

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

تأثير التجميد السريع في تركيز المالون الديهايد و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير معايير 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

:

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

المنهجية: أنجزت هذه الدراسة في مختبر الحقن المجهرى وتجميد النطف في مركز الخصوبة في مدينة الصدر الطبية / محافظة النجف الأشرف وامتدت الدراسة من المدة أيار 2012 إلى نيسان 2013 30 من مرضى وهن النطف. وكان معدل العمر (33.1 ± 1.23) سنة أنجزت التحليلات الإحصائية الخاصة بهذه الدراسة باستخدام اختبار – (Student's t – test) – (paired t – test) على مستوى الاحتمالية 0.05

.. أظهرت نتائج أن عملية التجميد السريع لنطف المرضى المشمولين في الدراسة باستعمال وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) 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 لحيوية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون الديهايد MDA النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فرقا "معنوياً" ($P<0.05$) في تركيز الخلايا الدائرية مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط . يستنتج من هذه الدراسة بأن عمليات التجميد السريع والإذابة للنطف تمتلك تأثيرات سلبية في معايير الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في كل عينات المرضى المشمولين بالدراسة

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

:

infertility حالة مرضية تؤثر في حوالي 15% من مجموع الأزواج الذين يرغبون بالحصول على 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). عدم الخصوبة هم وهن النطف تعرف حالة وهن النطف بأنها الحالة التي يكون فيها النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية 50% أو إن النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية السريعة أقل من 25% (WHO, 1999) و إن ما نسبته 20% من مرضى عدم الخصوبة يعانون من هذه (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 المرضي الذين لم تتج معهم التداخلات الطبية مثل مرضى انعدام النطف azoospermic وهن 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 In vitro fertilization (IVF) والتي تتطلب وجود كل من المشيج الذكري () والمشيج الأنثوي (الببيضة) Fertilization 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 أقل من الصفر مثل 80 - 196 °C والتي عندها التفاعلات الخلوية الكيموحيوية المسؤولة عن موت الخلايا يحد منها بصورة فعالة و تهدف عملية التجميد 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 (Cellular Diffusion) وكذلك خفض الطاقة الحرارية اللازمة لإتمام التفاعلات الكيميائية (Dohle et al., 2007). إن تجميد النطف والأنسجة الخصوية testicular tissue يؤدي إلى حالة عدم الخصوبة وأصبحت عمليات حفظ النطف والأنسجة الخصوية باستخدام التجميد ذات أهمية أكبر نتيجة البحثية وتطور التطبيقات السريرية في وسائل التكاثر المعان وبنوك المني semen banks 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 " Vitrification (التحول إلى حالة شبيهة الزجاج) 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 الواطنة 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 كيميائية ذات أوزان جزئية بالمواد الحافظة من ضرر التجميد Cryoprotectants Substances وكذلك عملية غمر المزيج في سائل النروجين ذي 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 () وذلك ناتج من الخصوصية في تركيب الأغشية البلازمية والأغشية داخل الخلية والتي تعتبر مواقع رئيسية لحدوث الجرح الخلوي عند تجميدها (Bailey et al, 2003) لذا فإن إجراء دراستنا الحالية هد تأثير عمليات التجميد السريع والإذابة في مستويات الأنواع الأوكسجينية الفعالة والضرر في كروماتين النطف وعلاقة ذلك مع معايير النطف المتمثلة بتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف والنسبة المئوية للنطف السوية .

:

جمعت عينات السائل المنوي في وعاء Container نظيفاً وجافاً ومعقماً سعتة (40) المريض جمع المني بطريقة الاستمناء Masturbation (3-5) أيام Abstinence Period ثم وضعت العينات في 37 م للسماح لها بالاماعة الطبيعية Normal Liquefaction . بعد اكتمال الاماعة التي تم تثبيت زمنها فحصت كل عينة فحصاً عياناً و مجهرياً وسجلت تركيز النطف Sperm Concentration و النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية Sperm progressive Motility و النسبة المئوية السوية Normal sperm morphology percent و النسبة المئوية لعيوشية النطف Sperm viability percent و تركيز الخلايا الدائرية Round Cell Concentration " إلى تقرير منظمة الصحة العالمية (WHO, 1999, 2010) . تم حساب تركيز المألون MDA في البلازما المنوية للسائل المنوي حسب الطريقة الموصوفة في (Muslih et al., 2002)

تم تقييم الضرر الحاصل في كروماتين النطف باستخدام صبغة الانيلين الأزرق Aniline blue stain (Vieytes et.al.,2008; Sasikumar and Dakshayani,2013) التالية : حيث تم تحضير صبغة الانيلين الأزرق PBS 100 5 Aniline blue stain مغلي لفترة قصيرة ثم تم ترشيح الصبغة ثم أضيف إليها الخليك الهيدروجيني 3.5 طريقة تصبغ كروماتين النطف الآتية : وضعت كمية من محلول الكلوترالديهايد 3% وضعت كمية من الصبغة الانيلين الأزرق المحضرة في جار آخر على شريحة زجاجية وتركت في درجة حرارة الغرفة لحد وضعت الشريحة الزجاجية للمسحة في محلول الكلوترالديهايد 3% لغرض التثبيت تم غسل الشريحة الحاملة للمسحة باستخدام محلول الفوسفات الدائري PBS وضعت الشريحة الحاملة للمسحة في صبغة الانيلين الأزرق لمدة 7 نقلت الشريحة من صبغة الانيلين وغسلت . لوحظ في فحص الشريحة المحضر أن النطف المتضررة حدث اصطبغ في رأس النطف باللون الأزرق والنطف غير المتضررة تكون عديمة اوقليلة الصبغة وتم حساب على الأقل 200 شريحة وحددت النسبة المئوية لكروماتين النطف المتضررة Chromatin abnormality والكروماتين السوي وحسب المعادلة عدد النطف ذات الكروماتين المتضرر

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

تم إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الغسل والنذب وباستخدام IVF Medium وحسب الطريقة (2006) عمليات التجميد السريع والإذابة الآتية : عمليات التجميد السريع - Sperm Vitirification Processes: 250 مايكرو لتر من العينة المنشطة والمحضرة في أنبوب التجميد الخاص Cryovials الذي حجمه 1.8 تم إضافة وسط تجميد النطف Sperm Freeze بصورة تدريجية ونسبة 1:0.7 من حجم العينة ويتم المزج بصورة جيدة . عُرض المزيج في أنبوب التجميد الخاص Cryovials النتروجين على ارتفاع 20 عن مستوى سائل النتروجين لمدة 10 يُغمر المزيج في أنبوب التجميد الخاص Cryovials الحوض الذي يحوي سائل النتروجين (Mohammad et al , ,2012)

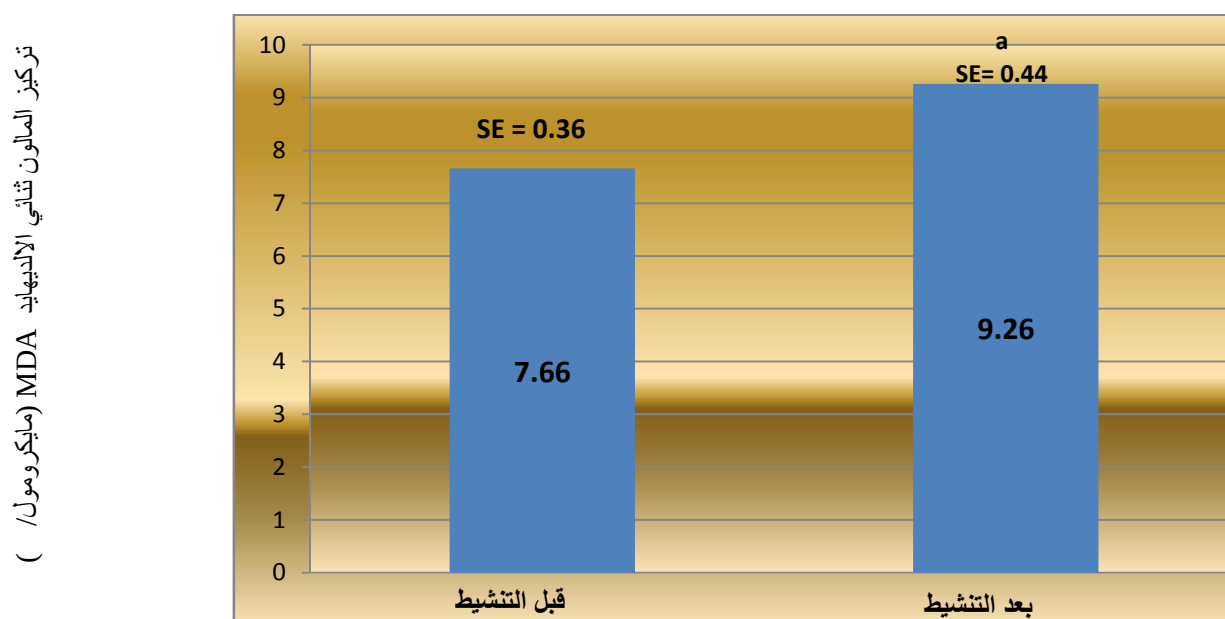
عمليات الإذابة للنطف - Sperm Thawing Processes: تم رفع أنبوب التجميد الخاص Cryovials من سائل النتروجين 37 ° 5 ثم نقل المزيج إلى أنبوبة اختبار جديدة ، وعُرض المزيج إلى طرد 2000 دقيقة . ثم أزيل الراشح واخذ جزء منة لغرض حساب تركيز المألون أديهايد MDA ثم أضيف 250 مايكرو ليتر من IVF Medium إلى الراشب وتم مزجة ، ومن ثم نُقل إلى الحاضنة مع تركيز 6 % CO₂ بدرجة حرارة 37 م 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 - (Student's t – test) - (paired t – test) على مستوى الاحتمالية 0.05 .

: أظهرت نتائج الدراسة الحاليه (1) أن عملية تنشيط النطف أدت إلى انخفاض معنوي (P<0.05) 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 لحيوية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية وتركيز المألون أديهايد MDA مقارنة مع معدلاتها قبل التنشيط .

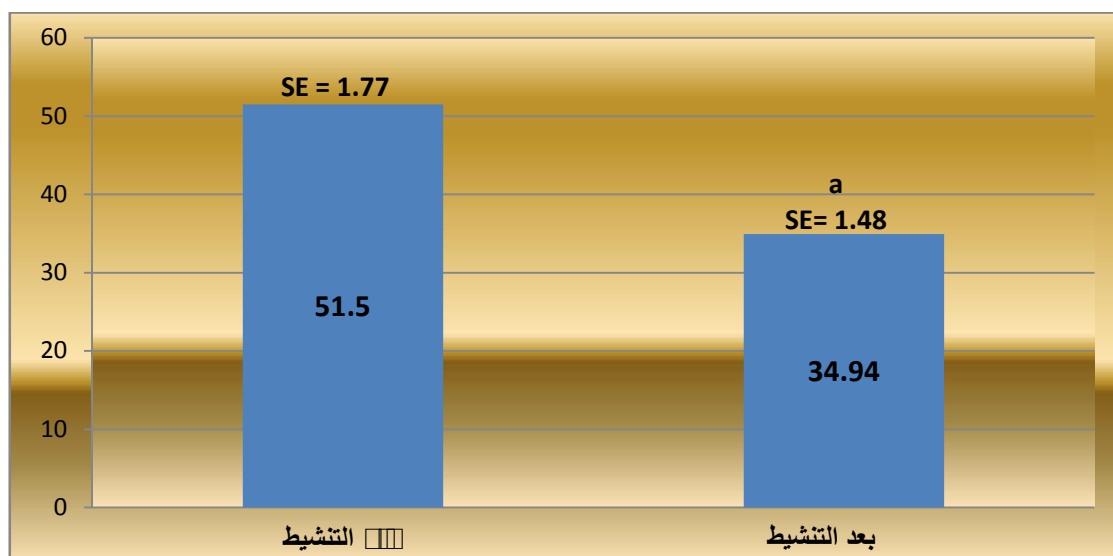
(1) معايير
الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل التنشيط مقارنة ببعء التنشيط
لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients باستخدام تقنية الغسل والنبد

تنشيط النطف باستخدام الوسط (IVF) 30 دقيقة		تنشيط النطف
بعد التنشيط	قبل التنشيط	معايير
8.93 ± 0.64^a	56.22 ± 2.70	تركيز النطف (مليون /)
61.06 ± 1.10^a	36.58 ± 1.006	النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)
50.25 ± 0.93^a	32.67 ± 1.06	النسبة المئوية للنطف السوية (%)
75.33 ± 1.12^a	59.33 ± 1.26	يةلعيوشية النطف %
2.71 ± 0.14^a	3.95 ± 0.19	تركيز الخلايا الدائرية مليون /
9.26 ± 0.446^a	7.66 ± 0.36	تركيز المألون ثنائي الديهايد MDA (مايكرومول /)
34.94 ± 1.48^a	51.50 ± 1.77	النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)

$\pm$ الخطأ القياسي SE 30 = a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05)



(1) تركيز المألون داي الالديهايد MDA (مايكرومول /) لمرضى وهن النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية
30 = a يدل على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) .



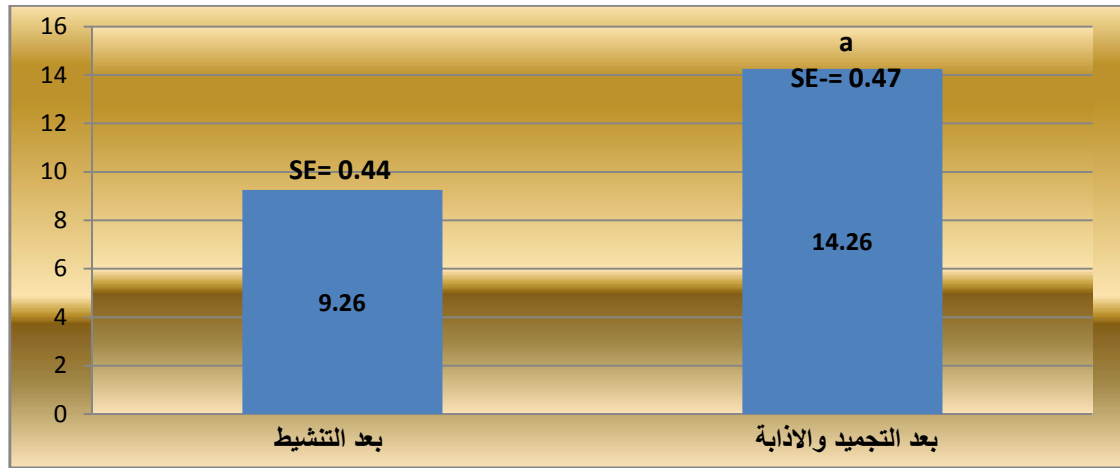
(2) النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية .
 a يدل على وجود الفروق المعنوية ($P < 0.05$) . 30 =

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 انخ ($P < 0.05$) في كل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعبوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط ولوحظ حدوث زيادة معنوية ($P < 0.05$) من تركيز المألون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط وكما مبين في الجدول .إما تركيز الخلايا الدائرية لم تظهر فرقا" معنويا" ($P < 0.05$) مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط

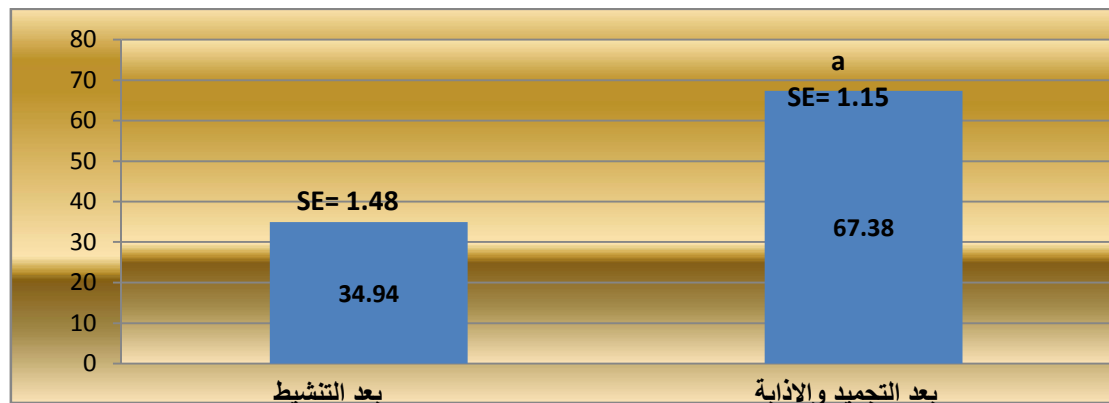
(2) تأثير التجميد السريع والإذابة لمدة شهر في معايير ف وتركيز المألون والديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients

تنشيط النطف	تجميد النطف باستخدام الوسط (IVF) 30 دقيقة	تجميد النطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) بعد التجميد والإذابة
معايير	بعد التنشيط	
تركيز النطف (مليون /)	8.93 ± 0.64	7.80 ± 0.61^a
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	61.06 ± 1.100	29.14 ± 1.23^a
النسبة المئوية للنطف السوية (%)	50.25 ± 0.93	39.87 ± 1.21^a
النسبة المئوية لعبوشية النطف (%)	75.33 ± 1.123	29.50 ± 0.91^a
تركيز الخلايا الدائرية (مليون /)	2.71 ± 0.14	2.40 ± 0.09
تركيز المألون الديهايد MDA (مايكرو مول /)	9.26 ± 0.44	14.26 ± 0.47^a
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	34.94 ± 1.48	67.38 ± 1.15^a

± الخطأ القياسي SE 30 = a يدل على وجود الفروق المعنوية ($P < 0.05$)



(3) تأثير التجميد السريع و في تركيز المألون الديهيد MDA لمرضى وهن النطف بعد مدة شهر واحد
التجميد . = 0.30 . a يدل على وجود الفروق المعنوية ($P < 0.05$) .



(4) تأثير التجميد السريع والاذابة في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف بعد مدة شهر واحد
من التجميد . = 0.30 . a يدل على وجود الفروق المعنوية ($P < 0.05$) .

إن لتنشيط

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 معنويًا ($p < 0.05$) في تركيز النطف المسترجعة باستعمال تقنية الغسل والنبد مقارنة بقيمها قبل التنشيط لمرضى وهن النطف وهذا يتفق مع ما توصلت إليه دراسات سابقة أشارت إلى أن تقنية الغسل والنبد تعمل على تقليل عدد النطف المسترجعة (العبيدي 2010). وربما يعود السبب في ذلك النطف الميتة والنطف غير المتحركة في الحبيبية النطفية المترسبة وعدم قدرتها على الصعود إلى الجزء الأعلى من المستنبت . وبينت نتائج دراستنا الحالية انخفاض معنويًا ($p < 0.05$) 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 الأوكسجينية الفعالة أقل مقارنة بالحبيبية النطفية حيث الخلايا الواهنة وذات الشكل غير السوي (Henkel and Schill, 2003). لحالية مع ما توصلت إليه دراسة سابقة إذ أشار العبيدي (2010) إلى أن استعمال تقنية الغسل والنبد لتنشيط نطف المرض المصابين بوهن النطف الحاد والمعتدل يقلل من النسبة المئوية للنطف غير السوية . أظهرت نتائج الدراسة انخفاضاً معنوياً ($p < 0.05$) في تركيز الخلايا الدائرية وهذا يتفق مع ما توصلت إليه (2002) حيث أشار إلى حدوث انخفاض معنوي في تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية تقنيه الغسل والنبد بقوة 2000 /دقيقه ولمدة خمس دقائق. وربما يرجع السبب في انخفاض تركيز الخلايا الدائرية إلى أن هذه الخلايا لا تمتلك القدرة على احه إلى الأعلى بعد إجراء عملي .

وبينت نتائج الدراسة الحالية الدور الواضح لجهاز النبد في زيادة مستوى الأنواع الأوكسجينية الفعالة حيث أظهرت النتائج زيادة معنوية في تركيز المألون الديهيد باستعمال نية الغسل والنبد مقارنة بقيمها قبل التنشيط .

وربما يعزى ذلك إلى تأثير عملية نذب عينات السائل المنوي نفاذية غشاء النطف وزيادة مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة، كما إن إزالة البلازما المنوية يعني إزالة مضادات الأكسدة الموجودة في البلازما المنوية ومن ثم 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 المألود (الدهايد) ليه Twigg وجماعته (1998) (2006) حيث لا زيادة معنوية في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة و تركيز المألود (الدهايد) باستعمال تقنية الغسل والنذب مقارنة بقيمها قبل التنشيط . كما بينت نتائج الدراسة الحالية حصول (p<0.05) النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي بعد التنشيط عند استعمال تقنية الغسل والنذب لمرضى وهن النطف وقد يفسر ذلك إلى إن النطف ذات التركيب والمظهر السوي والحركة النشطة هي التي تتمكن من الصعود إلى سطح الوسط أزرعي وغالبا ما تكون هذه النطف ذات تركيب سليم ع (Andrabi, 2009) يب الكروماتيني

أظهرت النتائج أن عملية التجميد السريع للنطف بأستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وإجراء عملية مرور شهر واحد في عينات وهن النطف (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, 2012, sinan et al 2008) وجماعته (2001) حدوث زيادة معنوية (p<0.05) تركيز (الدهايد) (مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة) بعد عملية التجميد للنطف Fraser Strzezek (2004) عمليات التجميد زيادة معنوية (p<0.05) في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (DNA) قد يعود سبب ذلك إلى إن عملية التجميد للنطف تتضمن إجراء عدد من العمليات مثل عملية تخفيف الوسط المراد تجميده بإضافة مواد كيميائية ذات أوزان جزئية واطنة تعرف بالمواد الح 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 بأستخدام 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 تغيرات في محتوى المزيج والتي تكون مؤثرة ع معايير ووظيفة النطف في داخله والتي تتولد من الحركات الحرارية Thermodynamic والخواص التركيبية Structural properties للأغشية البلازمية النطفية (Lin et al, 1993) حيث تستحث عملية التجميد للنطف حدوث تغيرات غشائية غير رجعية والتي تؤدي عند إجراء عملية إلى حدوث تغيرات في فعالية البروتينات وكذلك تغيرات في القدرة النفوذية للغشاء البلازمي للمذابات و الايونات والمواد من الخلية واليه الذي يؤدي إلى خفض كبير في الوظيفة النطفية وهذه التغيرات على مستوى التركيب 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 طور الهلامي (Gel state) وهذا الطور من التحول يحدث ضمن مدى معين من الدرجات الحرارية يعتمد على تركيب الدهنية المكونة للغشاء (Watson, 2000) . تكون درجة حرارة انتقال الطور لهذه التغيرات متغيرة مع الدهنية وتعتمد على تركيبهم و لا يحدث هذا الطور الانتقالي في حالة الدهون المركبة للغشاء في نفس الوقت لاختلاف الدهون لذا سيكون هناك وجود لكل من الحالتين ضمن مدى من خفض درجة الحرارة تميل مناطق الطور الهلامي للتجمع والاصطفاف مع بقية الدهون في الطور السائل بما يولد مناطق ارتباط (junction area) بين الطورين الدهنيين ومع البروتينات والتي تكون ذات بيئة تركيبية ضعيفة جداً ومعرضة للانفطار subject to fusion والتجزؤ والتحطم وكذلك عالية النفوذية للأيونات permeable to ions. (Hammerstedt et al, 1990) . إن هذه التغيرات في طوبوغرافية الغشاء أيضا إنزيمية غير خطية لقسم من إنزيمات (Dziekonska et al, 2009) قصور وتغيرات في القدرة النفوذية الغشائية للمواد المختلفة (Dziekonska et al, 2009). حدوث عملية خفض في درجة الحرارة المعرض لها الغشاء يحدث اضطراب في التداخلات الدهنية البروتينية وكذلك قصور في العمل الإنزيمي والقنوات الناقلة والمستقبلات البروتينية مما يؤدي إلى فقدان الغشاء قسم من سلامته الهيكلية والوظيفية (Medeiros et al, 2002) . وقد يحدث كذلك عملية 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 لها التجميد في أغشية البلازما النطفية لدى ب والخنزير. (Dziekonska et al, 2009) إن الانخفاض الشديد لدرجة الحرارة من مدى 0 - 130- جماد للمزيج ليكون حوالي (-10 - -15) أي إن عملية تكوين البلورات الثلجية للماء تطلب درجة حرارة اقل من () عند هذه الدرجات يبدأ تكون الثلج في الوسط خارج الخلية. وهذا الثلج المتكون يزيد من تركيز المذابات مثل السكريات والأملاح والبروتينات وغيرها في الوسط. (Andrabi, 2007) . وكنتيجه لذلك يتكون تد جديد في الضغط الأزموزي. حيث إن الماء الموجود داخل النطف يكون تحوله إلى ثلج مما في الخارج و لذلك ينفذ الماء من داخل الخلية إلى الخارج عبر الأغشية و ذلك 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 الخلوية cellular compartment تعتمد على معدل التبريد الذي تتعرض له العينة. التجميد حدث بسرعة فان الخلايا لن تستطيع أن تحف بصورة كفوءة لذا الماء الباقي سوف يكون ثلجاً داخل خلوي والذي يؤدي زيادة تكوينه إلى خفض فرصة حياته الخلية كما إن تكوين البلورات الثلجية داخل المقصورة الخلوية يؤدي لان تكون العضيات الخلوية معرضة إلى الخطر نتيجة احتمالية تضرر الأغشية المحيطة بها الذي يضعف من احتمالية حيائية الخلية. (Lee et al ,2012) .

يؤدي هذا الوضع إلى حدوث تغيرات في حجم الخلية نتيجة التغيرات في حركة الماء وحدث حالة الجفاف الخلوي إضافة إلى التأثيرات السمية التي تنتج من ارتفاع تركيز المذابات.

الدراسات المتابعة لتأثيرات عمليات التجميد فوق التركيبية Ultra structural studies حدوث تأثيرات ضارة على العضيات النطقية المختلفة مثل تلك الملاحظ حدوثها في بيوت الطاقة (Nishizono et al,2004) حيث إن التأثيرات الأغشية البلازمية السايوبلازمية فقط الأغشية المحيطة بالعضيات الخلوية المختلفة حيث أظهرت دراسات التجميد وجود دور سلبي على الميتوكوندريا نتيجة الجهد (Connell) . تكون الأغشية المايكوندريية معرضة إلى الضرر المتولد من عملية التجميد النفوذية الغشائية وتحرير الأنواع الأوكسجينية الفعالة بشكل كبير الأمر الذي يؤدي إلى زيادة مستوياتها في الوسط ونتيجة كثافة لميتوكوندريية في الخلايا النطقية فمن المتوقع إن يكون هناك زيادة أكبر في مستوى الأنواع الأوكسجينية الفعالة داخل الدفاعية (Said et al ,2010) . 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 الأوكسجينية الفعالة (Andrabi et al ,2009) . الدراسات إن عملية التجميد تؤدي إلى حدوث انخفاض معنوي في مستويات كل من مضادات الإنزيمية وغير الإنزيمية حيث ذكرت دراسة Kumar وجماعته (2011) حدوث انخفاض معنوي في مستويات مضادات بعد إجراء عمليات التجميد وحدثت زيادة في مستويات الأوكسجينية الفعالة ROS . إن الزيادة العالية في مستويات الأوكسجينية الفعالة ربما يؤدي إلى زيادة معدلات الموت الخلوي المبرمج في مجتمع الخلايا النطقية (Wang et al, 2003). و يؤدي زيادة مستويات الأوكسجينية الفعالة ROS لحدوث حالة الجهد oxidative stress وكل المكونات الخلوية للنطف مثل الدهون Lipids والبروتينات proteins النووية Nucleic acid والسكريات sugars أهداف لتأثيرات الإجهاد (Said et al ,2010) . وتعد الدهون الجزيئات الكبيرة عرضة للخطر والتي تدخل في تركيب الغشاء البلازمي النطفي بشكل دهنية غير مشبعة PUFA من اصرتين مزدوجة بين جزئتي الكربون. المجاورة إلى مجموعة المثلثين تجعل المثلثين كربون-هيدروجين ضعيفة ونتيجة لذلك تكون ذرة الهيدروجين Lipid (Kumar et al ,2011) . يؤدي الهجوم الاجهادي إلى حدوث حالة تسمى الدهن Lipid peroxidation الدهنية غير المشبعة في الأغشية الخلوية بواسطة سلسلة من تفاعلات التحفيز تبدأ العملية عندما يعمل الجذر الحر على 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 باط جذرين مع بعضهما (Said et al ,2010) أظهرت (Lee et al ,2012) مثل هذا الانخفاض يمكن إن يعزى إلى عدد من منها إن عمليات يد استحثت حدوث ضرر في أغشية الخلايا البلازمية وفي تركيب المايكوندريا التي تعتبر المصدر الرئيسي للطاقة الذي يؤدي إلى قصور في كل من الابيض الخلوي وبقية الوظائف الخلوية مثل الحركة Die (Diekonska et al ,2009) . حيث 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 glucolysis السايوبلازم أو عن طريق عملية الفسفرة التأكسدية oxidative phosphorylation الحادثة في داخل المايكوندريا (Dziekonska et al, 2009;) . وينقل ATP المتولد من عملية الفسفرة التأكسدية الحادثة في المنطقة الداخلية من الغشاء الميتوكوندري إلى النبيتات الدقيقة micro Tubules لذلك القصور في فعالية الميتوكوندريا ربما يفسر الانخفاض في الحركة النطقية (Connell et al ,2002, Januskauskas, and Zillinskas, 2002) , يكون نتيجة زيادة حدوث الضرر في الذيل النطفي المسؤول ع حيث ذكرت دراسة (Sinan et al ,2008) زيادة في ضرر الذيل النطفي عند عملية التجميد اضافة إلى إن زيادة مستويات انواع الأوكسجين خفض الحركة نتيجة سلسلة من العمليات المؤكسدة للدهون الغشائية والمؤدية لفقدانه سلامته بروتينات المحور المؤدية إلى حدوث شلل في النطف كما اوضحت الدراسة إن حدوث القصور في كل من الميتوكوندريا والغشاء البلازمي ساهمت في قصور الحركة النطقية . وقد يعزى سبب انخفاض الحركة إلى زيادة النسبة المئوية للخلايا غير الحية في مجتمع النطف ومن ثم انخفاض النسبة المئوية 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

($p < 0.05$) في النسبة المئوية لحيوية النطف مقارنة بقبل التجميد

(Muhammad, 2011) وقد يعزى ذلك إلى تأثيرات البنية الفيزيائية والكيميائية التي تعرضت لها النطف

(Hammadeh et al, 1996) حيث إن تكوين البلورات الثلجية خارج الخلايا يعد العامل الرئيسي الذي قد يؤدي إلى الإذى الفيزيائي للنطف كذلك تكوين البلورات الثلجية داخل الخلية والذي قد يؤدي إلى ضرر في تركيب كل من الأغشية والعصيات الخلوية (Sinan et al, 2008). كذلك فإن عملية التبادل المائي بين داخل وخارج الخلية خلال المراحل الأولية قبل التجميد عند إضافة المواد الحافظة للنطف من ضرر التجميد تؤدي إلى مرور الخلايا بسلسلة من التغيرات الحجمية من انكماش وتورم والذي يؤدي إلى فقدان سلامة الأغشية والعصيات والموت للخلايا السماح بنفوذ الصبغة (Medeiro et al, 2002).

أظهرت ($p < 0.05$) في النسبة المئوية للنطف السوية وقد يفسر ذلك نتيجة التأثيرات

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 وحدث حالة الانتفاخ الخلوي (Sinan et al, 2008). كما أظهرت نتائج الدراسة حدوث زيادة معنوية ($p < 0.05$) في تركيز المألون الدهياد مقارنة بقبل التجميد وقد يفسر ذلك نتيجة لزيادة انتاج الانواع الاوكسجينية الفعالة خلال التجميد وانخفاض القدرة الدفاعية لمضادات ومن ثم حدوث حالة الجهد التأكسدي

والذي أدى إلى حدوث عملية بيروكسدة الدهن في ية البلازمية والخلوية للنطف وزيادة تحللها ومن ثم زيادة في تركيز الدهياد (MDA) الذي يعتبر احد الجزيئات الكيميائية الناتجة من سلسلة تحلل الدهنية في عملية

البيروكسدة الدهنية. ويعد المألون الدهياد منتجاً ثانوياً يشير إلى مدى ضراوة الجهد التأكسدي ويعد الزيادة في تركيزه كمؤشر لزيادة مستويات انواع الأوكسجين (Hammadeh et al, 2001). وأظهرت نتائج الدراسة حدوث زيادة معنوية في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة بقيمها قبل عملية التجميد

وثقت حدوث تغيرات altered 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

والحامض النووي منقوص الأوكسجين : تعبئة الكروماتين النطفي defective sperm Chromatin

Pachaging وخللاً في عملية الموت الخلوي المبرمج Apoptosis والجهد عمليات التجميد تزداد حالة الجهد

المتولدة من الزيادة العالية في مستويات الاوكسجينية الفعالة وانخفاض القدرة الدفاعية لمضادات

يؤدي إلى حدوث كسر في الروابط الكروماتينية وحدث تحطم في الأوكسجين (Fraser and

Stzezek, 2004 Chohan et al, 2004). إضافة إلى إن عمليات التجميد تؤدي إلى حدوث زيادة في الموت

(Khan et al, 2009). فإن الزيادة في كل من العاملين المذكورين ينعكس سلباً على النسبة المئوية

لكروماتين النطف السوي (Fraser and Strzezek 2004).

: يستنتج من هذه الدراسة بأن عمليات التجميد السريع والإذابة للنطف تمتلك تأثيرات سلبية في معايير

النطف وتركيز أالمألون داي ألددهياد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في كل عينات المرضى المشمولين

التوصيات :

:

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

2- **ألعبدي (2010)** . تأثير استخدام الوسط Fercult Flushing Media في تنشيط معايير النطف في الزجاج لمرضى العقم المصابين بوهن . رسالة ماجستير كلية العلوم .

3- **صاحب يحيى (2006)** . تأثير بيروكسيد الهيدروجين وبعض مضادات معايير النطف البشرية كلية العلوم .

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) : Comparison of synthetic serum substitute and fetal cord serum as media supplements for in vitro fertilization : a prospective, 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 Strzeżek, J.(2004.). The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 and 16°C. *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 and cryopreserved 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 docosaheptaenoic 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 mammalian 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.