایش تنها در غلظت mM ۰/۰۱ ملاتونین نسبت به گروه کنترل انجماد معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). همچنین پس از تیمار با غلظت‌های افزایشی ملاتونین، کلاس d به طور متناسب کاهش یافت، اما این کاهش تنها در غلظت mM ۰/۰۱ ملاتونین نسبت به گروه کنترل انجماد معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

مقایسه غلظت ROS

نتایج مطالعه میانگین غلظت رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) بر حسب µg/ml در اسپرم منجمد شده در گروه‌های با محیط انجمادی حاوی دوزهای مختلف ملاتونین (MLT) و گروه بدون ملاتونین (CG) در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می‌گردد، غلظت ROS در اسپرم‌های منجمد شده با دوزهای مختلف ملاتونین کاهش پیدا کرده است و در بین گروه‌های با ملاتونین، رادیکال های آزاد اکسیژن در محیط انجمادی با ملاتونین ۰/۰۱ mM نسبت به دیگر گروه‌ها و گروه کنترل کاهش قابل ملاحظه ای (p <۰/۰۵) را نشان می‌دهد.

مقایسه غلظت MDA

غلظت MDA که طبق نمودار استاندارد بر حسب nmol/litمحاسبه شده در شکل ۳ نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که استفاده از غلظت‌های مختلف ملاتونین به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌توانند تا حدودی مانع روند لیپید پراکسیداسیون گردد، بطوریکه کاهش مقدار محصول نهایی روند لیپید پراکسیداسیون یعنی مالون دی آلدهید در گروه‌های تیمار شده با ملاتونین کاهش نشان می‌دهد. این کاهش در اسپرم‌های منجمد شده در محیط انجمادی با دوز ۰/۰۱ mM ملاتونین کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (P<۰/۰۵).



شکل ۳- میانگین غلظت مالون دی آلدهید (MDA) در گروه های با محیط انجمادی حاوی دوز های مختلف ملاتونین و گروه بدون ملاتونین. CG= گروه کنترل انجماد؛ MLT1= گروه تیمار شده با ملاتونین ۱ mM؛ MLT0.1 = گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۱mM؛ MLT0.01= گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۰۱mM؛ MLT0.001= گروه تیمار شده با ملاتونین ۰/۰۰۱ mM؛ *: P<۰/۰۵.

بحث

در سال ۱۷۷۶ برای اولین بار تأثیر انجماد بر اسپرم توسط اسپلانزی گزارش شد. وی اظهار داشت که در منی یخ زده

حیوان، پس از ذوب مجدد و رساندن به حرارت محیط، تعدادی از اسپرم‌ها تحرک خود را به دست می‌آورند. در سال ۱۸۶۶ مونتگازا متوجه شد که تعداد کمی از اسپرم‌ها پس از ذوب مجدد منی که مدت زیادی در درجه حرارت ۱۵ درجه سانتیگراد ذخیره شده بود، دوباره تحرک خود را به دست آورده‌اند. درسال ۱۹۳۷ جانل اسپرماتوزوئیدهای انسانی را به مدت ۴۰ روز در دمای ۷۹- درجه سانتی گراد ذخیره نمود و پس از ذوب آنها مشاهده کرد که تعدادی از اسپرم‌ها دارای تحرک می‌باشند (۱۳). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که آنتی اکسیدان‌های محلول در چربی و آنتی اکسیدان‌های محلول در آب در کاهش رادیکال‌های آزاد نقش موثری دارند. از آنجایی‌که پارامترهای اسپرم بر میزان لقاح موثرند، لذا به نظر می‌رسد که آنتی اکسیدان‌ها با کاهش رادیکال های آزاد وکاهش اثرات منفی شوک اکسیداتیو و همچنین بهبود پارامترهای اسپرم از اهمیت کلینیکی در تکنیکهای ART برخوردار است (۱۴). مطالعه پلزیس در شرایط *In vitro* نشان داد که ملاتونین باعث خنثی کردن مستقیم یا غیر مستقیم رادیکال های آزاد نیتروژن و کاهش قابل ملاحظه NO شود، اما بر میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن تاثیری ندارد (۱۵). در مطالعه ما بررسی رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در اسپرم‌های منجمد شده در محیط انجمادی بدون ملاتونین و همچنین مقایسه میزان این رادیکال‌ها در اسپرم‌های منجمد شده در محیط انجمادی حاوی غلظت‌های مختلف ملاتونین (۱، ۰/۱، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱) بر حسب میلی مولار نشان داد که ملاتونین باعث کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. بنابراین گزارش ما بر خلاف گزارشاتی است که اثر آنتی اکسیدانی ملاتونین را تنها روی رادیکال‌های آزاد بر پایه نیتروژن می‌دانند. همچنین در مطالعه ما ارتباط قابل معنی‌داری بین سطح MDA و میزان تحرک اسپرم دیده نشد که این نتیجه با گزارش سلیمان و همکاران مطابقت داشت که هیچ ارتباطی را بین میزان تحرک اسپرم و سطح MDA پلاسمای سمینال مشاهده نکردند (۱۶). در تحقیق انجام شده مشاهده شد که به طور کلی تاثیر ملاتونین بر پارامترهای حرکتی اسپرم وابسته به دوز می‌باشد و این گزارش با مطالعه بال و همکارانش که اثر وابسته به دوز ملاتونین را بر پارامتر های حرکتی اسپرم موش در شرایط *In vitro* گزارش نمودند و همچنین ساکو و همکارانش که این اثر را در گوسفند نشان دادند، مطابقت دارد (۱۷، ۱۸). در سا ل‌های اخیر با استفاده از بانک‌های انجمادی امید به باروری بیماران دو چندان شده است. بنابراین می‌توان گفت که حفظ پارامترهای اساسی و کلیدی اسپرم‌ها (حرکت، توان زنده مانی و ...) در برابر آسیب‌های گوناگون طی روند انجماد-ذوب و افزایش توان باروری اسپرمها پس از ذوب همواره به عنوان یک هدف مطرح بوده است. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان با تکرار آزمایشات دیگر در این زمینه و تایید آنها در مراکز IVF از این نتایج بهره‌مند گردید. همچنین با تکرار این آزمایش روی نمونه‌های دیگر پستانداران از نتایج آن برای افزایش قابلیت باروری آنها در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی استفاده نمود.

در بررسی به عمل آمده در پژوهش حاضر مشخص شد که افزودن آنتی اکسیدان ملاتونین مانع تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن و همچنین مانع فرایند لیپید پراکسیداسیون غشای اسپرم طی فرایند انجماد شده و تنها دوز ۰/۰۱ میلی مولار آن تحرک اسپرم را بهبود می‌بخشد.

قدردانی و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام که با تصویب و تأمین هزینه‌های این طرح (شماره ۹۰۱۰۱۴/۶۵)، ما را در انجام این پروژه تحقیقاتی یاری رسانیده‌اند، سپاسگزاری می‌نماییم.

REFERENCES

1. Sanger WG, Olson JH, Shermman JK. Semen cryobanking for men with cancer criteria change. Fertil Stril 1992; 58:1024-27.
2. Glander HJ, Schaller J. Hidden effects of cryopreservation on quality of human spermatozoa. Cell Tissue Bank 2000; 1:133-42.
3. Sherman JK. Frozen semen- efficiency in artificial insemination and advantage in testing for acquired immune deficiency syndrome. Fertil Stril 1987; 47:19-24.
4. Hsieh L. Cryopreservation of human sperm within mouse empty zona pellucida. Fertil Strel 2000; 79:694-702.
5. 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.
6. Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I. Free radicals antioxidants enzymes and lipid peroxidation in different type of lukemias. Clin Chim 2000; 293:53-62.

7. 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.

8. Breinger E, Beorlegui N, Flaherty C, Beconi M. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters incryopreserved boar semen. Theriogenol 2005; 63:2126-2135

9. Gavella M,Lipovac V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. Arch Androl 2000;44,1:23-7.

10. Álvaro E, Domínguez-Rebolledo L, María R, Fernández-Santos, Alfonso Bisbal, et al. Garde Improving the effect of incubation and oxidative stress on thawed spermatozoa from red deer by using different antioxidant treatments. Reprod Fertil Develop 2009; 22:856–870.

11. Sreegith JN, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SP, Chaudhary T. 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.

12. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interactin. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1999.

13. Rao B, Soufir J, Martin M, Daveno G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Res 1989; 24:127-34.

14. Anger J, Gilbert B, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. J Urol 2003; 170:1079-1084.

15. Breinger E, Beorlegui N, Flaherty C, Beconi M. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenol 2005; 63:2126-35.

16. Plessis S, Hagenaar K, Lampiao F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. Andrologia 2010; 42:112-16.

17. Suleiman S, Ali M, Zaki Z, El-Malik E, Nasr M. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. J androl 1996; 17:530-37.

18. Ball BA, Vo A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. J Androl 2002; 23:259-69.