اثر افزودن ۴- هیدروکسی تمپو (تمپول) به رقیق کننده تریس- اسید سیتریک بر قابلیت نگهداری اسپرماتوزوئیدهای گاومیش

مهدی تبسمی[۱]، سید مرتضی علوی شوشتری[۲*]، کامران درستکار[۳]، امیر خاکی[۱]

۱- دانش آموخته دکترای تخصصی، بخش مامایی و بیماریهای تولید مثل دام، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲- استاد، بخش مامایی و بیماریهای تولید مثل دام، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، بخش مامایی و بیماریهای تولید مثل دام، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، سنندج، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۲/۳ پذیرش نهایی: ۹۳/۵/۱۲)

چکیده

هدف این تحقیق بررسی اثر افزودن تمپول به رقیق کننده در اسپرماتوزوئیدهای گاومیش قبل و بعد از انجماد- ذوب است. بیست و پنج نمونه منی از ۵ گاومیش نر سالم (۵ نمونه از هر گاومیش در ۵ زمان مختلف) مورد استفاده قرار گرفت. هر نمونه در $37^{\circ}C$ در رقیق کننده تریس-اسید سیتریک (بدون زرده تخم مرغ) حاوی ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ۴، ۸ و ۱۲ میلی مول تمپول رقیق گردید. تحرک روبه جلو و میزان زنده ماندن اسپرماتوزوئیدهای منی رقیق شده در ۰ (T0) (بلافاصله بعد از رقیق کردن)، ۶۰ (T1) و ۱۲۰ (T2) دقیقه بعد از رقیق کردن اندازه گیری شد. در مرحله بعد همین دوزهای تمپول، زرده تخم مرغ و گلیسرول به رقیق کننده فوق افزوده، نمونه های منی در آن رقیق شد و ظرف ۲ ساعت تا $4^{\circ}C$ سرد گردید، به مدت ۴ ساعت در آن دما نگهداشته شد تا به حالت تعادل درآید و سنجه های منی (تحرک روبه جلو، زنده ماندن، یکپارچگی غشا و میزان آسیب دیدن DNA) ارزیابی شد. منی متعادل شده در پایدتهای فرانسوی ۰/۵ میلی لیتری بسته بندی و در ازت مایع منجمد گردید. بعد، منی را ذوب کرده همان سنجه ها به اضافه توان آنتی اکسیدانی تام آن اندازه گیری شد. نتایج نشان داد افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده منی در قیاس با نمونه های شاهد تحرک روبه جلو اسپرماتوزوئیدها را در نمونه رقیق و متعادل شده بدون تاثیر بر بقیه سنجه ها بهبود می بخشد. در منی منجمد- ذوب شده در رقیق کننده حاوی ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول، تحرک رو به جلو، زنده ماندن، یکپارچگی غشا و توان آنتی اکسیدانی تام اسپرماتوزوئیدها بالاتر ومیزان آسیب دیدن DNA کمتری از شاهد مشاهده شد. نتیجه آن که، افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده، کیفیت منی گاومیش را هنگام انجماد – ذوب حفظ می کند.

واژگان کلیدی: گاومیش، منی، آنتی اکسیدان، ۴-هیدروکسی تمپو

مقدمه

تلقیح مصنوعی ابزار مفیدی در برنامه‌های بهبود ژنتیک است و روش مورد استفاده وسیع در اصلاح نژاد دامهای اهلی، بخصوص گاومیش است (Sansone, *et al.*,2000) در برنامه های لقاح آزمایشگاهی در انسان یا تلقیح مصنوعی دامهای اهلی،

*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.alavi@mail.urmia.ac.ir

اسپرماتوزوئیدها هنگام فراوری منی در معرض اکسیژن و نور مرئی قرار می‌گیرند. این عمل باعث ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species) ROS شده به تحرک و سلامت ژنوم آنها آسیب رسانده منجر به کاهش باروری می‌شود (Foote, *et al.*,2002)این کاهش باروری به دلایل مختلف ایجاد می‌شود: مثل حساسیت به شوک سرما، فشار اسمزی و تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی هنگام انجماد – ذوب (Pena, *et al.*, 2003).

پلاسمای منی منبع مهم مواد آنتی اکسیدان (خنثی کننده ROS) و عامل اصلی محافظت اسپرماتوزوئیدها برابر آسیب اکسید کننده است (Zini, *et al.*, 1993). این مطلب مهمی است، زیرا اسپرماتوزوئیدها سیتوپلاسم ناچیزی دارند (آنزیمهای آنتی اکسیدان اغلب داخل سلولی هستند) و توان سنتز پروتئین و آنتی اکسیدان درآنها تقریبا هیچ است (Zini, *et al.*, 2009). غشای اسپرماتوزوئید به دلیل داشتن مقدار زیادی اسید چرب اشباع نشده به اکسید شدن (پراکسیداسیون) چربی هم حساس است (Foote, *et al.*,2002). در جفت گیری طبیعی، اسپرماتوزوئیدها در محیط بی هوازی قرار گرفته احتمال آسیب دیدن ناشی از ROS در آنها کاهش می یابد.

تعیین اینکه با افزودن ترکیب مختلفی از مواد آنتی اکسیدان به منی یا رقیق کننده منی می توان زنده ماندن و باروری اسپرماتوزوئیدهای با سرما حفظ شده (منجمد) گاو را بهبود بخشید مهم است (Foote, *et al.*,2002). مهار کردن پراکسیداسیون چربی در اسپرم پستانداران با افزودن آنتی اکسیدانها تا حدی موفق بوده است (Maxwell and Stojanov, 1996; Alvarez and Storey, 1983; Aitken and Clarkson, 1988) و توانسته اند فعالیت سوخت و ساز و میزان زنده ماندن اسپرماتوزوئیدها را حفظ کنند (Kadirvel, *et al.*, 2009; Jiang, *et al.*, 2007).

تمپول بنیان نیتروکسید حلقوی است که اثری شبیه بعضی آنزیمهای با خاصیت آنتی اکسیدانی، مثل سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase) SOD دارد (Mitchell, *et al.*, 1990) و بر SOD این مزیت را دارد که خیلی محلول بوده آسان در غشای سلول نفوذ می‌کند (Foote, *et al.*,2002). گزارش کرده اند که آنتی اکسیدانهای محلول در آب، مثل ویتامین C، پراکسیداسیون خارج سلولی را کاهش داده، در غشا سلول یا داخل سلول اثر ناچیز دارد. ترکیبات محلول در چربی، مثل ویتامین E و هیدروکسی تولوئن بوتیله شده (Butylated hydroxytoluene =BHT)

آسیب دیدن غشای پلاسمایی را، مثل ترکیباتی چون تمپول که در چربی و آب محلول است، به حداقل می‌رسانند (Donoghue and Donoghue, 1997; Andrabi, *et al.*, 2008).

لیندمن و کانوس در سال ۱۹۹۱ آثار مفید تمپول بر زنده ماندن اسپرماتوزوئید گاو را در رقیق کننده تریس- زرده تخم‌مرغ گزارش داده‌اند (Lindemann and Kanous, 1991) .

درباره اثر تمپول بر اسپرماتوزوئیدهای گاومیش رودخانه‌ای اطلاعات ناچیزی در دست است. این بررسی تجربی برای تعیین اثر افزودن غلظتهای مختلف تمپول به رقیق کننده بر سنجه‌های اسپرم (تحرک رو به جلو، زنده ماندن، یکپارچگی غشا و آسیب دیدن DNA) قبل و بعد از انجماد و به منظور یافتن راه عملی برای بهبود کیفیت منی گاومیش بعد از انجماد و ذوب طراحی شده است.

مواد و روش کار

- گرفتن و فراوری منی

برای این کار از ۵ راس گاومیش نر سالم (با سن بین ۳ تا ۵ سال) که در مرکز اصلاح نژاد و پرورش گاومیش شمال غرب ایران (´۳۳ °۳۷ شمالی و ´٤ °٤٥ شرقی) نگهداری می شدند استفاده گردید. نمونه های منی با مهبل مصنوعی گرفته شد. در مجموع تعداد ۲۵ نمونه منی (حداقل ۵ انزال از هر گاومیش در ۵ نوبت

به فاصله یک هفته) در این بررسی به کار رفت. هر نمونه به ٦ قسمت تقسیم و در ۳۷°C در رقیق کننده تریس- اسید سیتریک (تریس ۲/٦٦ گرم، اسید سیتریک ۱/۳۹ گرم، گلوکز ۱/۲ گرم، سیستئین ۰/۱۳۹ گرم آب مقطر دوبار تقطیر تا ۱۰۰ میلی لیتر،۷/۱ pH، فشار اسمزی ۳۰۰ میلی اسمول بر کیلوگرم بدون زرده تخم مرغ) رقیق گردید. (تمام مواد شیمیایی از شرکت مرک، آلمان خریداری شده بود.) رقیق کننده دارای ۰ (شاهد)، ۰/۵، ۱، ٤، ۸ و ۱۲ میلی مول (mM) ٤-هیدروکسی تمپو (تمپول) (٤-هیدروکسی ۲-۲-٦-٦ تترا متیل پیپریدین، ۱- اکسیل) بود. تحرک رو به جلو و زنده ماندن اسپرم در ۰ (T0) (بلافاصله بعد از رقیق کردن)، ٦۰ (T1) و ۱۲۰ (T2) دقیقه بعد از رقیق کردن منی اندازه گیری شد. همه اندازه گیریها دوبار انجام شد. در مرحله بعد، رقیق کننده فوق با۲۰٪ زرده تخم مرغ و ۷ درصد گلیسرول (در یک مرحله افزوده شد) و همان مقدار تمپول تهیه شد و نمونه های منی به نسبت ۱:۱۰ در آن رقیق گردید. نمونه های رقیق شده ظرف ۲ ساعت در یخچال تا ٤°C خنک شده به مدت ٤ ساعت در آن دما نگهداری شدند تا به حالت تعادل درآیند. سپس منی در نی های فرانسوی ۰/۵ میلی لیتربسته بندی گردیده ظرف ۲۵ دقیقه تا ۱۲۰°C- در بخار ازت مایع منجمد وسپس در ازت مایع غوطه ور شده (Sukhato, *et al.*, 2001) تا زمان اندازه گیری در ازت نگهداری شدند. بعدا منی منجمد را به مدت ۳۰ ثانیه در آب ۳۷°C ذوب کرده همان سنجه ها به اضافه توان آنتی اکسیدانی تام منی منجمد و ذوب شده اندازه گیری شد.

- ارزیابی کیفیت منی

سنجه های زیر در منی رقیق شده، متعادل شده و منجمد- ذوب شده گاومیش اندازه‌گیری شد:

- تحرک رو به جلو

زنده ماندن و اشکال غیرطبیعی تحرک روبه جلو اسپرماتوزوئیدها با روش آنالیز منی با کمک رایانه (Computer assisted semen analysis) CASA (نرم افزار شرکت هوشمند فناور٦، شرکت مهندسی پزشکی امیرکبیر، تهران) ارزیابی شد. درصد زنده ماندن اسپرماتوزوئیدها با استفاده از روش رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین (Barth, 2007) ارزیابی گردید. به طور خلاصه، یک قطره محلول ائوزین ۱درصد ویک قطره محلول نیگروزین ۵ درصد (هردو در محلول سیترات سدیم ۳ درصد) و یک قطره کوچک منی روی لام گرم شده قرار داده مخلوط کرده با لام دیگر طبق دستورالعمل آزمایشگاهی سازمان بهداشت جهانی (World Health Organisation, 2010) گسترش داده شد، در هوا خشک گردید و با میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ٤۰۰× بررسی گردید. اسپرمهای زنده با سرهای بی‌رنگ در زمینه تیره مشاهده شدند در حالی که اسپرمهای مرده با سر به رنگ قرمز ظاهر شدند. در هر لام دویست اسپرم شمارش گردید. شکل ظاهری (مورفولوژی) غیرطبیعی اسپرمها هم در این لام ارزیابی شد.

- بررسی یکپارچگی غشا پلاسمایی اسپرم

یکپارچگی غشای اسپرم قبل و بعد از انجماد با تست تورم هیپو-اسموتیک طبق توصیف جیندران و همکاران درسال۱۹۸٤ارزیابی شد(Jeyendran,1984). به طور خلاصه، محلول هیپواسموتیک (فشار اسمزی ۱۵۰ میلی اسمول در کیلوگرم) با حل کردن ۰/۷۳ گرم سیترات سدیم و ۱/۳۵ گرم فروکتوز در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه گردید. ۵۰۰ میکرولیتر محلول هیپواسموتیک با ۵۰ میکرولیتر منی به مدت ٤۰ دقیقه در دمای ۳۷°C گرم (انکوبه) شد. سپس یک قطره از نمونه منی با میکروسکوپ فازکنتراست BX31 (٤۰۰×) بررسی و تعداد ۲۰۰ اسپرم در حداقل ۵ میدان میکروسکوپ از نظر تورم که با خمیدگی دم، که نشانه سالم بودن غشا است، بررسی گردید. این خمیدگی از دمهای غیرطبیعی اسپرم که قبلا بررسی شده بود قابل تشخیص است.

- آسیب دیدن DNA اسپرم

آسیب دیدگی اسپرم با روش رنگ آمیزی با آکریدین اورنج DNA طبق روش کاتایوز و همکاران در سال ۲۰۰۳ قابل تشخیص است (Katayose, *et. al,*. 2003) به طور خلاصه، گسترش ضخیمی از اسپرم روی لام تهیه کرده در هوا خشک کرده سپس نمونه به مدت دوساعت در محلول کارنوی (متانول/ اسید استیک گلاسیال به نسبت ۱:۳) که تازه تهیه شده باشد ثابت می گردد. پس از خشک شدن در هوا، با محلول ۰/۰۱۹ درصد آکریدین اورنج اسیدی رنگ می شود. همه لامها با میکروسکوپ فلورسنت (Model GS7, Nikon Co., Japan) بررسی می‌شوند. تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر لام بررسی شده و برحسب رنگ سبز یا قرمزی که در نور فلورسنت نشان می دهند طبقه بندی می‌شوند.

- توان آنتی اکسیدانی تام

TAC (Total antioxidant capacity) توان آنتی اکسیدانی تام منی منجمد – ذوب شده با استفاده از کیت تجارتی اندازه گیری مضاعف شد. منی منجمد – ذوب شده (۳۷°C به مدت ۳۰ ثانیه) در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رو به لوله ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید. ۱۰میکرولیتر آن برای اندازه گیری TAC به کار رفت. اسپکتروفتومتر برای خواندن تغییر تراکم نور مخلوط مورد استفاده قرار گرفت.

- آنالیز آماری

داده های ۲۵ نمونه منی از ۵ گاومیش (برای هر مورد ۱۵۰ آزمایش) با استفاده از برنامه SAS تجزیه و تحلیل شد. قبل از آنالیز، داده ها را از نظر خطا و نامربوط بودن با استفاده از (Box plots)کنترل شدند. هیچ عدد نامتعارفی دیده نشد. داده ها با استفاده از مدل خطی آمیخته (Proc Mixed) با دستور (Repeated) آنالیز شدند. برای یافتن تقریبی بیشترین درجه آزادی از روش (Kenward-Roger)استفاده گردید. طبیعی بودن (Residuals) با استفاده ازروش (quantile-quantile plots) با چشم بررسی شد و مقادیر پیش‌بینی شده برای ارزیابی همگن بودن واریانس، برابر (Residuals) علامت گذاری شدند. برای برقرار شدن فرضیات تستها، داده های همه سنجه ها، بجز TAC با استفاده از جذر گیری تبدیل شدند. مدل اولیه برای هر سنجه شامل آزمایش (تیمار) مرحله و اثر آنها بر هم به عنوان آثار ثابت بود و گاومیشهای مورد آزمایش به عنوان اثر تصادفی در نظر گرفته شدند. وقتی حالت غیرمعنی دار مشاهده شد، مدل مجددا با حذف اثر متقابل اجرا شد. برای هر سنجه چند ساختار کوواریانس بین اندازه گیریهای تکراری بررسی شد و مدلی که طبق حداقل معیاراطلاعات (Akaike) روش مناسبتر بود به کار برده شد. تفاوت بین حداقل مربعهای میانگین ها با استفاده از انتخاب (Optio- Diff) تعیین و روش اصلاح بن فرونی (Bonferroni) برای مقایسه زوجها به کار برده شد. همه اعداد ارایه شده حداقل مربعهای میانگین‌ها و انحراف معیار هستند. نتایج بدست آمده در $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

- منی رقیق شده

افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده تحرک روبه جلو اسپرم را در منی تازه رقیق شده در T1 و T2 در قیاس با شاهد افزایش معنی دار داد (به ترتیب ۸٦/٦٦ درصد و ۸۳/۳۰ درصد در قیاس با ۸۰/٥٤ درصد در T1 و ۸۳/۲۳ درصد و ۸۱/۷۳ درصد در قیاس با ۷٦/۳٥ درصد در T2) (جدول ۱). ولی، با اضافه کردن تمپول به رقیق کننده میزان زنده ماندن اسپرم خیلی تحت تاثیر قرار نگرفت، بجز در غلظت ۱۲ میلی مول، که در همه اندازه گیریها (T0، T1 و T2) تحرک روبه جلو و زنده ماندن اسپرم را کاهش چشمگیر داد. میزان تحرک روبه جلو و زنده ماندن اسپرم در T2 به طور معنی‌داری از T0 و T1 کمتر بود (جدول ۱)

جدول ۱- اثر غلظتهای مختلف تمپول بر درصد تحرک و زنده ماندن (میانگین LS ± خطای استاندارد میانگین) اسپرماتوزوئیدها در منی رقیق شده تازه

سنجه	زمان	آزمایش (تیمار)						خطای استاندارد	میزان P		
		شاهد	۰/۵	۱	٤	۸	۱۲		آزمایش(تیمار)	مرحله	تیمار× مرحله
تحرک (درصد)	T_0	۸۳/۸± ۱/۰^{a}	۸٤/۰ ± ۱/۰^{a}	۸٤/۸ ± ۰/ ۸^{a}	۸٤/۷ ± ۱/۰^{a}	۸۲/۱ ± ۱/۱^{ab}	۷۹/٤ ± ۱/۵^{b}	۰/۰۰۲۵	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
	T_1	۸۰/۵ ± ۱/۲^{a}	۸٦/٦ ± ۰/۵^{b}	۸۳/۳ ± ۰/۸^{b}	۸۲/۳ ± ۱/۱^{a}	۷۵/٤ ± ۱/۵^{c}**	۷۱/۲ ± ۱/۹^{d}**	۰/۰۰۲۵			
	T_2	۷٦/۳± ۱/٤ ^{a}***$^{+}$	۸۳/۲ ± ۱/۲^{b}***$^{++}$	۸۱/۷ ± ۱/۸ ^{bc}*$^{++}$	۷۸/۵ ± ۱/۳$^{a\ c}$	۷۰/۵ ± ۱/۵ ^{d}*$^{+++}$	٦۰/۷ ± ۱/٦^{e}**$^{+++}$	۰/۰۰۲۵			
زنده ماندن (درصد)	T_0	۸۷/۱ ± ۱/۲^{a}	۸۸/۸ ± ۰/۷^{a}	۸۷/۵ ± ۰/۸^{a}	۸٦/۸ ± ۰/٦^{a}	۸٦/٤ ± ۰/۸^{a}	۸۳/۷ ± ۰/۸^{b}	۰/۰۰۱٦	< ۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۳۳۰
	T_1	۸۵/٦ ± ۱/۲^{a}	۸٦/۲ ± ۱/۱^{a}	۸٦/٤ ± ۱/۰^{a}	۸۵/۱ ± ۱/۲^{a}	۸۳/۲ ± ۱/۲^{ab}	۸۰/۵ ± ۱/٦^{b}***$^{+}$	۰/۰۰۱٦			
	T_2	۸۱/۵ ± ۱/۷^{a}**$^{+}$	۸۳/۹ ± ۱/۹^{a}**$^{+}$	۸۳/۰ ± ۱/٦^{a}**$^{+}$	۸۰/۸ ± ۱/۷ ^{a}**	۷۹/٦ ± ۱/٤^{a}**	۷٤/۲ ± ۱/۷ ^{b}***$^{++}$	۰/۰۰۱٦			

T_0: ۰، T_1: ۶۰ و T_2: ۱۲۰ دقیقه بعد از رقیق کردن منی. حروف بالاچین متفاوت (a,b,c,d,e) تفاوت معنی دار (p<۰/۰۵) را در هرردیف نشان می دهند.

* تفاوت معنی دار (p<۰/۰۵) با T_0؛ ** تفاوت معنی دار (p<۰/۰۱) با T_0؛ *** تفاوت معنی دار (p<۰/۰۰۱) با T_0 را نشان می دهد.

*تفاوت معنی دار (p<۰/۰۵) با T_1؛ $^{++}$ تفاوت معنی دار (p<۰/۰۱) با T_1؛$^{+++}$ تفاوت معنی دار (p<۰/۰۰۱) با T_1 را نشان می دهد.

- منی متعادل شده

در منی متعادل شده افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده، تحرک رو به جلو اسپرم را نسبت به شاهد معنی دار افزایش داد (۷۷/۳٤ درصد و ۷٦/۳۰ درصد در قیاس با ۷۰/۱٤ درصد)؛ زنده ماندن، یکپارچگی غشا و تعداد اسپرمهای با DNA آسیب دیده را تغییر نداد ولی، افزودن ۱۲ میلی مول تمپول این سنجه‌ها را معنی‌دار کاهش داد و تعداد اسپرماتوزوئیدهای با DNA آسیب دیده را قبل از انجماد منی معنی‌دار افزایش داد.

- منی منجمد- ذوب شده

در منی منجمد- ذوب شده، افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده، تحرک رو به جلو (٤۷/۵۰ درصد و ٤٦/٦۳ درصد در قیاس با ٤۰/۳۳ درصد)، زنده ماندن (٦۷/٤ درصد و ٦٤/۸۵ درصد در قیاس با ۵۹/۱٤ درصد) و یکپارچگی غشا (٦٦/۱۸ درصد و ٦۳/٤۳ درصد در قیاس با ۵٦/۵۸ درصد) را در فرایند انجماد – ذوب نسبت به شاهد حفظ کرد (جدول ۲). تمپول با غلظت ۸ و ۱۲ میلی مول بر این سنجه ها اثر مضر داشت. افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده، منجر به تعداد کمتر اسپرم با DNA آسیب دیده گردید (۹/۰٤ درصد در قیاس با ۱۰/۸٤ درصد) و ۱۲ میلی مول تمپول این میزان را معنی دار افزایش داد (۱۳/۲٤ درصد در قیاس با ۱۰/۸٤ درصد). توان آنتی اکسیدانی تام (TAC) منی منجمد- ذوب شده با افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده از ٦۲/۰٤ میکرومول در لیتر به ۷۱/۰٤ و ۷۲/٦۰ میکرومول در لیتر افزایش یافت در حالی که با افزودن ۸ و ۱۲ میلی مول تمپول این میزان کاهش یافت (۵۳/۹۲ و ٤۵/۳۲ میکرومول در لیتر در قیاس با ٦۲/۰٤ میکرومول در لیتر) (جدول ۲).

در ضمن مشاهده گردید انجماد پذیری اسپرماتوزوئیدها در نمونه های منی با فصل نمونه‌گیری تغییر می‌کند و در تابستان بعد از انجماد زنده نمی‌مانند.

جدول ۲- اثر غلظتهای مختلف تمپول بر سنجه های اسپرماتوزوئیدها (میانگین LS ± خطای استاندارد میانگین) بعد از زمان تعادل وذوب کردن

سنجه	مرحله	آزمایش (تیمار)						خطای استاندارد	میزان P		
		شاهد	۰/۵	۱	٤	۸	۱۲		آزمایش (تیمار)	مرحله	تیمار×مرحله
تحرک درصد	تعادل	۷۰/۱ ± ۱/٦a	۷۷/٤ ± ۱/۲b	۷٦/۳ ± ۲/۲bc	۷۱/۳ ± ۲/۱ac	٦٤/۳ ± ۱/٦d	٥٦/۹ ± ۱/۳e	۰/۰۰۸۱	۰<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
	ذوب	٤۰/۳ ± ۱/٦a	٤۷/٥ ± ۲/۰b	٤٦/٦ ± ۲/۱b	٤۳/۱ ± ۱/۸ab	۳۲/٥ ± ۲/۱c	۳٦/۷ ± ۱/۹d	۰/۰۰۸۱			
زنده ماندن درصد	تعادل	۷۷/۲ ± ۱/٥a	۷۸/۰ ± ۱/۷a	۷۸/٥ ± ۱/۷a	۷۹/٥ ± ۱/۸a	۷٤/۹ ± ۱/٥a	٦۹/٦ ± ۲/۱b	۰/۰۰۳٦	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
	ذوب	٥۹/۱ ± ۱/٥a	٦۷/٤ ± ۲/۱b	٦٤/۸ ± ۱/۹bc	٥۹/۱ ± ۱/۷ac	٥۳/٦ ± ۲/۰d	٤۱/٦ ± ۲/۰e	۰/۰۰۳٦			
سالم‌بودن غشا درصد	تعادل	۷۸/٦ ± ۱/۲a	۷۹/۷ ±۱/۱a	۸۱/٦ ± ۱/۱a	۸۱/۰ ± ۱/۱a	۷٤/٥ ± ۱/٥b	٦۸/٥ ± ۱/۷c	۰/۰۰۳٦	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱
	ذوب	٥٦/٥ ± ۱/٦a	٦٦/۱ ± ۱/۷b	٦۳/٤ ± ۱/۸bc	٥۹/۱ ± ۱/۸ac	٤۸/٤ ± ۱/۸d	۳۸/٥ ± ۲/۱e	۰/۰۰۳٦			
DNA آسیب دیده درصد	تعادل	۳/۰ ± ۰/۲a	۲/٤ ± ۰/۲a	۲/۷ ± ۰/۲a	۳/۰ ± ۰/۲a	۳/۱ ± ۲/۰a	٤/۲ ±۰/۲b	۰/۰۰۲٥	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۳۰۸٤
	ذوب	۱۰/۸ ± ۰/۳ad	۹/۰ ± ۰/۲b	۹/٥ ± ۰/۳bc	۱۰/۲ ± ۰/۲ac	۱۱/۳ ± ۰/۳d	۱۳/۲ ± ۰/٤e	۰/۰۰۲٥			
توان آنتی اکسیدانی تام (µmol L-1)	ذوب	٦۲ ± ۳/ ٥a	۷٤ ± ۱/٦b	۷۳ ± ۱/٤b	٦۱ ± ۰/۹a	٥۱ ± ۱/٦c	٤٤ ± ۱/۹d				

حروف بالاچین متفاوت (a,b,c,d,e) تفاوت معنی دار ($p<۰/۰٥$) را در هرردیف نشان می دهند.

بحث و نتیجه گیری

این تحقیق به منظور بررسی اثر افزودن مقادیر مختلف تمپول (بنیان نیتروکسید حلقوی محلول در آب و چربی)، که آنتی اکسیدان سنتتیک است، به رقیق کننده و بررسی آثار آن بر سنجه‌های منی گاومیش در محیط آزمایشگاه (In vitro) در تلاش برای یافتن راهی برای حفظ کردن کیفیت منی در فرایند انجماد طراحی شده است.

در مرحله اول، بعد از ارزیابی تحرک کلی و روبه جلو و غلظت (تراکم) اسپرم، نمونه های منی در رقیق کننده تریس – اسید استیک، که در مرکز اصلاح نژاد و پرورش گاومیش به کار می رفت، رقیق گردید ولی زرده تخم مرغ و پادزیست به آن افزوده نشد تا در بررسیها اختلال ایجاد نکند، با این باور که این مواد بر سنجه‌های اسپرم اثر دارد. مدارکی در دست است که افزودن پادزیست به رقیق کننده، تحرک و زنده ماندن اسپرم را بعد از ذوب بیشتر می‌کند (Hasan, *et al.*, 2001; Akhter, *et al.*, 2011). در این جا قصد ما بررسی اثر دوز تمپول و گذشت زمان بر تحرک و زنده ماندن اسپرم بود. نتایج نشان داد که افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده، در قیاس با شاهد، تحرک رو به جلو اسپرم را با گذشت زمان حفظ کرد. اما، دوزهای بالا (۸ و ۱۲ میلی مول)، بلافاصله بعد از افزودن آنها به نمونه منی (در T0) تحرک و زنده ماندن اسپرم را کاهش داد که می توان آن را اختلال سریع در سوخت و ساز (متابولیسم) (تنفس، تولید انرژی و غیره) اسپرم تفسیر کرد. همان طور که انتظار می رفت، با گذشت زمان، تحرک و زنده ماندن اسپرم در همه نمونه‌ها (تیمارها)، ازجمله شاهد، بتدریج کاهش یافت (جدول ۱).

روش آنالیز با کمک رایانه برای ارزیابی تحرک اسپرم به کار رفت ولی چون سیستم برای منی گاومیش تنظیم نشده بود، تحرک رو به جلو اسپرم در ۲۵ نمونه منی همزمان با ارزیابی دستگاه با چشم بررسی شد و نتایج با هم مقایسه شدند. چون تفاوت بین دو روش کمتر از ۳ درصد بدست آمد، فقط این سنجه تحرک در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت. سنجه‌های دیگر تحرک به دلیل قابل اطمینان نبودن نتایج برای گاومیش در نظر گرفته نشد.

در انتخاب سنجه های منی برای ارزیابی، فقط نمونه‌های با تحرک روبه جلو بیش از ۸۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت و هر نمونه با شاهد خود مقایسه گردید. فرض بر این بود که منی تازه بیشترین اسپرم طبیعی و کمترین تعداد اسپرم غیرطبیعی را داشته باشد و انجماد و ذوب کردن بر سلولها آسیب می رساند. همبستگی مثبتی بین توان آنتی اکسیدانی تام (TAC)

پلاسمای منی و تحرک و زنده ماندن اسپرم قبلا گزارش شده است (Eghbali, *et al*., 2010).

استفاده از رقیق کننده تریس- اسید سیتریک و افزودن ٤- هیدروکسی تمپو به آن در آزمایشگاه (In vitro) در این بررسی خوب عمل کرد و نتایج خوبی بدست آمد. این با گزارش آندرابی در سال ۲۰۰۹ مطابقت دارد که از بررسی چند تحقیق نتیجه گرفت که، تریس ممکن است بهترین سیستم بافری مناسب برای افزایش قابلیت انجماد و خصوصیات تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش باشد (Andrabi, *et al.,* 2009). آختر و همکاران در سال۲۰۱۱ اثر رقیق کننده‌های لسیتین سویا بیوکسل (®Bioxcell)، تریس - اسید سیتریک زرده تخم مرغ، زرده تخم مرغ- سیترات و شیر پس چرخ را بر اسپرماتوزوئیدهای گاومیش که به مدت ۵ روز در دمای ۵°C نگهداری شده بود مقایسه کرده مشاهده کردند تحرک رو به جلو، زنده ماندن، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرماتوزوئیدهای گاومیش در رقیق کننده‌های تریس- اسید سیتریک زرده تخم‌مرغ، شیر و بیوکسل در روزهای اول و سوم یکی بود ولی در روز پنجم در بیوکسل بهتر از بقیه بود (Akhter, *et al.,*2011). رسولی و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش دادند تریس- اسید سیتریک در بالا بردن خصوصیات تحرک اسپرماتوزوئیدهای گاومیش بعد از ذوب، بهتر از بافرهای تریس- سیترات سدیم، تریس- Tes و تریس- HEPES اثر می‌کند (Rasule, *et al.,*2000).

تمپو و تمپول (٤-هیدروکسی تمپو)، که از نظر شیمیایی می توانند مانند SOD عمل کنند، در محیط آزمایشگاه زنده ماندن اسپرم گاو و بوقلمون را افزایش دادند (Lindemann and Kanous, 1991; Donoghue and Donoghue, 1997)

دونوگو در سال ۱۹۹۷ گزارش دادند افزودن تمپو به منی رقیق شده بوقلمون، زنده ماندن و یکپارچگی غشای اسپرم را بعد از ٤٨ ساعت انبار کردن، افزایش و از بین رفتن تحرک را کاهش می دهد. علاوه بر این، به دلیل سنتتیک بودن آن، تمپو با قیمت کمتر در دسترس است (Donoghue, *et al.,* 1997). در این بررسی زنده ماندن اسپرم در منی رقیق شده و متعادل شده دارای تمپول تحت تاثیر قرار نگرفت ولی بعد از انجماد و ذوب میزان آن بالاتر بود.

فوت و همکاران در سال ۲۰۰۲ تمپو و تمپول را به رقیق کننده شیر کامل اضافه کرده نتایج را با رقیق کننده زرده تخم مرغ- تریس مقایسه کردند؛ آنها دریافتند تمپو و تمپول در شیر کامل در تحرک و زنده ماندن اسپرم اثر ندارند زیرا شیر دارای مقادیر زیادی کازئین است که خاصیت آنتی اکسیدان دارد ولی در رقیق کننده زرده تخم مرغ-تریس اسپرمها فرایند انجماد را تحمل کرده ٦ تا ١١ درصد تحرک بیشتر نشان دادند (Foote, *et al.,* 2002).

مارا و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشاهده کردند افزودن تمپول به بافر سدیم سیترات، تحرک اسپرم قوچ را افزایش داده و باروری منی را بعد از انبار کردن در ۱۵°C افزایش می دهد(Mara, *et al.,*2005).

مارا و همکاران در سال ۲۰۰۵ دریافتند اضافه کردن تمپول به رقیق کننده شیر پس چرخ، بعد از ٢٤ ساعت انبار کردن، باروری منی بز را خوب حفظ می کند (Mara, *et al.,*2007).

نتایج ما نشان داد اضافه کردن ٤-هیدروکسی تمپو به رقیق کننده منی با غلظت ۰/۵ میلی مول، تحرک اسپرم را در منی رقیق شده تازه و متعادل شده به طور معنی‌داری تحریک کرد و بالا برد، بدون این که در زنده ماندن آن اثر داشته باشد؛ اما، در منی منجمد- ذوب شده، اضافه کردن ۰/۵ میلی مول تمپول به رقیق کننده تاثیر مثبتی بر تحرک و زنده ماندن هر دو داشت. این افزایش ممکن است ناشی از این باشد که هنگام انجماد، حساسیت اسپرماتوزوئیدها به فشار اکسیداتیو، احتمالا ناشی از شروع خود به خود پراکسیداسیون چربی (Kadirvel, *et al*., 2009) خیلی افزایش یافته

و به این ترتیب اثر حفاظتی تمپول موجود در رقیق کننده معلوم شده است.

دراین بررسی افزودن ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول به رقیق کننده، تحرک رو به جلو اسپرم را بعد از ٦۰ و ۱۲۰ دقیقه (T1 و T2) و بعد از ذوب کردن اسپرم منجمد حفظ کرد. نمونه های منجمد و ذوب شده ظرف چند دقیقه ارزیابی شدند چون انتظار می رفت تحرک بیشتر اسپرمها زود از بین برود؛ در عمل هم مرسوم است که منی را ظرف ۱۵ دقیقه پس از ذوب کردن تلقیح نمایند. در ارتباط با این مطلب، کاندبار و همکاران در سال ۲۰۱۱ منی گاومیشهای کوندهی (Kundhi) را ۵ ساعت در ۲۵°C نگه داشتند و مشاهده کردند تحرک اسپرم ۲/۹۵ ± ٤۳/۲۵ درصد و زنده ماندن ۰/۲۸ ± ۱۱/۷۸ درصد در زمان شروع آزمایش (۰ ساعت) بتدریج کاهش یافت و ظرف ۵ ساعت همه اسپرمها مردند (Kundbhar, *et. al*., 2011). نتایج ما نشان داد افزودن ۰/۵ میلی مول تمپول به رقیق کننده منجر به حفظ بهتر یکپارچگی غشا اسپرم بعد از تعادل و انجماد و ذوب می شود (جدول ۲). در انسان نشان داده اند وجود مواد آنتی اکسیدان در غذا ممکن است در کاهش میزان اسپرمهای با DNA آسیب دیده مفید باشد، بخصوص در مردان مبتلا به درصد بالایی از اسپرمهای با DNA آسیب دیده (Zini, *et al*., 2009).

توان آنتی اکسیدانی تام (TAC) پلاسمای منی نمایانگر مجموع آنزیمهای ضد ROS فعال منی مثل گلوتاتیون پراکسیداز است. علاوه بر این، کانتری و همکاران در سال ۲۰۰۱ و اقبال و همکاران در سال ۲۰۱۰ رابطه مثبتی بین سنجه‌های اسپرم و توان آنتی اکسیدانی تام پلاسمای منی را گزارش دادند. در این بررسی میزان بالاتر توان آنتی اکسیدانی تام مشاهده شده در منی دارای ۰/۵ و ۱ میلی مول تمپول بعد از انجمادو ذوب ممکن است نشانه اثر محافظتی تمپول در توان آنتی اکسیدانی حین فراوری منی باشد (Eghbali, *et al*.,2010; Contri, *et al*., 2001). در این بررسی افزودن دوزهای بالای تمپول به رقیق کننده، به محض افزودن منی، اثر مضری بر سنجه‌های اسپرم داشت. این مشاهده با گزارش قبلی این حالت در گاو مطابقت دارد و نشان می‌دهد که فعالیت حیاتی اسپرم ممکن است با تمپول اضافی مختل شود (Foote, *et al*., 2002).

علیرغم مشاهده کیفیت خوب منی در تابستان در گزارش قبلی علوی شوشتری و بابازاده حبشی در سال ۲۰۰٦ در این بررسی، قابلیت انجماد اسپرماتوزوئیدها در ماههای گرم سال خوب نبود و تحرک اسپرماتوزوئیدها تا مهر ماه خوب نشد (Alavi-Shoushtari and Babazadeh- Habashi, 2006). این مشاهده با گزارش ساجئو در سال ۱۹۹۱ در منی گاومیشهای سوری و گزارش باگا و خوکار در سال ۱۹۹۱ که پایین ترین میزان تحرک اسپرم بعد از ذوب کردن نمونه های منی بدست آمد که در تابستان گرفته شده بود، مطابقت دارد (Bahga and Khokar, 1991; Sagdeo, *et al*.,1991). اگرچه این بررسی نشان داد افزودن تمپول به رقیق کننده منی ممکن است بر سنجه‌های منی اثر مفید داشته باشد، به نظر می رسد اثر تمپول برحسب دوز کم یا زیاد آن و زمان آزمایش و مراحل مختلف فراوری متفاوت باشد. این تحقیق نشان داد افزودن تمپول به رقیق کننده منی ممکن است تحرک، زنده ماندن، یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم و تعداد اسپرمهای با DNA سالم را بعد از انجماد-ذوب افزایش می دهد و مقادیر (از نظر آماری) معنی دار بیشتری بعد از افزودن ۰/۵ میلی مول ٤-هیدروکسی تمپو (تمپول) به رقیق کننده بدست می‌آید. تمپول به روش وابسته به دوز و زمان اعمال اثر می کند و بیشترین اثر با دوزهای کم ۰/۵ و ۱ میلی مول بدست می آید و دوزهای بالای ۸ و ۱۲ میلی مول برای اسپرم مضر هستند. بررسیهای بیشتر با تعداد بیشتری نمونه و بررسی میزان باروری منی در حیوان زنده برای تایید

این نتایج ضروری است تا بتوان آن را برای کاربرد وسیع توصیه کرد.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی تحصیلات تکمیلی دانشگاه ارومیه اجرا گردید. لازم است از مسوولین و کارکنان مرکز اصلاح نژاد و پرورش گاومیش منطقه شمال غرب ایران برای همکاری و تامین نمونه های منی و در اختیار گذاشتن وسایل مرکز قدردانی و تشکر نماییم. از همکار محترم جناب آقای دکتر بهرام دلیرنقده بهخاطر آنالیز داده ها و تهیه جداول، بی‌نهایت متشکریم.

منابع

- Aitken, R.J., Clarkson, J.S., (1988). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparative techniques. Journal of Andrology 9, 367–376
- Akhter, S., Ansari, M.S., Andrabi, S.M.H., Ullah, N., Quayyum, M., (2008). Effect of antibiotics in extender on bacterial and spermatozoal quality of cooled buffalo (Bubalus bubalis) bull semen. Reproduction in Domestic Animals 43, 272-278.
- Akhter, S., Ansari, M.S., Rakha, B.A., Ullah, N., Andrabi, S.M., Khalid, M., (2011). In vitro evaluation of liquid-stored buffalo semen at 5°C diluted in soya lecithin based extender (Bioxcell®), tris-citric acid egg yolk, skim-milk and egg yolk-citrate extenders Reproduction in Domestic Animals 46(1), 45 – 49.
- Alavi-Shoushtari, S.M. and Babazadeh-Habashi, B. (2006). Seasonal variation in the characteristics of the Azarbaijani buffalo (Bubalus bubalis) semen. Iranian journal of Veterinary Research 7(1), 49-54.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T., (1983). Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O2 toxicity due to lipid peroxidation. Biology of Reproduction 28, 1129–1136.
- Andrabi, S.M.H., Ansari, M.S., Ullah, N., Afzal, M., (2008). Effect of non-enzymatic antioxidants in extender on post-thaw quality of buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. Pakistan Veterinary Journal 28, 159-162.
- Andrabi, S.M.H., (2009). Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals 44, 552-569
- Bahga, C.S, Khokar, B.S., (1991). Effect of different seasons on concentration of plasma luteinizing hormone and seminal quality vis-à-vis freezability of buffalo bulls (Bubalus bubalis). International Journal of Biomteorology 35, 222-224.
- Barth, A.D., (2007). Evaluation of potential breeding soundness of the Bull, In: Youngquist, R.S., Threlfall, W.R. (Eds.), Current therapy in large animal Theriogenology. Saunders Elsevier, Philadelphia, pp. 235-239.
- Contri, A., De Amicis,I., Molinari,A., Faustini,M., Gramenzi, A., Robbe, D., Carluccio, A., (2001).Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion.Theriogenology. 75,1319-1326
- Donoghue, A.M., Donoghue, D.J., (1997). Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. Poultry Science 76, 1440–1445.

- Eghbali, M., Alavi-Shoushtari, S.M., Asri-Rezari, S., Ansari, M.H.K., (2010). Calcium, Magnesium and total antioxidant capacity (TAC) in seminal plasma of water buffalo (Bubalus bubalis) bulls and their relationships with semen characteristics. Veterinary Research Forum 1(1), 12-20.
- Foote, R.H., Brocket, C.C., Kaproth, M.T., (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Animal Reproduction Science 71, 13–23.
- Hasan, S., Andrabi, S.M.H., Muneer, R., Anzar, M., Ahmad, N., (2001). Effects of a new antibiotic combination on post-thaw motion characteristics and membrane integrity of buffalo and Sahiwal bull spermatozoa and on the bacteriological quality of their semen. Pakistan Veterinary Journal 21, 6-12.
- Jeyendran, R.S., Van der ven, H.H., Perez Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D., (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. Journal of Reproduction and Fertility 70, 219-228.
- Jiang, Z.L., Li, Q.W., Li, W.Y., Hu, J.H., Zhao, H.W., Zhang, S.S., (2007). Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing–thawing boar sperm by neutral comet assay. Animal Reproduction Science 99, 401-407.
- Kadirvel, G., Kumar, S., Kumaresan, A., (2009). Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. Animal Reproduction Science 114, 125–134.
- Katayose, H., Yanagida, K., Hashimoto, S., Yamada, H., Sato, A., (2003). Use of diamide-acridine orange fluorecence staining to detect aberrant protamination of human ejaculated sperm. Nuclear Fertility and Sterility 79, 670-676.
- Kundbhar, H.K., Raho, T.A., Samo, M.U., (2011). In vitro fertility assessment of Kundhi buffalo bull semen. Research Opinion on Animal Veterinary Science (ROAVS) 1(2), 102-106.
- Lindemann, C.B., Kanous, K., (1991). The cyclic nitroxide free radical 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1oxyl (Tempol) is effective in prolonging the motility of bull sperm in vitro. Biology of Reproduction 44 (Suppl. 1), 117 (Abstract).
- Mara, L., Accardo, C., Pilichi, S., Dattena, M., Chessa, F., Chessa, B., Branca, A., Cappai, P., (2005). Benefits of Tempol on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. Theriogenology 63(8), 2243-2253.
- Mara, L., Dattena, M., Pilichi, S., Sana, D., Branca, A., Cappai, P., (2007). Effects of different diluents on goat semen fertility. Animal Reproduction Science 102(1-2), 152-157.
- Maxwell, W.M.C., Stojanov, T., (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction and Fertility Development 8, 1013–1020.
- Mitchell, J.B., Samuni, A., Krishna, M.C., Degratt, W.G., Ahn, M.S., Samuni, U., Russo, A., (1990). Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. Biochemistry 29, 2802–2807.
- Pena, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodriguez Martinez, H., (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane

potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Animal Reproduction Science 78, 85–98.

- Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S., Ahmad, N., (2000). Effect of buffering system on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. Animal Reproduction Science 59: 31-41.
- Sagdeo, L.R., Chitnis, A.B., Kaikini, A.S., (1991). Effect of seasonal variations on freezability of Surti buffalo bull semen. Indian Journal of Animal Reproduction 12, 1-3.
- Sansone, G., Nastri, M.J., Fabbrocini, A., (2000). Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. Animal Reproduction Science 62, 55-76.
- Sukhato, P., Thongsodseang, S., Utha, A., Songsasen, N., (2001). Effects of cooling and warming conditions on post-thaw motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. Animal Reproduction Science 67(1), 69-77.
- World Health Organisation., (2010). laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition, pp 59.
- Zini, A., de Lamirande, E., Gagnon, C., (1993). Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. International Journal of Andrology 16, 183–188.
- Zini, A., Gabriel, M.S., Baazeem, A., (2009). Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 26, 427–432.