وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

تأثير تجميد النطف السريع والإذابة وأضافه مضادات الأكسدة في مستويات الجذور الحرة ومعايير النطف لمرضى قليلي الخصوبة

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في

علوم الحياة / علم الحيوان

تقدم بها الطالب :

هشام قاسم محمد ألنويني

ماجستير علوم الحياة /كلية التربية / 2008

بأشراف

ا.م.د صاحب يحيى حسن ألمرشدي ا.م.د وفاق جبوري محمد البازي

محرم 1435 ه كانون الأول 2013 م

بسم الله الرحمن الرحيم

لِلَّهِ مُلْكُ السَّمَاوَاتِ وَالأَرْضِ يَخْلُقُ مَا

يَشَاءُ يَهَبُ لِمَنْ يَشَاءُ إِنَاثًا وَيَهَبُ لِمَنْ

يَشَاءُ الذُّكُورَ* أَوْ يُزَوِّجُهُمْ ذُكْرَانًا وَإِنَاثًا

وَيَجْعَلُ مَنْ يَشَاءُ عَقِيمًا إِنَّهُ عَلِيمٌ قَدِيرٌ)

صدق الله العلي العظيم

(الشورى/49-50)

إقرار المشرفين

نشهد بأن إعداد هذه الأطروحة جرى بأشرافنا في قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء، وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة /علم الحيوان/ فسلجة التناسل.

التوقيع : **التوقيع :**

الاسم : د. صاحب يحيى حسن ألمرشدي **الاسم : د. وفاق جبوري محمد البازي**

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد **المرتبة العلمية : أستاذ مساعد**

العنوان : كلية الطب / جامعة الكوفة **العنوان : كلية العلوم التطبيقية/ جامعة كربلاء**

التاريخ : / / 2014 **التاريخ : / /2014**

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناء على التوصيات المتوافرة من المشرفين ، أرشح هذه الأطروحة إلى المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

الاسم : د. نصير حمزة مرزة

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء

التاريخ : / /2014

إقرار المقَوم اللغوي

أشهد أني قومت لغويا أطروحة الدكتوراه الموسومة (تأثير تجميد النطف السريع والإذابة وأضافه مضادات الأكسدة في مستويات الجذور الحرة ومعايير النطف لمرضى قليلي الخصوبة) فأصبحت صالحة للمناقشة وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة /علم الحيوان/ فسلجة التناسل.

التوقيع:

الاسم :

المرتبة العلمية :

العنوان:

التاريخ : / / 2013

أقرار المقَوم العلمي

أشهد أني قومت علميا" أطروحة الدكتوراه الموسومة (تأثير تجميد النطف السريع والإذابة وأضافه مضادات الأكسدة في مستويات الجذور الحرة ومعايير النطف لمرضى قليلي الخصوبة) فأصبحت صالحة للمناقشة وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة /علم الحيوان/ فسلجة التناسل.

التوقيع:

الاسم

المرتبة العلمية :

العنوان:

التاريخ : / / 2013

قرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على هذه الأطروحة الموسومة (**تأثير تجميد النطف السريع والإذابة وأضافه مضادات الأكسدة في مستويات الجذور الحرة ومعايير النطف لمرضى قليلي الخصوبة**) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 13 / 1 / 2014 ووجدناها جديرة بالقبول لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة /علم الحيوان بتقدير (امتياز) .

رئيس اللجنة :

التوقيع :

الاسم : د.إسماعيل كاظم عجام

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان:كلية الزراعة/ جامعة القاسم الخضراء

التاريخ : / / 2014

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.فارس ناجي عبود

المرتبة العلمية :أستاذ

العنوان : كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ: / / 2014

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د .ستار جاسم حتروش

المرتبة العلمية :أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2014

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.تهاني سلمان شعوبي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد .

التاريخ : / / 2014

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.حسين خضير عبيس

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة القادسية .

التاريخ: / / 2014

عضو اللجنة (مشرف)

التوقيع :

الاسم : د.وفاق جبوري محمد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم الطبية التطبيقية/ جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2014

عضو اللجنة (مشرف)

التوقيع :

الاسم: د.صاحب يحيى حسن

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة الكوفة / كلية الطب

التاريخ : / / 2014

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة :

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع :

الاسم: د. نجم عبد الحسين نجم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2014

شكر وتقدير

الحمد لله الذي يفعل مايشاء ولا يفعل مايشاء غيره، الحمد لله كما يحب الله أن يحمد ، الحمد لله كما هو أهله .

الحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على اشرف الخلق والمرسلين الرسول الأمين وعلى آله الطيبين الطاهرين .

يطيب لي و أنا على مشارف إنهاء دراستي أقدم خالص شكري وتقديري إلى مشرفيَّ الفاضلين الأستاذ المساعد الدكتور صاحب يحيى حسن ألمرشدي لاقتراحه موضوع البحث و متابعة خطواته والأشراف العلمي الملتزم في مراحله اجمع و الأستاذ المساعد الدكتورة وفاق جبوري محمد البازي لما أبدته من مساعدة وتوجيهات سخية في موضوع الدراسة.

وببالغ التقدير والاحترام أتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة والى رئاسة وأساتذة قسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لي لإكمال دراستي وتعاونهم البناء .

وببالغ التقدير والاحترام أتقدم بالشكر الجزيل إلى منتسبي مركز العقم والخصوبة في مدينة الصدر الطبية / محافظة النجف الاشرف واخص بالذكر مدير المركز د. رائد طالب الكرعاوي ود. علي ابراهيم ود. هند الابراهيمي ود. رغد الموسوي والآنسات البيولوجيات حميدة وزينب والممرض الجامعي سحرصالح عبد وتقني تحليلات سجاد صالح و ناجي طالب والأستاذ عامر لتعاونهم البناء وتقديمهم التسهيلات الممكنة في انجاز موضوع الدراسة .

وببالغ التقدير والاحترام أتقدم بالشكر الجزيل إلى المدرس المساعد ضياء كريم /كلية التمريض / جامعة الكوفة لمساعدته أياي في انجاز إحصائيات الدراسة .

وأخيراً شكري يصل إلى كل من مد يد العون لي ولو بكلمة طيبه.... وعذراً لمن نسيت .

والله ولي التوفيق

هشام

الخلاصة

أُنجزت 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 .

هدفت الدراسة 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 بالإضافة إلى دراسة تأثير إضافة أنواع من مضادات الأكسدة والتي شملت فيتامين E بتركيز 40 μmol والكلوتاثايون Glutathione بتركيز 1 ملي مول إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) في تقليل التأثيرات السلبية الناتجة من عمليات التجميد السريع والإذابة في النطف .

شملت الدراسة ثلاثة أنواع من مرضى عدم الخصوبة وهم مرضى سواء النطف Normozoospermic ومرضىِ قَلة النطف Oligozoospermic و مرضى وهن النطف Asthenozoospermic، وكان عدد المرضى في كل نوع 30 مريضاً. كان معدل العمر لدى مرضى سواء النطف (1.31 ± 32.2) سنة و معدل العمر لدى مرضى قلة النطف (1.29 ± 31.1) سنة و معدل العمر لدى مرضى وهن النطف (1.23 ± 33.1) سنة .

أظهرت النتائج أن عملية تنشيط النطف أدت إلى حدوث فروق معنوية (P<0.05) في معايير النطف مقارنة بقبل التنشيط ، إذ أظهرت نتائج هذه الدراسة أن عملية تنشيط النطف باستعمال تقنية الطبقية البسيطة Simple Layer لعينات مرضى سواء النطف و مرضى قلة النطف أدت إلى انخفاض معنوي (P<0.05) في معدلات تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي ووجود زيادة معنوية (P<0.05) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية مقارنة مع معدلاتها قبل التنشيط . بينما عملية تنشيط النطف مرضى وهن النطف باستعمال تقنية الغسل والنبذ Centrifugation Wash – Out technique أدت إلى انخفاض معنوي (P<0.05) في معدلات تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و 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 .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية 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 .

أظهرت دراسة مدة التجميد من حساب معايير النطف في الشهر الأول ومقارنتها مع الشهر الثاني والشهر الثالث بعد التجميد والإذابة في عينات المرضى المشمولين في الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف وحدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فروق معنوية($P<0.05$) في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في الشهر الثاني و الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد .

كما أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و عدم وجود فروق معنوية ($P >0.05$) في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية عند مقارنة معدلات الشهر الثالث مع معدلات الشهر الثاني .

وأوضحت نتائج الدراسة إن استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية مضادات الأكسدة من نوع فيتامين E أو الكلوتاثايون بشكل منفرد أو بشكل مزيج من النوعين أدى إلى حدوث فروق معنوية ($P<0.05$) في المعايير المدروسة لنطف المرضى المشمولين في الدراسة حيث أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و عدم وجود فروق معنوية ($P<0.05$) في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده.

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 ، ويزداد هذا التأثير السلبي لعمليات التجميد السريع والإذابة مع زيادة مدة التجميد ، وان إضافة مضادات الأكسدة من نوع فيتامين E أو

الكلوتاثايون بشكل منفرد أو بشكل مزيج من النوعين إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) اظهر مقاومة لهذه التأثيرات السلبية انعكست بحدوث تحسن معنوي في المعايير المدروسة .

فهرس المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة باللغة العربية	I
	فهرس المحتويات	IV
	قائمة الجداول	X
	قائمة الأشكال	XI
	قائمة الصور	XI
	قائمة المختصرات	X I
	الفصل الأول/المقدمة	
1-1	المقدمة	1
	الفصل الثاني/استعراض المراجع	
1:2	عدم الخصوبة	4
2:2	العوامل المسببة لعدم خصوبة الذكور	5
3:2	عوامل عدم خصوبة الذكور	8
1:3:2	فقدان المني	8
2. 3.2	اللانطفية	9
3. 3.2	قلة النطف	10
1.3. 3.2	تصنيف قلة النطف	11
2.3. 3.2	قلة النطف و الهرمونات	11
4. 3.2	وهن النطف	12
5. 3.2	تشوه النطف	14
6. 3.2	موات النطف	15
7. 3.2	خفاء النطف	15
8.3.2	ابيضاض المني	16

4.2	تقنيات تنشيط النطف البشرية	17
1.4.2	التقنية الطباقية البسيطة	18
2.4.2	تقنية الغسل والنبذ	20
2- 5	الجذور الحرة	20
1. 5.2	أنواع الجذور الحرة	21
2 -5-2	تاثيرات الجذور الحرة	21
3. 5.2	مصادر الجذور الحرة	22
4. 5.2	آلية تاثير الجذور الحرة	22
5. 5.2	أنواع جذور الأوكسجين الفعالة ووظيفة النطف	23
6.2	الإجهاد التأكسدي	24
1. 6.2	علامات الإجهاد التأكسدي	24
2.6.2	المالون داي الالديهايد	24
7.2	مضادات الأكسدة	24
1.7.2	أنواع مضادات الأكسدة	25
1.1.7.2	مضادات الأكسدة الأنزيمية	25
2.1.7.2	مضادات الأكسدة غير الأنزيمية	25
1.2.1.7.2	فيتامين E	25
2.2.1.7.2	الكلوتاثايون	27
3.7.2	دور فيتامين E و الكلوتاثايون GSH في الخصوبة الذكرية	28
8.2	تركيب الكروماتين في نطف لأنسأن	29
1.8.2	العلاقة بين ضرر ال(DNA) والكفاءة الوظيفية للنطف	30
2.8.2	العلاقة بين الإجهاد التاكسدي للنطفة وتحطم الحامض النووي (DNA) النطفي في حالةعدم الخصوبة الذكرية	31

3.8.2	أسباب ضرر الحامض النووي (DNA) النطفي	32
4.8.2	طرق تقييم النضج النووي	32
1. 4.8.2	طريقة صبغة الأنيلين الزرقاء الحامضية	32
2. 4.8.2	طريقة صبغة التولويدين الزرقاء	32
3. 4.8.2	صبغة الكروموماسين A3	33
9.2	عملية التجميد	33
1.9.2	أنواع عملية التجميد	35
1.1.9.2	عمليات التجميد البطيئة	35
2.1.9.2	عمليات التجميد السريعة	35
2.9.2	مبادئ التجميد السريع	36
3.9.2	المواد الحافظة من ضرر التجميد	37
4.9.2	تأثيرات التجميد السريع على الخلايا النطفية	37
	الفصل الثالث / المواد وطرائق العمل	
1.3	عينات الدراسة	39
2-3	الأجهزة المستخدمة	39
3 -3	المواد الكيميائية والأوساط المستخدمة	40
4.3	البيانات المختبرية للمرضى	41
5.3	جمع السائل المنوي	42
6.3	فحص السائل المنوي	42
1.6.3	الفحص العياني	42
1.1. 6.3	حجم المني	42

2.1. 6.3	اللون	42
3. 1. 6.3	مدة الاماعة	42
4. 1. 6.3	اللزوجة	42
2. 6. 3	الفحص ألمجهري	43
1.2. 6. 3	تركيز النطف	43
2.2. 6.3	النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (A + B)	43
3.2. 6. 3	النسبة المئوية للنطف السوية	43
4.2. 6.3	النسبة المئوية لعيوشية النطف	44
5.2. 6.3	تركيز الخلايا الدائرية	44
7. 3	تركيز المالون داي ألديهايد	44
1.7.3	تحضير الكواشف	45
2.7.3	طريقة العمل	45
8.3	تقييم كروماتين النطفة	45
1.8.3	تحضير الكواشف	46
2.8.3	خطوات طريقة تصبيغ كروماتين النطفة باستخدام صبغة الانلين الازرق	46
9. 3	تحضير مضادات الأكسدة	49
1.9.3	فيتامين E	49
2.9.3	الكلوتاثايون	49
10.3	الاوساط المستعملة في تحضير النطف في الزجاج	49
1.10.3	وسط Ferticult IVF Medium	49
2. 10 .	وسط تجميد النطف	49

3		
11.3	التقنيات المستخدمة في تنشيط النطف	50
1.11.3	تقنية الغسل والنبذ	50
2.11.3	تقنية الطبقية البسيطة	50
12.3	عمليات التجميد السريع والإذابة للنطف	50
1.12.3	عمليات التجميد السريع	51
2.12.3	عمليات الإذابة للنطف	51
12.3	تصميم التجارب في هذه الدراسة	51
1.12.3	المحور الأول : دراسة عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات المني لمرضى سواء النطف	51
2.12.3	المحور الثاني : دراسة عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات المني لمرضى قلة النطف	51
3.12.3	المحور الثالث : دراسة عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات المني لمرضى وهن النطف	51
13.3	التحليل الإحصائي	54
الفصل الرابع/ النتائج		
1-4	دراسة معايير المني والنطف لمرضى عدم الخصوبة المشمولين بالدراسة	55
2.4	المحور الأول : عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات مني سواء النطف	57
1.2.4	دراسة تأثير عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة والوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة و تأثير عملية التجميد السريع والإذابة لمدة شهر واحد في معايير النطف و تركيز ألمالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى سواء النطف	57
2.2.4	دراسة تأثير مدة التجميد السريع واستخدام مضادات الأكسدة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى سواء النطف	59
3.2.4	دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى سواء النطف	62
4.2.4	دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير	65

	النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى سواء النطف	
3.4	المحور الثاني : عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات المني لمرضى قلة النطف	68
1.3.4	دراسة تأثير عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة والوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة و تأثير عملية التجميد السريع والإذابة لمدة شهر واحد في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى قلة النطف	68
2.3.4	دراسة تأثير مدة التجميد السريع واستخدام مضادات الاكسدة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى قلة النطف	70
3.3.4	دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط التجميد (Sperm Freeze) مضافا" إلية الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى قلة النطف	73
4.3.4	دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى قلة النطف	76
4.4	المحور الثالث : عمليات التجميد والإذابة لعينات المني لمرضى وهن النطف	79
1.4.4	دراسة تأثير عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة والوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة و تأثير عملية التجميد السريع والإذابة لمدة شهر واحد في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى وهن النطف	79
2.4.4	دراسة تأثير مدة التجميد السريع واستخدام مضادات الاكسدة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى وهن النطف	81
3.4.4	دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط التجميد (Sperm Freeze) مضافا" إلية (GSH) والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى وهن النطف	84
4.4.4	دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط التجميد (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH) والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى وهن النطف	87
5	الفصل الخامس / المناقشة	90

6	الاستنتاجات	108
	التوصيات	109
المصادر		
	المصادر العربية	110
	المصادر الأجنبية	111
	الخلاصة باللغة الانجليزية	

قائمة الجداول

ت	العنوان	الصفحة
(2 – 1)	صفات المني الطبيعية	5
(2 – 2)	عمليات التجميد باستخدام الطريقة السريعة والطريقة البطيئة	36
(3 -1)	الأجهزة المستعملة لانجاز خطوات البحث	39
(3- 2)	المواد الكيميائية والأوساط المستخدمة المستعملة لانجاز خطوات البحث	40
(4-1)	معايير المني والنطف لمرضى قلة الخصوبة المشمولين بالدراسة	56
(4 - 2)	معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايد والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل وبعد التنشيط وبعد التجميد والإذابة لمرضى سواء النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة	58
(4 - 3)	تأثير مدةالتجميد وإضافة فيتامين (E) في معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى سواء النطف	61
(4-4)	تأثير مدة التجميد وإضافة (GSH) في معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى سواء النطف	64
(4 - 5)	تأثير مدة التجميد وإضافة (E+ GSH) في معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى سواء النطف	67
(4 -6)	معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل وبعد التنشيط وبعد التجميد والإذابة لمرضى قلة النطف	69

	باستخدام تقنية الطبقية البسيطة	
(4 - 7)	تأثير مدة التجميد وإضافة فيتامين(E) في معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف	72
(4 -8)	تأثير مدة التجميد وإضافة (GSH) في معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف	75
(– 9 (4	يبين تأثير مدة التجميد وإضافة (E+ GSH) في معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف	78
(- 10 (4	معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل وبعد التنشيط وبعد التجميد والإذابة لمرضى وهن النطف باستخدام تقنية الغسل والنبذ	80
(- 11) 4	تأثير مدة التجميد وإضافة فيتامين (E) في معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف	83
(4 - 12)	تأثير مدة التجميد وإضافة (GSH) في معايير النطف وتركيز المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف	86
(– 13 (4	تأثيرمدة التجميد واضافة (E+ GSH) في معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف	89

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
(2- 1)	تركيب انواع مركبات توكوفيرول	26
(3 - 1)	يوضح مخطط الدراسة	53

قائمة الصور

رقم الصورة	العنوان	الصفحة
(3- 1)	تقييم النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف باستخدام صبغة الانلين الازرق	47
(3-2)	تقييم النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف باستخدام صبغة الانلين الازرق	48
(3 - 3)	تقييم النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى سواء النطف باستخدام صبغة الانلين الازرق	48

قائمة المختصرات

ADP	**Adenine diphosphate**
ART	**Assisted Reproduction Technique**
ATP	**Adenine triphosphate**
CAT	**Catalase**
CPAS	**Cryoprotectants Substances**
DFI	**DNA Fragmentation index**
FOR	**Free Oxygen Radical**
GIFT	**Gamete intra fallopian transfer**
GPX	**Glutathione peroxidase**
GSH	**Glutathione**
GR	**Glutathione Reductase**
HAS	**Human Albumin serum**
HOST	**Hypo osmotic Swelling Test**
ICSI	**Intracytoplasmic Sperm Injection**
IUI	**Intrauterine Insemination**
IVF	**In Vitro Fertilization**
L.P	**Lipid peroxidation**
MDA	**Malondialdehyde**
NOA	**NON - Obstructive Azoospermia**
OA	**Obstructive Azoospermia**
OS	**Oxidative Stress**
PBS	**Phosphate buffer saline**

PUFA	**Polyunsaturated Fatty Acid**
TBA	**Thiobarbituric acid**
SOD	**superoxide dismutase**
TCA	**Trichloroacetic acid**

جدول (4 -1) معايير المني والنطف لمرضى قلة الخصوبة (Infertility) المشمولين بالدراسة

المرضى / المعايير المدروسة	سواء النطف	قلة النطف	وهن النطف
حجم المني (مل)	3.70 ± 0.17	^{a} 2.91 ± 0.10	^{a} 3.10 ± 0.13
زمن الاماعة (دقيقة)	17.33± 0.98	^{a} 36.67±4,7	^{a} 37.41± 4.9
تركيز النطف مليون / مل	73.67 ± 2.81	^{a} 14.9 ± 3.73	^{a,b} 56.22 ± 2.7
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية %	67.92± 1.02	^{a} 52.93± 1.61	^{a,b} 36.58±1.00
النسبة المئوية للنطف السوية (%)	41.93 ± 1.09	^{a} 33.86± 1.12	^{a} 32.67 ± 1.06
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	66.93 ± 1.40	^{a} 58.26 ± 1.24	^{a} 59.33 ± 1.26
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	3.16 ± 0.19	^{a} 4.22 ± 0.18	^{a} 3.95 ± 0.19
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرومول / لتر)	3.77 ± 0.22	^{a} 7.99 ± 0.38	^{a} 7.66 ± 0.36
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي(%)	29.36 ± 1.30	^{a} 50.96 ± 2.04	^{a} 51.50 ± 1.77

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية ($P<0.05$) : a : عند المقارنة مع حالة سواء النطف

b : عند المقارنة بين قلة النطف و وهن النطف

عدد المرضى = 30 لكل حالة

جدول (4 - 2) معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل وبعد التنشيط وبعد التجميد والإذابة لمرضى سواء النطف Normozoospermic patients باستخدام تقنية الطبقية البسيطة

تنشيط النطف / معايير النطف	تنشيط النطف باستخدام الوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة		تجميد النطف باستخدام وسط تجميد النطف
	قبل التنشيط	بعد التنشيط	بعد التجميد والإذابة
تركيز النطف مليون / مل	73.67±2.81	^{a} 20.67±1.06	^{b} 18.87 ± 1.01
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية(%)	67.92 ± 1.02	^{a} 80.02 ± 0.93	^{b} 29.34 ± 0.95
النسبة المئوية للنطف السوية (%)	41.93 ± 1.09	^{a} 58.17 ± 1.11	^{b} 48.43 ± 0.97
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	66.93± 1.40	^{a} 79.98 ± 1.136	^{b} 31.81 ± 1.16
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	3.16 ± 0.19	^{a} 2.46 ± 0.11	^{b} 1.91 ± 0.11
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/ لتر)	3.77 ± 0.22	^{a} 2.84 ± 0.17	^{b} 7.62 ± 0.29
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي(%)	29.36 ± 1.30	^{a} 20.31 ± 0.96	^{b} 51.55 ± 1.30

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE

عدد المرضى = 30

الحروف المختلفة تدل على وجود الفروق المعنوية ($P<0.05$) a عند مقارنة قبل مع بعد التنشيط و b عند مقارنة بعد التنشيط مع بعد التجميد والإذابة

جدول (4 - 6) معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل وبعد التنشيط وبعد التجميد والإذابة لمرضى قلة النطف Oligozoospermic patients باستخدام تقنية الطبقية البسيطة

تنشيط النطف / معايير النطف	تنشيط النطف باستخدام الوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة		تجميد النطف باستخدام وسط تجميد النطف
	قبل التنشيط	بعد التنشيط	بعد التجميد والإذابة
تركيز النطف مليون / مل	14.90 ± 0.37	$^{a}\ 4.49 \pm 0.20$	$^{b}\ 3.75 \pm 0.18$
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية(%)	52.93 ± 1.61	$^{a}\ 68.75 \pm 1.17$	$^{b}\ 26.44 \pm 0.69$
النسبة المئوية للنطف السوية (%)	33.86 ± 1.12	$^{a}\ 52.83 \pm 1.09$	$^{b}\ 43.57 \pm 0.89$
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	58.26 ± 1.24	$^{a}\ 74.85 \pm 1.07$	$^{b}\ 28.63 \pm 0.95$
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	4.22 ± 0.18	$^{a}\ 2.67 \pm 0.15$	2.50 ± 0.12
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/ لتر)	7.99 ± 0.38	$^{a}\ 5.44 \pm 0.30$	$^{b}\ 12.19 \pm 0.38$
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي(%)	50.96 ± 2.04	$^{a}\ 33.07 \pm 1.53$	$^{b}\ 63.16 \pm 1.34$

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE

عدد المرضى = 30

الحروف المختلفة تدل على وجود الفروق المعنوية ($P<0.05$) a عند مقارنة قبل مع بعد التنشيط و b عند مقارنة بعد التنشيط مع بعد التجميد والإذابة

جدول (4 - 10) معايير النطف ومستوى المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل وبعد التنشيط وبعد التجميد والإذابة لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients باستخدام تقنية الغسل والنبذ

تنشيط النطف / معايير النطف	تنشيط النطف باستخدام الوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة		تجميد النطف باستخدام وسط تجميد النطف
	قبل التنشيط	بعد التنشيط	بعد التجميد والإذابة
تركيز النطف مليون / مل	56.22 ± 2.70	^{a} 8.93 ± 0.64	^{b} 7.80 ± 0.61
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية(%)	36.58 ± 1.006	^{a} 61.06 ± 1.10	^{b} 29.14 ± 1.23
النسبة المئوية للنطف السوية (%)	32.67 ± 1.06	^{a} 50.25 ± 0.93	^{b} 39.87 ± 1.21
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	59.33 ± 1.26	^{a} 75.33 ± 1.12	^{b} 29.50 ± 0.91
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	3.95 ± 0.19	^{a} 2. 71 ± 0.14	2.40 ± 0.09
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/ لتر)	7.66 ± 0.36	^{a} 9.26 ± 0.446	^{b} 14.26 ± 0.47
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي(%)	51.50 ± 1.77	^{a} 34.94 ± 1.48	^{b} 67.38 ± 1.15

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE

عدد المرضى = 30

الحروف المختلفة تدل على وجود الفروق المعنوية ($P<0.05$) a عند مقارنة قبل مع بعد التنشيط و b عند مقارنة بعد التنشيط مع بعد التجميد والإذابة

جدول (4 - 3) تأثير مدة التجميد وإضافة فيتامين (E) في معالم النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لعينات مني سواء النطف Normozoospermic

التجميد والإذابة / معالم النطف	بعد التجميد والإذابة					
	ألشهر الأول		الشهر الثاني		الشهر الثالث	
	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين E	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين E	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين E
تركيز النطف مليون / مل	16.40 ±1.21	16.30 ±1.28	16.20 ±1.41	16.80 ±1.40	16.80 ±1.36	16.80 ±1.22
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	30.48±1.65	^{e} 46.48±1.40	^{a} 25.13±1.36	^{c} 41.57±1.49 ^{e}	^{a,b} 22.20 ±1.48	^{c,d} 37.76±1.66 ^{e}
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	48.80±1.79	50 ±1.94	47.95 ±1.48	49.20 ±1.68	47.40 ±1.53	49. ±1.55
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	1.10±0.151	1.00±0.149	1.16±0.149	1.15±0.155	1.12±0.149	1.2±0.155
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	33.50±1.83	^{e} 49.70±1.44	^{a} 25.40±1.88	^{c} 44.20±1.95 ^{e}	^{a,b} 22.89±1.82	^{c,d} 41.80±1.55 ^{e}
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكروموول/لتر)	7.87±0.36	^{e} 5.85±0.36	^{a} 11.25±0.51	^{c} 8.26±0.45 ^{e}	^{a,b} 12.90±0.42	^{c} 9.33±0.50 ^{e}
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	51.80 ± 3.31	^{e} 41.50 ± 2.89	^{a} 62.25 ± 3.12	^{c} 46.55 ± 3.21 ^{e}	^{a,b} 67.28 ± 2.88	^{c,d} 51.96 ± 3.06 ^{e}

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد بدون مضاد أكسدةb: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد بدون مضاد أكسدة

c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +فيتامين E d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث +فيتامين E e : مقارنة تأثير وسط التجميد بدون مضاد أكسدة مع تأثير وسط التجميد +فيتامين E

جدول (4 -7) يبين تأثير مدة التجميد وإضافة فيتامين(E) في معالم النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطفOligozoospermic Patients

التجميد والإذابة / معالم النطف	بعد التجميد والإذابة					
	ألشهر الأول		الشهر الثاني		الشهر الثالث	
	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين E	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين E	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين E
تركيز النطف مليون / مل	3.30±0.26	3.45±0.32	3.45±0.302	3.65±0.279	3.45±0.302	3.40±0.27
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	26.13±1.33	41.10±1.8 e	a 20.40±1.08	c 36.90±1.41 e	a,b 16.65±2.140	c,d 32.15±2.1 e
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	43.70±1.21	43.80±1.29	43.10 ±1.08	43.20 ±1.06	43.20±1.06	43.50± 1.20
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	2.4±0.22	2.45±0.19	2.41±0.22	2.41±0.267	2.35±0.221	2.45±0.197
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	26.40±2.14	42.50±1.4 e	a 21.25±2.27	c 39.10±1.62 e	a,b 15.95±1.97	c,d 34.60±1.7 e
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/لتر)	12.15±0.58	9.285±0.6 e	a 14.98±0.750	c 11.225±0.6 e	a,b 17.312±0.84	c,d 13.8±0.57 e
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	63.2±3.28	48.85±3.4 e	a 71.50±3.46	c 54.95±3.59 e	a,b 78.50±2.85	c,d 60.80±3.2 e

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد بدون مضاد أكسدةb: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد بدون مضاد أكسدة

c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +فيتامين E d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث +فيتامين E e : مقارنة تأثير وسط التجميد بدون مضاد أكسدة مع تأثير وسط التجميد +فيتامين E

جدول (4 - 8) تأثير مدة التجميد وإضافة (GSH) في معالم النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف Oligozoospermic Patients

التجميد والإذابة / معالم النطف	بعد التجميد والإذابة					
	ألشهر الأول		الشهر الثاني		الشهر الثالث	
	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين GSH	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين GSH	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+فيتامين GSH
تركيز النطف مليون / مل	4.05±0.369	4.40±0.40	4.20±0.343	4.50±0.428	4.3±0.37	4.25±0.375
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	26.60±1.20	42.50±1.6 e	a 21.10±0.62	c 38.90±1.35 e	a ,b 17.10±0.67	c,d35.80 ±1.03 e
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	42.60± 1.63	43.1± 1.55	42.0± 1.39	42.85± 1.54	41.75± 1.24	42.1± 1.53
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	2.3±0.15	2.2±0.10	2.4±0.15	2.25±0.105	2.4±0.15	2.25±0.105
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	30.1 ± 1.66	43.30±1.99 e	a 24.60±1.63	c 39.85±2.1 e	a,b20.60±1.51	c36.95±2.14 e
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/لتر)	12.13±0.6	9.38±0.43 e	a 16.26±0.6	c 11.73±0.60 e	a,b 18.26±0.79	c,d 13.47±0.62 e
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	61.1±1.48	47.7±1.58 e	a 71.7±1.38	c 55.5±2.31 e	a ,b 79.55±1.10	c,d 59.75±2.17 e

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية ($P<0.05$) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد بدون مضاد أكسدةb: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد بدون مضاد أكسدة

c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد + GSH d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث + GSH e : مقارنة تأثير وسط التجميد بدون مضاد أكسدة مع تأثير وسط التجميد + GSH

جدول (4 - 9) يبين تأثير مدة التجميد وإضافة (E+ GSH) في معالم النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف Oligozoospermic Patients

التجميد والإذابة / معالم النطف	بعد التجميد والإذابة					
	ألشهر الأول		الشهر الثاني		الشهر الثالث	
	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+ (E + GSH)	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+ (E + GSH)	وسط التجميد بدون مضاد أكسدة	وسط التجميد+ (E + GSH)
تركيز النطف مليون / مل	3.90 ± 0.28	4.0 ± 0.33	3.95 ± 0.302	4.10 ± 0.38	3.90 ± 0.31	3.90 ± 0.31
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية(%)	25.70 ±0.78	49.20 ±1.6 e	a20.50 ±0.62	c44.00 ±1.35 e	a,b17.10 ±0.67	c,d39.40 ±1.03 e
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	44.40± 1.81	45. ± 1.70	44. ± 1.63	44.7 ± 1.70	43.65 ± 1.60	44.15 ± 1.50
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	2.40 ± 0.16	2.40 ± 0.16	2.40 ± 0.16	2.40 ± 0.16	2.40 ± 0.16	2.40 ± 0.16
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	28.40 ± 0.97	47.55 ± 1.7 e	a 22.0 ± 0.79	c 42.90 ± 1.28 e	a,b 17.20 ± 0.93	c,d 38.50 ± 1.2 e
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/لتر)	12.6 ± 0.69	8.39 ± 0.54 e	a 15.24 ± 0.63	c 10.10 ± 0.56 e	18.68 ± 0.841	c,d 11.97 ± 0.5 e
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	65.18 ± 1.84	43.40 ± 1.4 e	a 73.92 ± 2.27	c 47.34 ± 2.09 e	a,b 81.15 ± 1.74	c,d 54.30 ± 1.8 e

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد بدون مضاد أكسدة b: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد بدون مضاد أكسدة

c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +(E+ GSH) d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث +(E+ GSH) e : مقارنة تأثير وسط التجميد مع تأثير وسط التجميد +(E+ GSH)

جدول (4 - 11) تأثير مدة التجميد وإضافة فيتامين (E) في معالم النطف ومستوى المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients

التجميد والإذابة / معالم النطف	بعد التجميد والإذابة					
	ألشهر الأول		الشهر الثاني		الشهر الثالث	
	وسط التجميد	وسط التجميد+فيتامين E	وسط التجميد	وسط التجميد+فيتامين E	وسط التجميد	وسط التجميد+فيتامين E
تركيز النطف مليون / مل	7.20 ± 1.27	7.70 ± 1.272	7.50 ± 1.34	7.60 ± 1.31	7.55 ± 1.334	7.40 ± 1.299
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	31.4 ± 1.65	41.48 ± 1.40^{e}	$^{a}26.13 \pm 1.36$	$^{c}36.5 \pm 1.49^{e}$	$^{a,b}23 \pm 1.48$	$^{c,d}31.76 \pm 1.66^{e}$
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	35.9 ± 2.28	36.5 ± 1.38	33.8 ± 2.24	35.1 ± 1.35	$^{a}31.5 \pm 2.24$	$^{c}33.7 \pm 2.15$
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	2.40 ± 0.16	2.40 ± 0.16	2.40 ± 0.16	2.40 ± ± 0.16	2.40 ± 0.16	2.40 ± 0.16
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	28.8 ± 1.61	41.5 ± 1.49^{e}	$^{a}23.3 \pm 1.601$	$^{c}37.2 \pm 1.70^{e}$	$^{a,b}20.6 \pm 1.72$	$^{c,d}33.5 \pm 1.49^{e}$
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/لتر)	14.59 ± 0.98	12.42 ± 0.89^{e}	$^{a}18.31 \pm 1.075$	$^{c}14.85 \pm 1.04^{e}$	$^{a,b}19.70 \pm 1.35$	$^{c}16.12 \pm 1.11^{e}$
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	68.40 ± 1.87	53.70 ± 1.54^{e}	$^{a}74.50 \pm 1.57$ -	$^{c}60.90 \pm 1.62^{e}$	$^{a,b}82.50 \pm 1.63$ -	$^{c,d}66.30 \pm 1.74^{e}$

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد b: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد

c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +فيتامين E d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث +فيتامين E e : مقارنة تأثير وسط التجميد مع تأثير وسط التجميد +فيتامين E

جدول (4 - 12) تأثير مدة التجميد وإضافة (GSH) في معالم النطف وتركيز المالون داي الديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients

التجميد والاذابة / معالم النطف	بعد التجميد والإذابة					
	ألشهر الاول		الشهر الثاني		الشهر الثالث	
	وسط التجميد	وسط التجميد+ GSH	وسط التجميد	وسط التجميد+ GSH	وسط التجميد	وسط التجميد+ GSH
تركيز النطف مليون / مل	7.80± 1.07	7.750±0.97	8.20±1.07	7.90± 1.03	7.80± 1.01	7.80±1.08
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (%)	31.48±1.65	41.38±1.01 e	a 26.13±1.36	c 35.57± 1.49 e	a ,b 22. 3±1.489	c,d 30.76±1.66 e
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	40.4± 1.61	41.9± 1.71	39 ± 1.45	40.3± 1.60	a 37.7± 1.76	c 38.7± 1.62
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	2.50± 0.17	2.50 ±0.17	2.50± 0.17	2.50 ±0.17	2.50± 0.17	2.50 ±0.17
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	29.10 ±1.12	40.20±2.11 e	a 24.40±1.15	c 35.70±1.68 e	a ,b 21.90±0.72	c 32.70±1.62 e
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/لتر)	15.41±0.742	12.65±0.31 e	a 18.56±0.97	c 15.59±0.61 e	a ,b 21.37±0.90	c,d 17.21±0.54 e
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	64.050±1.8	52.750±1.7 e	a 72.77±1.83	c 58.49±1.74 e	a,b 78.78±2.15	c,d 65.3±1.61 e

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد b: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد

c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +GSH d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث +GSH e : مقارنة تأثير وسط التجميد مع تأثير وسط التجميد +GSH

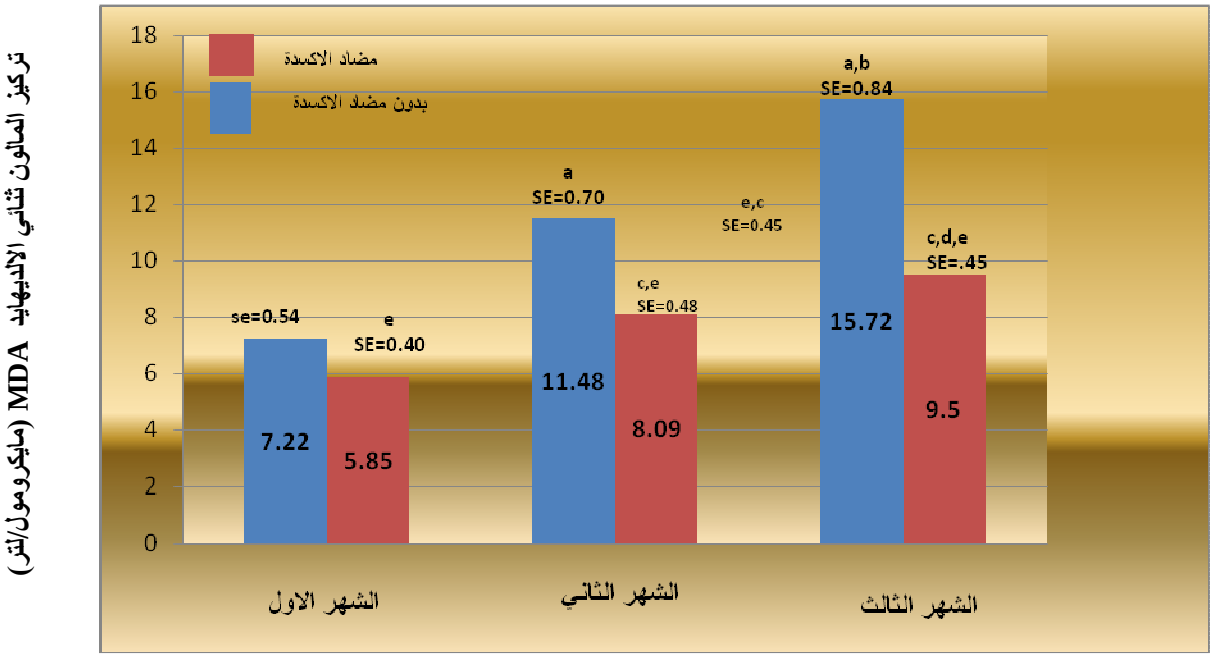
جدول (4 - 13) تأثير مدة التجميد واضافة (E+ GSH) في معالم النطف ومستوى المالون داي الديهايدMDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients

التجميد والإذابة / معالم النطف	بعد التجميد والإذابة					
	ألشهر الأول		الشهر الثاني		الشهر الثالث	
	وسط التجميد	وسط التجميد+ (E+ GSH)	وسط التجميد	وسط التجميد+ E+ (GSH)	وسط التجميد	وسط التجميد+ (E+ GSH)
تركيز النطف مليون / مل	8.40±0.8	8.55±0.95	8.60±0.81	8.40±0.85	8.70±0.88	8.60 ±0.78
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية(%)	29.45±1.33	45.70±1.89 e	a 24.0±0.88	c 41.30±1.69 e	a,b19.55±0.94	c,d 37.70 ±1.75 e
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	43.5± 1.78	45.5± 2.06	42. ± 1.25	44.1± 1.88	a 40.6± 1.97	c 42.7±1.84
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل	2.20±0.15	2.10±0.15	2.10±0.15	2.05±0.15	2.20±0.15	2.1±0.15
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	30.6±1.92	46.2±2.11 e	a 25.6±1.83	c 40.7±1.75 e	a ,b 20.1±1.36	c,d 37.8±2.19 e
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول/لتر)	13.69±0.68	10. 9±0.79 e	a 17.30±0.97	c 13.02±0.82 e	a ,b 19.66±1.15	c,d 14.65±0.86 e
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي (%)	66.70±2.04	47.20±1.86 e	a 70.10±2.17	c 53.40±2.22 e	a,b 78.80±1.88	c,d 59.46±2.12 e

الأرقام في الجدول تمثل المعدل ± الخطأ القياسي SE عدد المرضى = 10

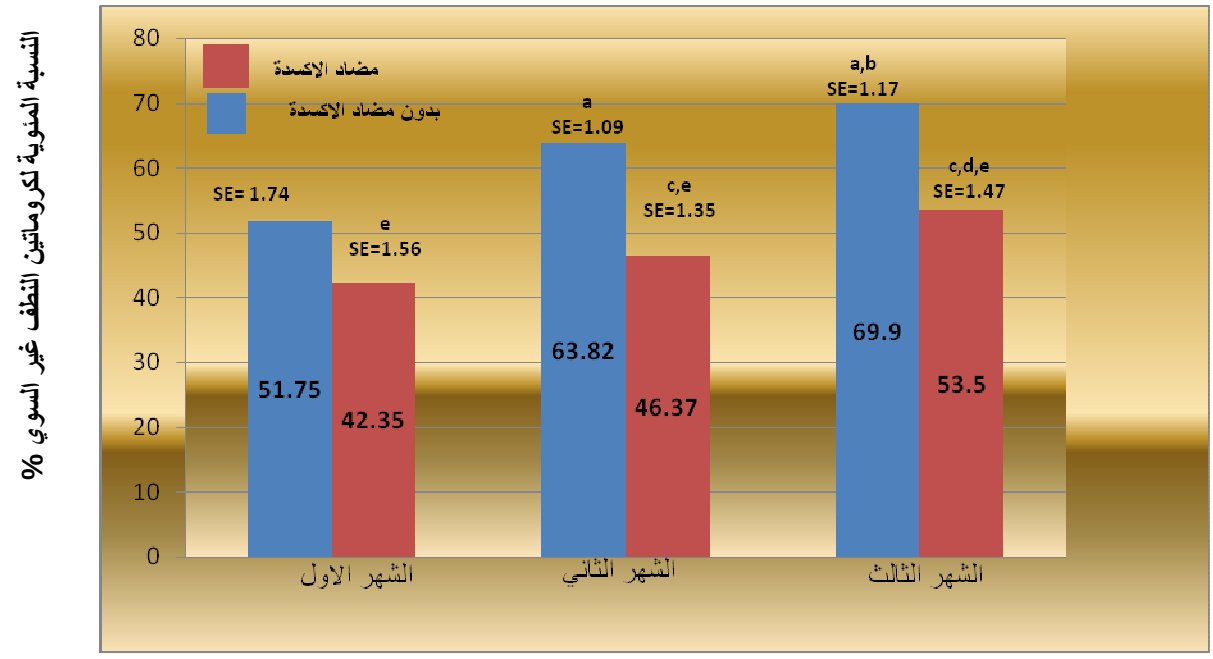
الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد b: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد

c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +(E+ GSH) d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث +(E+ GSH) e : مقارنة تأثير وسط التجميد مع تأثير وسط التجميد (E+ GSH)



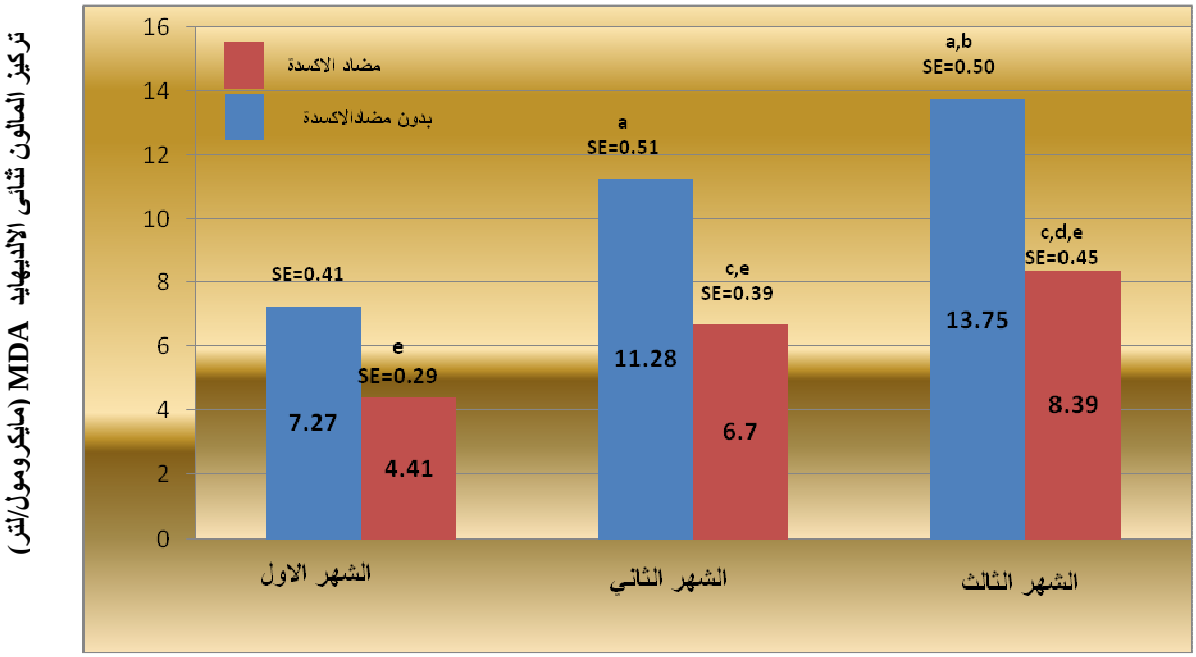
شكل (4 -11) تأثير إضافة مضاد الاكسدة نوع الكلوتاثايون إلى وسط التجميد في تركيز المالون ثنائي الالديهايد MDA (مايكرومول/لتر) لمرضى سواء النطف. عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد b: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد . c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +مضاد الأكسدة d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث + مضاد الأكسدة e : مقارنة تأثير وسط التجميد مع تأثير وسط التجميد + مضاد الأكسدة .



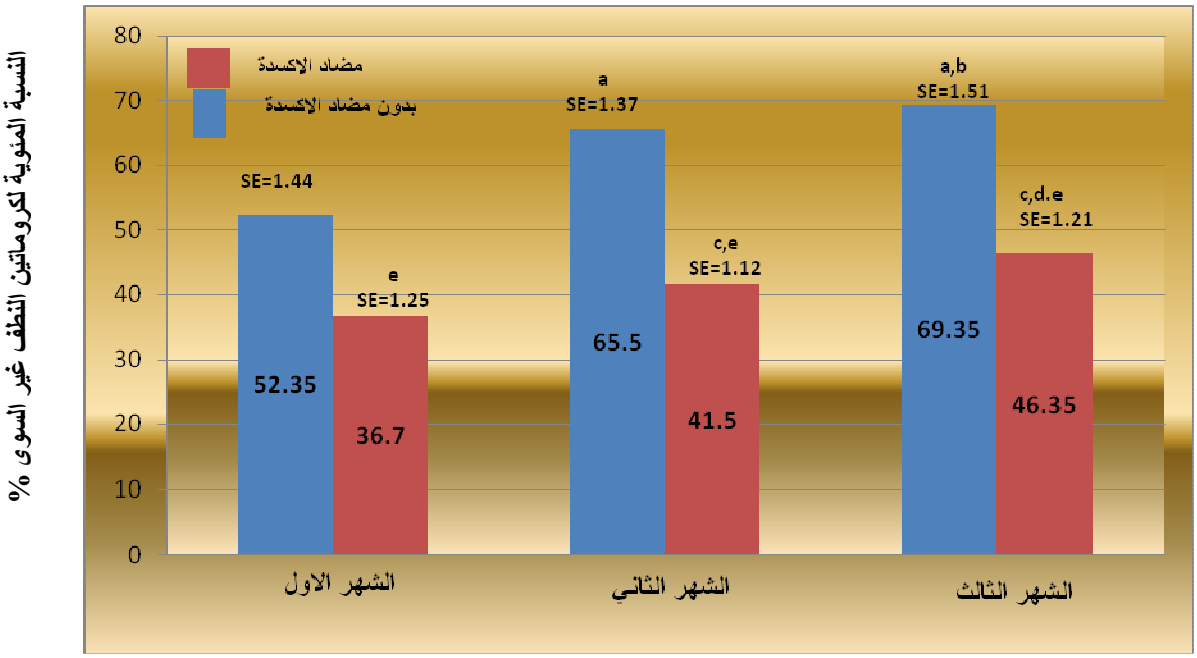
شكل (4 - 12) تأثير إضافة مضاد الأكسدة نوع الكلوتاثايون الى وسط التجميد في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى سواء النطف. عدد المرضى = 10 الأرقام داخل الشكل تمثل المتوسط

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد b: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد . c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +مضاد الأكسدة d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث + مضاد الأكسدة e : مقارنة تأثير وسط التجميد مع تأثير وسط التجميد + مضاد الأكسدة .



شكل (4 - 13) تأثير إضافة مضاد الاكسدة نوع فيتامين E والكلوتاثايون إلى وسط التجميد في تركيز المالون ثنائي الالديهايد MDA (مايكرومول/لتر) لمرضى سواء النطف. عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد b: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد . c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +مضاد الأكسدة d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث + مضاد الأكسدة e : مقارنة تأثير وسط التجميد مع تأثير وسط التجميد + مضاد الأكسدة .



شكل (4 - 14) تأثير إضافة مضاد الأكسدة نوع فيتامين E والكلوتاثايون الى وسط التجميد في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى سواء النطف. عدد المرضى = 10

الحروف المختلفة دلالة على وجود الفروق المعنوية (P<0.05) : a: مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد b: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث وسط التجميد . c : مقارنة مع ألشهر الأول وسط التجميد +مضاد الأكسدة d: مقارنة الشهر الثاني مع الثالث + مضاد الأكسدة e : مقارنة تأثير وسط التجميد مع تأثير وسط التجميد + مضاد الأكسدة .

الفصل الأول

المقدمة

إن عدم الخصوبة infertility حالة مرضية تؤثر في حوالي 15% من مجموع الأزواج الذين يرغبون بالحصول على أطفال،وهي مشكلة طبية لها تأثيرات نفسية كبيرة، تشكل عوامل عدم الخصوبة الذكرية ما نسبته حوالي 50% من هذه الحالة ويكون حوالي 25% منها أسبابها غير مشخصة Idiopathic (Jungwirth *et al*,2012) .

.

وخلال العقود الأخيرة الماضية شهدت علاجات حالات عدم الخصوبة تطورا" ملحوظا نتيجة التقدم المستمر في تقنيات التكاثر المعان Assisted reproduction techniques(ART) وتقنيات التعامل والتداخل الخلوي cell manipulation فأصبح المرضى الذين لم تنجح معهم التداخلات الطبية مثل مرضى انعدام النطف azoospermic أو قلة النطف Oligozoospermic يمتلكون الفرصة لان يحصلوا على الأطفال إذا أمكن الحصول على نطفة مفردة فقط لغرض استخدامها في التلقيحات داخل المختبر(Sinan *et al*,2008). فأصبحت تقنيات التكاثر المعان خياراً علاجياً ناجحاً للعديد من حالات عدم الخصوبة ،وعموما" لاتزال معدلات النجاح فيها دون المستوى المطلوب (Said *et al* , 2008).

وتشمل 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 يحد عندها التفاعلات الخلوية الكيموحيوية المسؤولة عن موت الخلايا 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) . وهناك نوعان من عمليات التجميد: عمليات التجميد البطيئة Slow Freezing وعمليات التجميد السريعة Rapid Freezing ،وكل الطرق تهدف إلى تحقيق غاية واحدة وهي محاولة الحفاظ على الخلية من تأثيرات التبريد و تكوين الثلج الخلوي والجفاف والتأثيرات السامة الحادثة عند الدرجة الحرارية المنخفضة، و إحدى تقنيات علم التجميد السريع 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 وسط 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) . أن نطف الحيوانات الثديية تكون ذات تحسسية مرتفعة إلى حالة خفض درجة الحرارة إلى ما بعد درجة انجماد الماء (صفر مْ) وذلك ناتج من الخصوصية في تركيب الأغشية البلازمية والأغشية داخل الخلوية والتي تعتبر مواقع رئيسية لحدوث الجرح الخلوي عند تجميدها (Bailey *et al*, 2003) . .

كما أوضحت الدراسات إن عملية التجميد تؤدي إلى حدوث انخفاض معنوي في مستويات كل من مضادات الأكسدة Antioxidants الإنزيمية وغير الإنزيمية بعد إجراء عمليات التجميد والإذابة

وحدوث زيادة في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS)Reactive Oxygen Species)في الوسط(Kumar *et al* ,2011) .و يؤدي زيادة مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS على حساب مضادات الأكسدة إلى حدو ث حالة الجهد التاكسدي oxidative stress وهي حالة تكون لها تأثيرات سلبية كبيرة وكل المكونات الخلوية للنطف مثل الدهون Lipids والبروتينات proteins والأحماض النووية Nucleic acid والسكريات sugars تكون أهداف محتملة لتأثيرات الإجهاد التاكسدي السامة (Sanocka, and kurpisz ,2004) .

.

إن الزيادة العالية في مستويات إلROS الأنواع الاوكسجينية الفعالة وانخفاض مضادات الأكسدة يؤدي كذلك إلى زيادة معدلات الموت الخلوي المبرمج في مجتمع الخلايا النطفية الموجود في العينة (Wang *et al*, 2003) .

لذا فان إجراء دراستنا الحالية هدف إلى :

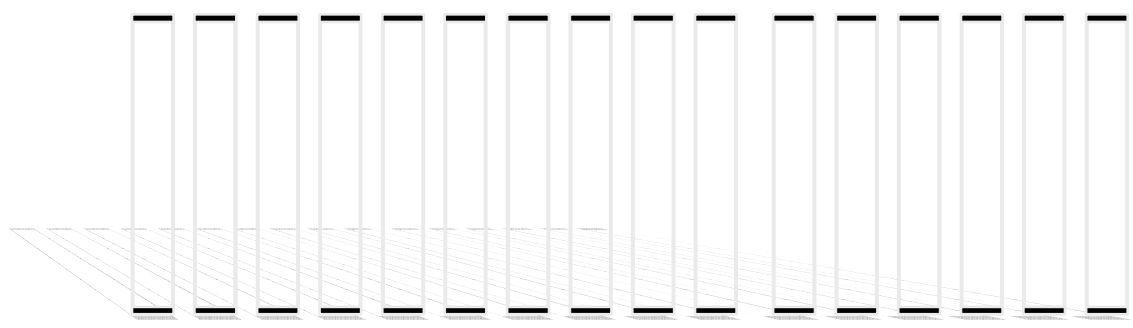
1- دراسة تأثير عمليات التجميد السريع والإذابة في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة والضرر في كروماتين النطف وعلاقة ذلك مع معالم النطف المتمثلة بتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشيه النطف والنسبة المئوية للنطف السوية .

2- دراسة تأثير مدة التجميد في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة والضرر في كروماتين النطف وعلاقة ذلك مع معالم النطف المتمثلة بتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشيه النطف والنسبة المئوية للنطف السوية .

3- بيان دور إضافة مضادات الأكسدة في الحفاظ على كفاءة النطف الوظيفية من تأثير عمليات التجميد السريع والإذابة وعامل الزمن ومن ثم إمكانية الاستفادة منها في زيادة نسب نجاح عمليات أطفال الأنابيب والحقن ألمجهري للنطف مستقبلاً .

الفصل الثاني

استعراض المراجع



1.2.: عدم الخصوبة :Infertility

هو عدم القدرة على الحمل بعد مرور عام على الزواج المستمر غير المقيد دون استعمال موانع الحمل (Zavos *et al* ., 1999). ويتحقق الحمل أثناء السنة الأولى في الأحوال الاعتيادية لدى (80%) من الأزواج الذين لا يتعاطون موانع للحمل، وبخلاف ذلك فان الحالة تتطلب تدخلاً طبياً لتقييم نوع العقم وسببه (McClure, 1992). و حالة عدم الخصوبة ظاهرة منتشرة في كل إرجاء العالم، حيث أن حوالي 15% من الأزواج لديهم مشاكل في الخصوبة (Poppe and velkeniers ., 2002) .

هناك عدة أسباب يمكن إن تؤدي إلى حالة عدم الخصوبة، وتكون 30-40% من الحالات بسبب الزوجة و30% بسبب الزوج بينما يساهم الزوجان معاً بنسبة 15-30% من الحالات (Isidori *et al*., 2005) . و حوالي 14% من حالة عدم الخصوبة تكون غير مشخصة لان الفحوصات الأولية والأساسية لكلا الزوجين طبيعية ولا يحدث الحمل (Keck *et al*., 2007) .

تصنف حالات عدم الخصوبة بشكل عام إلى صنفين:

A - عدم الخصوبة الأولي: Primary Infertility

وهي الحالة التي لا يحدث فيها الحمل لدى الزوجين مطلقا" ويشكل نسبة 61.9 %

B - عدم الخصوبة الثانوي: Secondary Infertility

وهي الحالة التي يحدث فيها الحمل لدى الزوجين مرة واحدة على الأقل، ولا يستطيعان تحقيقه مرة أخرى ويشكل نسبة.1 38 % (Akhter *et al*. ; 2011).

تعرف حالة عدم خصوبة الذكر Male Infertility عموما" بأنها الخلل الحاصل في معالم المني Semen Parameters ونوعيته (Cooper *et al*. ; 2010) ، و السائل المنوي هو سائل يقذف عند ذروة الجماع و يتألف من مزيج من النطف و البلازما المنوية، الذي يحملها و يغذيها و يوفر لها الحماية و ينقلها في تياراته و هي سابحة الى إن تصل إلى الرحم (Ganong, 2005)، وتمثل البلازما المنوية Seminal plasma أكثر من 90% من حجم المني المقذوف ، و يتصف هذا السائل بخصوصيته الكيميائية التي تستخدم مؤشرا عن الحالة الوظيفية للغدد الملحقة ، والسائل المنوي غير متجانس في تركيز النطف، لذلك فان فحص العينة المجزأة يعطي نتائج خاطئة، فالجزء الأول من السائل المنوي الذي مصدره الخصيتان والبربخ والاسهر والبروستات يكون أكثر تركيزا في عدد النطف من الجزء الثاني الذي ينشأ من الحويصلات المنوية ، و هذه حقيقة ثابتة في 95% من الحالات، بينما نقيضه يشمل 5% من الحالات، أي إن الجزء الثاني هو الأغنى بالنطف (WHO, 1999).

يكون المني السوي الطازج ذا مظهر رمادي – ضبابي متجانسا و عالي اللزوجة ،عبارة عن خثره Coagulum ، تتميع خلال (60) دقيقة بدرجة حرارة الغرفة تلقائيا تحت تأثير الأنزيمات ذات المنشأ البروستاتي لتكوين سائل لزج شفاف ذي قلوية طفيفة يتراوح أسه الهيدروجيني pH بين 7.4– 8 (WHO,2010). وحدثت خلال العقود القليلة الأخيرة العديد من النقاشات حول أدلة انخفاض معايير نوعية المني المسببة للحمل والتي تُعرف بانها: تركيز النطف (Sperm Concentration) وعدد النطف (Sperm Count)و حركة النطف (Sperm Motility) ومظهر النطف (Sperm Morphology) وهذه المواصفات استخدمت لغرض تقييم خصوبة الذكورMale Fertility ، وطبقاً إلى دليل منظمة الصحة العالمية 1999 تكون صفات المني الطبيعي كما يلي :

جدول (2-1): صفات المني الطبيعية

الاختبارات القياسية Standard tests	القيم الطبيعية Normal values
الحجم Volume	2.0 ml أو أكثر
تركيز النطف Sperm concentration	$20 * 10^6$ / مل أو أكثر
عدد النطف الكلية Total sperm count	$40 * 10^6$ / القذفة
حركة النطف Motility	50% أو أكثر ذات حركة تقدمية أو 25% أو أكثر ذات حركة تقدمية سريعة ضمن إل60 دقيقة الأولى بعد القذف
المظهر الخارجي Morphology	30% أو أكثر من النطف ذات المظهر الخارجي السوي
العيوشية iability	75% أو أكثر من النطف تكون حية
خلايا الدم البيضاء White blood cells	$< 1 * 10^6$ / مل

2:2 : العوامل المسببة لعدم خصوبة الذكور : Etiology of male infertility

إن التعرض للعوامل الخارجية ومنها العوامل البيئية و إنماط الحياة life style and Environmental factors ، يمكن أن يضر الخصوبة عند الرجل ويؤدي إلى انخفاض نوعية المني البشري (Tsujimura *et al.*,2004) . فمثلا اختلاف درجة الحرارة في الصيف والشتاء هي من العوامل المناخية التي قد تؤثر على نوعية المني وقد يكون لها تأثير في حركة النطف وعددها وشكلها الطبيعي (Ganong, 2005) . ويؤدي التعرض للإشعاع Radiation exposure إلى ضرر في الخلايـــا الطلائيـــة الجرثوميـة Germinal epithelium cells التي تكون حساسة جدا للأشعة ، حيث بينت دراسة Takagi وجماعته (2001) إن التعرض للإشعاع مثل أشعة x المؤينة تحفز حدوث حالة الجهد التاكسدي Oxidative stress(OS) الذي يؤدي إلى حدوث حالة موت النطف المبرمج. وإن التعرض للمعادن مثل الكادميوم و الخارصين و الزرنيخ و المنغنيز التي تستخدم في بعض الصناعات قد يؤدي الى الإضرار بعملية نشأة النطفة و إقلال عدد النطف و حركتها وإشكالها السوية (Telisman *et al* ., 2000)، إضافة لذلك ، فقد يؤثر التعرض لهذه المعادن الثقيلة في وظيفة النطفة وذلك بتنشيط الجذور الحرة Free radicals من الأنواع الأوكسجينه الفعالة Reactive oxygen species (ROS) (Paul and Frazier., 2000).

يُعدُّ التقدم في العمر Age واحداً من الأسباب التي تؤدي إلى مشاكل الخصوبة كما إن نوعية السائل المنوي يمكن إن تقل مع تقدم العمر (Check *et al*., 1998)، يكون زيادة العمر عند الرجال مصاحباً للتغيرات في الخصية وتضييق وتصلب أنسجة التجويف الأنبوبي و نقصان في نشاط النطف و تراجعاً في الخلايا الجرثوميـة germ cells وخلل في وظيفة خلايـــا لا يدك وخلايـــــا سيرتولي (Vermeulen and kaufman , 1995) ، كذلك قد تخفض الشيخوخة النوعية الوراثية للنطفة من خلال زيادة تغيرات الخلية الجرثومية و خلل الحامض النووي منقوص الأوكسجين deoxyribonucleic acid (DNA) (Rolf and Nieschlag , 2001).

إن بعض العقاقير يمكن إن تؤثر في نوعية السائل المنوي حيث وجد Hargreave وجماعته (1998) في دراسة أجريت عن تأثيرات بعض العوامل المضادة للجراثيم في خصائص حركة النطف والعيوشية Viability وقابلية النطف على تفاعل الجسيم الطرفي Acrosome reaction ، إن تأثيرات بعض هذه الأدوية تكون على الأغلب غير عكسية Irreversible ،و تقوم بعض العوامل الدوائية مثل المهدئات tranquilizer و الأدوية المضادة للجهاز الباراسمبثاوي anticholinergics والأدوية المضادة للحساسية antihistamines و الأدوية المخدرة

الموضعية local anesthetics و الأدوية المعاكسة لمستقبلات إلفا وبتا السبمثاوية α and β adrenergic blocking agents بتثبيط حركة وايض النطف . و في دراسة أجراها Abd-allah و جماعته (2000) وجدوا إن العلاج بكل من الافلوكساسين Ofloxacin والسيبروفلوكساسين Ciprofloxacin يؤدي الى نقصان في عدد النطف والحركة والانتاج اليومي للنطف بطريقة معتمدة على الجرعة المعطاة في ذكور الجرذان . إن وجود الخمج في القنوات التناسلية – البولية عند الرجال من أهم العوامل المسببة لعدم خصوبة الرجال في العالم (Ibadin and Iben, 2008). وقد وجد إن التهابات وخمج Infection and inflammation القنوات التناسلية ترتبط بنسبة تقدر بحوالي 8-35% من أسباب عدم الخصوبة في الرجال(Askienazy-Einhar ,. 2005) .

إن وجود البكتريا في المني bacteriaspermia غير المصحوب بالأعراض السريرية asymptomatic يمكن إن يلعب دوراً رئيساً في عدم خصوبة الرجال (Bukharin *et al.*, 2000 and Li and Lui., 2002)، و يعتبر خمج الغدد الجنسية الملحقة عاملاً رئيساً في إحداث عدم الخصوبة (Diemer *et al.*, 2000) . و يطلق على وجود الخمج الذي يمكن مشاهدته من خلال متابعة وجود خلايا الدم البيض في المني بابيضاض المني leukocytospermia

.(Gonzales *et al.*, 1992)

ومن الأسباب الشائعة لعُقمِ الذكور وجود مشكلة في إنتاج النطف في الخصى و يعاني حوالي ثلثي الرجالِ عديمي الخصوبة من هذه المشكلة ، وهناك عدد مِنْ العواملِ يُمْكِنُ إن تُعرقلَ إنتاجَ النطف ومنها الخصيةِ غيرِ المُنْحَدرةِ undescended testis و النكافِ mumps و الحرارة heat و الأضداد النطفية sperm antibodies والقيلة الدوالية varicocele والضرر الناتج من الأدوية أَو إلا شعاع drugs or radiation damage (Sigman *et al.* ,. 1993).

إن العوائق أو التضيق في الأنابيب الناقلة للنطف مِنْ الخصى إلى القضيبِ يُمْكِنُ إن يُسبّبَ قلةَ النطف ، ويعد هذا ثاني سبب شائع مِنْ عُقمِ الذكور ويؤثّرُ في حوالي ثلاثة لكُلّ 20 رجلاً عديم الخصوبة ،ويدخل ضمن ذلك حالة إزالة الوعاء الناقل vasectomy . (Backman *et al* .2006,.).

إن صعوبات الاتصال الجنسي، مثل مشاكلِ القذفِ ejaculation أَو الانتصاب erection ، يُمْكِنُ إن تمْنعَ حدوث الحمل ،وهناك عدد من الأسباب المؤدية إلى التأثير على الانتصاب اوالقذفَ منها ضرر العصبِ بعد أمراض الحبل ألشوكي و مرض السكّري و جراحة البروستاتِ أَو الحوضِ (Frajese and Pozzi. ,2005).

إن وجود الأضداد النطفية Sperm antibodies في بَعْض الرجالِ، يُمْكِنُ إن تؤدي إلى قلة حركةَ النطف ومْنعُ ارتباطها مع البيضة أثناء إلاخصابِ. وحوالي واحد في كُلّ 16 رجلاً عقيماً يعانون من وجود الأضداد النطفية (Backman *et al*. ,.2006).

إن بَعْض العقاقير المستخدمة في مُعَالَجَة الكآبةِ أَو ضغطِ الدمّ العاليِ قَدْ يُسبّب خللا في القذفِ والانتصاب أيضاً. وعموما المشاكل الجنسية لَيستْ من الأسباب الشائعة في عُقمِ الذكور وتُؤثّرُ في حوالي أقل مِنْ واحد في كل 100 رجلِ عقيم (Frajese and Pozzi ,.2005).

تعد الاضطرابات التي قد تصيب الغدد الصم من الأسباب المهمة لعدم خصوبة الذكور لان الخلل الهرموني الحاصل في تحت المهاد Hypothalamus أو الغدة النخامية Pituitary gland يؤدي إلى نقص في إنتاج الهرمونات ألموجهه للمناسل ومن ثم حدوث خلل في عملية تكوين النطف Spermatogenesis (Ishikawa *et al*. ; 2004) ،لان عملية تكوين النطف تحتاج لتنظيم هرموني يبدأ من تحت المهاد والذي يحفز إفراز الهرمونات المحررة لمغذيات القند Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) وبدوره يحفز النخامية لإفراز هرمون المحفز للجريب Follicle Stimulating Hormone (FSH) وهرمون اللوتيني Luteinizing hormone (LH) ليقوما بدورهما بإكمال عملية تكوين النطف (Gupta *et al*. ; 2002) ، لذا فان ارتفاع هرمون المحفز للجريب (FSH) و انخفاض مستوى هرمون التستوستيرون

(T) Testosterone أو ارتفاع هرمون الحليب Prolactine يرافقهما انخفاض في عدد النطف وضعف حركتها (Geidam *et al*. ; 2008) .

كما إن القيلة الدوالية varicocele أَو توسُّع الوريد المنويِ، والذي يَحْدثُ نموذجياً على الجانب الخصوي الأيسر فقط يُرتَبطُ مع زيادةِ عدم خصوبة الذكور (Fretz and Sandlow ,2002)، حيث يَزِيدُ الدوالي التجريبيُ في الحيوانات المختبريةِ تدفق الدمّ الخصوي blood testicular ودرجة الحرارة وتسبب انخفاض في ناتجِ الخصية من النطف (Turner ,2001)، و تعد القيلة الدوالية من أكثر الأسباب شيوعا لعدم خصوبة الرجال والتي يمكن معالجتها بوساطة التداخل الجراحي. لقد لوحظ إن 9-15% من الرجال يعانون من وجود القيلة الدوالية (Aziz *et al*., 2006)، وقد ثبت إن 17% من الرجال الخصبين وحوالي 39% من الرجال غير الخصبين يعانون من وجود القيلة الدوالية (Li *et al*., 1999).

3.2: عوامل عدم خصوبة الذكور : Male Factors Infertility

1. 3.2: فقدان المني : Aspermia

يقصد به انعدام الدفق Unejaculate (WHO , 2010) ، إن الخلل في وظائف عنق المثانة bladder neck dysfunction قد يؤدي إلى انخفاض حجم المني أو غيابه وهذه الحالة تلاحظ في الأشخاص المصابين بداء السكري أو الأشخاص الذين استخدموا العمليات الجراحية للمنطقة البولية التناسلية مثل جراحة عنق المثانة bladder neck surgery أو استئصال جزئي للبروستات prostate عبر الاحليل، أو يحدث نتيجة القذف الرجعي Retrograde ejaculation (جريان المني إلـى المثانة في وقت الذروة) (Jarow *et al.* ; 2002) ، أو قد تكون أسبابهُ حالات عصبية غير سوية من أكثرها شيوعاً حصول إضرار في الحبل ألشوكي Spinal cord injury أو أسباب تتعلق بضرر الحوض Pelvic injury أو قد تكون نفسية Psychological (Elliott *et al.* , 2000) .

2. 3. 2 :اللانطفية Azoospermia

ويقصد بها انعدام النطف في الدفق بعد إجراء عملية الطرد المركزي للعينة وفحص الحبيبة النطفية (WHO ,2010) ويشكل نسبة 5 – 20 % من حالة عدم الخصوبة الذكرية . وأشار Al-Alousi (2004) إلى إن نسبة مرضى اللانطفية في العراق تشكل حوالي % 26.8 من مرضى عدم خصوبة الذكور ، ويمكن تصنيف حالة اللانطفية إلى نوعين : اللانطفية غير الانسدادية NON - Obstructive Azoospermia (NOA) و اللانطفية الانسدادية Obstructive Azoospermia (OA) والتمييز بينهم غير محدد ويتطلب تدخلاً جراحياً في اغلب الأحيان (Batruch *et al.* ,.2011):

A - اللانطفية الانسدادية Obstructive Azoospermia :-

ينعدم في هذه الحالة وجود النطف لحصول انسداد في الاقنية المنوية Seminal ducts وبالأخص الاسهر Vase defernse، ويحتل هذا النوع 40% من مجموع المرضى المصابين باللانطفية (Silber *et al.* , 1988) ، ويرافق هذا النوع خلل في إفرازات الغدد اللاحقة كالحويصلات المنوية . حيث يلاحظ انخفاض أو انعدام مستوى سكر الفركتوز في السائل المنوي (Schroeder-Printzen *et al.*, 2000) لدى بعض المرضى، بينما تكون عملية نشأة النطفة سوية عندهم كذلك يلاحظ إن مستويات هرمون الشحمون الخصوي Testosterone وهرمونات المحرضة للاقناد Gonadotropin طبيعية عند مرضى عقم اللانطفية الا نسدادي ،

وقد يعزى سبب الانسداد إلى كونه ولاديا Congenital أو مكتسبا Acquired نتيجة حصول خطأ في بعض العمليات الجراحية مثل الفتق Hernia أو عند قطع الاسهر Vasectomy

. (Kolettis,2003)

B- اللانطفية غير الانسدادية Non- Obstructive Azoospermia

يعاني مرضى عدم الخصوبة بحالة اللانطفية غير الانسدادية من حصول تلف في النسيج الظهاري المبطن للنبيبات ناقلة المني مما يسبب خللا" في عملية إنتاج النطف و هناك العديد من الأسباب التي تؤدي إلى حصول هذا الخلل كالاضطرابات في الغدة النخامية وتحت المهاد أو سرطان الخصية Testis cancer والقيلة الدوالية Varicocele ، فضلاً عن التعرض للإشعاعات أو المواد الكيميائية المضرة وبعض الاخماج التي تصيب الجهاز التناسلي الذكري مما تسبب تلفاً في نسيج الخصية ومن ثم حصول حالة اللانطفية غير الانسدادية (Garcia *et al.* , 2004) ، يرافق اللانطفية غير الانسدادية ازدياد مستوى هرمون FSH نتيجة للاختزال الحاصل في أعداد الخلايا الجرثومية و انخفاض مستوى هرمون الانهبين Inhibin ، لوجود اضطراب في خلايا سرتولي المسؤولة عن إنتاج هذا الهرمون وحصول خلل في تطور الصفات الجنسية الثانوية كتطور الثدي وأحيانا صغر حجم الخصى. (Hayes *et al.*,2001).

3. 3. 2 : قلة النطف : Oligozoospermia

يطلق مصطلح قلة النطف للدلالة على النقص في العدد السوي للخلايا النطفية (Johnson and Everitt,1988) ، وعندما يهبط عدد النطف في كل مليلتر واحد من السائل المنوي إلى اقل من حوالي 20 مليون نطفة ، يحتمل أن يصبح الشخص عديم الخصوبة ، حيث عُدَّ العدد الأخير حداً للعتبة Threshold limit في مجال خصوبة الذكور. والمريض بقلة المحتمل إنه يحتوي منيه بشكل عام على أقل من 20 مليون نطفة في المليلتر الواحد (WHO, 1999) ،و هذا الرقم من المحتمل إنه يعتمد بصورة رئيسية كنتيجة لدراسات Macleod and Gold اللذين وجدا إنه حوالي 5% من الرجال الخصبين كان لديهم تركيز النطف اقل من 20 مليون / مل (Zhang *et al.* , 2006) .

إن لتقدم العمر دوراً في اختزال العدد الكلي للنطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة فضلاً عن حجم القذفة ، فقد أشارت دراسات عديدة إلى إن الاختزال يبدأ من عمر 25 سنة ، ولكن هذا الاختزال لم يكن معنوياً (Kidd *et al.*, 2001). ويختزل تركيز النطف البشرية والتعداد الكلي لها

في المني المقذوف والنسبة المئوية للنطف المتحركة خلال فصل ارتفاع الحرارة حيث أشار Politoff وجماعته (1989) إلى إن اقل كثافة للنطف تحدث عندها. كما تعد القيلة الدوالية أحد أسباب قلة النطف الناتجة من ركود الدم الوريدي مما يؤدي إلى رفع درجة حرارة الخصية وحدوث تحطم في الحواجز الخصوية- الدموية مما يسبب إنتاجاً للأضداد النطفية (IgA) Immunoglobulin–A و Immunoglobulin – M (IgM) في المصل والمني ومن ثم حصول اختزال خصوبة الرجال (Silber , 2000) .، كما إن الإصابة بالالتهابات المزمنة chronic infection قد يؤدي إلى قلة النطف (Garcia *et al*. ,2004) . .

وفي وقت البلوغ تعد الإصابة بالتهاب الخصى الناتج من النكاف ألبلوغي Mumps Orhitis سببا لحالة قلة النطف الشديد حيث يهاجم فيروس النكاف الخصية ويحطم برنكيما الخصية مما يقلل من إنتاج الاندروجين ويرافقه ضمور في الخصية بنسبة 13% من مرضى قلة النطف الشديد (Forti and Krausz , 1998) . وبينت إحدى الدراسات على بعض مرضى العقم والمصابين بالنكاف إنخفاضا في مستوى هرمون الشحمون الخصوي مع ارتفاع في مستوى هرموني LH و FSH لديهم ، مما يشير إلى دور هذا الفيروس في أحداث إعاقة في وظيفة خلايا ليدك لخصى هؤلاء المرضى (Dejueq and Jogon, 2001). و أشارت نتائج الدراسة التي أجراها Abdul-Rashed (2007) إلى إن الجهد التاكسدي OS يزداد في السائل المنوي لدى الرجال المصابين بقلة النطف واللانطفية مقارنة مع الأشخاص الخصيبين كما لوحظ أيضا إنخفاض في مضادات الأكسدة في السائل المنوي . ويسبب التدخين واخذ الكحول و انعدام التوازن الغذائي والتعرض للتلوث بالمعادن الثقيلة تأثيرات سلبية على أعداد النطف (Abdulla ,.2005).

فضلاً عن إن التعرض للموجات الماكروية Microwave التي تصدر عن الهواتف النقالة Mobile phone المستخدمة لاوقات طويلة له تأثير سلبي على أعداد النطف (Kesari *et al.* ; 2010) ، وحركتها وتركيبها وقد تؤثر هذه الموجات أيضا على إفراز الهرمونات بسبب تأثيرها على خلايا لأيدك وخلايا سرتولي التي لها الدور في نشأة ونضوج النطف (Roosli *et al.* ; 2007) . وقد تعزى أسباب قلة النطف عند بعض المرضى إلى عدم الثبات في الانقسام الخيطي والذي يؤثر في جميع الكروموسومات ولكن بدرجات مختلفة اعتمادا على حساسيتها، ويعد التنظيم في الانقسام الخيطي ضروريا" لعملية إنتاج النطف، لذا فان الخلل الحاصل في الانقسام الخيطي يؤدي إلى قلة في إنتاج النطف فضلا" عن التغاير الكروموسومي Aneuploid في الخلايا النطفية ، وتعد حالات قلة النطف مجهولة السبب idiopathic

Oligospermia من الحالات الشائعة لدى الرجال المصابين بقلة النطف والقليل منها يعود لاسباب وراثية (Gazvani *et al*. ,. 2000).

1.3. 3.2 : تصنيف قلة النطف :

صنف Fauser وجماعته (1990) قلة النطف إلى ثلاث مجاميع رئيسة بالاعتماد على تعداد النطف في المليلتر الواحد من السائل المنوي هي :

1- قلة النطف الحاد ويتراوح العدد مابين 1-5 مليون نطفة / مل .

2 - قلة النطف المعتدل (Moderate Oligospermia) ويتراوح عدد النطف ما بين 5-10 مليون نطفة / مل . .

3- قلة النطف المتوسط (Mild Oligospermia) ويتراوح عدد النطف مابين 10الى اقل من 20 مليون نطفة / مل .

2.3. 3.2 : قلة النطف والهرمونات :

تؤثر الهرمونات بشكل مباشر في عملية نشأه النطفة ، واهم هذه الهرمونات هي هرمونات النخامية FSH و LH والبرولاكتين Prolactin وهرمون النمو Growth hormone ، بالاضافة الى هرمونات التستوستيرون Testosterone والانهبين Inhibin، وينظم إفراز هذه الهرمونات من خلال التغذية الاسترجاعية السالبة ، و إن أي خلل في كمية هذه الهرمونات في الجسم يؤدي إلى خلل في عملية نشاءه النطفة Spermatogenesis و إنخفاض في عدد النطف أو تردي نوعيتها ومن ثم يؤدي إلى إنخفاض أو إنعدام الخصوبة (كايتون ، 1997) . فقد أشار Sueldo وجماعته (1985) إلى وجود ارتباط بين المستوى العالي للبرولاكتين في البلازما المنوي وحدوث اختزال في عملية نشأة النطفة ، حيث أشارت دراسة المقاطع النسيجية للخصى إلى حدوث نقص معنوي في عدد سليفات الخلايا النطفية واورمات النطف لمرضى العقم الذين يعانون من ارتفاع مستوى هرمون الحليب (Hyperprolactinemia) . حيث يعمل البرولاكتين على تثبيط الهرمون النخامي المحرر لهرمونات القند GnRH من تحت المهاد، ومن ثم يؤدي إلى قلة الهرمون اللوتيني LH ، أي إن ارتفاع البرولاكتين يؤدي إلى تثبيط إفرازات التستوستيرون ، وبذلك فان ارتفاع تركيز البرولاكتين في الدم قد يؤدي إلى قلة أعداد النطف (Aiman *et al*. , 1988) . ويعد تقدير مستوى هرمون محفز الجريب FSHمن الاختبارات التشخيصية النافعة لدى المصابين باللانطفية وقلة النطف الحاد ، حيث تكون مناسيب هذا الهرمون مرتفعة على الأرجح لديهم (McClure , 1988) ، ومن المعروف إن هذا الهرمون له دور في المحافظة على ديمومة

إنجاز عملية نشأة النطفة بالإضافة إلى دوره في تنبيه خلايا سرتولي على إفراز الاستروجينات والبروتينات الرابطة للاندروجين ، الذي يحافظ على مستوى الاندروجينات في السائل المنوي (Ganong ,1991) .

4.3.2 : وهن النطف : Asthenozoospermia

تعرف حالة وهن النطف لدى مرضى عدم الخصوبة بانها الحالة التي تكون فيها النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية Forword Progression 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 هذة الحالة (Curi *et al* ,. 2003) . تعد حركة النطف احد أهم معالم السائل المنوي في تقويم الامكانية التخصيبية ، فالتحرك النشط والحركة التقدمية الجيدة تساعد النطف السوية في اختراق مخاط عنق الرحم والهجرة خلال القناة التناسلية الانثوية للوصول إلى قنوات فالوب لكي تتم عملية إخصاب البويضة (Aitken *et al*., 1983)، أما النطف غير المتحركة فلا تستطيع إخصاب البويضة مهما كان عددها (Morales *et al*., 1988). إن امكانية حدوث الحمل لزوجات المرضى المصابين بوهن النطف تكون ضعيفة جدا وذلك بسبب إنخفاض عدد النطف المتحركة الكلي الى حوالي 10^5- 10^6 خلال رحلة النطف في القناة التناسلية الانثوية، كما إن نجاح إنتقال النطف واختراقها لمخاط عنق الرحم يتناسب طرديا مع حركة النطف بشكل معنوي (Kolettis , 2003) . إن النسبة المئوية العالية من النطف غير المتحركة وغير الفعالة قد يشير الى إن هناك امراضاً او خللاً في البربخ Epididymal pathalogy (Correa- Perre,. 2004) ، وذلك يعود الى كون النطف تكتسب قدرتها على الحركة وقابليتها الأخصابية في أثناء مرورها على طول البربخ وخاصة منطقة ذيل البربخ حيث تعمل إفرازات البربخ على تطور حركة النطف (Roberts *et al*.,. 2006) .

قد تعزى حالات وهن النطف إلى حصول عجز في تركيب المايتوكوندريا Mitochondria والتي تعد الموقع الرئيس لتصنيع الادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) Adenosin Triphosphateوالذي بدوره يعد مصدر الطاقة لحركة النطف، عن طريق تحوله إلى الادينوسين داي الفوسفات (ADP) Adenosin Diphosphate فتنتقل الطاقة إلى ذيل النطفة ،و إن لتركيز ATP دوراً في تحديد تكرار ضربات ذيل النطفة (Kolettis , 2003) ،فقد أشارت دراسات عديدة إلى وجود ارتباط بين حجم بيوت الطاقة ونشاط سلسلة الأنزيمات التنفسية فيها والنسبة المئوية للنطف المتحركة لدى بعض الأشخاص المصابين بوهن النطف ، كما امتازت نطف

هؤلاء الأشخاص بوجود قطعة وسطية Mid piece قصيرة وقليلة بيوت الطاقة (Mundy *et al*., 1995). إن زيادة مدة الخزن في البربخ قد تؤدي الى نقصان في حركة النطف وتغيرات في شكلها نتيجة للعوامل غير المناسبة التي قد تتعرض لها ومنها ارتفاع درجة حرارة كيس الصفن (Rrumbullaku *et al*. ,. 1998) . كما ينسب العجز الحاصل في حركة النطف إلى فشل الخلايا الظهارية المبطنة للقناة التناسلية في تجهيزها للمواد الضرورية التي تدعم حركة النطف (Garcia *et al*., 2004). إن للأضداد النطفية الموجودة في البلازما المنوية للذكور عديمي الخصوبة تأثيراً في اختزال حركة النطف وفترة بقائها في القناة التناسلية الانثوية (Arap ,. 2007) .ومن العوامل التي تثبط حركة النطف زيادة إنتاج الانواع الأوكسجينية الفعالة والتي قد تؤدي الى تحطم النطف وشل حركتها نتيجة حدوث الجهد التاكسدي (Pasqualotto *et al*.,.2000) .

إن الجهد التاكسدي يزيد من بيروكسدة الدهون Lipid Peroxidation في غشاء النطف مما يؤدي الى قلة مرونتها ومن ثم تقل حركة النطف ، ويسبب كذلك زيادة في تلف الحامض النووي لبيوت الطاقة (DNA) ويقلل من امكانية توفير الطاقة اللازمة لحركة النطف (Tremellen,. 2008) . واظهرت نتائج الدراسة التي اجراها كمونة (2011) وجود علاقة عكسية بين تركيز المالون داي الديهايد MDA في البلازما المنوية والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية مع وجود علاقة طردية مع النطف ذات الحركة الموضعية والنطف غير المتحركة . ويعتقد إن للتدخين تأثيراً شديداً في التراكيب الدقيقة للاسواط حيث يؤدي إلى تغير عدد وترتيب النبيبات الدقيقة التي تكون المحور في نطف الأشخاص المدخنين (Zavos *et al*. ., 1999).

5 . 3 . 2 : تشوه النطف :

Teratozoosperm تمتلك النطف السوية رأسا" بيضويا" بحدود ملساء منتظمة يبلغ طوله 5-6 مايكرومتر وقطر 2.5-3.5 مايكرومتر . ويشغل الجسيم الطرفي (Acrosome) 40-70% من مساحته وتتميز القطعة الوسطية بكونها هلامية . أما ذيل النطفة فأسطواني الشكل غير ملتف ذو طول 45 مايكرومتر تقريباً (Franken and Kruger ,. 2004) . تحدث حالة تشوة النطف عندما تكون النسبة المئوية للنطف السوية اقل من 30% (WHO,. 1999) . إن التركيب الطبيعي للنطف لة دور مهم في حدوث عملية الاخصاب والحمل (Chenomth,. 2005) . إن اكثر الاشخاص الذين يعانون من خلل في تكوين النطف يكون لديهم تشوة في شكل النطف ومن ثم فشل اخصاب البويضة لان النطفة غير السوية قد لا تمتلك القدرة على نقل المحتوى الجيني الى داخل سايتوبلازم البويضة واحداث الحمل (Adil,.2009) .وهناك نوعين من التشوهات التي تحدث في النطف :**A** - **التشوه الأولي :**

Primary Abnormality

يحدث نتيجة الخلل الحاصل في عملية نشأة النطفة ، ويتضمن تلك التي تحدث في رأس النطفة مثل الرأس الكبير Macrociphalic والرأس الصغير Microciphalic والرأس المستدق Tapered head وداية الرأس Double head ، ومستديرة الرأس Round head والرأس الدبوسي(Acosta *et al*,. 1988) . أما شواذ القطعة الوسطية فتشمل وجود القطيرات الهيولية والقطعة الوسطية غير منتظمة الحدود ، والقطعة الوسطية غير المستقيمة . إما شواذ الذيل فتشمل النطف ذات الذيل القصير Short tail ، وذات الذيل الملتف Coiled tail ، وذات الذيل المنحني Bent tail، وداية الذيل Double tail وعديمة الذيل (WHO, 1999)

B - التشوه الثانوي : Secondary abnormalities

وهي حالة تحدث بعد عملية نشأة النطفة ، وعادة تحدث بعد عملية نضج النطف في البربخ وتتمثل بحدوث تغيرات في التراكيب الدقيقة للنطف كتحطم الجسيم الطرفي أو المقتدرات أو تحلل التركيب الدقيق للذيل وتدعى هذه الحالة تلف أو تحطم النطف أكثر مما تعرف بتشوه النطف (Acosta *et al.* , 1986) . والنطف السوية مهمة في نجاح عملية الإخصاب خارج الجسم، فقد لوحظ إن نسب نجاح عالية لعمليات الإخصاب خارج الجسم تحدث عندما تتجاوز النسبة المئوية للنطف السوية 14% (Kruger *et al.* , 1988) . وقد استخدمت تقنية الحقن ألمجهري Intra cytoplasmic sperm injection (ICSI) لعلاج المرضى الذين يعانون من تشوه النطف والذين فشلت معهم حالات الإخصاب الخارجي ونقل المشيج داخل قناة فالوب Gamete intra fallopian transfer (GIFT) (Palermo *et al.*, 1993). في حين أشارت دراسة أخرى إلى انخفاض معدل الإخصاب عند استخدام نطف ذات شكل غير سوي وحقنها داخل سايتوبلازم البويضة مقارنة مع مجموعة السيطرة (Gomez *et al.* , 2000) ، فالشكل غير السوي للنطف يزيد من احتمال كون المادة الوراثية غير سوية ومن َثمّ تنتقل إلى النسل (Ryu *et al.* , 2001) .

6. 3 . 2 : موات النطف : Necrozoospermia

يتميز مرضى موات النطف بكون نطفهم غير متحركة مطلقاً على الرغم من إنها ذات أشكال و تراكيز سوية (Ezeh , 2008) . ويؤدي تعرض النطف إلى الظروف غير الملائمة لدى مرورها أو خزنها في البربخ إلى موتها وتدعى هذه الحالة من العقم الذكري بموات النطف البربخي Epididymal Necrospermia (Mallidis *et al.* ; 2000) . والأشخاص الذين يعانون من

موات النطف يحتاجون إلى فحص دقيق للكشف عن الأسباب المؤدية إلى حالة موات النطف ومن تلك الأسباب الأجسام النطفية الذاتية Auto antisperm antibodies في المني لانها تسبب خلل في الأداء الوظيفي للنطف حيث تشل حركة النطف وقد تؤدي إلى موتها (Fan and Hendrichson , 2009) . وتسبب التراكيز العالية من بيرو كسيد الهيدروجين في البلازما المنوي زيادة في فعالية أكسدة الدهون ومن ثم موت النطف (Sanocka and kurpisz , 2004) . ويجب على الطبيب المعالج معرفة حالات موات النطف خلال فحص السائل المنوي لانه قد تكون النطف حية لكنها غير متحركة Immotile alive ، و إن تقنيات التكاثر المعان Assisted Reproduction Technique (ART) يمكن إن تساعد المرضى الذين لديهم نطف غير متحركة لكنها حية والتي يمكن الكشف عنها باستخدام اختبار حيوي النطف تحت الضغط التناضحي (الازموزي) الواطئ Hypo osmotic Swelling Test (HOST) ، وقد لوحظ إن المرضى الذين لديهم 100 % نطف غير متحركة ولكن 10 % منها تكون حية يمكن أن يتحقق حمل من خلال تقنية الحقن ألمجهري (Jarvi *et al.* ; 2010) ، و يمكن معرفة عيوشية النطف بطريقة أخرى باستعمال صبغة الايوسين Eosin حيث يصطبغ الغشاء الخارجي للنطف الحية فقط بالصبغة دون اصطباغ داخل الخلية على عكس النطف الميتة تصطبغ كلها بالصبغة (WHO,2010) . وقد لوحظ حصول نسب من الحمل عند حقن نطف غير متحركة منتزعة من الخصى (Mallidis *et al.*, 2000) . وتعد تقنية الحقن ألمجهري من التقنيات التي حققت النجاح في علاج عينات السائل المنوي ذات النطف عديمة الحركة بصورة كاملة لكنها حية (Kamal *et al.*; ; 1999) .

7. 3 . 2 : خفاء النطف : Cryptozoospermia

يقصد به وجود عدد قليل من النطف في القذف ولا يمكن تميزها في الفحص الأولي الا من خلال استخدام جهاز الطرد المركزي Centrifugation للعينة المقذوفة وفصل نموذج المني وفحص الحبيبة النطفية Pellet (Dorin , 2008) . إن التقلبات في أعداد النطف يؤدي إلى صعوبة أيجاد النطف في القذف ليوم سحب البويضات Pick up for Oocytes (Schill *et al.* 2003 ;) ، أو يؤدي إلى أعطاء كميات غير كافية من النطف المتحركة في القذف لغرض استخدامها في الحقن ألمجهري لحقنها في سايتوبلازم البويضة أو البعض قد يخفقوا في إعطاء العينة لأسباب نفسية أو غيرها من الأسباب لذا اقترح على الأشخاص المصابين بقلة حادة في أعداد النطف Sever Oligozoospermia وخفاء النطف ، أعطاء عينة المني قبل يوم من سحب البويضات ووضعها في التجميد بالسائل النتروجيني بعملية تجميد النطف Cryopreservation

والمحافظة على حيوية النطف ولوحظ تحقيق نسب عالية من الحمل Koscinski وجماعته (2007) .

2 .3 . 8 : ابيضاض المني : Leukocytospermia

هي حالة وجود تركيز لخلايا الدم البيضاء أكثر من 1 مليون / مل الواحد من السائل المنوي (WHO,. 1999) . توجد خلايا الدم البيض وخاصة العدلة منها Neutrophils في معظم قذفات المني البشري (Tomlinson *et al.* , 1993) ، غير إن التراكيز العالية لهذه الخلايا تعدّ مؤشراً لوجود إصابة بكتيرية في المسلك التناسلي أو في الغدد الملحقة (Garcia *et al.*, 2004) وأشار Ibadin and Iben (2008) إن خمج القناة التناسلية البولية احد الأسباب التي تسهم في حدوث حاله عدم الخصوبة لدى الرجال . وعندما يبلغ عدد الخلايا البيضاء 1-2 مليون / مل فان ابيضاض المني يعتبر متوسطا ، بينما يعتبر ذلك الابيضاض ملحوظا (Marked) عندما يبلغ عدد تلك الخلايا 2-5 مليون / مل من المني ويصاحب ذلك وجود عناقيد Clusters من الخلايا البلعمية التي تقوم بالتهام النطف . ويعاني المريض من حالة ابيضاض ملحوظ جدا Very marked عندما يبلغ عدد الخلايا أكثر من 5 مليون / مل من المني (Altaee ,. 1994) . وتكون الحالة مسؤولة عن حوالي 15%من حالة عدم الخصوبة الذكرية (Gdoura *et al.* 2007,.) .تعد خلايا الدم البيضاء وخاصة العدلة Neutrophils والبلعم الكبير Macrophage من المصادر الرئيسية لانتاج إنواع الاوكسجينة الفعالة ROS في السائل المنوي لانها تنتج اضعاف ماتنتجة النطف من الانواع الاوكسجينية الفعالة في السائل المنوي (Kothari *et al.* ,. 2010) ، إن الجهد التاكسدي هو العامل الرئيسي في الحالات المؤدية لعدم الخصوبة الذكرية والذي يحدث عندما يزداد مستوى إنواع الاوكسجين الفعالة المنتجة من الخلايا البيضاء عن قدرة فعالية مضادات الاكسدة الموجودة في المني (Sikka ,. 2008) .وهناك عدد من الدراسات وجدت علاقة بين حالة ابيضاض المني و صفات المني غير السوية و إنخفاض القدرة الاخصابية للنطف (Diemer *et al.* ,.2000)

2 . 4 : تقنيات تنشيط النطف البشرية : Human Sperm Activation Techniques

إن الهدف من تنشيط عينات السائل المنوي هو تنشيط النطف للحصول على نسبة مئوية اعلى من النطف المتحركة السوية مظهرياً، والحصول على سائل منوي خالٍ من الحطام Debris والنطف الميتة (Mortimer ,1994 a,b) ، وازداد استخدام هذه التقنيات مع زيادة استخدام تقنيات التكاثر المعان لإعطاء فرصة اكبر في إنجاح عملية التلقيح (Balerna *et al.*,. 1994)

، لذلك أصبح من الضروري إجراء تنشيط للنطف وعزلها خارج الجسم قبل إجراء عمليات التلقيح الاصطناعي لتحقيق زيادة في سرعة النطف وفي النسبة المئوية للنطف المتحركة (Quanzhong *et al.* .,1996) . ولوحظ في إحدى الدراسات تحسن معنوي في معالم النطف التي تضمنت النسبة المئوية للنطف المتحركة ومظهر النطف السوية ودرجة نشاط النطف واختزال في تركيز الخلايا البيضاء والتلازن ألنطفي بعد إجراء تنشيط عينات السائل المنوي مقارنة بقبل التنشيط وباستخدام تقنيات التنشيط المختلفة ووسطي Earles , Hams – 10 (الهادي، 1997) .

وتوجد في الوقت الحاضر تقنيات عديدة لتنشيط النطف لها القدرة على إنتقاء النطف ذات الحركة الجيدة والشكل السوي ومن تلك التقنيات تقنية السباحة إلى اعلى Swim up و تقنية عمود صوف الزجاج Glass wool – Column Technique و تقنية الغسل والنبذ Centrifugation Wash – Out technique وغيرها من التقنيات (Balerna *et al.* ,. 1994) ، و إن لهذة التقنيات دورا" مهما" في تحسين القدرة التخصيبية لنطف مرضى عدم الخصوبة من الذين لديهم مشاكل في السائل المنوي قبل استخدام عمليات التلقيح داخل الرحم (IUI Intrauterine Insemination) وعملية الحقن ألمجهري (ICSI) (Kadri *et al.* ,. 2010) .وقد اشارت دراسات عديدة الى إن عملية تنشيط النطف خارج الجسم تعمل على اختزال الوقت اللازم لتمكين النطف من إخصاب البويضة مقارنة بالوقت الذي تتطلبه داخل الجسم (Dugan *et al.* ,.1997). ومن المهم اختيار التقنية اللازمة لتحضير النطف بما يناسب عينات المني وخصائصها

. (Smith *et al.*, 1996)

ويجب توافر الشروط الاتيه لتصبح تقنية التنشيط المستخدمة أكثر مثالية :

1- إن تكون سهلة وسريعة وذات كلفة مناسبة.

2- تعزل قدر الإمكان نسبة عالية من النطف المتحركة .

3- لاينتج منها تحطم النطف ولا تسبب تغيرات فسيولوجية في النطفة المعزولة .

4- تُقصي النطف الميتة وخلايا الدم البيض والبكتريا .

5- تتخلص من تأثير المواد السامة أو الفعالة حياتياً مثل العوامل المانعة للتمكين Decapacitation factors والمستويات العالية من الأنواع الاوكسجينية الفعالة (Henkel and Schill ,2003) .

تحتاج عملية التنشيط وجود أوساط خاصة والتي لها دور مهم في تحسين نوعية السائل المنوي ويعد واحداً من العوامل الهامة في إنجاح عملية التلقيح الاصطناعي (Kaewnoonual *et al.* ,. 2008) . وبينت نتائج الدراسة التي أجراها ألعبيدي (2010) إن استخدام مستنبت

Ferticult Flushing Medium وتقنية السباحة إلى اعلى وباستخدام أوقات حضن مختلفة اظهر إنخفاضا" معنويا" في تركيز النطف ، وتحسناً معنوياً في كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف مقارنة بقبل التنشيط عند مرضى وهن النطف .

1 . 4 . 2 : التقنية الطباقية البسيطة : Simple Layer technique

إن معظم طرق عزل النطف تستخدم النبذ Centrifugation لعزل النطف من البلازما المنوية وغالباً ما يسبب النبذ تحطم النطف (WHO, 1999 ; Shekarriz *et al*.. , 1995;) وقد أصبح بالإمكان تهيئة النطف لأغراض التمنية الاصطناعية Artificial insemination دون استخدام عملية النبذ ، وقد تؤدي طريقة الهجرة الذاتية أو السباحة إلى استرجاع نسبة مئوية عالية من النطف المتحركة بالمقارنة مع طريقة النبذ التقليدية (Wikland *et al* ,1987)، وتتضمن هذه التقنية طريقتين :

A- التقنية الطباقية البسيطة المفردة Single Simple Layering technique

وتتضمن وضع جزء واحد من عينة السائل المنوي طبقياً وبهدوء تحت جزءين من أحد الاوساط الزرعية التي تستخدم في برامج التلقيح في المختبر IVF ، تترك العينة لفترة زمنية معينة تتراوح بين 30 – 60 دقيقة في الحاضنة و بدرجة حرارة 37 مْ للسماح للنطف بالسباحة للأعلى خلال إنبوب التنشيط ثم تؤخذ قطرة من السطح العلوي للمستنبت لغرض فحصها (AL – Janabi , 1992) ، تمتاز هذه الطريقة بالتركيز المقبول للنطف المسترجعة كما إنها سهلة الاستخدام و إن أساس عملها يعتمد على تقليل لزوجة السائل المنوي وتقليل تراص الخلايا عن طريق بقاء النطف الميتة والنطف غير المتحركة والخلايا الأخرى والحطام Debris في قعر إنبوب التنشيط ، وبذلك تكون النطف السوية مظهرياً التي تمتاز بحركتها التقدمية الخطية المستقيمة Progressive rectilinear وحدها قادرة على السباحة خلال إنبوب الوسط (Stovall *et al*.. , 1994) . وقد لوحظ إن استخدام التقنية الطبقية البسيطة في تنشيط نطف مرضى العقم المصابين بقلة ووهن النطف (الحاد والمعتدل) قد أدى إلى حدوث تحسن معنوي ($p < 0.001$) في كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف (الحربي ، 2002) و أشارت دراسات عديدة إلى إن النطف المتحركة والمسترجعة باستخدام التقنية الطبقية البسيطة لهؤلاء المرضى تكون كافية للحصول على معدلات حمل جيدة عند استخدامها في تقنيات التكاثر المعان ART (Zavos *et al*.,.2000) . إن بقاء النطف التي لا تمتلك القابلية على السباحة للأعلى في الحبيبة النطفية أسفل أنبوب التنشيط أدى إلى حصول انخفاض معنوي في تركيز النطف (الهادي ، 1997) ، وليس المهم الحصول على أعظم نسبة من النطف المسترجعة

ولكن من الضروري إن تكون هذه النطف كافية لإحداث معدل حمل جيد . فقد أشارت إحدى الدراسات إلى إن اقل حد لحدوث معدل حمل جيد بعد التلقيح داخل الرحم IUI عندما يكون تركيز النطف المتحركة 5×10^6 ml / في العينة الأصلية والعدد الكلي للنطف 10×10^6 ml / والنسبة المئوية للحركة التقدمية تبلغ 30% (Dickey *et al*.. , 1999) ، و أشارت إحدى الدراسات إلى إن معدل الحمل الجيد يمكن الحصول عليه من خلال تعداد منخفض للنطف المتحركة نسبياً واختيار وقت مناسب لإجراء IUI يكون أكثر تأثيراً مقارنة بالتعداد العالي للنطف (Goverde *et al* , 2000).

B - التقنية الطباقية البسيطة المزدوجة Simple Double Layering technique

يوضع 1 مللتر من السائل المنوي تحت طبقتين من وسطين مختلفين بواقع 1 مللتر لكل منها في إنبوبة التنشيط ، ويحضن الأنبوب بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 30 دقيقة ، وقد ذكر السلطاني (1997) إن مناسيب عالية من تراكيز النطف قد تم الحصول عليها باستخدام كل من وسطي Ham's F – 10 و آيرل Earle's medium سواء أكان ذلك بالطريقة الطباقية المفردة أم المزدوجة (الطبقة السفلى) مقارنة بما تم الحصول عليه من الطبقة العليا بالطريقة الطباقية المزدوجة ، حيث أشار إلى إن معظم النطف تتجمع في الطبقة السفلى ويتعذر وصولها إلى الطبقة العليا لان ذلك يتطلب وقتاً أطول وجهداً أكثر لمواجهة تأثير الجاذبية ، كما يؤدي استخدام التقنيات الطباقية المفردة والمزدوجة إلى حدوث إنخفاض معنوي في تركيز خلايا الدم البيض والخلايا البلعمية لعدم قدرة هذه الخلايا على السباحة ومقاومة قوة الجاذبية (Pasqualotto *et al*. , 2000) و تعد الطريقة الطباقية من الطرق المبسطة عملياً لتحضير النطف فهي لا تحتاج إلى خبرة عملية و تعد ذات كلفة أقل من باقي الطرق و لا تحتاج لمختبرات عالية التخصص لإجرائها (Zavos *et al*.,2000)، ولاختزال خطوات التقنية الأثر في حماية العينات من التلوث بالمواد الفعالة حياتياً . (Gianaroli *et al*.. , 2000)

وهناك طريقة أخرى في التقنية الطباقية يكون فيها سباحة النطف نحو الأسفل وليس للأعلى وتتم بوضع 1.5 مليلتر من الوسط ثم 0.5 مليلتر من السائل المنوي فوقه وتترك إنبوبة التنشيط لمدة 30 دقيقة وتحت درجة حرارية مقدارها 37 مْ (Dickey *et al*.. , 1999) .

2 .4. 2 : تقنية الغسل والنبذ Centrifugation Wash – Out technique :

يتم في هذه التقنية غسل عينة المني المتميع ونبذه باستخدام احد إنواع الاوساط الزرعية وهي الطريقة الأقدم والأكثر شيوعاً في عزل النطف كما تعد الطريقة القياسية المستخدمة في مختبرات IVF ..تمتاز هذه الطريقة بكفاءتها في اختزال النطف غير السوية بنسبة 26 – 45% (Harris *et al*.. , 1981) ، والدور الايجابي الأكبر لهذه الطريقة يتمثل بحدوث تحسن معنوي في

المعدل الكلي للنطف السوية ذات الحركة التقدمية لغرض استخدامها في إنجاح عملية التلقيح ألصنعي (Duvan *et al*. ,.2009) .

إن طرائق الغسل Washing والسباحة Swim – up المستخدمة في برامج الإخصاب الخارجي IVF أو التلقيح الاصطناعي داخل الرحم IUI أو أي برامج أخرى مماثلة ذات تأثير جيد في التقليل من وجود الجراثيم في المني البشري (AL – Ansari *et al*. , 1997) ، إلا إن طريقة النبذ قد تسبب تقليلاً في حيوية النطف خاصة عندما تكون النطفة واهنة في الفحص الأولي للسائل المنوي (Steen *et al*. , 1986) وربما يؤدي الجهد التاكسدي العالي المتولد نتيجة مراحل النبذ المتعددة إلى إلحاق الضرر في الحامض النووي DNA للنطف بصورة معنوية (Twigg *et al*. , 1998) وقد يكون الغسل لمرحلتين أو ثلاث مراحل بدلاً من مرحلة واحدة ذات تأثير في حيوية النطف وحركتها ، فقد أشار الهادي (1997) إلى حدوث تحسن معنوي في جميع معالم النطف لدى استخدام تقنية الغسل المزدوج لمرضى العقم المناعي . و أشارت دراسات أخرى إلى إن الغسل المزدوج الذي يليه سباحة النطف للأعلى من الحبيبة يحسن من خصائص تركيب كروماتين النطف

. (Spano *et al*. , 1999 ; Lopes *et al*. , 1998)

5 . 2 : الجذور الحرة Free Radicals

الجذر الحر هو أي ذرة او جزيئة تحتوي على واحد او اكثر من الإلكترونات غير المزدوجة فتجعلها غير مستقرة وميالة للتفاعل الكيمائي (Sahnoun and Jamoussi, 1997, Agarwal *et al* ,2005) . و إن استقرارية الجذور الحرة تكتسب بواسطة ازالة الالكترون من الجزيئات المحيطة لانتاج مزدوج الكتروني (Maxwell, 1995, Pierce *et al* ,2004) . إن عملية انتقال الالكترون تسبب في إنتاج الكترونات غير مزدوجة في الجزيئات المتبقية لتصبح جذوراً حرة و إن هذه الجذور يمكن إن تعمل على بدء سلسلة من تفاعلات إنتقال الالكترون (Vendemiale, 1999) . إن الجذور الحرة هي جزيئات فعالة جدا ولها القدرة على اكسدة الجزيئات الحياتية التي تتضمن البروتين والدهون والاحماض النووية والكاربوهيدرات (Jacob and Burri, 1996; Stahl and Sies, 1997) ، و الخطر الرئيس الناتج عن الجذور الحرة عامة يكمن في قدرتها على تحطيم اهم مكونات الخلية وهو الحامض النووي DNA او غشاء الخلية مما يسبب تدميرها وعدم قدرتها على القيام بوظائفها بالشكل المطلوب مما يسبب العديد من الامراض. ويؤدي فقدان الفعالية البايولوجية في العديد من مناطق الجسم عن طريق الجذور الحرة إلى استهلاك تدريجي ونقص لفعالية خلايا النسيج الوعائي (Robert K. *et al*., 200) .

2 . 5 . 1 : إنواع الجذور الحرة : Types Of Free Radicals

في الأنظمة البايلوجية يوجد نوعان من الجذور الحرة :

إنواع الاوكسجينِ الفعالة (ROS) (reactive oxygen species) و إنواع النتروجينِ (nitrogen species) والتي لا تَتضمّنُ جزيئاتَ تفاعليةَ فقط بالألكتروناتِ غيرِ المُزَدوَجةِ، مثل جذر السوبراوكسايد السالب Superoxide anion radial ($O^{\cdot}_2$) وجذر الهيدروكسيل hydroxyl radical($OH^{\cdot}$) وجذر اوكسيد النتريك nitric oxide (NO) وجذر الوكسيل Alloxyl ($RO^{\cdot}$)

و إن ما أيضاً الجزيئاتَ التفاعليةَ التي لا تَحتوي على ألكتروناتَ غيرَ مُزَدوَجةً، مثل بيروكسيدِ الهيدروجينِ hydrogen peroxide (H_2O_2) ، حامض hypochlorous acid (HOCl)، و peroxynitrite anion ($ONOO^-$) (Murray *et al.* , 2003)

2.5.2 : تاثيرات الجذور الحرة : Effects of Free Radical

عموماً، التأثيرات الضارّة للجذور الحرّةِ على الخليةِ تكون الاتية :

1 – احداث الضرر للحامض النووي DNA Damaging of DNA

2 - أكسدة الحوامضِ الشحمية غير المشبعة polyunsaturated fatty acids في الدهون lipids و أحداث الضرر لغشاءِ الخلايا damaging of cells membrane .

3- أكسدة الأحماض الأمينية في البروتينِ. Oxidation of amino acids in proteins

4. تثبيط نشاط إلانزيمات المتخصصة specific enzymes بواسطة أكسدةِ العامل المساعد oxidation of co-factors . (Baynes and Dominiczak ,2004) .

2 . 5 . 3 :مصادر الجذور الحرة : Sources Of Free Radical

إن المصدر الرئيس للجذور الحرة هو الاوكسجين الجزيئي اذ إن جميع الحيوانات والنباتات تحتاج الى الاوكسجين لغرض إنتاج الطاقة(Halliwell and Gutterridge, 1985) ومن المعلوم إن 98% من الاوكسجين الجزيئي يختزل الى ماء عن طريق السلسلة التنفسية للحصول على الطاقة (Wohaieb and Godin, 1987) ، اما النسبة المتبقية وتشكل حوالي 2% من الاوكسجين المتفاعل مع السلسلة التنفسية تؤدي الى تكوين الجذور الحرة (Boveris *et al.*, 1991) .

إن الاوكسجين هو اكثر الجذور الحرة شيوعا واهمية في النظام الحيوي (biologically) وفي حال وقوع الالكترونات غير المزدوجة (unpaired electrons) على ذرة الاوكسجين تسمى

جذر الأوكسجين الحر (Free Oxygen Radical) (FOR) وهناك جذور حرة اقل اهمية تتكون من وجود الكترونات غير مزدوجة على ذرة الكاربون والكبريت والنيتروجين والكلور . (Evans and Halliwell, 2001)

2 . 5 .4 : آلية تاثير الجذور الحرة :

إن إنواع الاوكسجين الفعالة المتولدة داخل الجسم مثل $OH^{\cdot}$ hydroxyl radical ، $O^{\cdot}_2$ superoxide anion radical ، O_2^1 single oxygen ، $RO^{\cdot}$ alkoxyl radical ، $ROO^{\cdot}$ Peroxyl radical ، $NO^{\cdot}$ nitric oxide radical ، H_2O_2 Hydrogen peroxide ، HOCl hypochloros acid تعمل على مهاجمة الخلايا وتحطيم مكوناتها من البروتين والدهون والاحماض النووية والكاربوهيدرات ومكونات اخرى في الخلية وتؤدي الى تلف الجدار الخلوي

(Bartosikova *et al.*, 2003; Vladimirov, 2004) . ويكون تأثير إنواع الاوكسجين الفعالة على البروتينات من خلال التأثير على الاصرة المزدوجة ، اذ تعمل على اكسدتها وكذلك تعمل على اكسدة مجموعة الثايول(SH group) ومن ثم سوف تغير من تركيب البروتينات وحدوث تحويرات

عليها وبعد ذلك سوف تؤثر على عملها وتثبط فعالية الانزيمات ،اما التأثير على الدهون فيكون من خلال الاكسدة على الاصرة المزدوجة الموجودة في الاحماض الدهنية ومن ثم حصول عملية بيروكسدة الدهن Lipid Peroxidation وخاصة بالنسبة للدهون الموجودة في غلاف الخلية وبعد ذلك سوف تؤثر في نفاذية غشاء الخلية . وكذلك فان إنواع الاوكسجين الفعالة تؤثر على الحامض النووي DNA من خلال فك ارتباط سلاسل DNA وحدوث تحويرات في DNA مما يؤدي الى حدوث الطفرات الوراثية او حدوث خلل في الخلايا من الصعوبة تصليحه . **(**Ambrosio & Tritto, 1999; Michael, 2001**)** .

2 . 5 . 5 : أنواع جذور الأوكسجين الفعالة ووظيفة النطف:

النطف الموجودة في السائل المنوي المقذوف لايمكنها إن تقوم بإخصاب البويضة إذا لم تقضي مدة في القناة الانثوية تدخل في خلالها بعدد من الفعاليات التحويرية في غشائها البلازمي وايضها الخلوي يطلق عليها اسم عملية الاستطاعة او التمكين Capacitation التي تعد عملية ضرورية في كل من إنجاح عملية ارتباط النطفة مع المحيط الخارجي للبويضة المنطقة الشفافة Zona Pullcidy و حدوث تفاعل الجسيم الطرفي Acrosome reaction .

ويبدو إن إنواع الأوكسجين الفعالة تقوم بادوار تتوسط الوظيفة النطفية الطبيعية للنطف ، ويعتمد دورها على نوع وتركيز الجذر المتوسط للعملية ،ويعد ذلك ضرورياً في تنظيم معدل زيادة الفعالية Hyperactivation وقدرة النطف على تفاعل الجسيم الطرفي Acrosome Reaction وكذلك في عملية ارتباط النطفة مع المحيط الخارجي للبويضة (Agarwal *et al* ,2003) .

أما عند تواجد نسب الانواع الاوكسجينية الفعالة ROS بتركيز يفوق قدرة مضادات الأكسدة الموجودة في السائل المنوي التي تستطيع معادلة النسبة العالية من ROS تسبب تحطم النطف وشل حركتها ، لذا فان تأثيرها يعد ساماً ومضراً لكل من تركيب ووظيفة النطف ، حيث إن ارتفاع نسب الانواع الاوكسجينية الفعالة يؤدي إلى تثبيط حركة النطف (Pasqualotto *et al.* , 2000) .

ان كُلّ الخلايا تَعِيشُ تحت الظروف الهوائيةِ ، والنطف تواجهُ بشكل مستمر الأوكسجين لانه متطلبِ لدَعْم الحياةِ، لكن ايضاتة metabolites، مثل إنواع الأوكسجين الفعالة يجب إن تثبط بشكل مستمر لإبْقاء تراكيز قليلة جدا والتي تدخل في وظيفةِ الخليةِ الطبيعيةِ. إما عند تواجدها بتراكيز عالية فهي ذات تأثير سلبي كبير على الخلايا النطفية ،حيث إن الغشاء البلازمي ألنطفي يحتوي على نسبة عالية من احماض دهنية متعددة غير مشبعة PUFA إضافة لامتلاكها على كمية قليلة من السايتوبلازم يحتوي على تراكيز قليلة من مركبات أو إنزيمات تسمى مضادات الأكسدة التي تعد الخطوط الدفاعية الأساسية الكاسحة لتأثير الجذور الحرة والتي لاتكون كافية لحماية النطفة من التأثير الضار المتولد من التراكيز العالية من إنواع الأوكسجين الفعالة (Said *et al* ,2010).

كما إن إنزيمات مضادات الأكسدة الموجودة في داخل الخلية لاتتمكن من حماية الغشاء البلازمي الذي يحيط بذيل النطفة والجسيم الطرفي ، لذا فان زيادة إنتاج إنواع الأوكسجين الفعالة في القناة التناسلية يودي إلى تخريب سيولة الغشاء البلازمي وكذلك يؤثر على الحامض النووي منقوص الأوكسجين ألنطفي حيث يوجد أدلة علمية متعددة تدل على إن وجود تراكيز عالية من إنواع الأوكسجين الفعالة في مني الذكر ارتبط مع زيادة في تضرر إلDNA حيث يعتقد حدوث تحور في تركيب قواعد إلDNA وتحطم الأشرطة والروابط العرضية للكروماتين نتيجة الإجهاد ألتأكسدي Oxidative Stress (Gharagozloo and Aitken,2011) .

2 . 6 : الإجهاد ألتأكسدي : Oxidative Stress

يعَرَّفُ الإجهاد ألتأكسدي على إنه حالة عدم توازن بين إنتاجِ الجذور الحرّةَ والقدرة الدفاعية لمانعات التأكسد لمصلحة الأولى . عدمِ التوازن هذا يُمْكِنُ إن يُؤدّي إلى الضررِ في الجزيئِيات الكبيرةِ macro molecules بضمن ذلك اشرطة أل(DNA) ، غشاء الخليةِ،

البروتينات والدهون lipid و يُؤدّي الإجهاد التأكسدي إلى العديد مِنْ التغييراتِ الكيمياوية الحيويةِ ويعد عاملا مُسَاهِماً مهماَ في عِدّة أمراض مُزمنة تصيب الانسان ، مثل ألإمراض القلبية الوعائية والسرطان

.(Myatt and Cui ,2004)

1. 6. 2 : علامات الإجهاد التأكسدي : Oxidative Stress Markers

الجذور الحرّة لَها نِصْف حياةٍ قصيرةٌ short half-life مما يجْعل قيَاْسها في المختبرِ صعباً جدا".ويتوافر حاليا" عدد من المقاييس ، لكُلّ منها منافعِ معينة تساعد عموماً فيَ قِياس علاماتَ الجذور الحرّةِ بدلاً مِنْ الجذور الحرّةِ الفعليةِ (Farmer and Davoine , 2007).

بيروكسدة الدهن Lipid peroxidation هو بداية آليةَ الجرحِ الخلوي في الانسان ، ويستعملُ كمؤشر للإجهاد التأكسدي في الخلايا و الأنسجة، و بيرو كسيد الدهن Lipid peroxid المتولد مِنْ تحلل الأحماض الدهنية غير المشبعة يكون غير مستقر ويتحلل بسرعة مكونا سلسلةَ معقّدةَ مِنْ المركّباتِ التفاعلية الكربونية carbonyl ومن ضمنها المالون داي الديهيد (Malondialdehyde MDA) وهي جزيئةُ عالية التفاعل جداً. لذا يمكن إن يستخدم قياس تركيز المالون داي الديهيد MDA كمقياسا للإجهاد التاكسدي (Aitken *et al.* , 1998) .

2 . 6 . 2 : المالون داي الالديهايد : Malondialdehyde (MDA)

جزيئه عضوية صيغتها الكيميائية $CH2(CHO)2$ ، وتعد الناتج النهائي لعملية بيروكسدة الدهن lipid peroxidation وذلك من خلال تحويل بيروكسيد الدهن للأحماض الدهنية غير المشبعة إلى المالون داي الديهايد الذي يعكس حالات زيادة توليد الجذور الحرة والجهد التاكسدي. إن MDA له القابلية على التفاعل كذلك مع البروتينات والفوسفوليبيدات Phospholipids محدثا تغيرا في خصائصها ووظيفتها (Slatter et al., 2000) .

2 . 7 : مضادات الأكسدة : Antioxidants

يحتوي السائل المنوي على مصادر لانتاج الانواع الأوكسجينية الفعالة ROS تشمل خلايا الدم البيض والنطف غير الناضجة والنطف غير السوية . وتتصف الانواع الأوكسجينية الفعالة بكونها عوامل مؤكسدة ذات فعالية عالية تستطيع التفاعل بشدة وبسرعة مع مختلف الجزيئات والمركبات في الخلية مثل : البروتينات ، والدهون ، والكاربوهيدرات ، والأحماض النووية (Sanocka, and Kurpisz, 2004) . وفي الحالات الطبيعية تزال الانواع الفعالة للاوكسجين من الجسم باستمرار بواسطة الانظمة الدفاعية المتمثلة بمضادات الأكسدة وبذلك تحمي الجسم من حدوث حالات الجهد التاكسدي (Exner *et al.*, 2000) ، وقد لوحظ حدوث الجهد

التاكسدي في حال عدم قدرة هذه الاليات الدفاعية لازالة التأثيرات التأكسدية للجذور الحرة (Wohaieb *et al*., 1994) . ويمكن تعريف مضادات الاكسدة بانها أي مادة عند وجودها بتراكيز قليلة مقارنة مع المواد الاساسية المؤكسدة (Oxidizable substrate) تعمل على ازالة او تثبيط عملية الاكسدة للمادة الاساس (Andrabi *et al* ,2009) . إن مصطلح مواد الاساس المؤكسدة (Oxidizable substrate) يشمل على الاغلب جميع محتويات الخلية الحية مثل البروتين Protein ، الدهون Lipid والكاربوهيدرات Carbohydrate والاحماض النووية Nucleic acid (Maxwell and Lip, 1997) .

1.7 . 2 : إنواع مضادات الأكسدة : :

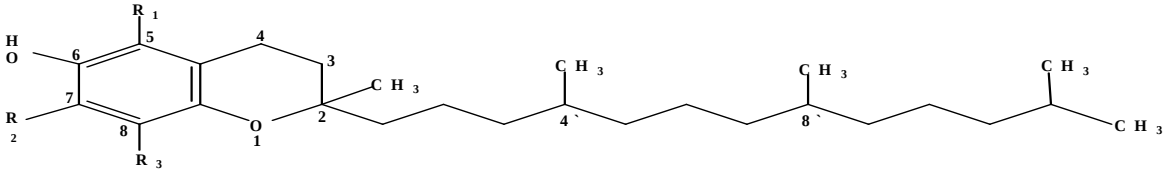
ان الانظمة الدفاعية للجسم ضد تكون الجذور الحرة، والصيغ الأوكسجينية تظهر بعدة صيغ. **1.1.7.2:مضادات الأكسدة الانزيمية Enzymatic Antioxidants**

وتشمل هذه إنزيمات سوبر اوكساید دسميوتيز superoxide dismutase (SOD) وكتاليز Catalase (CAT) وكلوتاثايون بيروكسيديز Glutathione peroxidase (GPx) وكلوتاثايون ريدكتيز Glutathione Reductase (GR) (Omer, 2000) .

2.1.7.2 : مضادات الأكسدة غير الانزيمية Non-Enzymatic Antioxidants

1.2.1.7.2 : فيتامين E Vitamin E

وهو من الفيتامينات الذائبة في الدهون ولا يذوب في الماء ويذوب في معظم المحاليل العضوي ويكون على شكل زيت أصفر شاحب بدرجة حرارة الغرفة (Stahl and Sies, 1997; Zheng , 2003). يوجد في كل الاغشية البيولوجية ويخزن بشكل رئيس في الانسجة الدهنية وفي الكبد والعضلات .



activity ,with α-tocopherol being the most potent.

α-tocopherol: R1:CH3 , R2:CH3 , R3:CH3 .

β-tocopherol: R1:CH3 , R2:H , R3:CH3 .

γ-tocopherol: R1:H , R2:CH3 , R3:CH3 .

δ-tocopherol: R1:H , R2:H, R3:CH3 .

شكل (2 -1) تركيب إنواع مركبات توكوفيرول

(Zheng, 2003).

ويعد فيتامين E من مضادات الأكسدة الأساسية في الجسم ، ويحمي الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة في أغشية الخلايا من الأكسدة (Bagchi, and Puri, 1998)، وهو أسم يشمل مجموع ثمانية مركبات ذائبة في الدهون التي تقسم على مجموعتين التوكوفيرولات Tocopherols والتي تتكون من الفا توكوفيرول (وهو الأكثر شيوعاً من ناحية الفعالية الحياتية) ، وبيتا توكوفيرول ، وكاما توكوفيرول ، ودلتا توكوفيرول. وكذلك التوكوترينولات Tocotrienols التي تتكون من الفا توكوترينول ، وبيتا توكوترينول ، وكاما توكوترينول ، ودلتا توكوترينول .

اكتشف لأول مرة عام (1920) في الجرذان عندما لوحظ إن إنخفاض هذا الفيتامين لديها ادى الى عدم قدرتها على التكاثر ، لكن لم يتم عده ضروريا للإنسان رسميا حتى عام (1966) و يتواجد فيتامين E في الغذاء بشكل غني و إن من المصادر الغنية بفيتامين E هي الخضراوات الزيتية vegetable oil و الخضراوات الورقية الخضراء green leafy vegetable (Friedman, 1977; Stahl and Sies, 1997) ومن المصادر الغنية بفيتامين E هي البيض، اللحوم، الكبد، الأسماك، الدجاج، الزيوت النباتية، عباد الشمس، كما يوجد في حليب الأم بكميات وافرة (قيس الدوري، 1980) .

إن أهم وظيفة بيولوجية لفيتامين E هي حماية الحوامضِ الشحمية غير المشبعة PUFA وباقي مكونات غشاء الخلية وحماية الدهون قليلة الكثافة (LDL) Low density lipoprotein من عملية الأكسدة الناتجة من الجذور الحرة وهو بهذه العملية يمنع تكوين الدهون

البيروكسيدية. إن ارتفاع مستوى الدهون البيروكسيدية يكون متعلقا بالعديد من الامراض والحالات السريرية و إن وجود فيتامين E في الخلايا وغشائها يستطيع إن يوفر الحماية القصوى كما إن تركيزه يمكن إن يكون جزيئة واحدة مقابل 2000 جزيئة دهون مفسفرة (Phospholipid molecules) .إن الاعتقاد السائد إنه بعد تفاعله مع الجذور الحرة ممكن إن يتولد ثانية وهذا يتم بواسطة مضادات اكسدة اخرى مثل فيتامين Cو هذه العملية تجعله نشطاً على الدوام للدفاع عن الخلية وغشائها.(Kagan ,1998)

و يعد فيتامين E احد مضادات الأكسدة في السائل المنوي ويبلغ تركيزه في البلازما المنوية حوالي 0.32 -0.52 مايكرومول/ لتر (Buettner, 1993). ويمتلك هذا الفيتامين دوراً كبيراً في الحفاظ على حركة النطف بحالة سوية ؛ وذلك يعود إلى إنه يعمل على تثبيت سلاسل الأغشية البلازمية لخلايا النطف ، اذ يعمل بشكل مباشر على معادلة الانواع الأوكسجينية الفعالة مثل جذور السوبر اوكسيد السالب (O2-) وبيروكسيد الهيدروجين (H2O2) والهايدروكسيل (OH) (Agarwal and Allamaneni , 2004)، وبذلك فهو يعمل على تثبيط فعالية اكسدة الدهون ويحافظ على حركة النطف بحالة سوية **(**zheng ,2003**)** . القيمة الطبيعية له في بلازما الدم هي (10 mg/L) ، أما الكميات المأخوذة الملائمة يومياً تتراوح بين 25-30 g/day . . (Michal , 2002)

2 . 7 . 1 . 2 . 2 : الكلوتاثايون : Glutathione (GSH)

يوجد الكلوتاثيون في مختلف الكائنات الحية مثل : الإنسان والحيوان والنبات والأحياء المجهرية ويعد من اوفر مركبات الثايول غير البروتينية الخلوية (هي تلك المركبات التي تحتوي في تركيبها الكيميائي على عنصر الكبريت) ، وهو ببتيد مؤلف من ارتباط ثلاثة احماض امينية (كاما كلوتامايت ، سستين كلايسين) L-Y-glutamyl-L-Cysteinyl glycine)(Gadea *et al* ,2004). إن وجود مجموعة الثايول الحرة في الكلوتاثايون توفر حماية رئيسة ضد حالات الاكسدة الشديدة ، اذ تعمل على ازالة الجذور الحرة وتتأكسد مجموعة SH مكونة مركب داي الاصرة الكبريتية GSSG ولذلك يمتلك الكلوتاثايون شكلين الشكل المختزل GSH والشكل المؤكسد GSSG (Halliwell and Cutteridge, 1993). ويعد الكلوتاثايون من مضادات الاكسدة الذائبة في الماء والتي تخلق داخل الجسم وهو يختلف عن مضادات الاكسدة غير الانزيمية الغذائية مثل الفيتامينات A, C, E بالاضافة الى السيلينيوم ويمكن تخليقه في الجسم من الاحماض الامينية السستين والكلايسين والكلوتاميت بواسطة عمل إنزيم glutamyl Cysteine-Synthase و إنزيم GSH Synthase واستخدام 2ATP وتتم عملية تخليقه بشكل رئيس في الكبد (Suleyman, 2003). ويعمل الكلوتاثايون على ازالة الانواع الفعالة للاوكسجين ROS اما

مباشرة مثل Hydoxyl Radical ، Peroxynitrite ، Single Oxygen ، اذ يتفاعل مع الجذور الحرة ويتكون جذر الكلوتاثايون GS (Buettner, 1993) . او عن طريق كونه مادة اساسية لبعض الانزيمات المضادة للاكسدة ومنها Glutathion – S – Transferase, Glutathion Peroxidase (GPx) ، اذ يلعب GSH دورا كبيرا في المحافظة على الخلية من الاذى التأكسدي ، اذ يقوم الكلوتاثايون مع وجود إنزيم GPX باختزال H2O2 الى ماء باستمرار مع اكسدة GSH وتحويله الى GSSG (Halliwell and Gutteridge, 1993) وبذلك سوف تزال سمية بيروكسيد الهيدروجين H2O2 ، وكذلك يعمل GSH على اعادة تكوين بعض مضادات الاكسدة مثل Vit C .

3. 7. 2 : دور فيتامين E و الكلوتاثايون GSH في الخصوبة الذكرية :

هناك عدد من الدراسات أجريت في داخل الجسم الحي in vivo أو خارج الجسم الحي in vitro توضح الدور الوقائي لمضادات الأكسدة في حماية النطف والحفاظ على نوعية السائل المنوي Semen quality او تحسينه حيث أشارت إلى إن عمليتي الحفظ والتجميد للنطف البشرية تؤدي إلى زيادة في الإجهاد التأكسدي مما يسبب انخفاضا في النسبة المئوية للنطف المتحركة (Mazzilli *et al*. .,1995) ، حيث ذكرت احدى الدراسات إن حفظ النطف بوجود فيتامين E بتركيز 10 ملي مول /لتر حافظ على النسبة المئوية للنطف المتحركة قياساً بالعينات التي تم حفظها بدون إضافة الفيتامين (Askari *et al*., 1994) ، كما لوحظ عند إعطاء الأشخاص المصابين بمتلازمة قلة ووهن وتشوه النطف جرعة 400 ملغم /يوم من فيتامين E والسلينيوم Selenium بجرعة 100 ملغم / يوم عن طريق الفم ولمدة شهر واحد قد سبب زيادة في تركيز فيتامين E والسلينيوم في البلازما المنوية فضلاً عن تحسن في معالم النطف التي شملت النسبة المئوية للنطف المتحركة والعيوشية والشكل السوي للنطف (Kodama *et al*., 1997) ، وأظهرت تحاليل 9 رجال يعانون من حالة إنخفاض عدد النطف وتباين حركتها تحسنا معنويا بعد أخذهم فيتامين E والسلينيوم لمدة 6 اشهر في كل من الحركة والنسبة المئوية للنطف الطبيعية (Vezina *et al*. ,1996).

يمتلك الكلوتاثيون دوراً علاجياً لمرضى العقم وذلك يعود إلى دوره الوقائي لمكونات الدهون في أغشية الخلايا ، إذ تبين إن إعطاء مرضى العقم الذين يمتلكون مستوى عالياً من الانواع الأوكسجينية الفعالة جرعة 600 ملغم / يوم من الكلوتاثيون عن طريق العضل ، اظهر تحسناً معنوياً في النسبة المئوية للنطف المتحركة والشكل السوي للنطف ودرجة نشاط النطف بعد مدة شهرين من العلاج (Lenzi *et al*., 1993) ، وكذلك أدى إعطاء جرعات مقدارها 200 ملغم /يوم

من فيتامين E و200 ملغم/يوم من فيتامين C و400 ملغم /يوم من الكلوتاثيون لمرضى العقم لمدة شهرين إلى زيادة معنوية واضحة في تركيز النطف (Kodama *et al*., 1997) .

2 .8 :تركيب الكروماتين النطفي في الإنسان : Chromatin Structure in Human Sperm

يتميز كروماتين النطف بقوة تماسكه وذلك بسبب شدة الارتباط بين الحامض النووي إلDNA والبروتينات في نواة النطفة (البروتامين) اما بالنسبة إلى كروماتين الخلايا الجسمية فيكون نسبيا اضعف مقارنة بكروماتين النطف (Brewer *et al*.,1999) . في عملية تكوين النطف spermatogenesis وفي المراحل الأخيرة لهذه العملية يتم تكوين السبيرماتيد Spermatides وتتجدد النواة في الخلية وتصبح أكثر قوة وفي نفس الوقت يزداد تحطم الهستونات وزيادة تشكل البروتامينات (Steger *et al* ,2000) .

تكون أشرطة الحامض النووي DNA ملتفة حول جزيئات البروتامين مكونه لفات عالية الدقة في التنظيم والتماسك (Brewer *et al*.,1999) ، ويعتقد إن التماسك النووي مهم بدرجة عالية لحماية العوامل الوراثية من تأثيرات الضغط والاجهادات الخارجية مثل الأكسدة وارتفاع درجة الحرارة (Kosower *et al*. 1992) . إن الارتباط بين البروتينات والحامض النوويDNA يكون منظما بشكل دقيق وغير عشوائي وقد ذكرت إحدى الدراسات إن كروماتين النطفة يتكون من 15% من هستونات مرتبطة بالحامض النووي DNA والباقي يمثل البروتامين كما تتصف سلاسل الحامض النووي DNA المرتبطة بالهستونات تكون ذات اندماج ضعيف بالإضافة إلى قدرتها المشاركة في عملية الإخصاب وكذلك التطور الجنيني المبكر (Gate wood *et al*.,1987)

وذكرت إحدى الدراسات إن الرجال العقيمين لديهم نسبة عالية من الهستونات نسبة إلى البروتامينات في النطفة مقارنة مع مجموعة السيطرة من الرجال الخصبين (Oliva , 2006) .

يتميز الحامض النووي DNA بضخامته في نواة النطفة إلا إنه يوجد جزء صغير من الحامض النووي بالنطفة يكون ذا منشأ مايتوكوندريي حيث يقع هذا الجزء في داخل القطعة الوسطية (Agarwal *et.al*.;2003) ومن صفات ال (DNA) المايتوكوندريي بالنطفة كونة صغير الحجم بالإضافة إلى شكله الدائري وعدم تقييده أو ارتباطه مع البروتينات (Anderson *et al*.,1981) ومن صفاته الأخرى احتوائه على معدلات عالية من الطفرات حيث لاحظ Kao وجماعته(1998)ارتباط حركة النطفة مع حجم الميتوكندريا Mitochondria داخل القطع الوسطية Mid piece و إن قلة حركة النطفة يرتبط مع الطفرات التي تحدث في الحامض النووي ال (DNA) المايتوكوندري للنطفة . إن انتقال مورثات الحامض النووي DNA المايتوكنوديري للأجيال اللاحقة يتم عن طريق الام الا إن قسماً من طفرات الحامض النووي DNA المايتوكوندريي تنتقل

عن طريق الاب بحيث لايتجاوز نسبة اكثر من 1% من هذه المورثات (Schwartz and Vissing,2002).

1.8.2 : العلاقة بين ضرر ال(DNA) والكفاءة الوظيفية للنطف

إن سلامة الحامض النووي للنطف ذات أهمية كبيرة في الحفاظ على القدرة الاخصابية للرجل (Agarwal and Allamaneni; 2004) إذ إن القدرة الاخصابية للنطف لاتعتمد على كفاءة النطفة وظيفيا" فقط بل تعتمد كذلك على سلامة الحامض النووي للنطفة (Saleh *et al*.2003 ,Sharma *et al*.2004) .

أشارت أحدى الدراسات إلى إن معالم النطف المتمثلة بتركيز النطف والشكل السوي لها لاتعطي صورة متكاملة عن القدرة أو الكفاءة الوظيفية للنطف مالم يتم قياس الضرر الحاصل للحامض النووي DNA للنطف (Sheikh *et al*.,2008) وينتج عن هذا الضرر في الحامض النووي DNA فقدان النطفة قدرتها على الإخصاب (Alvarez *et al*.,2002) .

واستخدمت طرق مختلفة لقياس ضرر الحامض النووي DNA للنطف ودراسة علاقته بمعالم النطف حيث لاحظت بعض الدراسات إن هنالك علاقة عكسية بين ضرر الحامض النووي DNA ومعالم النطف المتمثلة بتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة والشكل السوي للنطف (Ramos *et al*.;2001;) في حين لم تجد دراسات أخرى مثل هذه العلاقة (Hughes *et al*.,1996) ولأهمية هذه العلاقة لابد من تحديدها وتثبيت ومعرفة حد العتبة لتجزئة الحامض النووي DNA في المني للأشخاص العقيمين والخصبين (Sheikh *et al*.,2008) . وجد الباحثان Gharagozloo و Aitken (2011) إنه يوجد خط دفاعي ثاني ضد الجهد التاكسدي الذي يحدث في خلية النطفة حيث إن بيوض اللبائن تمتلك آليات متطورة ومعقدة من خلالها تستطيع إن تشخص ضرر الحامض النووي DNA للنطفة وتعمل على المحافظة على سلامة العامل الوراثي حيث تشمل هذه الآليات عدة خطوات مهمة منها :

1- الكشف عن الضرر في الحامض النووي للنطفة
2- إصلاح الحامض النووي للنطفة
3- إيقاف دوران الخلية
4- إيقاف الموت الخلوي المبرمج Apoptosis . وبعد ذلك تعمل هذه الخطوات جميعها سويا لحماية الجنين من ضرر الحامض النووي للنطفة المتكون في كل من الامشاج الذكرية والانثوية .

ومن الجدير بالذكر إن امكانية البيضة في المرأة لتصليح الحامض النووي DNA في نطفة الرجل ربما تختلف جوهريا من بيضة إلى أخرى ويعتمد إصلاح البيضة للحامض النووي على عدة عوامل منها النوع ومدى الضرر بالإضافة إلى العمر وكذلك نوعية البيوض .

أشار Matsuda وجماعتة (1989) وكذلك Genesca و جماعتة (1992) إلى إنه من المتوقع إن تقوم البيضة بترميم المستوى القليل المتضرر من الحامض النووي للنطفة تحت الظروف الطبيعية ولكن عندما يكون الضرر حاد جدا وقاسي إضافة إلى وجود عجز في آليات الترميم التي من المحتمل إن تحدث عند التقدم في عمر الرجل مما يؤدي إلى ظهور نتائج تشمل إضعاف تطور الجنين .

2 .8 . 2 :العلاقة بين الإجهاد التاكسدي للنطفة وتحطم الحامض النووي (DNA) النطفة في عدم الخصوبة الذكرية : Relation between Sperm Oxidative stress and DNA damage in male infertility

يعد وجود المستويات العالية من الانواع الاوكسجينية الفعالة (ROS) في مختلف اشكال العقم الذكري ظاهرة علمية مهمة يُعتمد عليها في تشخيص العقم الذكري . (Agarwal *et al.*, 2009; Aikten ,2011) حيث اثبتت احدى الدراسات العلمية إن وجود الانواع الاوكسجينية الفعالة في الرجال العقيمين يؤدي الى ضرر الحامض النووي DNA النطفي وتحطيم البروتينات والدهون الموجودة في الاغشية المايتوكوندرية والبلازمية للنطف . (Gharagozloo and Aitken,2011) يعد الغشاء البلازمي للنطفة من أكثر الأغشية تعرضاً الى ضرر الاجهاد التأكسدي وذلك لانة غني بالاحماض الدهنية غير المشبعة الموجودة في تركيبه مثل حامض Docosahexaenoic والذي يتصف بانة يتحسس بشكل كبير لعوامل الأكسدة . (Jones *et al.*,1997) لاحظ Aitken وجماعته (1998) قدرة الانواع الاوكسجينية الفعالة (ROS) في زيادة نفاذية الغشاء البلازمي للنطفة مما يؤدي إلى إنخفاض في حركة النطفة وفشل عمليتي تفاعل الجُسيم الطرفي Acrosome Reaction واتحاد النطفة بالبيضة Sperm Oocyte Fusion .كما تسبب الانواع الاوكسجينية الفعالة (ROS) ضررا للحامض النووي DNA في النواة و بيوت الطاقة في النطفة البشرية (Sawyer *et al.*,2003) ويتم ذلك من خلال تحطم قواعد الحامض النووي DNA للنطفة وبالأخص قاعدة الگوانين وكذلك تحطم الروابط الفسفورية بين قواعد الحامض النووي DNA للنطفة مما يسبب عدم استقرار الجزيئة والتي في النهاية تؤدي الى تجزئة الحامض النوويDNA النطفي (Wang *et al.*.,2003;Villegas *et al.*.,2005) . يكون الجهد التأكسدي المسبب لضرر الحامض النووي DNA للنطف ذات منشأ داخلي أو خارجي (Gharagozloo and Aitken,2011) .حيث تعد خلايا الدم البيض والنطف غير السوية المصدر الرئيسي للانواع الاوكسجينية الفعالة الداخلية المنشأ في المني (Aitken *et al.*,1995) . إن الفشل الوظيفي للنطف مؤشراً مهما لوجود زيادة في إنتاج الانواع

الاوكسجينية الفعالة (ROS) في المني (Aitken *et al*.,2003) . ويعتقد إن الضرر في الحامض النووي DNA للنطفة يعود بشكل رئيسي إلى وجود الانواع الاوكسجينية الفعالة في المايتوكونديريا مما ينعكس سلبا على وظيفة النطف وبالاخص حركة النطف .

2 . 8. 3 : أسباب ضرر الحامض النووي (DNA) النطفي :

Causes of sperm DNA damage

هنالك ثلاث فرضيات تفسر اسباب تحطم الحامض النووي DNA للنطفة في خلية النطفة البشرية اولا: يعتقد إن الضرر الحاصل للحامض النووي DNA للنطفة يعود إلى حدوث خلل في عملية التعبئة Packaging للكروماتين (Sharma *et. al* .,2004) .
ثانياُ: يُعتقد إن الاجهاد التأكسدي سبب لتحطم الحامض النووي DNA في خلية النطفة البشرية . (Agarwal and Said,2003)
ثالثاً: إن ظاهرة موت الخلية المبرمج Apoptosisسبب لحدوث الضرر في الحامض النووي DNA للنطفة (Sakkas *et al*..,2002) .

2. 8 . 4 : طرق تقييم النضج النووي :

2 .8 . 4 . 1 : طريقة صبغة الانيلين الزرقاء الحامضية Acidic aniline blue stain method

إن مبدأ هذه الطريقة يعتمد على التمييز او التفريق بين الهستونات الغنية بالحامض الاميني اللايسين والبروتامين الغني بالحامضين الامينيين الارجنين والسستين . هذه التقنية تعطي تفاعلاً نوعياً ايجابياً للحامض الاميني القاعدي اللايسين ويكشف الاختلاف في الاساس التركيبي للبروتين النووي للنطف حيث تكون النوى غنية بالهستونات للنطف غير الناضجة وهذه الهستونات غنية بالحامض الاميني اللايسين ومن ثم تصتبغ باللون الازرق ومن ناحية اخرى النوى التابعة للنطف الناضجة تحتوي على البروتامينات وهذه البروتامنيات تحتوي على الحامضين الامينيين الارجنين والسستين وكذلك تحتوي على نسبة قليلة من اللايسين والذي يعني إنها لاتصطبغ باللون الازرق (Hammadeh *et al*.1996)

2. 4.8.2 :طريقة صبغة التولويدين الزرقاء Toluidine blue stain method

صبغة التولودين هي صبغة نووية قاعدية تستعمل لتلوين الكروماتين وللتفريق بين الكروماتين المتضرر من غير المتضرر .حيث تتحد بشدة مع الكروماتين المتضرر وتكون هذه الصبغة حساسة لتركيبة الـDNA واغلفته ، إن مبدا هذه الصبغة يعتمد على الشحنة السالبة الموجوده على الكروماتين حيث يتصف الكروماتين المتضرر بانة اكثر سالبية من الكروماتين غير المتضرر ويكون من السهل ازالة الصبغة عن الكروماتين الطبيعي (Erenpreisa *et al.*;2003)

3. 4 . 8. 2 : صبغة الكروموماسين A3 : Chromomycin A3 assay

صبغة الكروموماسين A3 صبغة نووية المتالقة الخاصة بالزوج القاعدي guanine– cytosine وفائدتها الكشف عن الكروماتين المتضرر في النطف عن طريق الكشف غير المباشر للـ(DNA) الذي يحوي على عدد قليل من البروتامين ومبدا عمل هذه الصبغة هو التنافس بين صبغة Chromomycin A3 والبروتامين على نفس مواقع الارتباط في جزيئة الـDNA ومن ثم فان وجود الصبغة بكمية عالية يشير الى قلة البروتامين في النطف (Manicardi *et al.;* 1995)

9.2 : عملية التجميد : Cryopreservation Processes

تعود محاولات عملية تجميد النطف Sperm Cryopreservation الأولى إلى العام 1776م عندما أوضح العالم Lazzaro إن نطف الخيول التي تم تجميدها في الثلج Snow استعادت قسم من قدرتها الحركية بعد إجراء عملية الإذابة لها ،وفي العام 1866 قام العالم الايطالي Mantegazza بتقديم مفهوم بنك النطف البشري Human Sperm Bank لغرض حفظ العينات المنوية بعد نجاح تجربته في تبريد النطف البشرية إلى درجة حرارة -15 درجة مئوية . (Bunge *et al.* , 1954)وحدث تقدم جيد للعملية بوساطة جهود العالمين Bernstein و Petropavlovski في العام 1937 اللذين توصلا إلى إدخال الكليسيرول glycerol كعامل يساعد في تقليل تأثير التجميد على النطف ، مما مكن من إطالة المدة في تجميد النطف ،و سهل ذلك إن تصبح عملية التجميد للنطف ممكنة بصورة عملية , ونتيجة حدوث التوسع في تقنيات صناعة الالبان Dairy Industry، أدى ذلك إلى زيادة عمليات التلقيح الصناعي للحيوانات Artificial Insemination ، مما ادى إلى حدوث تقدم في الطرق المستخدمة في مجال علم التجميد للنطف (Isachenko *et al.* ,2003) . وسجل العالم Chang (1940) أول ولادة في الارانب من أجنة حفظت عند درجة حرارة مساوية إلى صفر درجة مئوية 0 °C ، ويعتبر العالم Lovelock المؤسس لعلم التجميد الحديث لاعمالة خلال الفترة من 1950-1960 . (Rama *et al.* , 2006) . تلى ذلك الاكتشاف الهام المتمثل في امكانية استخدام سائل النيتروجين

(Nitrogen Liquid) لغرض حفظ النطف داخلة عند درجة حرارة مقاربة ل 196- درجة مئوية تحت الصفر ، هذا وفر نسبا"جيدة من ناحية حركة وعيوشية النطف مقارنة بتلك الطرق التي تجمد فيها النطف بدرجات حرارية تصل إلى.20- درجة مئوية تحت الصفر (Katkov *et al.* , 2006) .

ونتيجة إلى التقدم الواسع الحادث في مجال الطب التكاثري في العقود الخمسة الأخيرة الماضية ،جعل ذلك عملية تجميد النطف البشرية أداة هامة في إنجاح التداخل ألسريري لحالات عدم الخصوبة إضافة في إنجاح استحداث بنوك السائل المنوي .

إن تقدم تقنيات التكاثر المعان (Assisted Reproductive Techniques) والتوصل لاستخدام تقنية الحقن ألمجهري للنطف في السايتوبلازم ، والتقدم الحادث في التقنيات المعنية في التعامل مع المشيج الأنثوي، استدعى ذلك زيادة الطلب والحاجة إلى تقنيات تجميد عينات المني والأنسجة التي تحوي خلايا النطف . (Moskovtsev *et al.* ,2010)

تعرف عملية التجميد Cryopreservation بأنها عملية حفظ المواد البيولوجية بدرجة حرارة اقل من الصفر مثل 80 – أو 196 – والتي يحد فيها التفاعلات الخلوية الكيموحيوية المسؤولة عن موت الخلايا بصورة فعالة ، وتهدف العملية اساسا"إلى محاولة الحفاظ على عيوشية الخلايا والنشاط الوظيفي بعد مدة من الحفظ بدرجة حرارة تقل عن الصفر المئوي ، 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 عملية تجميد النطف أصبح طريقة نموذجية يلجا إليها المريض في عدد من الحالات، ومن ضمنها:

1 - التعرض إلى حالة العقم المحتملة التي قد تحدث نتيجة استخدام علاجات كيمائية Chemotherapy أو إشعاعية Radiotherapy لعلاج الحالات السرطانية أو غير السرطانية.

2 - التعرض إلى حالة العقم المحتملة التي قد تحدث نتيجة إجراء عملية جراحية قد تتداخل في الحالة مثل العمليات الجراحية في عنق المثانة Bladder Neck Surgery في الشباب صغار العمر، أو إزالة الخصية الثانية لدى المريض بحالة الورم الخصوي الجانبي.(Dohle *et al.* , 2007)

3 – في حالة إنخفاض نوعية المني بشكل مستمر نتيجة إمراض تحمل مخاطر تتعلق بتولد حالة فقدان النطف في السائل المنوي (Azoospermia) .

4 – في حالات إزالة الوعاء الناقل Vasectomy ورغبة الفرد في الحصول على الأطفال مستقبلا"

5 – في حالات المرضى عديمي النطف والذين خضعوا إلى عملية سحب النطف من البربخ أو أنسجة الخصى .

6 – بعض الإمراض مثل داء السكري والاضطرابات المناعية والتي قد تؤدي إلى حالة الفشل الخصوي (Testicular Failure) .

7 – يعد ضروريا" في الدول التي يسمح فيها القانون بإجراء عملية الإخصاب المختلط في إنظمة التلقيح داخل الرحم . (Saito *et al.* , 2005)

1 .9. 2 : أنواع عملية التجميد : Types Of Cryopreservation

هناك نوعان من عمليات التجميد:عمليات التجميد البطيئة Slow Freezing وعمليات التجميد السريعة Rapid Freezing . وكل الطرق تهدف إلى تحقيق غاية واحدة وهي محاولة الحفاظ على الخلية لأطول فترة ممكنة من تأثيرات التبريد و تكوين الثلج الخلوي و الجفاف والتأثيرات السامة الحادثة عند الدرجة الحرارية المنخفضة

1.1.9.2 : عمليات التجميد البطيئة : Slow Freezing Processes

صممت بوساطة العالمين Behrman and Sawade (1966)، وتتضمن سلسلة من الخطوات المتعاقبة تستغرق وقتا"من 2 -4 ساعة ، ويتم تنفيذها اما بشكل يدوي أو بواسطة استخدام مجمد خاص .وتتضمن الطريقة اليدوية تخفيض درجة الحرارة من درجة الغرفة إلى 5 م^0 وبمعدل تخفيض 0.5 - 1 م^0/ دقيقة ، يلي ذلك تخفيض درجة الحرارة من 5 م^0 إلى 80- م^0 و وبمعدل تخفيض1- 10 م^0/ دقيقة ، يتبع ذلك وضع العينة في سائل النتروجين الذي تبلغ درجة حرارته 196- م^0 (Said *et al* , 2010) .

2.1.9.2 : عمليات التجميد السريعة : Rapid Freezing Processes

وهي احد تقنيات علم التجميد الحديثة ضمن هذا الحقل من علم التناسل ، وتدعى أيضا" ب Vitrification والذي يعني (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 و تكوين الثلج الخلوي و الجفاف والتأثيرات السامة الحادثة عند الدرجة الحرارية الواطئة ولا تحتاج التقنية إلى متطلبات خاصة لتحقيق ذلك، تعتمد الطريقة على التبريد السريع لوسط العينة المراد تجميدها عن طريق الغمر في سائل النتروجين الذي تبلغ درجة حرارته 196- م^0 مما يساهم

في تقليل فرصة تكوين البلورات الثلجية الكبيرة Large Ice Crystals التي تتكون أثناء عمليات التجميد (Isachenko *et al*. ,2007) .

قدمت الطريقة لأول مرة من قبل العالم Sherman ، وتشمل الطريقة الاتصال المباشر بين العينة وبخار سائل النتروجين لفترة من 8 - 10 دقائق ويتبع ذلك غمرها في سائل النتروجين .وطورت الطريقة لكي تحاول التقليل من عيوب الطريقة البطيئة، ويمكن إن تعرف بالشكل التالي:عملية تعريض الوسط إلى خفض في درجة الحرارة باستخدام معدلات تبريد عالية بصورة سريعة والتي تؤدي إلى التحول الفائق السرعة Super Cooling للوسط المحتوي على تركيز عالٍ من مواد تساعد على التقليل من تأثير عملية التجميد Cryoprotectants Substances وتؤدي العملية إلى حدوث حالة من زيادة سريعة في لزوجة الوسط يتبعها تكون حالة تشبه الزجاج مقللة بذلك من فرصة تكوين بلورات ثلجية والضرر الخلوي المتولد منها ، تحت هذا التأثير لزوجة السايتوسول Cytosol لم تعد بحالة سائلة و إنما أصبحت تملك صفات الحالة الصلبة ، وتستغرق الطريقة مدة زمنية قصيرة، وتحتاج إلى مواد غير مكلفة وتكون معدل التبريد فيها سريعاً جدا"

(Naworth *et al*. ,2002)والجدول(2 – 2) ادناه يوضح عمليات التجميد باستخدام الطريقة السريعة والطريقة البطيئة (Rama *et al*. , 2006) :

المتغير	التجميد السريع	التجميد البطئ
الوقت المتطلب	اقل من 10دقائق	أكثر من 3 ساعات
المواد	اقل كلفة	أكثر كلفة
الضرر الميكانيكي	اقل ضررا"	أكثر ضررا"
تكوين الثلج الخلوي	اقل	أكثر
تركيز مواد الحافظة من ضرر التجميد	عال	منخفض
تحطيم Zona Pellucida	لايحدث	متوقع

2.9.2 : مبادئ التجميد السريع Vitrification Principle

تتضمن الطريقة تعريض الخلية إلى تركيز عال من المواد الحافظة من ضرر التجميد Cryoprotectants Factors لمدة زمنية قصيرة عند درجة حرارة الغرفة ومن ثم يتبع ذلك إجراء عملية تبريد سريعة .

يكون الوسط حاوي على العوامل الحافظة من ضرر التجميد والتي يكون تركيزها عادة اقل ب 10% من الوسط الخلوي ، يؤدي ذلك إلى حدوث حالة الجفاف في الخلية لان الازموزية العالية لعوامل التجميد تؤدي إلى حالة التنافذ الخلوي لماء الخلايا ، وهذا يجعل الخلايا تحتفظ بكميات قليلة من الماء داخلها ،يتبع هذه الخطوة وضع العينة في سائل النتروجين ، وبسبب احتواء الخلايا على كميات قليلة من الماء داخلها ، فان فرصة تكون البلورات الثلجية داخل الخلايا تقل (Rama *et al.* , 2006) .

3. 9. 2 :المواد الحافظة من ضرر التجميد Cryoprotectants Substances

وهي مواد كيميائية ذات وزن جزئي واطئ وتمتلك نفوذية عالية highly permeable تستخدم في المساعدة على حماية النطف من تأثيرات عملية التجميد وخصوصا" نسبة تكون البلورات الثلجية ice crystallization .

ومن اهم المواد الحافظة من ضرر التجميد المستخدمة **:**الكليسيرول glycerol واثلين كلايكول ethylene glycol وداي مثيل سلفواكسيد dimethyl sulphoxide و 1، 2 – بروبان يدايول 1,2-propaned iol). **ويعتمد** مبدأ عملها على خفض نقطةِ إلانجماد freezing point للمادة وخفّضُ كميةُ الأملاحِ و المذاب solutes الموجودة في الطور السائل للعيّنةِ وتقليل تشكيلِ الثلجِ داخل النطف .(Royere *et al.* ,1996) . تضاف قطرات من المواد الحافظة من ضرر التجميد الى حجم مقارب مِنْ المني بشكل تدريجي مع المزج المتواصل للعينة بلطف في درجةِ حرارة الغرفةِ، وبعد ذلك توَضعَ في درجة حرارة 37 لمدة 10- 15 دقيقةِ للسَماح للموازنةِ الصحيحةِ ، ومن الضروريُ إن يتداخل الوسطُ بالخلايا لان تأثير المواد الحافظة من ضرر التجميد تعتمد على وقت التفاعلِ بينها وبين الخلايا (Fabbri *et al.* ,2004) .

4.9. 2 :تأثيرات التجميد السريع على الخلايا النطفية : Effect Of Vitrification On Sperm

تتضمن عملية التجميد للنطف أجراء عدد من العمليات مثل عملية تخفيف الوسط المراد تجميده بإضافة المواد الحافظة من ضرر التجميد ، وكذلك عملية غمر المزيج في سائل النتروجين ذو درجة حرارة 196- م وعملية التدفئة والإذابة للعينات والتي تشمل بدورها عدد من العمليات من تدفئة باستخدام الحمام المائي وأجراء عملية فصل وسط التجميد بأجراء عملية الطرد المركزي وسط التنشيط (Luvoni, 2006) . وإضافة

وغيرها ويعتقد إن كل خطوة من هذه العمليات تستحث حدوث تأثيرات سلبية قد تؤدي لتوليد الضرر في كل من تركيب الأغشية البلازمية للنطف وخفض القدرة الحركية والتخصيبية وإعادة غير الناضج Premature nuclear decondensation . التكثف النووي

. (Maxwell and Watson ,1996 ,Cormier and Sirard ,1997)

إن نطف الحيوانات الثديية تكون ذات حساسية عالية إلى حالة خفض درجة الحرارة إلى ما بعد درجة إنجماد الماء (صفر مْ) وذلك ناتج من الخصوصية في تركيب الأغشية البلازمية والأغشية داخل الخلوية والتي تعتبر مواقع رئيسية لحدوث الضرر الخلوي عند تجميدها (Bailey *et al*,2003) .

كما أوضحت دراسة (Kumar *et al* ,2011) إن عملية التجميد تؤدي إلى حدوث إنخفاض معنوي في مستويات كل من مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية بعد إجراء عمليات التجميد والإذابة وحدوث زيادة في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة داخل الوسط .

ان زيادة مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة وانخفاض مستويات مضادات الأكسدة يؤدي لحدوث حالة الجهد التاكسدي والتي تكون كل المكونات الخلوية للنطفة مثل الدهون Lipids والبروتينات proteins والأحماض النووية Nuclici acid والسكريات sugars اهداف محتملة لتأثيرات الإجهاد التاكسدي السامة (Raghuveer *et al* ,2010)

كما ان الزيادة العالية في مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة و انخفاض مضادات الاكسدة ربما يؤدي إلى زيادة معدلات الموت الخلوي المبرمج في مجتمع الخلايا النطفية . (Wang *et al*, 2003)

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

1.3 : عينات الدراسة The Study samples

أُنجزت هذه الدراسة في ممريضا"،قن ألمجهري وتجميد النطف التابع إلى مركز الخصوبة في مدينة الصدر الطبية / محافظة النجف ألاشرف ، وامتدت الدراسة من أيار 2012 إلى نيسان2013 شملت الدراسة (90) مريضا" ، وكان تقسيمهم اعتمادا" على حالتهم المرضية إلى :

مرضى وُهن النطف Asthenozoospermic الذين كانت لديهم النسبة المئوية لحركة النطف التقدمية اقل من 50% وعددهم (30) مريضا"، ومرضى قلة النطف Oligozoospermic الذين كان لديهم تركيز النطف اقل من20×10^6/ ml وعددهم (30) مريضا"،، ومرضى سواء النطف Normozoospermic الذين كانت لديهم النسبة المئوية لحركة النطف التقدمية أكثر من 50% , و تركيز النطف أكثر من 20×10^6/ ml وعددهم (30) مريضا . كان معدل العمر لدى مرضى سواء النطف (1.31 ± 32.2) و معدل العمر لدى مرضى قلة النطف (1.29 ± 31.1) و معدل العمر لدى مرضى وهن النطف (1.23 ± 33.1) .

2:3: الأجهزة المستخدمة Instruments

تم استخدام العديد من الأجهزة ذات الصلة بانجاز هذه الدراسة وذلك على وفق الجدول :

الجدول (3-1) يوضح الأجهزة المستخدمة لانجاز خطوات البحث مع اسم الشركة المجهزة وبلد المنشأ

ت	اسم الجهاز	الشركة المجهزة وبلد المنشأ
1	جهاز نبذ مركزي Centrifuge	Hittich-(Germany)
2	حاضنة CO2 Incubator	Genx International- USA
3	حاضنة هواء Air Incubator	Green Field, Oldham-(England)
4	حامل ألمنيوم خاص aluminum cane	BDH (England)
5	حمام مائي Water bath	Memmert-(Germany)
6	**حوض خاص للنيتروجين السائل** Nitrogen Tank	BDH (England)
7	ماصة أوتوماتيكية Micro pipette	Slamid- (France)
8	مجهر ضوئي Light microscope	Olympus-(Japan)
9	مرشح (0.22) Filter	Millipore –(USA)

10	مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer	Shimadzu, Seisakusho, LTD-Japan
11	ممصات مدرجة Graduate pipit	Falcon
12	منظم الأس الهيدروجيني PH- meter	Jenway - (Germany)
13	ميزان حساس Sensitive balance	Mettler-(USA)

3:3: المواد الكيميائية والأوساط المستخدمة :

الجدول (3-2) يوضح المواد الكيميائية والأوساط المستخدمة لانجاز خطوات البحث مع اسم الشركة وبلد المنشأ

ت	اسم المادة الكيميائية	الشركة المجهزة وبلد المنشأ
.1	مسحوق حامض الثايوباربيتيوريك Thiobarbituric acid bowder Powder (TBA)	BDH (England)
.2	مسحوق حامض ألخليك ثلاثي الكلور Trichloroacetic acid TCA Powder	Thomas Baker (India)
.3	مسحوق لفيتامين E . Alpha-tocopherrol Powder	BDH (England)
.4	مسحوق مادة الكلوتاثايون Glutathione Powder	BDH (England)
.5	مسحوق محلول الفوسفات الدارئ (PBS) Phosphate buffer saline Powder	BDH (England)
.6	حامض ألخليك الثلجي Glacial acetic acid	Merck, Darmstadt(Germany)
.7	سائل نايتروجيني بدرجة حرارة _196	Iraq,
.8	صبغة الانلين الأزرق Aniline blue stain	Hannover (Germany)
.9	كت لفحص لفحص عيوشية النطف Viability kit	BDH (England)

.10	محلول الكلوترالديهايد تركيز 25% Glutaraldehyde	Merck, Darmstadt(Germany)
.11	وسط تجميد النطف SPERM FREEZE medium	Fertipro (Belgium)
.12	وسط تنشيط النطف IVF medium	Fertipro (Belgium)

4.3 : البيانات المختبرية للمرضى :

تم تسجيل البيانات المختبرية لكل مريض وفق الاستمارة المخصصة لهذا الغرض (الشكل 3-1)، والتي تضمنت البيانات التالية :

(الشكل 3-1) استمارة البيانات المختبرية للمرضى المستخدمة في الدراسة :

الاسم : **الرقم والتاريخ : ( ) / / 201**
العمر : **سنة** **نوع العقم : spermia**
مدة الامتناع : **يوم**
( ) Vitrification + vitamin

المعالم The parameters	قبل التنشيط	بعد التنشيط	التجميد والإذابة					
			شهر1		شهر 2		شهر 3	
حجم المني (مل)								
زمن الاماعة (دقيقة)								
تركيز النطف مليون / مل				مضاد أكسدة نوع		مضاد أكسدة نوع		مضاد أكسدة نوع
النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية %	%	%	%	%	%	%	%	%
النسبة المئوية للنطف السوية(%)	%	%	%	%	%	%	%	%
النسبة المئوية لعيوشية النطف(%)	%	%	%	%	%	%	%	%
تركيز الخلايا الدائرية مليون / مل								
تركيز المالون داي الديهايد MDA (مايكرو مول / لتر)								
النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي(%)	%	%	%	%	%	%	%	%

5.3: جمع السائل المنوي : Seminal Fluid Collection

جمعت عينات السائل المنوي في وعاء Container نظيفً وجافً نبيذ سعته (4o) ملي لتراً وكتب اسم الزوج 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 .

6.3: فحص السائل المنوي Seminal fluid Analysis

بعد اكتمال الاماعة التي تم تثبيت زمنها فحصت كل عينة فحصاً عيانياً و مجهرياً وسجلت معلومات ونتائج اختبارات المني استنادا" إلى تقرير منظمة الصحة العالمية (WHO, 1999,. 2010)وفق مايأتي :

1.6.3 : الفحص العياني Macroscopic examination

1.1. 6.3 : حجم المني Semen volume

تم قياس حجم السائل المنوي بواسطة أنابيب اختبار مدرجة، يتراوح الحجم الطبيعي لدفق الرجل بين 2- 6 مل وقد عدت العينة ناقصة الحجم Hypovolumic إذا قل حجمها عن 2 مل ، في حين كانت مفرطة الحجم Hypervolumic إذا زاد حجمها عن 6 مل .

2.1. 6.3 : اللون Color

يبدو السائل المنوي متجانساً ذا لون حليبي milky. ويدل اللون الأحمر البني على وجود خلايا الدم الحمر بينما يشير وجود الخيوط المخاطية Mucus streaks مع اللون الأصفر إلى الإصابة بالخمج .

3. 1. 6.3 : زمن الاماعة Liquefaction Time

تم قياس مدة الاماعة من وقت اخذ العينة وحتى إتمام تميعها بتغير قوام المني من شبة السائل إلى القوام السائل حيث تتم الاماعة التامة لعينة السائل المنوي ضمن 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ونادرا ما تكتمل خلال 60 دقيقة .

4. 1. 6.3 : اللزوجة Viscosity

بعد الاماعة ، تم تقدير المني المتميع من خلال ملاحظة الخيط المخاطي ، وذلك بدفق العينة من الماصة pipette ، ويعد قوام المني سوياً عند تدفقه قطرة فقطرة من الماصة ، بينما يكون القوام شاذا عندما تكون العينة خيطياً أكثر من 2 سم .

2. 6. 3 : الفحص ألمجهري Microscopic examination

الفحص ألمجهري الأولي Initial microscopic Examination تضمن اخذ قطرة 10 ماكروليتر من عينة السائل المنوي بعد مزجها مزجاً جيداً بعد الاماعة التامة ، ووضعت على شريحة زجاجية دافئة وغطيت بغطاء زجاجي Cover slide ، ثم فحصت العينة تحت العدسة الشيئية أولا تحت القوة X 10 ومن ثم القوة 40X. وتم قياس معالم النطف التالية: تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية للنطف السوية والنسبة المئوية لعيوشية النطف وتركيز الخلايا الدائرية .

1.2. 6. 3: تركيز النطف Sperm concentration

تم تقدير تركيز النطف في 1 مليلتر من معدل عدد النطف في عشرة حقول مجهريه Fields عشوائية وضرب معدل العدد بالعامل 10^6 ، أما العدد الكلي Total count للنطف فيستخرج من حاصل ضرب تركيز النطف بحجم الدفق.

2.2. 6.3: النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية (A + B)

Sperm motility forward movement Percent

تم حساب النسبة المئوية للنطف المتحركة تقدمياً forward movement بحسب المعادلة الآتية :-

$$\text{النسبة المئوية لحركة النطف} = \frac{\text{عدد النطف المتحركة حركة تقدمية}}{\text{عدد النطف الكلي}} \times 100$$

كما شخصت النطف ذات الحركة اللاتقدمية والتي لاتظهر التقدم في حيز المحدد أو لاتقوى على انجاز حركة خطية مستقيمة أو قطع مسافة مرئية (Yeung *et al* ., 1993) .

3.2. 6. 3: النسبة المئوية للنطف السوية Normal sperm morphology percent

تعد النطف غير طبيعية عند ملاحظة أي انحراف في شكلها السوي، وتشمل التشوهات التي تحدث في رأس النطفة الحالات التالية:

الرأس الضخم Macrocephalic ، والرأس الصغير Microcephalic ، والرأس المستدق Tapered head ، وداية الرأس Amorphous head ، أما التشوهات في ذيل النطف فتشمل الذيل الداي Double tail ، والذيل الملتف Coiled tail ، والذيل المنحني Bent tail وعديمة الذيل . وقد يحدث تشوه في القطعة الوسطية وهو وجود القطيرة الهيولية حوللنطف السويةف على إنها تشوه

ثانوي . تم عد النطف في عشرة حقول عشوائيا ومن ثم حسبت النسبة المئوية للنطف السوية حسب المعادلة الآتية :

$$\text{النسبة المئوية للنطف السوية} = \frac{\text{عدد النطف السوية}}{\text{عدد النطف الكلية}} \times 100$$

4.2. 6.3:النسبة المئوية لعيوشية النطف Sperm viability percent

تم استخدام صبغة الايوسين لوحدها في اختبار عيوشية النطف Vitality Test Using Eosin alone ، حيث أخذت 5 ماكروليتر من الايوسين و5 ماكروليتر من السائل المنوي ووضعت القطرتان على الشريحة الزجاجية ومزجت جيداً ووضع غطاء الشريحة Cover slid وتركت لمدة 30 ثانية وبعدها تم الفحص تحت المجهر، لذا تم ملاحظة إن النطف الحية (live) يصطبغ غشاؤها الخارجي فقط بالصبغة دون أن تدخل إلى داخل الخلية على اعتبار غشاءها الخلوي يمنع مرور الصبغة أما النطف الميتة (Dead) فسوف تصطبغ بالصبغة لان تلف غِشائها يفقد السيطرة على النفاذية ويسمح بدخول الصبغة وتصبح ذات لون احمر.

تم حساب مائتي نطفة على الأقل في كل شريحة ومن ثم حسبت النسبة المئوية لعيوشية النطف حسب المعادلة الآتية:-

النسبة المئوية لعيوشية النطف=(عدد النطف الحية) / (عدد النطف الكلي) × 100

5.2. 6.3 : تركيز الخلايا الدائرية Round cell concentration

تم حساب عدد الخلايا الدائرية في عينات السائل المنوي بقوة التكبير 40 X حيث عدت الخلايا في عشرة حقول مجهريه وضرب المعدل في 10^6 / خلية في الملليتر الواحد للقذف الكلي، إن الخلايا الدائرية الموجودة في عينة المني البشري هي كريات الدم البيض وخلايا نطفية غير ناضجة كطلائع النطف Spermatid ، وأن العدد السوي لخلايا البيض في عينة السائل المنوي اقل من مليون في الملليتر الواحد1 × 10^6 ، بينما عدد الخلايا البلعمية الطبيعي اقل من نصف مليون في الملليتر الواحد من السائل المنوي . ويجب أن تكون جميع الخلايا النطفية غير الناضجة في السائل المنوي أقل من 5 % من مجموع عدد النطف ، وقد عدت العينة التي تحتوي على معدل أكثر من خمسة مليون خلية لكل مل عينة غير سوية.

7. 3 :تركيز المالون داي ألديهايد Malondialdehyde concentration

تم حساب تركيز المالون داي الديهايد MDA في البلازما المنوية للسائل المنوي حسب الطريقة الموصوفة في (Muslih *et al*., 2002) حيث تم فصل عينات السائل المنوي بوضعها في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة /دقيقة ولمدة 15 دقيقة للحصول على البلازما المنوية وكانت الخطوات لطريقة العمل كما يلي :

1.7.3 :تحضير الكواشف **Preparation of Reagent**

1 - محلول ثلاثي كلور وحامض الخليك تركيز 70% Trichloroacetic acid (TCA)

تمت إذابة 70 غرام من مادة (TCA) في كمية من الماء المقطر وإكمال الحجم إلى 100 مل .

2 - محلول ثلاثي كلور وحامض الخليك تركيز 17.5% Trichloroacetic acid (TCA)

تمت إذابة 17.5 غرام من مادة (TCA) في كمية من الماء المقطر وإكمال الحجم إلى 100 مل .

3- محلول حامض ثايوباربيوتريك Thiobarbituric acid (TBA)

تمت إذابة 0.6 من مادة TBA في الماء المقطر وإكمال الحجم إلى 100 مل .

2.7.3 : - طريقة العمل

1- وضع 150 مايكروليتر من البلازما المنوية للسائل المنوي في أنبوبة اختبار زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف أليها 1 سم^3 من كل من 17.5% حامض الخليك ثلاثي الكلور TCA و 0.6% حامض الثايوباربيتيوريك TBA.

2 - وضعت الأنبوبة الزجاجية في حمام مائي مغلي لمدة (15) دقيقة ومن ثم بردت.

3- أضيف 1 سم^3 من 70% TCA ثم ترك المزيج في درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة.

4 - فصل الراشح باستعمال جهاز الطرد المركزي لمدة (15) دقيقة عند السرعة 2000 دورة/دقيقة.

5 - قراءة الامتصاصية للراشح باستعمال جهاز المطياف الضوئي عند الطول ألموجي 532 نانومتر وحساب تركيز المالون داي الديهايد بحسب المعادلة الآتية:

$$MDA\,\text{conc.}\,(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{A532}}{\text{L}\times\text{E}_\text{o}}\times D$$

A: Absorbance at 532 nm

L: Light bath= 1 cm

E_o: Extiniction Coefficient= 1.56×10^5 M^{-1} cm^{-1}

D: Dilution factor = 1 ml/ 0.15 ml=6.7

8.3 : تقييم كروماتين النطفة **Sperm chromatin assessment**

تم تقييم الضرر الحاصل في كروماتين النطف حسب الخطوات التالية :

(Vieytes *et.al.*,2008; Sasikumar and Dakshayani,2013)

1.8.3 :تحضير الكواشف **Preparation of Reagent**

1 - محلول الفوسفات الدارئ Phosphate buffer saline (PBS)

تم إذابة 1 غرام من محلول الفوسفات الدارئ في 100 مل من الماء المقطر

2 - حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid

3 - صبغة الانلين الأزرق Aniline blue stain

تم إذابة 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 الخليك الثلجي لغرض الوصول إلى الأس الهيدروجيني 3.5

4 - محلول الكلوترالديهايد 3% Glutaraldehyde Solution

تم وضع 3 مل في محلول الكلوترالديهايد في اسطوانة مدرجة وأكمل الحجم النهائي إلى 100مل من محلول الفوسفات الدارئ PBS .

2.8.3 :خطوات طريقة تصبيغ كروماتين النطفة باستخدام صبغة الانلين الأزرق Aniline blue staining

1- وضعت كمية من محلول الكلوترالديهايد 3% المحضر في جار خاص

2- وضعت كمية من الصبغة الانيلين الأزرق المحضرة في جار آخر

3- تم عمل مسحة من السائل المنوي على شريحة زجاجية وتركت في درجة حرارة الغرفة لحين الجفاف

4- وضعت الشريحة الزجاجية الحاملة للمسحة في محلول الكلوترالديهايد 3% لمدة نصف ساعة

5- تم غسل الشريحة الحاملة للمسحة باستخدام محلول الفوسفات الدارئ PBS

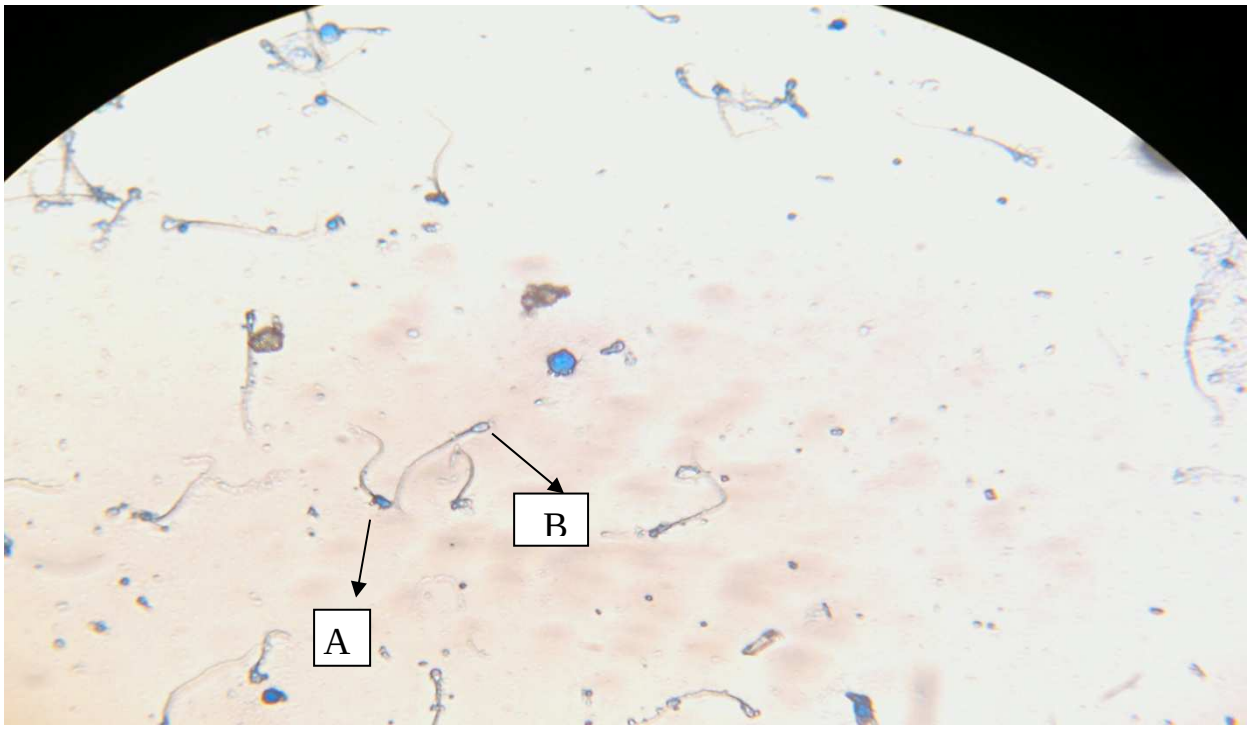
6- وضعت الشريحة الحاملة للمسحة في صبغة الانلين الأزرق لمدة 7 دقائق

7- نقلت 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 أو قليلة الصبغة الصور (3 - 1) و (3 - 2) و

(3 - 3) وتم حساب على الأقل 200 نطفة في كل شريحة وحددت النسبة المئوية لكروماتين النطف المتضررة Chromatin abnormality والكروماتين السوي وحسب المعادلة

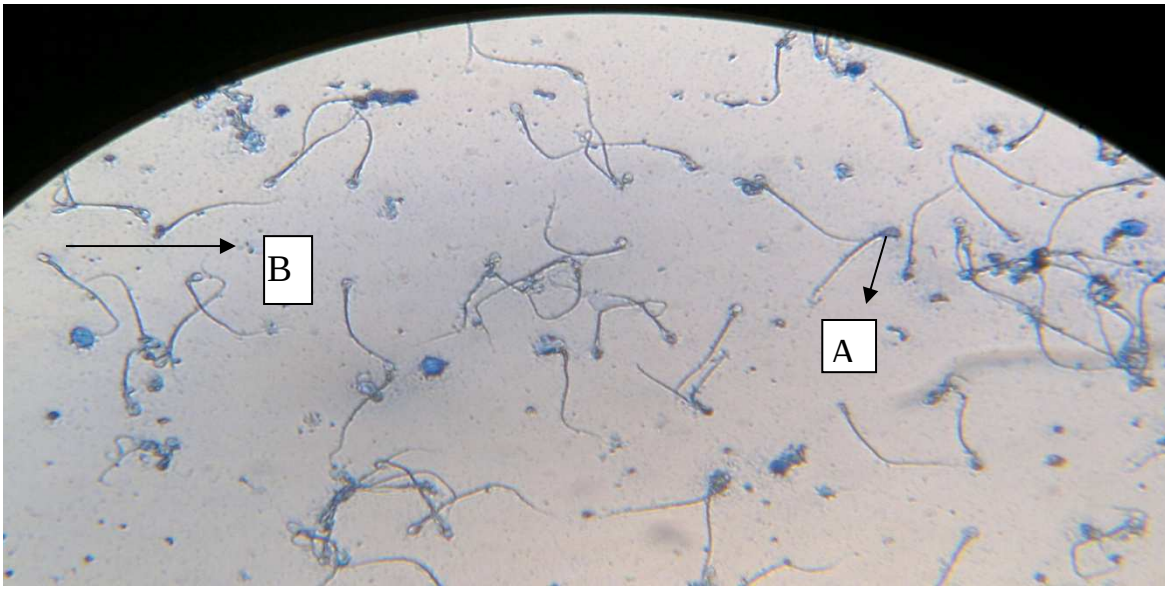
$$\text{نسبة الضرر} = \frac{\text{عدد النطف ذات الكروماتين المتضرر}}{\text{عدد النطف الكلي}} \times 100$$



صورة رقم (3 - 1) توضح تقييم النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى قلة النطف باستخدام صبغة الانلين الأزرق

A : اصطباغ رأس النطفة

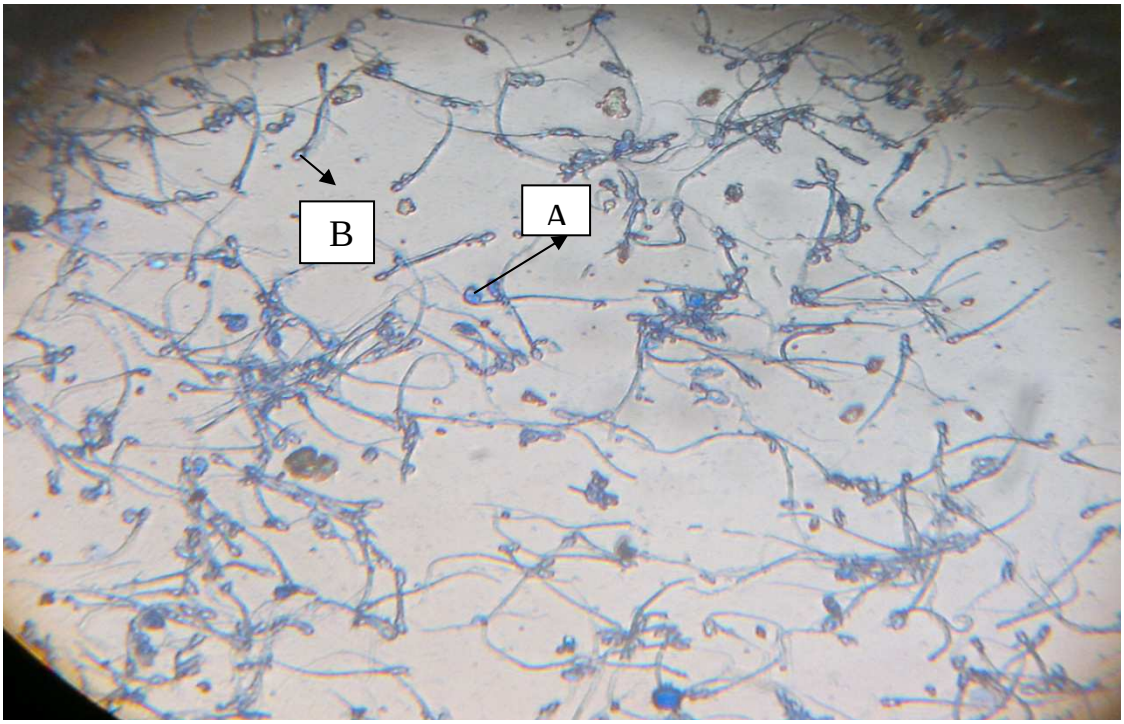
B : عدم اصطباغ رأس النطفة



صورة رقم (3 - 2) توضح تقييم النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى وهن النطف باستخدام صبغة الانلين الأزرق

A : اصطباغ رأس النطفة

B : عدم اصطباغ رأس النطفة



صورة رقم (3 - 3) توضح تقييم النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لمرضى سواء النطف باستخدام صبغة الانلين الأزرق

A : اصطباغ رأس النطفة

B : عدم اصطباغ رأس النطفة

9. 3 :تحضير مضادات الأكسدة Antioxidants

1.9.3 : فيتامين E Vitamin E

استخدم فيتامين E (المسمى تجارياً Alpha -Tochopherol) على شكل مسحوق ذي وزن 10 غرام / علبة . تم إذابة 0.00169 غرام في حجم معين من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل من الماء المقطر، وهذا الحجم يعادل تركيز 40 μmol (Mohammad *et al* ,2012.) .

2.9.3 : الكلوتاثايون Glutathione

تم استخدام الكلوتاثايون على شكل مسحوق ذي وزن 1 غرام / علبة حيث تم وزن 0.03 غم من الكلوتاثايون وأذابتها في حجم معين من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل من الماء المقطر، وهذا الحجم يعادل تركيز 1 ملي مول (Gadea *et al* ,2011) .

10.3: الأوساط المستعملة في تحضير النطف في الزجاج

In vitro Sperm Preparation Medium

أستخدم نوعان من الأوساط في الدراسة الحالية هما:-

1.10.3: وسط Ferticult IVF Medium

يحتوي في تركيبه على البيكاربونات ، الأملاح ، الكلكوز ، البايروفيت ،الانسولين ، وبروتين المصل البشري Human Serum Albumin ، والوسط مجهز من قبل شركة Fertipro . N.V Belgium ، ويستعمل لتنشيط النطف وأيضا كوسط لأجنة الثدييات بعد عمليات الحقن ألمجهري ICSI ويفضل قبل الاستعمال وضعها في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ و تركيز 5 - 6 % CO_2.

2.10.3 : وسط تجميد النطف Sperm Freeze Medium

يحتوي في تركيبه على الكليسيرول Glycerol و بروتين المصل البشري Human serum Albumin (HSA) وبفر (HEPES) والوسط مجهز من قبل شركة Fertipro . N.V Belgium ، ويستعمل لغرض تجميد النطف ، ويفضل إن يترك بعد مزجه مع العينة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق قبل إن توضع في سائل النتروجين .

11.3:التقنيات المستخدمة في تنشيط النطف : Techniques Used For Sperm Activation

1.11.3 : تقنية الغسل والنبذ Centrifugation Wash – Out technique

تم في هذه التقنية غسل عينة المني المتميع ونبذه باستخدام احد أنواع الأوساط الزرعية وهي الطريقة الأقدم والأكثر شيوعاً في عزل النطف كما تعد الطريقة القياسية المستخدمة في مختبرات IVF وتحضر كما يأتي :

1- تم إضافة(1-2) مل من الوسط ألزرعي IVF Medium إلى المني المتميع ونبذ المزيج بسرعة 3000 rpm لمدة 10 دقائق .

2- أزيل الطافي وأضيف 0.5 مل من الوسط ألزرعي IVF Medium على الحبيبة النطفية pellet.

3- يحضن أنبوب التنشيط في الحاضنة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 مْ وتركيز 5- 6 % CO_2.

4- تم فحص معالم النطف بأخذ قطرة من الجزء الطافي القريب من الحبيبة النطفية واخذ 250 مايكرو لتر من الطافي لغرض التجميد . (الهادي، 1997).

2.11.3 : تقنية الطبقية البسيطة : Simple Layer technique

1- تم وضع حجم من الوسط IVF Medium في أنبوبة اختبار مدرجة

2 - أضيف حجم السائل المنوي بوساطة ماصة أوتوماتيكية إلى قعر الأنبوبة برفق ، ثم حضنت في 37 مْ لمدة 30 دقيقة ثم تم فحص العينات المنشطة وذلك بأخذ قطرة من الجزء الأعلى للوسط بعد مرور مدة تحضين 30 دقيقة (السلطاني، 1997) .

12.3 : عمليات التجميد السريع والإذابة للنطف :

Sperm Vitrification and Thawing Processes

1.12.3 : عمليات التجميد السريع :Sperm Vitrification Processes

1 - تم وضع 250 مايكرو لتر من العينة المنشطة والمحضرة في أنبوب التجميد الخاص Cryovials الذي حجمه 1.8 مل .

2 - يتم إضافة 50 مايكروليتر من مضاد الأكسدة إلى وسط التجميد في حالة العينات المراد دراسة تأثير مضاد الأكسدة فيها .

3 – تم إضافة وسط تجميد النطف Sperm Freeze الذي يحوي مضاد الأكسدة بصورة تدريجية وبنسبة 1:0.7 من حجم العينة ،ويتم المزج بصورة جيدة .

4 –عُرض المزيج في أنبوب التجميد الخاص Cryovials إلى بخار سائل النتروجين على ارتفاع 20 سنتمتراً عن مستوى سائل النتروجين لمدة 10 دقائق .

5 – يُغمر المزيج في أنبوب التجميد الخاص Cryovials في الحوض الذي يحوي سائل النتروجين (Mohammad *et al* , ,2012)

3 . 12 . 2 : عمليات الإذابة للنطف :Sperm Thawing Processes

1- تم رفع أنبوب التجميد الخاص Cryovials من سائل النتروجين .

2 – وضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م^0 لمدة 5 دقائق .

3 – نقل المزيج إلى أنبوبة اختبار جديدة ، وعُرض المزيج إلى طرد مركزي بسرعة rpm 3000 لمدة 10 دقائق .

4 _ أزيل الراشح واخذ جزء منة لغرض حساب تركيز المالون داي ألديهايد MDA .

5– أضيف 250 مايكروليتر من IVF Medium إلى الراسب وتم مزجة ، ومن ثم نُقل إلى الحاضنة مع تركيز 5- 6 % CO_2 بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 30 دقيقة . Mohammad *et al*) (2012, ومن ثم تم دراسة معالم النطف والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي .

13.3: تصميم التجارب في هذه الدراسة Experimental design

صممت هذه الدراسة وفق ثلاثة محاور رئيسية هي:

1.13.3: المحور الأول : دراسة عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات المني لمرضى سواء النطف Normozoospermic patients

2.13.3:المحور الثاني : دراسة عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات المني لمرضى قلة النطف Oligozoospermic patients

3.13.3:المحور الثالث : دراسة عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات المني لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients

شملت الدراسة في كل محور من المحاور اعلاة 30 عينة سائل منوي تعود إلى 30 مريضا"، وقسمت عينات السائل المنوي في كل محور الى ثلاث مجاميع وبواقع 10 عينات لكل مجموعة .

المجموعة الأولى : تم إضافة مضاد أكسدة نوع فيتامين E مع وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) لغرض دراسة تأثيره في المعايير المدروسة ومقارنته مع تأثير استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

المجموعة الثانية : تم إضافة مضاد أكسدة نوع الكلوتاثايون GSH مع وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) لغرض دراسة تأثيره في المعايير المدروسة ومقارنته مع تأثير استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

المجموعة الثالثة : تم إضافة مضاد أكسدة نوع فيتامين الكلوتاثايتسمى Aliquotوسط تجميد النطف (Sperm Freeze) لغرض دراسة تأثيره في المعايير المدروسة ومقارنته مع تأثير استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

قسمت كل عينة من عينات السائل المنوي إلى ثمانية أجزاء متساوية تسمى Aliquot .

Aliquot 1 الجزء الأول : استخدم لفحص المعايير المدروسة والتي تشمل تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية للنطف السوية والنسبة المئوية لعيوشية النطف و تركيز الخلايا الدائرية و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و تركيز المالون داي الديهايد للعينة قبل أجراء عملية التنشيط .

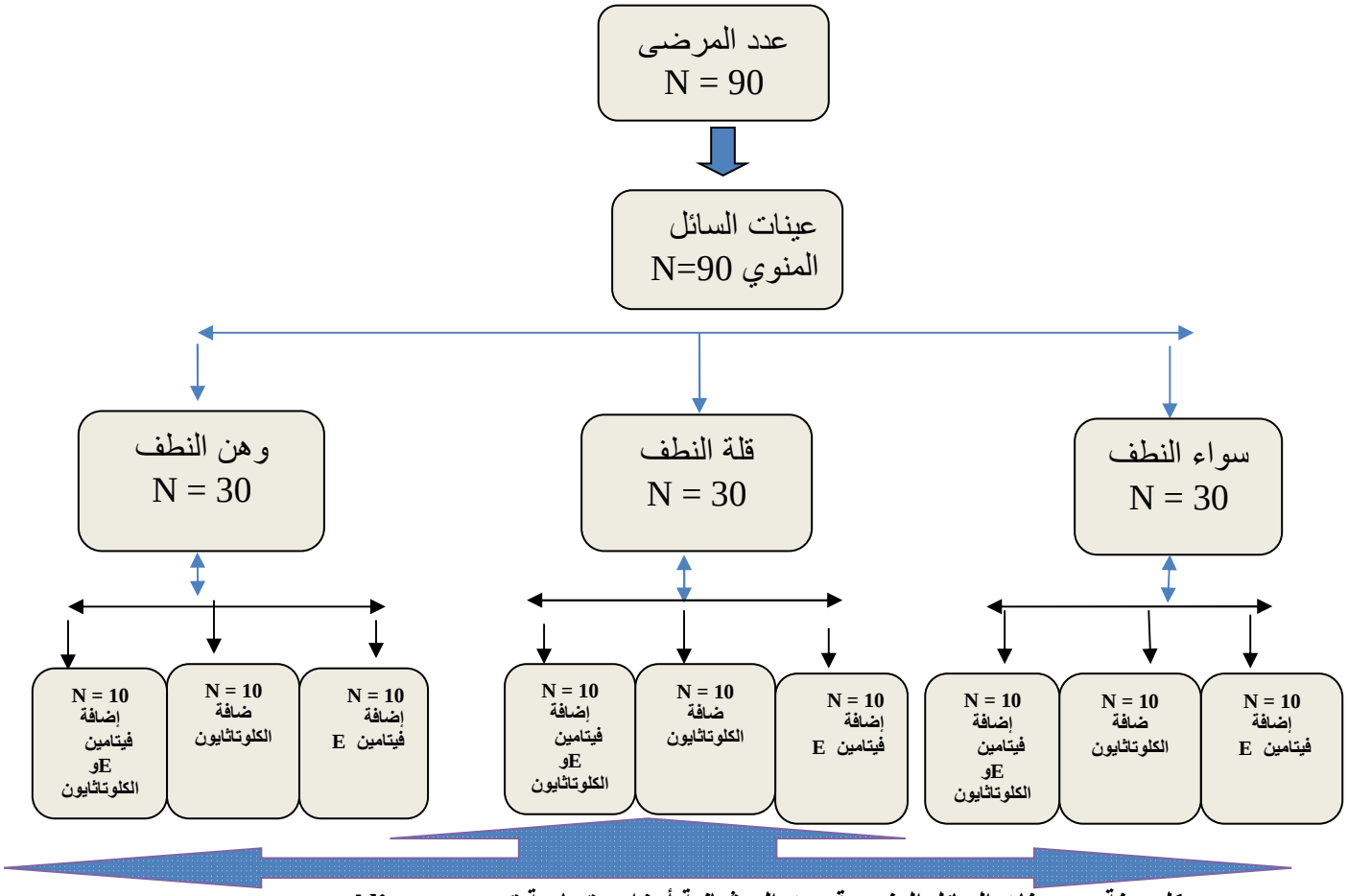
Aliquot 2 _ Aliquot 8 الأجزاء 2-8 : شملت الدراسة أجراء الخطوات التالية :

1- تم أجراء عملية تنشيط النطف لكل جزء باستخدام تقنية الطبقية البسيطة و الوسط IVF Medium لعينات مرضى سواء النطف ومرضى قلة النطف **وتقنية الغسل والنبذ في حالة مرضى وهن النطف**، وتم وضعها في الحاضنة مع تركيز5 - 6% CO2 بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 30 دقيقة .

2 – تم حساب المعايير المدروسة والتي تشمل تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية للنطف السوية والنسبة المئوية لعيوشية النطف و تركيز الخلايا الدائرية و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و تركيز المالون داي الديهايد للعينة بعد أجراء عملية التنشيط

3 – نقل الجزء المنشط من كل عينة الى أنبوب التجميد الخاص Cryovials

4 – تم أجراء عمليات التجميد ، حيث تم إضافة وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) إلى ثلاثة من الأجزاء المنشطة وإضافة وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) + مضاد الأكسدة إلى ثلاثة من الأجزاء المنشطة الأخرى لغرض تقييم تأثير زمن التجميد وتأثير إضافة مضاد الأكسدة .وكما مبين في الشكل (3 - 2)



كل عينة من عينات السائل المنوي قسمت إلى ثمانية أجزاء متساوية تسمى Aliquot

الجزء الأول استخدمت لفحص العينة قبل أجراء عملية التنشيط

الجزء الثاني تنشيط العينة باستخدام الوسط IVF Medium وفحص العينة بعد عملية التنشيط

الجزء الثالث تنشيط العينة باستخدام الوسط IVF Medium وتجميدها لمدة شهر واحد وفحص العينة بعد شهر

الجزء الرابع تنشيط العينة باستخدام الوسط IVF Medium وإضافة مضاد أكسدة وتجميدها لمدة شهر وفحص العينة بعد شهر

الجزء الخامس تنشيط العينة باستخدام الوسط IVF Medium وتجميدها لمدة شهرين وفحص العينة بعد شهرين

الجزء السادسي تنشيط العينة باستخدام الوسط IVF Medium وإضافة مضاد أكسدة وتجميدها لمدة شهرين وفحص العينة بعد شهرين

الجزء السابع تنشيط العينة باستخدام الوسط IVF Medium وتجميدها لمدة ثلاثة أشهر و وفحص العينة بعد ثلاثة أشهر

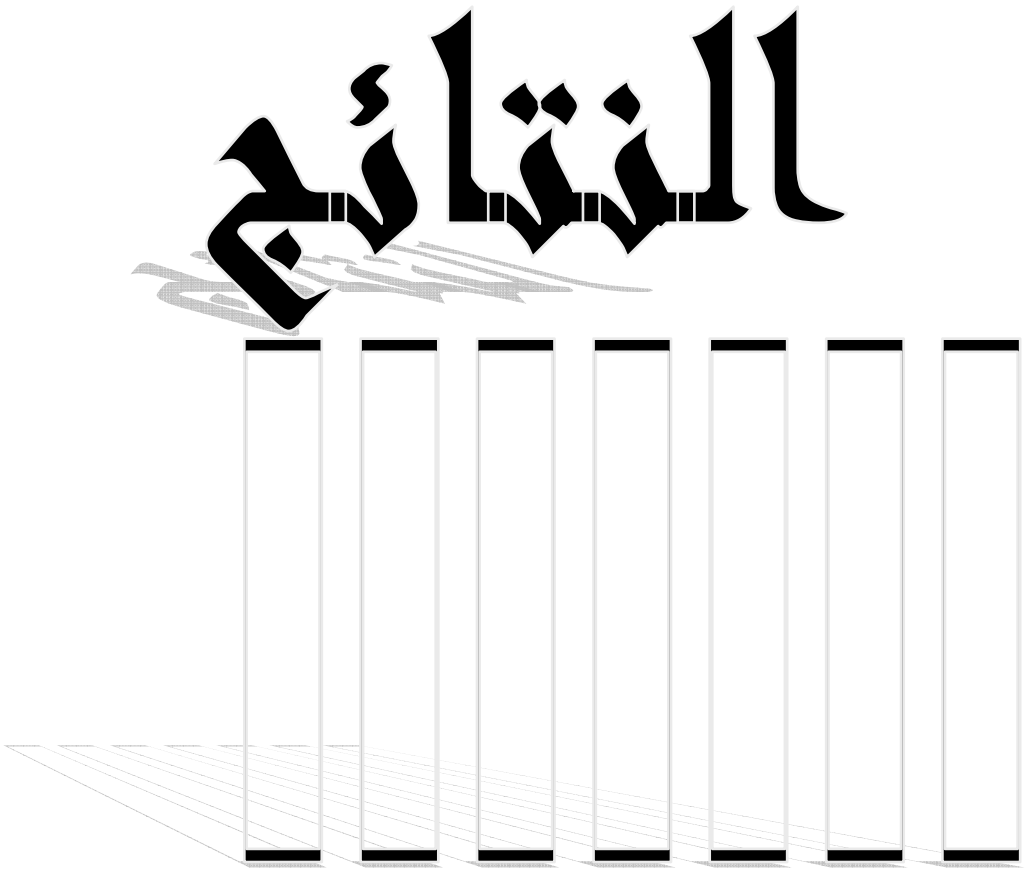
الجزء الثامن تنشيط العينة باستخدام الوسط IVF Medium وإضافة مضاد أكسدة وتجميدها لمدة ثلاثة أشهر وفحص العينة بعد ثلاثة أشهر

شكل (3 - 2) يوضح تصميم التجربة ، حيث تم حساب معالم النطف وتركيز ألمالون داي ألالديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام تقنية الطبقية البسيطة في حالة مرضى سواء وقلة النطف وتقنية الغسل والنبذ في حالة مرضى وهن النطف وبعد التجميد وإضافة مضادات الأكسدة من نوع (E , GSH , GSH+ E) لمدة شهر واحد وشهرين وثلاثة أشهر .

14.3: التحليل الإحصائي Statistical analysis

بُينت نتائج الدراسة باستخدام المتوسط +_ الخطا القياسي و أنجزت التحليلات الإحصائية الخاصة بهذه الدراسة باستخدام اختبار – ت (Student's t – test) و اختبار – ت (paired t – test) واختبار التباين على مستوى الاحتمالية 0.05 وباستعمال برنامج التحليل الإحصائي SPSS الإصدار 18، بالإضافة إلى الطرائق المعيارية المستخدمة في تحديد المتوسط Mean والخطأ القياسي Standard Error(SE) . (AL- Rawi and Khalf –Allah , 2000)

الفصل الرابع



1.4 : دراسة معايير المني والنطف لمرضى عدم الخصوبة المشمولين بالدراسة

تم حساب معدل عمر المرضى للمجاميع المدروسة المتمثلة بمرضى وهن النطف Asthenozoospermia الذين كأنت لديهم النسبة المئوية لحركة النطف التقدمية اقل من 50% وعددهم (30) مريضا"، ومرضى قلة النطف Oligozoospermia الذين كان لديهم تركيز النطف اقل من 20 × 10^6/ ml وعددهم (30) مريضا"،، ومرضى سواء النطف الذين كأنت لديهم النسبة المئوية لحركة النطف التقدمية اكثر من 50% , و تركيز النطف اكثر من 20 × 10^6/ ml وعددهم (30) مريضا وأظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين المجاميع حيث كان معدل العمر لدى مرضى سواء النطف (1.31 ± 32.2) و مرضى قلة النطف (1.29 ± 31.1)ومرضى وهن النطف (1.23 ± 33.10).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معايير المني والنطف المتمثلة في حجم المني و تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية عند مرضى قلة النطف و وهن النطف مقارنة مع مرضى سواء النطف .بينما لوحظ في النتائج وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في زمن الاماعة و تركيز الخلايا الدائرية و تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مرضى قلة النطف و وهن النطف مقارنة مع مرضى سواء النطف .

أما عند المقارنة بين نتائج مرضى قلة النطف و وهن النطف فقد أوضحت الدراسة وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في تركيز نطف مرضى وهن النطف مقارنة مع تركيز النطف في مرضى قلة النطف.

بينما لوحظ وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية عند مرضى قلة النطف مقارنة مع مرضى وهن النطف .

بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من زمن الاماعة والنسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مرضى قلة النطف مقارنة مع مرضى وهن النطف وكما مبين في الجدول رقم (4-1)

2.4 : المحور الأول : عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات مني سواء النطف Normozoospermic

1.2.4.: دراسة تأثير عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة والوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة و تأثير عملية التجميد السريع والإذابة لمدة شهر واحد في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى سواء النطف Normozoospermic patients

يبين الجدول (4 - 2) وجود فروق معنوية ($P<0.05$) في معايير النطف بعد أجراء عملية تنشيط النطف مقارنة بقبل التنشيط لعينات مرضى سواء النطف.

حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عملية تنشيط النطف أدت إلى انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية و تركيز المالون داي ألديهايد MDAو 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 مقارنة مع معدلاتها قبل التنشيط .

و أظهرت نتائج الدراسة الحالية الجدول (4 - 2) أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) ، وأجراء عملية الإذابة بعد مرور شهر واحد أدت إلى انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و تركيز الخلايا الدائرية و النسبة المئوية للنطف السوية مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط . بينما لوحظ 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 .

2.2.4 : دراسة تأثير مدة التجميد السريع واستخدام مضادات الأكسدة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى سواء النطف Normozoospermic patients :

تم في هذه الدراسة دراسة تأثير مدد التجميد من خلال دراسة معايير النطف في الشهر الثالث ومقارنتها مع الشهر الأول والشهر الثاني بعد التجميد والإذابة، حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف في الشهر الثالث و الثاني مقارنة مع معدلاتها بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد وكما مبين في الجدول (4-4) .

بينما لوحظ 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 بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد. و لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهرين وثلاثة أشهر مقارنة مع معدلاتها بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد ، وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني مع الشهر الثالث بعد التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني.

بينما لوحظ حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .وبينت النتائج عدم وجود فروق معنوية في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية وتركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

وأظهرت نتائج الدراسة الحالية (الجدول 4 – 4) أن عملية التجميد السريع للنطف، وأجراء عملية الإذابة أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد في حالة استخدام وسط تجميد النطف(Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده . بينما لوحظ حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير

السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .ولم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أدت إضافة فيتامين E إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده . كذلك حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده.

أما عند مقارنة تأثير مدد التجميد من حساب معايير النطف في الشهر الأول ومقارنتها مع الشهر الثاني والشهر الثالث بعد التجميد والإذابة عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E فقد لوحظ وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف في الشهر الثاني و الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد ، 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 بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد. بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهرين وثلاثة أشهر مقارنة مع معدلاتها بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني ومقارنتها مع الشهر الثالث بعد التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

بينما لوحظ حدوث زيادة لم تصل إلى مستوى المعنوية في تركيز المالون داي ألديهايد MDA ، وعدم وجود فروق معنوية في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

3.2.4: دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى سواء النطف Normozoospermic patients:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية الجدول (4 – 4) أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية (GSH) أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freezeوحده ،و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده . بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية (GSH) مقارنة مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أدى إضافه الكلوتاثايون (GSH) إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث مقارنة مع معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية إن تأثير مدد التجميد على معايير النطف في الشهر الأول مقارنة مع الشهر الثاني والشهر الثالث بعد التجميد والإذابة عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية (GSH) وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في

الشهر الثاني و الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية (GSH) .

بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهرين و ثلاثة أشهر مقارنة مع معدلاتها بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني ومقارنتها مع الشهر الثالث بعد التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية (GSH) والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فروق معنوية في كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

4.2.4: دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى سواء النطف Normozoospermic patients :

يبين (الجدول 4 – 5) أن عملية التجميد السريع للنطف، وأجراء عملية الإذابة أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فرق معنوي ($P<0.05$) في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية وتركيز الخلايا الدائرية بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد في حالة استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH) عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أدى إضافة فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH)إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث مقارنة مع معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية

النطف و انخفاض معنوي ($P<0.05$) في تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تأثير مدد التجميد على معايير النطف في الشهر الأول مقارنة مع الشهر الثاني والشهر الثالث بعد التجميد والإذابة عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH) أدى إلى انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي، بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في الشهر الثاني و الشهر الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد أجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH) .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني ومقارنتها مع الشهر الثالث بعد التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH) والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في تركيز المالون داي ألديهايد و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فروق معنوية في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

3.4 :المحور الثاني : عمليات التجميد السريع والإذابة لعينات المني لمرضى قلة النطف Oligozoospermic patients

1.3.4: دراسة تأثير عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الطبقية البسيطة والوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة و تأثير عملية التجميد السريع والإذابة لمدة شهر واحد في معايير النطف و تركيز

المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى قلة النطف Oligozoospermic patients

يبين الجدول (4 - 6) وجود فروق معنوية ($P<0.05$) في معايير النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف مقارنة بقبل التنشيط لعينات مرضى قلة النطف.

حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عملية تنشيط النطف أدت إلى انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية و تركيز المالون داي ألديهايد MDA 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 مقارنة مع معدلاتها قبل التنشيط .

و أظهرت نتائج الدراسة الحالية الجدول (4 - 6) 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 .

بينما لوحظ 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 (8-4) .

إما تركيز الخلايا الدائرية لم تظهر فرقا" معنويا" ($P<0.05$) مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط

2.3.4 : دراسة تأثير مدة التجميد السريع واستخدام مضادات الأكسدة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى قلة النطف Oligozoospermic patients

أظهرت دراسة مدة التجميد من حساب معايير النطف في الشهر الثالث ومقارنتها مع الشهر الأول والشهر الثاني بعد التجميد والإذابة في عينات مرضى قلة النطف وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي ، بينما لم يظهر هناك فرق معنوي ($P<0.05$)في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة في الشهر الثاني و الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد وكما مبين في الجدول (4-9) .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثالث مع الشهر الثاني بعد التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف ، بينما لوحظ حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فروق معنوية ($P<0.05$) في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية.

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية (الجدول 4 – 9) أن عملية التجميد السريع للنطف، وإجراء عملية الإذابة أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي ، بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية وتركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد في حالة استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

وأظهرت نتائج الدراسة أن إضافة فيتامين E إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده.

أما عند مقارنة تأثير مدد التجميد عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E من حساب معايير النطف في الشهر الأول ومقارنتها مع الشهر الثاني والشهر الثالث بعد التجميد والإذابة فقد لوحظ وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و زيادة معنوية ($P<0.05$) في تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فرق معنوي ($P<0.05$)في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في الشهر الثاني و الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني ومقارنتها مع الشهر الثالث بعد التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و زيادة معنوية ($P<0.05$) في تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فرق معنوي ($P<0.05$)في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

3.3.4 : دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط التجميد (Sperm Freeze) مضافا" إلية الكلوتاثايون الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى قلة النطف Oligozoospermic patients

أظهرت نتائج الدراسة الحالية (الجدول 4 – 8)أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية الكلوتاثايون (GSH) أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف وحدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فرق معنوي ($P<0.05$)في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أدى إضافة الكلوتاثايون (GSH) إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف وانخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تأثير مدد التجميد عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية الكلوتاثايون (GSH) على معايير النطف في الشهر الثاني والشهر الثالث مقارنة مع الشهر الأول بعد التجميد والإذابة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في الشهر الثاني و الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة في الشهر الأول من التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية الكلوتاثايون (GSH) .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني مع الشهر الثالث بعد التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية 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 فرق معنوي ($P<0.05$)في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني

4.3.4 :دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى قلة النطف Oligozoospermic patients

أظهرت نتائج الدراسة الحالية (الجدول 4 – 9)أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E والكلوتاثايون (GSH) أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف وانخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فرق معنوي ($P<0.05$)في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أدى إضافة فيتامين E والكلوتاثايون (GSH) إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف وانخفاض معنوي ($P<0.05$) في تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تأثير مدد التجميد عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامينE و(GSH) على معايير النطف في الشهر الثاني والشهر الثالث مقارنة مع الشهر الأول بعد التجميد والإذابة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف وحدوث زيادة معنوية

(P<0.05) في تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي، بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية في الشهر الثاني و الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة في الشهر الأول من التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إلية فيتامين E و (GSH).

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني ومقارنتها مع الشهر الثالث بعد التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي (P<0.05) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف وحدوث زيادة معنوية (P<0.05) في كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و لوحظ عدم وجود فروق معنوية في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائريةفي معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

4.4 : :المحور الثالث : عمليات التجميد والإذابة لعينات المني لمرضى وهن النطف Asthenozoospermic patient

1.4.4: دراسة تأثير عملية تنشيط النطف باستخدام تقنية الغسل والنبذ والوسط (IVF) وفترة حضن 30 دقيقة و تأثير عملية التجميد السريع والإذابة لمدة شهر واحد في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى وهن النطف Asthenozoospermic patient

يبين الجدول (4 - 10) وجود فروق معنوية (P<0.05) في معايير النطف بعد إجراء عملية تنشيط النطف مقارنة بقبل التنشيط لعينات مرضى وهن النطف .

حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية 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 .

وأظهرت نتائج الدراسة الحاليه الجدول (4 - 10) 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 .

إما تركيز الخلايا الدائرية لم تظهر فرقا" معنويا" ($P<0.05$) مقارنة مع معدلاتها بعد التنشيط .

2.4.4: دراسة تأثير مدة التجميد السريع واستخدام مضادات الأكسدة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى وهن النطف Asthenozoospermic patient

أظهرت دراسة مدد التجميد من حساب معايير النطف في الشهر الثالث ومقارنتها مع الشهر الأول والشهر الثاني بعد التجميد والإذابة في عينات مرضى وهن النطف وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف في الشهر الثالث و الثاني و النسبة المئوية للنطف السوية في الشهر الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد وكما مبين في الجدول (4 - 11) .

بينما لوحظ 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 بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد.

بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهرين و كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد ثلاثة أشهر مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني مع الشهر الثالث بعد التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و لوحظ

عدم وجود فروق معنوية($P<0.05$) في كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

كما أظهرت نتائج الدراسة الحاليه (الجدول 4 – 11) أن عملية التجميد السريع للنطف، وإجراء عملية الإذابة أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وعدم وجود فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية وتركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد في حالة استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه فيتامين E عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده . وأظهرت نتائج الدراسة أن إضافة فيتامين E إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تأثير مدد التجميد عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه فيتامين E على معايير النطف في الشهر الثاني والشهر الثالث مقارنة مع الشهر الأول بعد التجميد والإذابة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف في الشهر الثاني و الثالث و النسبة المئوية للنطف السوية في الشهر الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة في الشهر الأول من التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه فيتامين E .

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 بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد.

بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهرين و كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد ثلاثة أشهر مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد . وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني ومقارنتها مع الشهر الثالث بعد

التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

بينما لوحظ حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني . و لوحظ عدم وجود فروق معنوية في كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

3.4.4 : دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط التجميد (Sperm Freeze) مضافا" إلية الكلوتاثايون (GSH)والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients

أظهرت نتائج الدراسة الحإليه (الجدول 4 – 12)أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه (GSH) أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي و لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية وتركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أدى إضافة الكلوتاثايون (GSH) إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تأثير مدد التجميد عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه الكلوتاثايون (GSH) على معايير النطف في الشهر الثاني

والشهر الثالث مقارنة مع الشهر الأول بعد التجميد والإذابة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف في الشهر الثاني و الثالث و النسبة المئوية للنطف السوية في الشهر الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة في الشهر الأول من التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه (GSH)

ولوحظ حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد.

بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهرين و كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد ثلاثة أشهر مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني ومقارنتها مع الشهر الثالث بعد التجميد باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه (GSH) والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية للنطف السوية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

أما النسبة المئوية لعيوشية النطف فان مدد التجميد عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه GSH) لم يظهر فروق معنوية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

بينما لوحظ حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

و لوحظ عدم وجود فروق معنوية في كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

4.4.4 : دراسة تأثير عمليات التجميد السريع باستخدام وسط التجميد (Sperm Freeze) **مضافا" إليه فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH) والإذابة في معايير النطف و تركيز المالون داي ألديهايد MDA والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في مرضى وهن النطف Asthenozoospermic patients**

أظهرت نتائج الدراسة الحإليه (الجدول 4 – 13)أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH)أدى إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و حدوث انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده . بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه (GSH) مقارنة مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده .

كما أدى إضافة فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH) إلى وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) إلى زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات الشهر الثاني و الشهر الثالث في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و انخفاض معنوي ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة معدلاتها مع استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وحده . و أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تأثير مدد التجميد عند استخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH)على معايير النطف في الشهر الثاني والشهر الثالث مقارنة مع الشهر الأول بعد التجميد والإذابة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف في الشهر الثاني و الثالث و النسبة المئوية للنطف السوية في الشهر الثالث مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة في الشهر الأول من التجميد في وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) مضافا" إليه فيتامين E و الكلوتاثايون (GSH) .

كما لوحظ حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDAو النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد.

بينما لم يظهر هناك فرق معنوي في كل من تركيز النطف و النسبة المئوية للنطف السوية و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهرين و كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية بعد إجراء عملية الإذابة بعد ثلاثة أشهر مقارنة مع معدلاتها بعد إجراء عملية الإذابة بعد شهر واحد من التجميد .

وعند مقارنة معايير النطف في الشهر الثاني ومقارنتها مع الشهر الثالث بعد التجميد والإذابة أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف و النسبة المئوية للنطف السوية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

بينما لوحظ حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في معدلات كل من تركيز المالون داي ألديهايد MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

و لوحظ عدم وجود فروق معنوية في كل من تركيز النطف و تركيز الخلايا الدائرية في معدلات الشهر الثالث مقارنة بمعدلات الشهر الثاني .

الفصل الخامس

أظهرت النتائج في هذه الدراسة وجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في معايير النطف والمني المتمثلة بحجم المني وتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشيه النطف والنسبة المئوية للنطف السوية لدى مرضى سواء النطف مقارنة مع مرضى وهن النطف وقلة النطف حيث أشارت دراسة (Okonofua *et al.*, 2005) إلى وجود زيادة معنوية في تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشيه النطف والنسبة المئوية للنطف السوية لدى أسوياء النطف مقارنة بالأشخاص غير الخصبين، وقد يفسر ذلك نتيجة انخفاض تركيز الخلايا الدائرية ومنها كريات الدم البيضاء في السائل المنوي لدى مرضى سواء النطف مقارنة مع تركيزها في السائل المنوي لمرضى قلة ووهن النطف والتي تعد أحد المصادر الرئيسية لإنتاج الأنواع الأوكسجين الفعالة (ROS) والتي يؤدي زيادة إنتاجها إلى التأثير السلبي في معايير النطف نتيجة حدوث حالة الإجهاد ألتأكسدي ،آذ تعمل الأنواع الأوكسجينة الفعالة على مهاجمة الأحماض الدهنية غير المشبعة والبروتينات والسكريات الداخلة في تركيب الأغشية البلازمية للنطف مؤدية إلى حدوث حالة أكسدة الدهن lipid peroxidation في الأغشية البلازمية الخارجية والأغشية الخلوية داخل الخلية مثل أغشية الميتوكوندريا والغشاء النووي الأمر الذي يؤدي إلى حدوث انخفاض في النسبة المئوية للنطف المتحركة وانخفاض النسبة المئوية للنطف السوية وانخفاض النسبة المئوية لعيوشية النطف (Agarwal *et al* , 2009) ، كما إن زيادة إنتاج الأنواع الأوكسجين الفعالة قد يؤدي إلى حدوث زيادة في عملية الموت الخلوي المبرمج في الخلايا الجرثومية الأمر الذي يؤدي إلى نقصان في إعداد الخلايا النطفية (Wang *et al* ,2003) .

ولوحظ في هذه الدراسة حدوث انخفاض معنوي ($p<0.05$) في حجم المني لدى كل من مرضى قلة النطف ووهنها مقارنة بسواء النطف، مع ملاحظة وجود زيادة معنوية في تركيز الخلايا الدائرية والتي تضم الخلايا البيضاء لدى هؤلاء المرضى مقارنة بمرضى سواء النطف وتتفق نتائج الدراسة مع Ameen (2007) وقد يعزى ذلك إلى الزيادة في تركيز الخلايا الدائرية في السائل المنوي عن الحدود الطبيعية والتي تؤدي إلى حدوث انخفاض في حجم المني (Diemer *et al*., 2003) .

وأظهرت نتائج الدراسة وجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في زمن الاماعة للسائل المنوي لدى مرضى قلة النطف ومرضى وهن النطف مقارنة بمرضى سواء النطف،وربما يعود السبب في ذلك إلى حصول الالتهابات في الغدد الجنسية الملحقة لبعض مرضى وهن النطف بالإضافة إلى الاضطرابات

الهرمونية في مرضى قلة النطف والتي تعد من الأسباب الرئيسية لتأخر زمن الاماعة ، إذ ذكر الباحث Gray وجماعته (1981) أن ارتفاع مناسيب هرمون البرولاكتين يؤثر سلباً على الفعالية الوظيفية لغدة البروستات Prostate gland ويؤدي إلى تثبيط نمو البروستات وذلك بسبب وجود مستقبلات ذلك الهرمون على غدة البروستات، وان ضعف إفراز الحويصلات المنوية لأنزيم بروتين كاينيز Protienkinase والبروستات للإنزيمين الفايبرينولاسين Fibrinolysin و الامينوببتايديز Aminopeptidase يؤدي إلى عدم حدوث الاماعة الطبيعية ، وهذا يتفق مع ما أشار إليه اللبان (2005) من إن عدم تميع عينات السائل المنوي قد يعود إلى ضعف فعالية غدة البروستات في إنتاج إنزيم الفايبرينولاسين Fibrinolysin Enzyme الذي يعمل على تميع عينة السائل المنوي. أظهرت نتائج الدراسة وجود زيادة معنوية ($p<0.05$) في تركيز المالون داي ألديهايد MDA لدى مرضى قلة النطف ومرضى وهن النطف مقارنة بمرضى سواء النطف، آذ ذكرت نتائج Tariq وجماعته (2010) وجود تركيز اعلى لـ المالون داي ألديهايد في السائل المنوي لكل من مرضى قلة النطف و وهنها مقارنة بالأشخاص الخصبين ، وربما يعود السبب في ذلك إلى زيادة مستويات الأنواع الأوكسجينة الفعالة في البلازما المنوية لمرضى قلة النطف و وهنها مقارنة بمرضى سواء النطف والذي يؤدي إلى حدوث زيادة في عملية بيروكسده الدهون في الأغشية البلازمية النطفية والذي ينتج عنة حدوث ارتفاع في تركيز المالون داي ألديهايد MDA في السائل المنوي والذي يعد احد النواتج الثانوية من عملية بيروكسده الدهون ويمكن إن يستخدم كدليل لتقييم مستوى ضرر الإجهاد ألتأكسدي OS (Shamsa, 2010) .

إن معايير النطف المتمثلة بتركيز النطف وحركة النطف التقدمية والشكل السوي لايوفر تصوراً كاملاً عن الكفاءة الوظيفية للنطف وقدرة الرجال على الإنجاب (Perera *et al.*,2002) ، بالإضافة إلى إن هناك علاقة سالبة بين سلامة الكروماتين النطفي ومستويات أنواع الأوكسجين الفعالة التي تتولد نتيجة عمليات تحضير النطف وعمليات التجميد والإذابة (Florence *et al*,2012) كما أوضحت عدد من الدراسات أن تضرر ال DNA عد كمعلم رئيسي في حالة عدم الخصوبة الذكرية(Lewis *et al*,2008) ولوحظ وجود علاقة عكسية سلبية بين ضرر الDNA النطفي مع معدلات الحمل و آو تطور الأجنة (Alvarez ., 2003) ، لذا اهتمت هذه الدراسة بدراسة الضرر الحاصل في كروماتين النطف لمجاميع الدراسة المتمثلين بمرضى سواء النطف و مرضى قلة النطف ومرضى وهن النطف بعد عمليات التنشيط للنطف و عمليات التجميد والإذابة ، وتم في هذه الدراسة

تقييم الضرر في كروماتين النطف كمؤشر لضرر الحامض النووي منقوص الأوكسجين والحالة النووية للنطف عن طريق استخدام صبغة الأنيلين الزرقاء Aniline blue إذ استخدمت صبغة الأنيلين الزرقاء لدراسة حالة الكروماتين النطفي في عدد من الدراسات السابقة وعدت كمؤشر لتقيم الضرر في الحامض النووي منقوص الأوكسجين وتم استخدام تسميات مختلفة في كل دراسة ،حيث تم دراسة تكثف الكروماتين chromatin condensation لدى مرضى العقم الداخلين في برنامج الحقن ألمجهري للنطف لغرض معرفة علاقة الضرر في الكروماتين مع المظهر السوي للنطف ومعدلات الإخصاب والحمل (Hammadeh *et al* , 1996) ، وقام kim وجماعته (2013) بدراسة تركيب الكروماتين النطفي غير السوي Sperm abnormal chromatin باستخدام صبغة الأنيلين الزرقاء وصبغة التولويدين وكانت النتائج متشابهة بين الطريقتين واستخدم الباحثين تسمية الكروماتين النطفي غير السوي Abnormal Chromatin في هذه الدراسة ، وقام Park وجماعته (2011) باستخدام صبغة الأنلليين الزرقاء في دراسة تكثف الكروماتين النطفي Sperm Chromatin Condensation وعلاقته مع معدلات الإخصاب والحمل ونوعية الأجنة في مرضى اللانطفية الانسدادية وغير الانسدادية، واستخدم الباحثين Sasikumar و dakshayani (2013) صبغة الأنيلين الزرقاء وصبغة التولويدين لغرض تقيم ضرر الحامض DNA في مرضى العقم الداخلين برنامج حفظ النطف في سائل النتروجين .

يتضح من الدراسات المذكورة أنفا أن استخدام طريقة صبغة الأنيلين الزرقاء في تقييم الضرر في الكروماتين النطفي كمؤشر للضرر في إل DNA وان استخدامها أخذ أكثر من مسمى وفي دراستنا الحالية تم اختيار احد هذه التسميات وهي النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي Sperm Abnormal Chromatin Percent . .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود زيادة معنوية ($P<0.05$) في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي في كل من مرضى قلة النطف ووهن النطف مقارنة بمرضى سواء النطف ، وربما يعود السبب في ذلك إلى إن زيادة مستويات الأنواع الأوكسجينة الفعالة ROS في البلازما المنوية لدى مرضى قلة النطف ومرضى وهن النطف مقارنة بمرضى سواء النطف و التي تؤدي إلى زيادة الضرر في الكروماتين و DNA ، قد يعود الضرر الحاصل في تركيب الكروماتين والحامض النووي منقوص الأوكسجين إلى خلل في تعبئة الكروماتين النطفي defective sperm Chromatin

packaging (Sharma *et. al* .,2004) أو خلل في عملية الموت الخلوي المبرمج Apoptosis (Sakkas *et al*.,2002) أو الجهد التأكسدي (Agarwal *et.al*.,2003) Oxidative Stress، ولوحظ في نتائج الدراسة الحالية أن تركيز المالون داي الديهايد MDA كان عاليا في كل من مرضى قلة النطف ووهن النطف و الذي يدل على وجود زيادة في مستويات الجذور الحرة أو ألانواع الأوكسجينة الفعالة (ROS) في السائل المنوي لديهم وحدوث حالة الجهد التأكسدي OS، لذا ربما يعود السبب في زيادة النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي لديهم إلى حدوث حالة الجهد التأكسدي المؤدية إلى حدوث ضرر في تركيب الكروماتين النطفي أو الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA ، وأكد ذلك الباحثين Aitkin و krausz (2001) حيث ذكرا إن قواعد الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA تكون ذات حساسية كبيرة لتأثيرات ألأنواع الأوكسجينه الفعالة ROS والذي يؤدي إلى حدوث تحطم في شريطي إل DNA ونلاحظ هذه الحالة عند الرجال غير الخصبين بصورة أوسع مقارنة بمرضى سواء النطف .

أظهرت نتائج الدراسة وجود زيادة معنوية ($p< 0.05$) في النسبة المئوية للنطف المتحركة لدى مرضى قلة النطف مقارنة مع مرضى وهن النطف وقد يعزى سبب ذلك إلى إن مرضى قلة النطف يقسمون على صنفين الأول مرضى قلة و وهن النطف Oligoasthenozoospermic والصنف الثاني مرضى قلة النطف Oligozoospermic الذين يعانون من قلة للنطف وليس من الحركة ، وقي دراستنا الحالية تم اختيار المرضى من الصنف الثاني مما أدى إلى الاختلافات المعنوية في الحركة . (WHO ,1999 ,. Rowe ,2000)

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 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) . وفي هذه الدراسة تم استخدام تقنيتين لغرض تنشيط النطف وهي التقنية الطبقية البسيطة في حالة مرضى سواء النطف وقلة النطف وتقنية الغسل والنبذ في

حالة مرضى وهن النطف ، وقد استخدمت مدة تحضين (30) دقيقة فقد أشارت إحدى الدراسات إلى أن الحركة التقدمية الأمامية للنطف تقل بازدياد عمر العينة (Engel *et al*.,1999) .

أظهرت نتائج الدراسة أن تنشيط عينات السائل المنوي في حالة مرضى سواء النطف وقلة النطف باستخدام التقنية الطبقية البسيطة وتقنية الغسل والنبذ في حالة مرضى وهن النطف أدى إلى حدوث انخفاض معنوي ($p<0.05$) في تركيز النطف مقارنة بقيمتها قبل التنشيط ، وجاءت هذه النتائج منسجمة مع ما توصل إليه (السلطاني ،1997) الذي لاحظ إن استخدام التقنية الطباقية البسيطة يسبب نقصاناً معنوياً ($p<0.05$) في تركيز النطف ، ويعزى هذا النقصان إلى بقاء النطف غير المتحركة والنطف الميتة في قعر أنبوبة الاختبار ، وان النطف ذات السرعة الجيدة تكون وحدها قادرة على السباحة للأعلى ومقاومة تأثير الجاذبية (Stovall *et al* .,1994) ، وأشار الهادي (1997) إلى أن تقنية الغسل والنبذ تعمل على تقليل عدد النطف المسترجعة والذي قد يفسر إلى بقاء النطف الميتة والنطف غير المتحركة في الحبيبية النطفية المترسبة وعدم قدرتها على الصعود إلى الجزء الاعلى من المستنبت.

و بينت نتائج الدراسة تحسناً معنويا ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف المتحركة مقارنة بقيمها قبل التنشيط ،وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه (السلطاني ، 1997 و العبيدي ،2010) حيث أشارا إلى حدوث تحسن معنوي في النسبة المئوية للنطف المتحركة باستخدام التقنية الطبقية البسيطة والغسل والنبذ ولمدة تحضين (30) دقيقة ، و أشار Harris وجماعته (1981) إلى إن الزيادة الحاصلة في النسبة المئوية للنطف المتحركة باستخدام التقنية الطباقية البسيطة تكون نتيجة إقصاء كريات الدم البيض والخلايا البلعمية والنطف غير المتحركة،وقابلية النطف على الاستفادة من المادة الغذائية والايونات اللاعضوية الموجودة في طبقة المستنبت خلال مدة التحضين ، في توليد الطاقة في المقتدرات التي تعد موقع تصنيع مركب ثلاثي فوسفات الادينوسين (ATP) الذي يعد مصدراً للطاقة اللازمة لحركة النطف عن طريق تحوله إلى مركب داي فوسفات الادينوسين (ADP) وانتقال الطاقة من المايتوكوندريا إلى ذيل النطف لزيادة حركة النطف (Kasai *et al* .,2002) .

وأشارت نتائج هذه الدراسة إلى حدوث زيادة معنوية ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف ذات الأشكال السوية مقارنة بقيمتها قبل التنشيط وربما يعود السبب إلى إن النطف ذات الأشكال السوية

والتي تمتاز بنشاطها العالي هي وحدها قادرة على الصعود إلى الأعلى فيما تبقى النطف ذات الأشكال غير السوية والتي تتميز بحركتها الضعيفة في قعر الأنبوبة (Makler *et al* .,1998) ، وأشار العبيدي (2010) إلى إن استعمال تقنية الغسل والنبذ لتنشيط نطف المرض المصابين بوهن النطف الحاد والمعتدل يقلل من النسبة المئوية للنطف غير السوية .

وبينت نتائج الدراسة الحالية حصول انخفاض معنوي ($p<0.05$) في تركيز الخلايا الدائرية مقارنة بتركيزها قبل التنشيط ، وربما تعزى هذه النتيجة إلى بقاء هذه الخلايا في قعر الأنبوبة لكونها غير متحركة ولا يمكنها الوصول للأعلى حيث تعمل قوة الجاذبية على بقائها في قعر الأنبوبة ، ولاحظ (الحربي،2002) 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 كريات الدم البيض والخلايا البلعمية باستعمال تقنيه الغسل والنبذ إلى أن هذه الخلايا لا تمتلك القدرة على السباحه إلى الأعلى بعد إجراء عملية النبذ .

كما أظهرت نتائج دراستنا زيادة معنوية في النسبة المئوية لعيوشية النطف باستعمال الطبقية البسيطة والغسل والنبذ مقارنة بقيمها قبل التنشيط وقد تعزى الزيادة في النسبة المئوية لعيوشية النطف إلى إن فحص عينات التنشيط يتم في الجزء الأعلى من المستنبت الحاوي على النطف المتحركة والحية ويكون مستوى الجذور الحرة اقل مقارنة بالطبقات السفلى للحبيبة النطفية (Henkel and Schill, 2003) .

وبينت نتائج الدراسة الحالية حصول انخفاض معنوي ($p<0.05$) في تركيز المالون داي الديهايد بعد إجراء عملية التنشيط مقارنة بقبل التنشيط عند استخدام التقنية الطباقية البسيطة في حالة مرضى سواء النطف وقلة النطف وربما يعود ذلك إلى إن مستويات أنواع الأوكسجينة الفعالة تكون منخفضة في الجزء الاعلى من المستنبت مقارنة بالجزء الأسفل الحاوي على السائل المنوي الذي يتميز بوجود كريات الدم البيضاء والخلايا النطفية غير الناضجة وذات الإشكال غير السوية المولدة للجذور الحرة، وجاءت هذه النتائج منسجمة مع ما توصل أليه ألمرشدي (2006) إذ ذكر إن تركيز المالون داي الديهايد ينخفض بعد عملية التنشيط عند استخدام التقنية الطباقية البسيطة لمرضى عدم الخصوبة ، بينما أدى استعمال تقنية الغسل والنبذ لزيادة 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 بجهاز النبذ 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) الذين لاحظوا زيادة معنوية في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة و تركيز المالون داي الديهايد باستعمال تقنية الغسل والنبذ مقارنة بقيمها قبل التنشيط

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية حصول انخفاض معنوي ($p<0.05$) في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي بعد إجراء عملية التنشيط مقارنة بقبل التنشيط لمرضى سواء وقلة النطف ووهنها، 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 الكروماتين ، إذ أشار Andrabi (2008) إلى إن الضرر في كروماتين النطف ذات الشكل السوي والحركة الجيدة يكون اقل مقارنة بالنطف ذات الإشكال غير السوية والنطف غير المتحركة أو ذات الحركة الضعيفة .

تبين من نتائج الدراسة إن لعمليات التجميد والإذابة تأثيرات سلبية في معايير النطف وتؤدي إلى حدوث زيادة معنوية ($p<0.05$) في تركيز المالون داي الديهايد و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي وكانت النتائج من حيث الزيادة المعنوية والانخفاض المعنوي في معايير الدراسة متشابهة في مجاميع الدراسة الشاملة لسواء النطف ومرضى قلة النطف ومرضى وهن النطف ، حيث أظهرت النتائج أن عملية التجميد السريع للنطف باستخدام وسط تجميد النطف (Sperm Freeze) وإجراء عملية الإذابة بعد مرور شهر واحد في كل من عينات مرضى سواء النطف وقلة النطف ووهن 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 ، وجاءت نتائج الدراسة الحالية منسجمة 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 (sinan *et* ***al*** 2008 and Lee *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 الDNA ، 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 وسط 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) ، حيث وجد أن هناك بعض التأثيرات السلبية المتولدة من استخدام المواد الحافظة للنطف من ضرر التجميد والتي تؤثر على تركيب ووظيفة الخلية ومنها التأثيرات السمية لتلك المواد التي تنتج من كونها مواد كيميائية لا توجد في تركيب الخلية بالحالة الطبيعية، ويزداد الخطر من هذه التأثيرات السمية عند استخدامها بتركيز عال عند درجة حرارة أعلى من درجة الصفر مئوي (Fuller and Paynter ,2004) ، والآلية الأخرى السلبية المتولدة من استخدام هذه المواد هي استحثاثها لعملية التنافذ أو الجهد التنافذي Osmotic stress على الخلية حيث أن إضافة هذه المواد للوسط يزيد الجهد الازموزي على الخلايا نتيجة الاختلاف في الازموزية في السائل خارج الخلوي والسائل داخل الخلوي ، هذا يؤدي إلى إن تعاني الخلايا في البداية من حدوث عملية الجفاف Dehydration داخل الخلية نتيجة نفوذ الماء من الوسط داخل الخلية النطفية إلى الوسط خارج الخلية ذي التركيز الاعلى بسبب وجود المواد الحافظة للنطف لغرض معادلة التركيز بين الجهتين ونتيجة لذلك يتوقع حدوث حالة الانكماش الخلوي (cell shrinkage) للخلية النطفية ، وعند نفوذ المواد الحافظة للنطف إلى داخل الخلية عبر الغشاء البلازمي يحدث زيادة في تركيز المواد داخل الخلايا عن محيطها الخارجي مما يدفع إلى حدوث حالة نفوذ الماء من خارج الخلية إلى داخلها وتبدأ الخلايا بالعودة إلى حجمها الطبيعي.، وعند إزالة هذه المواد عند إجراء عملية الإذابة ، يؤدي ذلك إلى

دخول الماء إلى داخل الخلايا و بحجم اكبر من خروج المواد الحافظة للنطف منها الأمر الذي يؤدي إلى حدوث حالة الانتفاخ الخلوي (cellular swelling) قبل إن تحصل عملية التوازن بين الجهتين ، إن هذه التغيرات الحجمية (الأنكماش والانتفاخ) تكون ذات تأثيرات قد تصل إلى درجة إحداث الضرر الخلوي للأغشية البلازمية و العضيات غير الرجعي (Merryman,1970) .

.

وعند إجراء عملية التجميد للمزيج يحدث هناك عدة تغايرات في محتوى المزيج والتي تكون موثره على معايير ووظيفة النطف في الداخل 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 المتميعة 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) ، وتكون 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 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 والكلب والخنزير Dziekonska *et al*, (2009) .

إن الانخفاض الشديد لدرجة الحرارة من مدى 0 إلى 130- مْ ، تعمل المذابات الموجودة ضمن المحتوى المائي ألنطفي على خفض نقطة الانجماد للمزيج ليكون حوالي (-10 إلى -15مْ) أي إن عملية تكوين البلورات الثلجية للماء تطلب درجة حرارة اقل من درجة حرارة الماء المقطر (صفر مْ) 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) ، 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 كفؤءةَ لذا الماء الباقي سوف يكون ثلجاً داخل الخلية 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 Ultrastructural studies حدوث تأثيرات ضارة على العضيات النطفية المختلفة مثل تلك الملاحظ حدوثها في المايتوكوندريا (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 التأكسدي 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 الأعداد 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 الأنزيمية وغير الأنزيمية 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 الأنزيمية وغير الأنزيمية 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 زيادة مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة وانخفاض مستويات مضادات الأكسدة قد 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 لحدوث حالة الجهد التأكسدي oxidative stress ، والتي تكون كل المكونات الخلوية للنطف مثل الدهون والبروتينات والأحماض النووية والسكريات أهداف محتملة لتأثيرات الإجهاد التأكسدي السامة (Said *et al* ,2010) .

تعد الدهون أكثر الجزيئات الكبيرة عرضة للخطر والتي تدخل في تركيب الغشاء البلازمي ألنطفي 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 للانفصال (Kumar *et al* ,2011) . ويؤدي الهجوم الاجهادي إلى حدوث حالة تسمى بيروكسدة الدهن والتي تمثل تحلل الأحماض الدهنية غير المشبعة في الأغشية الخلوية بواسطة سلسلة من تفاعلات التحفيز الذاتي للجذور الحرة ،إذ تبدأ العملية عندما يعمل الجذر الحر على إزالة ايون الهيدروجين H^+ من الحامض ألدهني غير المشبع ليكون مركب الجذر الحر ألدهني Lipid free radical ثم يتفاعل مع الأوكسجين ليكون جذر البيروكسي ألدهني 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 (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 e Dziekońska *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 (*et al* ,2002 Connell) ، 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 (Dziekońska *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 ألنطفي المسئول عن الحركة ،حيث ذكرت دراسة (Sinan *et al* ,2008) حدوث زيادة في ضرر الذيل ألنطفي عند عملية التجميد إضافة إلى إن زيادة مستويات أنواع 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 أوضحت 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 المتحركة ،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 تأثيرات البيئية الفيزيائية والكيميائية التي تعرضت لها النطف (Hammadeh *et al* ,1996) ، حيث إن تكوين البلورات الثلجية خارج الخلايا يعد العامل الرئيسي الذي قد يؤدي إلى الأذى 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 الأولية 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 ، قد يعود ذلك نتيجة زيادة إنتاج الأنواع الاوكسجينة الفعالة خلال التجميد وانخفاض القدرة الدفاعية لمضادات الأكسدة ،ومن ثم حدوث حالة الجهد التأكسدي والذي يؤدي 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 منتجا ثانويا يشير إلى مدى ضراوة الجهد التأكسدي ويعد الزيادة في تركيزه كمؤشر لزيادة مستويات أنواع 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 ضرر altered or damaged في النسبة المئوية لكروماتين النطف السوي ومنها دراسة (Hammadeh *et al*, 2001) ودراسة (Fraser and Strzezek 2004) إذ إن هناك ثلاثة نظريات محتملة قد تفسر الضرر في تركيب الكروماتين والحامض النووي منقوص الأوكسجين تشمل:خللاً في تعبئة الكروماتين النطفي defective sperm Chromatin Packaging وخللاً في عملية الموت الخلوي المبرمج Apoptosis والجهد التأكسدي ، وإثناء عمليات التجميد تزداد حالة الجهد التأكسدي 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 اشرطة الحامض النووي منقوص الاوكسجين (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).

أن عملية التجميد تؤدي إلى حدوث انخفاض معنوي في مستويات مضادات الأكسدة و حدوث زيادة في مستويات أنواع الاوكسجين الفعالة ROS كما مر سابقاُ لذا هدفت دراستنا الحالية إلى إضافة أنواع مختلفة من مضادات الأكسدة كإستراتيجية تهدف إلى التقليل من التأثيرات الضارة المتولدة من عملية التجميد ،وتم في هذه الدراسة بيان دور مضادات الأكسدة والمتمثلة بفيتامين E و الكلوتاثايون GSH ومزيج من الاثنين في الحفاظ على كفاءة النطف والتقليل من التأثيرات السلبية لعمليات التجميد والتي تسبب زيادة مستويات الجذور الحرة والضرر في تركيب الكروماتين ألنطفي ، وكانت النتائج متشابهة من حيث الزيادة أو الانخفاض المعنوي للمجاميع المشمولة في الدراسة . حيث أوضح Ansari وجماعته (2010) إن إضافة مزيج من مضادات الأكسدة لوسط التجميد أدى

إلى تقليل الضرر المتولد على النطف ، وتم في دراستنا استخدام كل من فيتامين E والكلوتاثايون GSH كلاً على انفراد وبشكل ممزوج معاً . .

أظهرت نتائج الدراسة أن إضافة فيتامين E بتركيز 40 μmol إلى وسط التجميد(SPERM FREEZE) في مرضى سواء النطف وقلة النطف ووهن النطف أدى إلى حدوث تحسن معنوي ($p<0.05$)في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف ، وكذلك نقصان معنوي ($p<0.05$) في كل من تركيز ألمالون داي ألديهايد والنسبة المئوية للكروماتين النطف غير السوي ، اذ ذكرت نتائج دراسة Mohammad وجماعته (2012) إن إضافة فيتامين E أدى إلى حدوث تحسن معنوي في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف ، وأظهرت نتائج دراسة العالم Taylor وجماعته عام 2009 إن إضافة فيتامين E مختبريا إلى وسط التجميد حسن كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة وخفض تركيز المالون داي الديهايد MDA ، وقد يعزى سبب ذلك إلى كون فيتامين E احد أهم مضادات الأكسدة ذات الوزن الجزيئي الصغير الموجود بصورة رئيسية في غشاء الخلايا البلازمية القادر على كسر السلسلة التفاعلية ومنع عملية الانتشار (Propagation) حيث يقوم هذا الفيتامين بإزالة الجذور الحرة عن طريق منح ذرةH^+ إلى جذر Lipidperoxyl radical ليكون Tocopherol radical وان هذا الجذر يكون مستقرا نوعا ما واقل فعالية تجاه الجزيئات الموجودة في غشاء الخلية (Zheng ,2003) ، إضافة إلى إن موقع هذا الفيتامين في الغشاء البلازمي زاد من فعاليته في التقاط وطرح الجذور الاوكسيجينية الحرة ضمن الغشاء وهو قادر على اكتساح الأنواع الثلاثة من الجذور الحرة مثل جذر البيروكسيد RO وجذر الالوكسيل ROO والسوبر اوكساید لذا حسن فيتامين E من حركة النطف وسلامة الأغشية بعد الإذابة عن طريق منع الأكسدة الداخلية لـ DNAوالأغشية الخلوية بواسطة عمله على تحطيم سلسلة التفاعل ضمن الأغشية وقدرته على اكتساح الأنواع الثلاثة من الجذور الحرة وبسبب ذوبانه ألدهني يكون ضمن أول خط دفاعي ضد بيرو كسيدة الدهن للحوامض الدهنية غير المشبعة الداخلة بتركيب الدهون الفوسفاتية للأغشية البلازمية الخلوية وتحت الخلوية (Verma akanvar,1999) .

أظهرت النتائج انخفاضا معنويا ($p<0.05$) في تركيز ألمالون داي الديهايد وهذا قد يفسر نتيجة خفض عملية بيرو كسدة الدهون نتيجة الفعالية الكاسحة لفيتامين Eعلى الجذور الحرة.

وأظهرت نتائج الدراسة إن إضافة الكلوتاثايون إلى وسط التجميد Sperm freeze بتركيز 1mmأدى إلى تحسن معنوي في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشية النطف وانخفاض معنوي في كل من تركيز MDAوالنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مقارنة مع استخدام وسط التجميد لوحدة ، اذ ذكرت نتائج دراسة Gadea وجماعته (2011) إلى إن إضافة الكلوتاثايون إلى وسط التجميد أدى إلى تحسن معنوي في كل من حركة النطف وعيوشيتها وانخفاض معنوي في مستويات الأنواع الفعالة للأوكسجين ، كما أظهرت دراسة (Gadea *et al* ,2005) إن إضافة الكلوتاثايون إلى وسط الإذابة أدى إلى تحسن معنوي في نوعية النطف المدروسة المتضمنة الحركة والعيوشية النطفية وكذلك سلامة الغشاء وخفض النسبة المئوية للضرر الكروماتيني وDNA . وسجل الباحث Gadea وجماعته (2005) إن إضافة 5 مايكرو مول من الكلوتاثايون إلى وسط التجميد أدى إلى زيادة معنوية في سلامةDNA لكنه لم يسجل تحسناً في زيادة الحركة النطفية أو خفض البيروكسيدة للدهون ، وقد يعزى ذلك لكون الكلوتاثايون احد مضادات الأكسدة غير الأنزيمية ذات التأثير الفعال في مكافحة الجذور الحرة القادرة على النفوذ إلى الخلايا ويكون منظم رئيسي لعملية الكسح لجزئيات أنواع الاوكسجينة الفعالة (Ansari *et al* ,2010) ، حيث يمتلك الكلوتاثايون دور رئيسي كمضاد أكسدة قادرة على التخلص من جزئيات أنواع الأوكسجين الفعالة ،وهو مركب أساسي حاوي على مجموعة الثايول له عدد من الأمور يؤديها في الخلايا للحيوانات الثديية ومنها نقل الأحماض الامينية ،تصنيع البروتينات والـ DNA والقيام بكسح الجهد ألتأكسدي حيث أظهرت مجموعة Sulphydrl أنها تشكل حماية ضد الضرر الخلوي المتولد من المؤكسدات والكهارل والجذور الحرة (Taylor *et al* ,2009)، إن مستوى هذا المركب ينخفض بشكل معنوي عند إجراء عملية التجميد حيث وثقت دراسة (Gadea *et al* ,2004) حدوث انخفاض بنسبة 64% من تركيزه مقارنة بتركيزه قبل إجراء العملية ورافق ذلك انخفاض في حركة النطف بحوالي 68% .

قد يفسر سبب تحسن الحركة إلى قدرة الكلوتاثايون على كسح بيرو كسيد الهيدروجين والذي يفترض إن الكلوتاثايون بيرودكتيز على خفض مستوى حالة الاستقرار steady-state لبيرو كسيد الهيدروجين والبيروكسيدات الموجودة في الغشاء ألنطفي خلال عملية الإذابة الأمر المؤدي إلى تحسن كل من الحركة والعيوشية (Rossi *et al* ,2001) ، كما ذكرت دراسة إن مجموعة الثايول السطحية لها دور في الحفاظ على حركة النطف وان عملية التجميد تؤثر على خفض هذا التركيب مما

يؤدي إلى التأثير على الحركة لذا فان إضافة GSH قد يؤدي إلى زيادة في النسبة المئوية للخلايا الحاوية على مجموعة الثايول مما قد يؤدي إلى زيادة الحركة.(Chatterjee *et al* ,2001) .

وأظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في النسبة المئوية لعيوشية النطف ،وقد يفسر ذلك إلى قدرة الكلوتاثايون على اكتساح جزئيات الأنواع الفعالة للأوكسجين ومن ثم التقليل من شدة الضرر المتولد منها على الأغشية البلازمية (Gadea *et al* ,2011) .

ولوحظ في النتائج حدوث انخفاض معنوي في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند استخدام الأنواع المختلفة من مضادات الأكسدة في الدراسة وقد يعود ذلك إلى كون مضادات الأكسدة تقوم بدور مهم في حماية الكروماتين وال DNA ألنطفي إثناء عمليات التجميد والإذابة (Bucak *et al* ,2010) وذلك من خلال قدرتها على كسح جزئيات الأنواع الفعالة للأوكسجين ومن ثم التقليل من شدة الضرر المتولد منها على الأغشية البلازمية (Tuncer *et al* ,2010).

أظهرت نتائج الدراسة حدوث انخفاض معنوي في كل من النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف ، وزيادة معنوية في كل من تركيز MDA و النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي عند مقارنة نتائج الشهر الثالث والثاني مع نتائج الشهر الأول، وقد يفسر ذلك إلى الزيادة المستمرة في تولد أنواع الاوكسجينية الفعالة مع زيادة مدة التجميد ، فقد أشارت دراسة Muhammad (2011) إلى أن مستويات جزيئات الجذور الحرة الاوكسجينية استمرت في الارتفاع مع زيادة مدد التجميد ، أن زيادة مستويات أنواع الاوكسجينية الفعالة ينعكس سلباُ على معايير النطف المدروسة نتيجة زيادة عملية بيرو كسدة الدهن للأغشية الخلوية الداخلية والخارجية وكذلك زيادة في نسبة الموت الخلوي المبرمج للخلايا ، حيث أوضح Khan وجماعته (2009) أن كل المكونات الخلوية الشاملة للدهون والبروتينات والحوامض النووية تكون أهداف محتملة لأنواع الاوكسجينية الفعالة ويكون مدى التأثير معتمداً على نوع الجذور الحرة المتولدة وكميتها أضافه إلى المدة التي تتعرض لها الجزيئات الحيوية لتأثير هذه الجذور إضافة للعوامل الخارجية التي تكون الخلايا معرضة لها من درجة الحرارة وشدة الأوكسجين وتركيب البيئة المحيطة من ايونات وبروتينات وتركيز مضادات الأكسدة. وكما بين سابقا فأن هذه العوامل الخارجية في حالة التجميد للنطف تكون في مستويات متطرفة من انخفاض درجة الحرارة وانخفاض شدة الأوكسجين إضافة إلى وجود زيادة في تركيز الايونات والبروتينات الخلوية وانخفاض في قدرة مضادات الأكسدة الأمر الذي ينعكس سلباً

على أغلب المعايير النطقية وخصوصا الحركة و العيوشية (Muhammad ,2011) .

.

وأظهرت النتائج زيادة معنوية في تركيز ألمالون داي الديهايد وقد يعزى ذلك إلى زيادة عمليات بيرو كسدة الدهون على الأغشية الخلوية المتولدة من زيادة مستويات الجذور الحرة خلال التجميد وكذلك زيادة نسبة الكروماتين المتضرر نتيجة تأثير الجهد ألتأكسدي . وأظهرت النتائج عدم حصول متغايرات تصل لمستوى المعنوية في كل من التركيز والمظهر وتركيز الخلايا الدائرية وقد يعزى ذلك إلى كون التأثيرات المباشرة للتجميد تظهر بصورة اجلي على المعايير الحيوية مثل الحركة أكثر من الصفات الكمية للنطف. ولوحظ من نتائج هذه الدراسة وجود انخفاض معنوي في معايير النطف المتمثلة في النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية و النسبة المئوية لعيوشية النطف وزيادة معنوية في تركيز ألمالون داي الديهايد والنسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي ي عند زيادة مدة التجميد في عينات المني التي تم إضافة مضادات الأكسدة إليها لمرضى سواء النطف وقلة النطف ووهن النطف وقد يفسر ذلك نتيجة الزيادة في توليد أنواع الاوكسجينية الفعالة خلال زمن التجميد مع بقاء مستوى مضادات الأكسدة ثابتاُ الأمر الذي أدى إلى حدوث الجهد ألتأكسدي وتثبيط لفعالية مضادات الأكسدة(Muhammad ,2011) .

الفصل السادس

الاستنتاجات والتوصيات

المصادر

الاستنتاجات والتوصيات :

الاستنتاجات :

1- أثرت عمليات التجميد والإذابة بشكل سلبي في النسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشيه النطف والنسبة المئوية للنطف السوية بعد مرور شهر واحد من التجميد .

2 - أدت عمليات التجميد والإذابة لعينات مرضى سواء النطف ومرضى وهن النطف وقلة النطف إلى زيادة في مستويات الأنواع الأوكسجينة الفعالة.

3 - أدت عمليات التجميد والإذابة لعينات مرضى سواء النطف ومرضى وهن النطف وقلة النطف إلى زيادة في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي التي قيمت باستخدام صبغة الأنلين الزرقاء .

4- أزدادت التأثيرات السلبية لعمليات التجميد والإذابة في معالم النطف المتمثلة بالنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشيه النطف والنسبة المئوية للنطف السوية وكذلك زيادة مستويات الأنواع الأوكسجينة الفعالة المتولدة و زيادة في النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي مع زيادة مدد التجميد لمدة ثلاثة أشهر .

5- أدت إضافة مضادات الأكسدة المتمثلة بفيتامين E أو الكلوتاثايون GSH أو مزيج من الاثنين (E + GSH) لوسط التجميد إلى حدوث تغيرات ايجابية في معالم النطف المتمثلة بالنسبة المئوية للنطف ذات الحركة التقدمية والنسبة المئوية لعيوشيه النطف والنسبة المئوية للنطف السوية وتقليل مستويات الأنواع الأوكسجينة الفعالة المتولدة وتقليل النسبة المئوية لكروماتين النطف غير السوي.

6- أدت إضافة مضادات الأكسدة لوسط التجميد إلى تقليل التأثيرات السلبية المتولدة نتيجة زيادة زمن التجميد وكذلك وتقليل الضرر لكروماتين النطف للعينات المدروسة.

7- استعمال التقنية الطبقية البسيطة في تنشيط عينات المني لمرضى سواء النطف وقلة النطف واستعمال تقنية الغسل والنبذ في تنشيط عينات المني لمرضى وهن النطف ادى الى تحسنا معنوياً في سلامة كروماتين ألنطف.

التوصيات :

بعد انجاز هذة الدراسة ، نوصي بأجراء الأمور والدراسات التالية :

1- إضافة مضادات الأكسدة إلى وسط التجميد المستخدم في مختبرات مراكز الخصوبة لتقليل التأثيرات السلبية لعمليات التجميد والإذابة و دراسة تأثير إضافة مضادات الأكسدة لوسط التجميد على نتائج عمليات الحقن ألمجهري ICSI out come ومعدلات الحمل.

2- دراسة تأثير إضافة مضادات الأكسدة من نوع فيتامين E والكلوتاثايون GSH ومزيج من الاثنين

(E + GSH) لوسط التجميد ووسط التنشيط قبل التجميد وبعد الإذابة.

3- قياس مستويات الأنواع الأوكسجينة الفعالة والقدرة الكلية لمضادات الأكسدة Total antioxidant capacity بعد إجراء عمليات التجميد والإذابة.

4 – دراسة مستويات الأنواع الأوكسجينة الفعالة والضرر الحاصل في الكروماتين ألنطفي لمرضى انعدام النطف بعد إجراء عمليات التجميد والإذابة .

5- تقييم الضرر في تركيب كروماتين الخلايا النطفية في مختبرات مراكز الخصوبة .

6 – دراسة مدد التجميد لفترة زمنية أطول من ثلاثة أشهر لمتابعة مستويات تولد جزئيات الأنواع الأوكسجينة الفعالة والضرر الحاصل في الكروماتين ألنطف.

المصادر

المصادر العربية:

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

الدوري قيس و الدوري مازن سلمان (1980)، الغذاء والتغذية، بغداد، دار الكتب والوثائق، ص 53.

السلطاني ، يحيى (1997) : تنشيط النطف خارج الجسم لمرضى العقم والمصابين بقلة وابيضاض المني باستخدام المستنبتات الزراعية والهرمونات المحرضة للقند . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

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

اللبان، ولاء صالح (2005). دراسة وراثية للمرضى المصابين باللانطفية وقلة النطف ووهن النطف. رسالة ماجستير. كلية العلوم ،جامعة بابل .

ألمرشدي ، صاحب يحيى (2006) . تأثير بيروكسيد الهيدروجين وبعض مضادات الاكسدة في معاير النطف البشرية خارج الجسم الحي . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بابل

الهادي ، فارس ناجي عبود (1997) . استخدام التقنية الطبقية المزدوجة الترسيبية في تنشيط مرضى العقم المصابين بقلة ووهن النطف . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم .جامعة بغداد.

كايتون . (1997) : الفيزيولوجيا الطبية والفيزيولوجيا المرضية ، الجزء الثالث ، ترجمة حسان احمد قمحية . المركز التقني المعاصر ،دار ابن النفيس .

كمونه ، زينب حكمت (2011) . دراسة بعض المعايير المناعية والكيموحيوية لمرضى عدم الخصوبة . رسالة ماجستير . كلية التربية ، جامعة كربلاء .

المصادر الانجليزية :

Abd-Allah, A.; Aly, H.; Moustafa, A.; Abdel-Aziz A. and Hamada (2000). Adverse testicular effects of some quinolone members in rats. Pharmacol. Res.; 41: 211-219 .

Abdulla, S. M. (2005). Effect of royal jelly on treatment of men sub fertility MSc. Thesis. College of Medicine University of Tikrit.

Acosta , A.A.; Uen, J.V.; Ackerman , S.B.; Mayer, J.F.; Stecker ,J.F.; Swanson , R.J.; Pleban , P.;Yuan ,J.; Chillik, C. and Brugo, S. (1986) : Examination of male infertility by examination and testing of spermatozoa . In : invitro fertilization. Jones , H.W.; Jones ,G.S.; Hodgen , G.D. and Rosen waks, Z. (eds) . Willians and Wilkins ,Los Angeles .

Acosta ,A.A.; Oehninger , S.; Morshedi , M.; Swanson , R.J.; Scott, R. and Irianni , F. (1988) : Assisted reproduction in the diagnosis and treatmet of the male factor . Obstet . Gynecol .Surv.; 44 : 1-18 .

Adil, F. (2009). Correlation between intrauterine insemination outcome and Kruger strict criteria using two staining methods to detect the sperm morphology of infertile men. High Diploma Thesis. Submitted to the Institute of Embryo Research and Infertility Treatment, Al-Nahrain University.

Agarwal , A.; Saleh , R. and Bedaiwy , M. (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction . Fertil . Steril. ; 79 : 829 – 843 .

Agarwal A. and Said, T. (2003).Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility . Human Reproduction .9(4):331-345.

Agarwal, A. and Allamaneni, S. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcome: a review. Review Article. Minerva Ginecol 56: 235-245.

Agarwal, A., Gupta, S.and Sharma, R.K.(2005). Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol.; 3: 28.

Agarwal, A; Sharma, R.; Desai, N.; Prabakaran, S.; Tavares, A. and Sabanegh, E.(2009).Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. Urology.;73:461-470.

Aiman, J.; McAsey, M. and Harms, L. (1988) : Serum and Seminal plasma prolactin concentrations in men with normospermia , oligospermia or azoospermia. Fertil. Steril.; 49 : 133-137 .

Aitken , R. ; Ross , and Less , M. (1983) . Analysis of sperm function in Kartagener 's syndrome . Fertil. Steril . ; 49 : 133 – 137 .

Aitken ,R.J.and Krausz,C.(2001).Oxidative stress,DNA damage and the Y chromosome .Reprod. ;122:497-506.

Aitken, R. (2011) The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function. Biol Reprod.; 85:9-12.

Aitken, R. J.; Baker, M. A.and Sawyer, D. (2003). Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. Reproductive Biomedicine Online; 7: 65–70.

Aitken, R.J.; Buckingham, D.; Brindle, J.; Gomez, E.; Baker, G. and Irvine, S. (1995) Analysis of sperm movement in relation to the oxidative

stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. Hum. Reprod., 10, 2061- 2071.

Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. and Fishel, S. (1998). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Bio. Repro.; 41: 183-197.

Akhter , S. ; Alam, H. ; Khanam , N . N. and Zabin , F. (2011) . Characteristics of infertile couples . Mymensingh Med J. Jan ; 20 (1) : 121 – 127 .

Al – Rawi , K. M. and Khalaf – Allah , A. M. (2000) . Design and analysis of agriculture experiments .Musel University. Ministry of Higher Education and Scientific Research . page 488

AL- Ansari ,S.A.M idha-Albarzanchi,M.T. andKhunda,S.S.(1997): Pregnancy rate and reproductive hormones concentration in infertile patients following superovulation and sperm intrauterine transfer.14th Scientific conference of Iraqi Biological Society ,11-13 March,1997,(Abstr.).

Al-Alousi , S. S. (2004). Classification of male infertility according to seminal changes. High Diploma Thesis. IVF Institute for Embryo Research and Infertility Treatment. Baghdad University.

AL-Janabi ,F.S.D.(1992).Male infertility factors : The effect of female serum on sperm activation in vitro intrauterine insemination .M.S.C. Thesis college of Science, Al-Mustansyria University:115-130.

Al-Taee, H.A.J. (1994). Sperm activation and intrauterine insemination: the effect of serum concentrations and culture media on sperm

activation potential in vitro. MSc. Thesis, college of science, Baghdad University.

Alvarez ,J.G. (2003) DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. Minerva Ginecol;55(3):233-239.

Alvarez, J.; Sharma, R.; Ollero, M.; Saleh, R.; Lopez, M.; Thomas, A.; Evenson, D. and Agarwal, A. (2002) Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. Fertil. Steril.; 78: 319:329.

Ambrosio, G and Tritto, I. (1999). "Reperfusion injury Experimental evidence and clinical implications" Am Heart. 138: 569-575.

Ameen , E. M.,(2007). A Diagnostic Study of Some Causes of Male Infertility in Kurdistan Region of Iraq, Thesis. Submitted to the Department of Biology , Babylon university .

Anderson, S.; Bankier, A.and Barrell,G.(1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature; 290: 457−465.

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 .

Andrabi, S. M. H. (2008). Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. J. Assist. Reprod. Genet., 24: 561-569.

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

Ansari, M. S., B. A. Rakha., N. Ullah., S. M. H. Andrabi., S. Iqbal., M. Khalid and S. Akhter.(2010). Effect of exogenous glutathione in

extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. Anim. Sci. Pap. Rep., 28: 235-244.

Arap , M . A. (2007) . Late hormone level , semen parameter and presence of antisperm antibodies in patient treated for testicular torsion . J . Androl ; 28 : 528 – 32 .

Askari, H.A.; Check, J.H.and Peymer, N. (1994) . Effect of natural antioxidant tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. Arch. Androl; 33 :

Askienazy-Einhar, (2005). Male genital tract infection: the point of the View of the bacteriologist. Gynecology Obstetrique and Fertilite ; 33(9):691-697.

Aziz, N.; Agarwal, A.; Nallella, K. and Orvieto, R. (2006). Relationship between epidemiological features and aetiology of male infertility as diagnosed by a comprehensive infertility service provider, Report Biomed Online ;12:209-214 .

Backman, T.J. ; Abu- Lebdeh, H.S. and Mynderse, L.A.(2006). Evaluation and medical management of erectile dysfunction . Mayo Clin Proc. 81: 385-390.

Bagchi, K. and Puri, S. (1998) . Free radicals and antioxidants in health and disease. La Revue desant de to mediterranee, 4: 350-360 : (Review) .

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

Balerna , M. ; Piffaretti – Yanez , A. and Togni , G.(1994) . Human sperm processing technique and a critical review , In Colpi , G. M.; Balerna , M. (eds) : Treating male infertility progress in Reproductive Biology and Medicine ; 16 : 45 – 75 .

Bartosikova, L.; Necas, J.; Suchy, V.; Kubinova, D.; Vesela, L. and Benes,L. (2003). Effect of morine in alloxan-induced diabetes mellitus in the laboratory rat. Acta Vet. 72: 191-200.

Batruch , I . ; Smith , C. R.; Mullen, B . J. ; Grober , E. ; Lo , K. C.; Diamandis , E. P.; and Jarvi , K. A. (2011) . Analysis of seminal plasma from patient with non- obstruction azoospermia and identification of candidate bio markers of male infertility . J. Proteome Res . Abstract .

Baynes, J.W. And Dominiczak , H.M. (2004)."MedicaI Biochemis-try". 2nd

Behrman, S. J. and Sawada ,Y..(1966) “Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator,” Fertility and Sterility, vol. 17, no. 4:457–466.

Boveris, A; Haenen, G.R. and Doclman, C.J. (1991). "Biochemistry of free radicals: from electron to tissue". Am. J. Med. 91(2).

Brewer, L.; Corzett, M. and Balhorn, R.(1999). Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. Science.; 286.

Bucak, M. N., P. B. Tuncer., S. Sarıözkan., N. Başpınar., M. Taşpınar., K. Coyan., A. Bilgili., P. P. Akalın., S. Büyükleblebici., S. Aydos.,

S. Ilgaz., A. Sunguroğlu and D. Oztuna.(2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. Cryobiology, 61: 248-253.

Buettner, G. R. (1993). "The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation alpha-tocopherol, and ascorbat". Arch of Biochem and Biophysics. 300(2): 535-543.

Bukharin, O.; Kuz-min, M.and Ivanov, I. (2000). The role of the microbial factor in the pathogenesis of male infertility. Zh-Microbial-Epidemiol-Immunobial.; 2:106-110.

Bunge, R.G., Keettel WC, Sherman JK (1954) Clinical use of frozen semen. Fertil Steril 5: 520–529.

Chatterjee, S. E., de Lamirande, Gagnon, C. (2001) Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione, Molecular Reproduction and Development, 60 : 498.

Check, J.; Nowroozi, K. and Chung H. (1998). Effect of age on infertility therapy. Forty Fourth Annual Meeting of the American Fertility Sosiety. Atlanta, Georgia; 45: (Abstract).

Chenomth , P.J. (2005) ." Genetic sperm defect " , Theriogenology , 64 (3) : 457 – 468 .

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.

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.

Cooper , T.G.; Noonan , E. and Von Eckandstein, S. (2010) . World Health organization reference values for human semen characteristics . Hum. Reprod. Uptake 16(3) :231- 245 .

Cormier., N. , Sirard., M.A .and Bbiley, J.L. .(1997).Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation, J Androl,18:461–468.

Correa – Perre , z . (2004) . Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal Necrozoospermia : Fertility and Sterility ; 81 : 1148 – 1150 .

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 .

Dejueq ,N. and Jogon,B.(2001).Virus in the mammlian male genital tract and their effect on the reproductive system. Microbio .Mol .Bio .Rev.; 65:208-231.

Dickey, R.P.; Pyrzak, R.; Lu, P. Y.; Taylor, S.N. and Rye, P.H. (1999) : Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with word health organization threshold values for normal sperm. Fertil. Steril; 71 : 684-689 .

Diemer, T., Huwe, P., Ludwig, M., Schroeder-Printzen, I., Michelmann, H., Schiefer, H., and Weidner, W. (2003). Influence of

autogenous leucocytes and Escherichia coli on sperm motility parameters in vitro. Andrlogia, 35: 100-105.

Diemer, T.; Ludwig, M.; Huwe, P. and Weidner, W. (2000). Infulence of genital urogenital infection on sperm function. Current Opinion in Urology ;1(1):39-44.

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

Dorin , C. (2008). Acupuncture for the treatment of cryptozoospermia .Medical Acupuncture . December ; 20 (4) : 277 – 279 .

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 .

Duvan , C. I.; Berker, O. ; Bayrak , O.; Aydos , K.; Turhan , N.O. ; and Satiroglu , H. (2009) . Comparison of semen parameter between pregnant and non pregnant couple with male factor infertility during intrauterine insemination . Turk . J. Med . Sci ; 39 : 531 – 536 .

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 .

Elliott , S . P. ; Orejuela , F . and Hirsch , I . H. (2000) . Testis biopsy finding in the spinal cord injured patient . J . Urol ; 163 : 792 – 797 .

Engel, S.; Schreiner, I. and Petzold, R. (1999) . Lipid Peroxidation in human spermatozoa and maintains of progression sperm motility. Anarologia; 31 : 17-25.

Erenpreisa, J.; Erenpreiss, J.; Freivalds, T.; Krampe, R.; Butikova, J.; Ivanov, A. and Pjanova D.(2003). Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. J. Cytometry;52:19-27.

Evans, P. and Halliwell, B. (2001). “Micronutrients oxidant/antioxidant status" British Journal of Nutrition". 85 (2): 567-574.

Exner, R; Wassner, B; Manhart, N. and Roth, E. (2000)." Therapeutie potential of glutathione " Wien- klin- wochonschr . 112 (14): 610.

Ezeh , U. I.(2008) . Necrozoospermia . Human Reproductive ; 15 : 2356 – 2359 .

Fabbri, R. P., Ciotti, B. Di Tommaso et al.,(2004) . “Tecniche di Crioconservazione riproduttiva,” Rivista Italiana di Ostetrici e Ginecologia, vol. 3, pp. 33–41.

Fan , Q. R. and Hendrichson , W.A. (2009) . Structure of androgen in complex with its receptor . Nature ; 433: 269 – 277 .

Farmer- E.E. and Davoine- C..(2007) "Reactive electrophile species". Curr.Opin. Plant Biol; 10(4): 380-386.

Fauser, B.C.J.; Bogers, J.W.; Hop, W.C.J. and Dejong, F.H. (1990) . Bioactive and immunoreactive FSH in serum of normal and Oligospermic men. Clin. Endocrin; 32 : 433-442 .

Florence, Boitrelle., MartIne , Albert ., Claire , Theill ,A.C ., Fatma, Ferfouri ., Marianne, Bergere., Franc¸ O.I.S., Vialard, Robert , Wainer., Marc, Bailly., and Jacqueline, Selva. ,(2012). Cryopreservation of Human Spermatozoa Decreases the Number of Motile Normal Spermatozoa, Induces Nuclear Vacuolization and Chromatin Decondensation. Journal of Andrology, Vol. 33, No. 6:1371-1378.

Forti,G. and Krausz,C.(1998).Evaluation and treatment infertile couple. J.Clinic.Endocrin.Metab.; 83:4177-4188.

Frajese, G.V. and Pozzi, F.(2005). New achievement and novel therapeutic applications of PDE5 inhibitors in older males . J Endocrinol Invest ;28: 45-50.

Franken , D . R. and Kruger , T. F. (2004) . What is a normal spermatozoon ? In: Atlas of human sperm morphology evolution . Kruger , T. F. and Franken , D.R. (eds) , Taylor and Francis , New York ; 49 – 73 .

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.

Fretz, P.C. and Sandlow, J.I.(2002) . Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. Urol Clin North Am. ; 29: 921 –938.

Friedman, P. J. (1977). " Biochemistry" Brown and Company Inc. printed in the United States of America, pp. 55-58.

Fuller, B. and Paynter, S. (2004) . Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. Repro Biomed Online , 9:680-691 .

Gadea, J. E. Selles, M.A. Marco, P. Coy, C. Matas, R. Romar ,and S. Ruiz,(2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders, Theriogenology 62 : 690.

Gadea, J., F. Garcia-Vazquez, C. Matas, J.C. Gardon, S. Canovas and D. Gumbao.(2005) . Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. J. Androl. 26: 396-404.

Gadea. , J. M. Molla, E. Selles ., M.A. Marco ., F.A. Garcia-Vazquez a,and J.C. Gardon . (2011). Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders Cryobiology 62: 40–46 .

Ganong W.F. (2005). The gonads: development and function of the reproductive system. In: Review of Medical Physiology by: Ganong, W.F. (ed.), Lange Medical Books/McGraw-Hill, USA. Pp. 408-419.

Ganong, W.F. (1991) : The gonads-development and function of the reproductive system. In : Review of Medical physiology.

Garcia, J. E.; Nelson, L. M.; Wallach, E. E.; Zurawin, R. K. and Talavera, L. P. (2004) . Infertility medicine instant access to the minds of medicine. 1 - 82.

Gatewood, J.; Cook, G.; Balhorn, R.; Bradbury, E. and Schmid, C . (1987) Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. Science. 236:962 -964.

Gazavani,M.R.; Wilson,E.; Richmond,D.; Haward,P.; Klingsland,C. and Lewis- Jones,D. (2000). Role of mitotic control in spermatogenesis. Fertil.Steril.;74:251-255.

Gdoura, R.; Kchaou, W.; Chaari, C.; Znazen, A.; Keskes, L.; Rebai, T. and Hammami, A. (2007). Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. BMC Infect Dis. ; 7: 129-137.

Geidam, A. D. ; Yawe, K. D. T.; Adebayo, A. E. A. and Idrisa, A .(2008). Hormonal profile of men investigated for infertility to the university of maidugari in northern Nigeria . Singapore . Med. J. ; 49(7) : 538- 541 .

Genesca, A.; Caballin, .M.; Miro, R.; Benet, J.; and Germa, J. (1992) . Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. Human Genetics. 89(2): 181-186.

Gharagozloo, P. and Aitken, R.(2011) The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. Hum Reprod.;26:1628–1640.

Gianaroli, L.; Plachot, M. and VanKooij, R. (2000) : ESHRE Guidelines for good practice in IVF Laboratories. Hum. Reprod; 15 : 2241-2246 .

Gomez, E.; Cano,I.P.; Amorocho, B.; Landeras, J.; Ballesteros, A. and Pellicer, A. (2000): Effect of injected spermatozoa morphology on the out come of intracytoplasmic sperm injection in humans fertil. Steril; 74 : 842-843.

Gonzales, G.; Kortebani, G. and Mazzolli, A.(1992). Leukocytospermia and function of seminal vesicles on seminal quality. Fertil. Steril.; 57: 1058-1065.

Goverde, A.J.; McDonnell, J.; Vermeiden, J.P.W.; Schats, R.; Rutten, F.F.and Schoemaker, J. (2000) : Intrauterine insemination or in-vitro fertilization in idiopathic subfertility : arandomized trial and cost-effectiveness analysis-Lancet; 355 : 13-18 .

Gray , P . Franken , D . R. ; Slabber , C. F. and Potgieter , G . M. (1981) . A comparision of endocrine function and semen analysis infertile and sub fertile man . Andrologia ; 13 (3) : 260 – 4 .

Gupta, R. S . ; Sharma, R.; Sharma, A.; Bhatnager , A . K .; Dobhal , M. P. and Joshi, Y. C.(2002). Effect of alstor scholaris bark extract on testicular function of wistar rats . Asian J. Androl ; 4:75 – 78 .

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1985). Free radicals in biology and medicine". Clarendon press. Oxford, pp. 16, 28, 37, 100, 106, 147.

Halliwell, B; Gutteridge, J. M. (1993). "Free Radicals in Biology and Medicine" 3rd ed. New York: Oxford University Press: P 140-153.

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 subfertile men after freeze-thawing procedure. J. Androl., 22: 1012–1018.

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.

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.

Hargreave, C.; Rogres, S. and Hills, F. (1998). Effects of co-trimizole erythromycin, amoxicillin, tetracycline, and chloroquine on sperm function in vitro. Hum. Reprod. 13: 1878-1886.

Harris, S.J.; Milligan, M.P.; Masson, G.M. and Dennis, K.J. (1981) : Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH) . Fertil. Sertil; 36 : 219-221 .

Hayes ,F.J.; Pitteloud,N.; DeCruz,S.; Crowley,W.F. and Boepple,P.A.(2001). Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male .J.Clinic. Endocrin. Metab.; 86: 5541-5546.

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

Hughes, C.; Lewis, S.; McKelvey-Martin, V. and Thompson, W.(1996) A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. Mol. Hum. Reprod.; 2: 613-619.

Ibadin , O.K. and Iben, I.N. (2008) . Bacteriospermia and sperm quality in infertility male patient at University of Benin Teaching Hospital , Benin City , Nigeria Malaysian Journal of Microbiology ; 4(2) : 65 – 67 .

Isachenko , E.; Isachenko, V.; Katkov, I.I.; Dessole, S. & Nawroth, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. Reproductive Biomedicine Online, 6(2): 191-200.

Isachenko, V., Katkov, I.I., Yakovenko, S., Lulat, A.G., Ulug, M., Arvas, A., Isachenko, E.(2007). Vitrification of human laser treated blastocysts within cut standard straws(CSS): novel aseptic packaging and reduced concentrations

Ishikawa, T.; Fujioka , H. and Fujisawa, M. (2004) . Clinical and hormonal findings in testicular maturation arrest . BJL International ; 94 (9) : 1314 – 1316 .

Isidori , A. ; Latini , M. and Romanelli , F. (2005) . Treatment of male infertility . Contraception ; 72 : 314 – 318 .

Jacob, R.A. and Burri, B.J. (1996). "Oxidative damage and defenses". Am. J. Clin. Nutr. 63 (6) 985.

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 .

Jarow, J.P. ; Sharlip , I .D . and Belker , A .M (2002) . Best practice policies for male infertility . J. Urol. ; 77 (5) : 873 – 82 .

Jarvi , K. ; Lo, K. ; Fischer , A.; Grantmyre , J. ; Zini , A . Chow , V. and Mak, V. (2010) . Guidelines the work up of Necrozoospermia males" Can Urol. Assoc . J. ; 4(3) : 165 -7 .

Johnson, M. and Everitt, B. (1988) : Fertility. In : Essential Reproduction., Blackwell Scientific Publication-London ; 336-360 .

Jones, R.; Kelly, R. and Critchly, H. (1997). Chemokine and cycloxygenase-2 expression in human endometerium coincides with leukocyte accumulation. Human. Reprod.; 12: 1300-1306.

Jungwirth, A., Diemer, T., Dohle, G.R. , Giwercman, A., Kopa, Z., Krausz, C. and Tournaye ,H. (2012). Guidelines on Male Infertility . European Association of Urology,p.p:7 .

Kadri , A. ; Bakry, S.; Mansour , A. ; Khalifa , T. and Sharaf El – Dean , U. (2010) . ICSI outcome after assessment of sperm DNA integrity for dignosis of fertility . Aust. J . Basic . Appl . Sci ; 4 (5) : 835 - 843 .

Kaewnoonual , N.; Chiamchanya , C. ; Visutakul , P.; Mauochantr , S.; Chaiya, J. and Tor – Udom, P . (2008) . Comparative study of semen quality between pre – washed and post – washed with 3 sperm preparation media . Thammasat Medical Journal ; 8 (3) : 292 – 300 .

Kagan V. E.(1998). Recycling and redoxcyching of phenolic antioxidants. Ann. NV Acod. Sci. 854:425-434.

Kamal , A. ; Rhodes , C. A. and Fahmy , L. (1999) .Intracytoplasmic sperm Injecttion in men with totally immotile ejaculated sperm . Fertil . Steril ; 4 : 154 – 161 .

Kasai, T.J.; Ogawa. K.; Mizuno, K.; Nagea, S.; Uchida, Y.; Ohta, S.; Fujie, M.; Suzuki, K.; Hirata, S.and Hoshi, K. (2002) . Relationship between sperm mitochondrial membrane Potential, Sperm motility and fertility Potential. Asian J Androl; 4 : 97-103.

Katkov, I.I.; Isachenko, V.; Isachenko, E; Kim, M.S.; Lulat, A.G-M.I.; Mackay, A.M. & Levine, F. (2006). Low- and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductiveand progenitor cells. International Journal ofRefrigeration, 29, : 346– 357 .

Kao, S.; Chao, H. and Wei, Y. (1998) Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. Mol. Hum. Reprod.; 4, 657-666.

Keck , C. ; Tempfer , C.B. and Hugues , J . N. (2007) . Conservative infertility management . informa . healthcare. 3 : 4- 6 .

Kesari, K. K.; Kumar, S. and Behari, J. (2010). Mobile phone usage and male infertility in Wister rats. Indian J.of Experimental Bio. ; 47: 987 - 992.

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

Kidd, S.A.; Eskenazi, B. and Wyrobek, A.J. (2001) . Effects of male age on semen quality and fertility : areview of the literature. Fertil. Steril; 75 : 237-248 .

Kim, Hee .Sun , Moon, Joo . Kang., Sung ,A.h., Sun, Kyung. Oh., Hoon, Kim., Seung,Yup, Ku. , Seok, Hyun. Kim .,Shin, Yong. Moon.,and Young, Min. Choi2.(2013) . The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis . The korean society for reproductive medicine. 2013;40(1):23-28

Kodama, H.; Yamaguchi, R.and Fukuda, J. (1997) . Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertil. Steril; 68 : 519-524.

Kolettis, P. N. (2003). Evaluation of the sub fertile men. Am. Fam. Ph. 12: (4)1-11.

Koscinski , I. ; Wittemer , C. ; Lefebvre – Khalil , V.; Marcelli ,f . ; Defossez , A. and Rigot, J. M. (2007) . Optimal management of extreme oligozoospermia by an appropriate cryptopreservation programme . Hum . Reprodct. ; 22 : (10) : 2679 - 84 .

Kosower, N.; Katayose, H. and Yanagimachi, R.(1992) . Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. J. Androl. 13(4).

Kothari, S.; Thompson, A.; Agarwal, A. and Du Plessis, S. S. (2010). Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. Indian J. of Experimental Bio. ; 48 : 425 - 435.

Kruger, T.F.; Acosta, A.A.; Simmons, K.F.; Swanson, R.J.; Matta, J.F. and Oehninger, S. (1988) : Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization. Fertil. Steril; 49 : 112-117 .

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.

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 .

Lenzi, A.; Gluasso, F.; Gandini..; Lombardo, F.; Terminali, O.; Passi, S. and Dondero, F. (1993) . Placebo controlled, double blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Human. Reprod; 8 : 1657-1662.

Lewis, S.E.M., Agbaje, I.,and Alvarez, J.(2008). Sperm DNA tests as useful Adjuncts to semen analysis. SystBiol Reprod Med;(3)54:111-125.

Li, H.; Dubocq, F.; Jiang, Y.; Bartoov, B.; Eltes, F. and Servadio, C. (1999). Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and sertoli cell function. Urology.;53(6):1258-1262.

Li, H. and Lui, J. (2002). Influence of male genital bacteria infection on sperm function. Zhonghoa Nan Ke Xue.; 8(6A): 442-444.

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.

Lopes, S.; Jurisicova, A.; Sun, J. G. and Casper, R.F.(1998) : Reactive oxygen species : Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum. Reprod; 13 : 896-900 .

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

Makler, A.; Stoller, J. and Shiran, E.M. (1998) . Dynamic aspects concerned with mechanism of separating motile sperm from non motile sperm,Leukocytes, and debris with the use of high-density percoll. Gradients Fertil. Steril; 70 : 961-966 .

Mallidis , C. ; Lim , T. C.; Hill, S. T.; Skinner , D.J.; Drown, D. J.; Johnston , W. I.; and Backer , H.W. G. (2000) . Necrospermia and chronic spinal cord injury . Fertil . Steril ; 74 : 221 – 227 .

Manicardi, G.C., Bianchi, P.G., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U. and Sakkas, D. (1995) Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and it relationship to chromomycin A3 accessibility. Biol. Reprod.; 52: 864- 867.

Matsuda, T.; Nonomura, M. and Okada, K. (1989) Cytogenetic survey of subfertile males in Japan. Urol. Int.; 44:194-197.

Maxwell, S. (1995). " Prospects for the use of antioxidants therapies". Drugs. 49(3): 345.

Maxwell, S.R. and Lip, G. Y. (1997). "Free radicals and antioxidants in cardiovascular disease". Br. J. Clin. Pharmacol. 44 (4): 307.

Maxwell., W. M .C .,and Watson, P.F . (1996). Recent progress in the preservation of ram semen, Anim ReprodSci, 42: 55-65.

Mazzilli, F.; Rossi, T.; Sabatini, L.; Miyazaki and Skinner, D. (1995) . Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species production. Acta. Europea. Fertilitatis; 26 : 154-148.

McClure, R.D. (1988) . Endocrine investigation and therapy. In : contemporary Management of Impotence and Infertility. Tanagho, E.A.; Lue, T.F. and Mc Clure, R.D. (eds), Williams and Wilkins, Baltimore : 222-238 .

McClure, R.D. (1992) . Male infertility. In : Smiths General Urology. Tanagho, E.A. and McAninch, J.W. (eds), Alange Medical Book, California :. 669-695.

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 .

Merryman, H.T . (1970) . The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury . The Frozen Cell. London: Churchill Press : 565-569 .

Michael, L. (2001)." The peroxy Radical" Department of chemistry, University of Iowa, Iowa city, IA 52242.

Michal Jackob 2002, “Normal values poket” chapter 3 (clinical chemistry value) P49.

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.

Moskovtsev , S.I. , Lulat, A.G.M., and Librach, C.L.(2010). Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification vs. Slow Freezing: Canadian Experience .www.intechopen.com :p.p :77-82 .

Morales, M.; Katz, D.F.; Overstreet, J.W.; Samueles, S.J. and chang, R.J. (1988) : The relationship between the motility of morphology of spermatozoa in human semen. J. Androl; 9 : 241-247 .

Mortimer, D. (1994a) : Laboratory standards in routine clinical andrology. Reproductive Medicine Review ; 3 : 97-111 .

Mortimer, D. (1994b) : Practical Laboratory Anrology Oxford. Oxford University Press .

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

Mundy, A.J.; Ryder, T.A. and Edmonds, D.K. (1995) : Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. Hum Reprod; 10 : 116-119 .

Murray, R.K.,Granner, D.K.and Mayes, P.A. (2003), "Harper's Illustrated Biochemistry".26th ed. Lange Medical Books/McGraw-HilL: 87-91.

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.

Myatt , L. and Cui, X .(2004) ."Oxidative stress in the placenta".Histochem CellBiol:122:369-382.

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 .

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.

Okonofua, F., Menakaya, U., Onemu, S.O., Omo-Aghoja, L.O., and Bergstrom, S (2005). A case-control study of risk factors for male infertility in Nigeria. Asian J. Andrology, 7(4): 351-361.

Oliva, R.(2006). Protamines and male infertility. Hum. Reprod. Update.;12:417–435.

Omer, M.A. (2000). "The Effect of cigarette Smoke on some hematological parameters in Human". Mu'tah. Lil. Buhuth wad. Diasat, 15(3): 53-61.

Palermo, G.; Joris, H.; Derde, M.P.; Gamus, M.; Devroey, P. and Steirtegh A.V. (1993) . sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by sub-zonal insemination and intracytoplasmic sperm injection Fertil. Steril; 59 : 826-835 .

Park,Y.S.; Kim, M . K . ; Lee , S . H . ; Cho , J . W.; Song , I . O .and Seo ,J .T. (2011). Efficacy of testicular sperm chromatin condensation assay using aniline blue - eosin staining in the IVF-ET cycle . clin.Exp.Reprod.Med;38 (3):142-147.

Pasqualotto , F.F. ; Sharma , R. K . ; Nelson , D . R .; Thomas , A. J. and Agarwal , A. (2000) . Relationship between oxidative stress , semen characteristics , and clinical diagnosis in men undergoing in fertility investigation . Fertil . Steril ; 73 : 459 – 464 .

Paul, M. and Frazier, L. (2000). Reproductive disorders. In: Occupational Health: recognizing and preventing work-related disease and injury.by: Levy, B.S. and Wegman, D.H. (eds.), 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Baltimore, London. Pp. 589-592.

Perera,. D.; Pizzey, A.; Campbell, A.; Katz, M.; Porter, J.; Petrou, M.; Irvine, D. and Chatterjee, R. (2002). Sperm DNA damage in potentially fertile homozygous beta-thalassaemia patients with iron overload. Hum Reprod 17:1820-1825.

Pierce ,J.D., Cackler, A.B.and Arnett ,M.G. (2004).Why should you care about free radicals? RN.; 67: 38-42; quiz 43.

Politoff, L. ;Birkhauser, M.; Almendral, A.; Zorn, A. and Ing, D. (1989) .New data confirming acircannual rhythm in spermatogenesis. Fertil. Steril; 52 : 486-488 .

Poppe , K . and Velkeniers , B . (2002) . Thyroid and infertility . Verh . Kacad Geneeskd Belg. ; 64 (6) : 389 – 99 .

Quanzhong, L.; Huidi, L.; Yangyi, M. ; Keliang, R. and Maowen, L. (1996) : Effect of different Capacitation media on rabbit sperm capacitation. 2nd Asian symposium on animal biotechnology, nanjing, China : 135-138 .

Raghuveer ,Choudhary., Chawala, V.K., Soni, N.D, Jayant, Kumar.,and Vyas, R.K.(2010). Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. Pak J Physiol;6(2) :54-59.

Rama, G.A. , Raju, K. Murali. Krishna, G.J. Prakash, K. Madan .(2006). Vitrification: An Emerging Technique for Cryopreservation in Assisted Reproduction Programmes. Embryo Talk Vol 1.4; . 210 –2 27 .

Ramos, L.and Wetzels, A.(2001)Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. Hum Rep.;16:1703–1707.

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

Robert K, Murray Darryl K. Granner, Peter A. Mayes and victor W. Rod well (2000). “Harper’s Biochemistry, 25th ed. Appleton Lamye.

Roberts , K. P . ; Ensrud , K . M.; Wooters , J. L. ; Nolasn , M. A. Johoston , D . S. and Hamitton , D. W. (2006) . Epididymal secreted protein crisp – 1 and sperm function . Mol. Cell Endocrinal ; 114 : 405 – 417 .

Rolf, C. and Nieschlag, E. (2001). Reproductive functions, fertility and genetic risks of aging men. Exp. Clin. Endocrinol., Diabetes ; 109(2): 68-74.

Roosli , M. ; Michel , G.; Kuehni , C. E. and Spoerri , A. (2007) . Cellular telephone use and time trends in brain tumour mortality in Switzerland from 1969 to 2002 , Eur . J. Cancer prevention;16 (1) 77-82 .

Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M.and F. Dondero, (2001) . Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure, Cell and Tissue Banking 2 :9–13.

Rowe , P. J. ; Comhaire , F. H. ; Hargreave , T. B. ; and Mahmond , A . M . (2000) WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male . UK : Combridge University press .

Royere, D. C., Barthelemy, S. Hamamah, and J. Lansac,.(1996). Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review," Human Reproduction Update, vol. 2, no. 6, pp. 553–559.

Rrumbullaku , L. ; Boci, R . ; Dedja , A. and Dautaj , K . (1998) . Sperm morphology in infertile men with varicocele . Ist Balkan Symposium of Andrology , AL exanderonpolis ,Greece June : 12 - 14 .

Ryu, H. M.; Lin, W.W.; Lamb , D. J.; Chuang , W. ; Lipshultz , L. I. and Bischoff , F. Z. (2001) . Increased chromosome X, Y, and 18 non disjunction in sperm from infertile patient that were identified as normal by strict morphology : Implication for Intracytoplasmic sperm injection . Fertil . Steril ; 76 : 879 – 883 .

Sahnoun, Z and Jamoussi, K. (1997). "Free radical and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutic aspects". Therapic. 52 (4): 25.

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

Said, T.M., Agarwal, A., Zborowski, M., Grunewald, S., Glander H-J, and Paasch U.(2008) .Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. J Androl, , 29 (2), 134-142.

Saito, K., Suzuki, K., Iwasaki, A., et al.(2005). Sperm cryopreservation before cancer chemotherapy helps in the emotional battle against cancer. Cancer Aug;104(3):521-4.

Sakkas, D.; Moffatt, O.; Manicardi, G.; Mariethoz, E.; Tarozzi, N. and Bizzaro, D. (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. Biol. Reprod.; 66:1061-1067.

Saleh, R.; Agarwal, A.; Sharma, R.; Said, T.and Thomas, A. (2003) Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. Fertil Steril.; 80:1431-1436.

Sanocka, D. and kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod. Biol. Endocrinol ; 2 (4) : 12-19.

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.

Sawyer, D.E.; Mercer, B.G.; Wiklendt, A.M.and Aitken, R.J.(2003) Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. Mutat Res;529:21–34.

Schill, L. ; Buls – Pratsch, M . ; Kupker , W.; Sandmann , J. Johannisson R. Diedrich , k . (2003) . Clinical and endocrine follow up of

patients after testicular sperm extraction . Fertil . Steril ; 79 : 281 – 286 .

Schroeder-Printzen,I.;Ludwig,M.Kohen,F. and Weidner,W.(2000). Surgical therapy in infertile men with ejaculatory duct obstruction:technique and outcome of astandarizid surgical approach.Hum. Reprod.;15:1364-1368.

Schwartz, M. and Vissing, J. (2002) . Paternal inheritance of mitochondrial DNA. New Engl. J. Med.; 347: 576-580.

Shamsa ,A. J .(2010). Oxidative Stress in male infertility . MSc. Thesis. College of Medicine, University of Kufa.

Sharma ,R.; Said, T. and Agarwal, A. (2004) Sperm DNA Damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome (Review). Asian J Androl ; 6:139-148.

Sheikh,N.; Amiri,I.; Farimani ,M.; Najafi , R. and Hade, J.(2008) Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. Iranian Journal of Reproductive Medicine ; 6(1) : 13-18.

Shekarriz, M.; Dewire, D.M. ; Thomas, A.J. and Agarwal, A. (1995) : Amethod of human semen centrifugation to minimize the iatrogenie sperm imjuries caused by reactive oxygen species. Eur. Urol; 28 : 31-35 .

Sigman ,M. and Vance, L.(1993) . Aspected of male infertility . In: Hormonal Therapy in male infertility . The role of FSH Acoeta , A;Isidori, A.Negro-Vilar,A. and Schoemaker ,J(eds)Excerpta Medica Asia Ltd, Honk Kong ;P.5.

Sikka , S. C. (2008) . Relative impact of oxidative stress on male reproductive function curr. med. chem. ; 851 - 862 .

Silber ,S.J.; Balmaceda,J.; Borrero,C.;Ord,T. And Asch,R.(1988). Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis:a new treatment for congenital abscence of the vas deferens. Fertil.Steril.;50:525-528.

Silber, J.S.(2000).Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non- obstructive azoospermic men.Hum.Reprod.;15: 2278-2284 .

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

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.

Slatter, D. A; Botton, C.H; Bailey, A.J. (2000) "The importance of lipid-derived malondialdchyde in diabetes mellitus" Diabetologia. 43 (5): 550-557.

Smith , R. ; Vantman , D. ; Ponce , J. ; Escobar , J. and Lissi , E. (1996) :Total antioxidant capacity of human seminal plasma . Human Reproduction ; 11 : 1655-1660 .

Spano , M. ; Cordelli , E. and Leter , G. (1999) :Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim – up and cryopreservativation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay . Mol. Hum. Reprod ; 5 : 29-37

Stahl, W and Sies, H. (1997). "Antioxidant defense vitamins E and C and carotnoids". Diabetes 46: 14-18.

Steen , Y. ; Wilkland , M. ; Janson , P. O. and Wik , O. (1986) :A new method for the treatment of sperm in an IVF and ER programm . (Abstr.) , J. IVF and E. T. ; 3 : 173.

Steger, K.; Pauls, K.; Klonisch, T.; Franke, F. and Bergmann, M. (2000). Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. Mol Hum Reprod.; 6:219-25.

Stovall , D. W. ; Guzick , D. S. ; Berga , S. L. ; Krasnow , J. S. and Zeleznik , A. J. (1994) :Sperm recovary and survival : Two tests that predict in vitro fertilization out come . Fertil. Steril. ; 62 : 1244-1249 .

Sueldo , C. E. ; Berger , T. ; Kletzky , O. and Marrs , R. P. (1985) :Seminal prolactin concentration and sperm reproductive capacity . Fertil. Steril ; 43 : 632-635 .

Suleyman, D; Mustafa, Y; Mchmet, K, Natan. A Divler, A and Ahmet, A. (2003). "Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis". Turk J Gastroenterol 14(1): 39-43.

Takagi, S.; Itoh, N.; Kimura, M.; Sasao , T. and Tsukamoto, T. (2001) Spermatogonial proliferation and apoptosis in hypospermatogenesis associated with non obstructive azoospermia. Fertil. Steril.; 76 : 901-907.

Tariq, H. Al-Khyatt. ; Kadhum , J. Al-Hamdani. and Awn, Abdullah .Mohammed .(2010) . Oxidative stress in the sera and seminal plasma of the infertile subjects in Babylon governorate . Kerbala Journal Of Pharmaceutical Sciences .Number 1 :33-42.

Taylor, K. P., Roberts, K. Sanders, and P. Burton, (2009) Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa, Reproductive Biomedicine Online 18 184–189.

Telisman , S.; Cvitkovic, P. and Jurasovic, J. (2000). Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men. Environ. Health Perspect.; 108(1): 45-53.

Tomlinson, M.J.; Barratt, C.L. R.and Cooke, I.D. (1993) : Prospective study of leukocytes and Leukocyte subpopulations in semen suggests they are not acause of male infertility. Fertility and Styerility ; 60 : 1069-1075 .

Tremellen, k. (2008). Oxidative stress and male infertility - a clinical. Perspective Hum. J. of Reprod. ; 14 (3): 243–258.

Tsujimura, A.; Matsumiya, K. and Takkkahashi, T. (2004). Effect of life style factors on infertility in men. Arch. Androl. 50: 15-17.

Tuncer, P. B., M. N. Bucak., S. Büyükleblebici., S. Sarıözkan., D. Yeni., A. Eken., P. P. Akalın., H. Kinet., F. Avdatek., A. F. Fidan and M. Gündoğan., (2010). The effect of cysteine and glutathio sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology, 61: 303-307.

Turner, T.T.(2001). The study of varicocele through the use of animal models. Hum Reprod Update.; 7: 78 –84.

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 .

Vendemiale, G. (1999). "An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease". Int. J. Clin. Lab. Res. 29 (2): 49.

Verma, A . and Kanwar, J.C. (1999) . Effect of vitamin E on human sperm and lipid peroxidation in vitro. Asian. J Androl ; 1 : 151-154.

Vermeulen, A. and Kaufman, J. (1995). Aging of the hypothalamo-pituitary-testicular axis in men. Horm. Res.; 43: 25-28.

Vezina, D.; Mauffette, F.; Roberts, KD. and Bleau, G.(1996).Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutriental levels and distribution. Bio Trace Elem Res 53(1-3): 65-83.

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.

Villegas, J.; Schulz, M.; Soto, L.and Sanchez, R.(2005) Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. Springer Apoptosis ;10:105–115.

Vladimirov, Y.A. (2004). "Reactive oxygen and Nitrogen species diagnostic, preventive and theraps". Biochemistry 69(1) pp. 57.

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.

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

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

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

Wikland, M.; Wik,O.; Steen, Y.; Qvist,K.; Soderlund, B. and Janson, P.O. (1987) : Aself-migration method for Preparation of sperm for in vitro fertilization, Hum Reprod; 2 : 191-195 .

Wohaieb, S.A. and Godin, D.W. (1987). "Starvation related alterations in free radical tissue defense mechanism in rats". Diabetes 36(2): 169-173.

Wohaieb, S.A; Tohala, S.H. and Al-Dewachi, O.S. (1994). "Effect of vitamin E on hydrogen peroxide-induced oxidation stress in rabbits Iraqi J. Vet. Sci, 7: 81-84.

Wolf, H.; Politch, J.H.; Martinez, A.; Haimovici, F.; Hill, J.A. and Anderson, D.J. (1990) . Leukocytospermia is associated with poor semen quality. Fertile. Steril; 53 : 528-536.

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

Yeung , C . H. ; Cooper , J. G . ; Oberpenning K.; Schuize , H. and Nishinag , E. (1993) . Change in movement characterision of

human spermatozoa along the length of epididymis. Biology of reproduction ; 49 : 274 – 280 .

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.

Zavos , P. M. ; Abou – Abdallah , M. ; Aslanis , P.; Correa , J. R. and Zarmakonpis Zavos , P. N. (2000) . Use of the multi – Zscc one step standardized swim – up method : recovery of high – quality spermatozoa for intrauterine or other forms of assisted reproductive technologies . Fertil . Steril ; 74 : 834 – 835 .

Zavos, P.M.; Zarmakoupis, C.N. and Zavos, P.N.Z. (1999): The impact of cigarette smoking on human reproduction : its effects on female and male fecundity Middle East Fertility Society Journal; 4 : 94-101 .

Zhang, A. Z. S., Yang, Y., Ma, Y., et al.(2006). Single nucleotide polymorphisms of the gonadotrophin regulated testicular helicase (GRTH) gene may be associated with the human spermatogenesis Impairment. Hum Reprod; 21(3) :755-759.

Zheng, X. (2003). "Tocopherol, lipid antioxidant department of free radical and radiation biology". The university of Iowa, Iowa city. IA 52242-1181.

Abstract

This study was performed in the laboratory of Intra Cytoplasmic Sperm 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 aimed to study the effect of rapid freezing and thawing processes on semen and sperm parameters, Malondialdehyde concentration (MDA) and abnormal sperm chromatin percent, besides to study the effect of adding types from antioxidants Including vitamin E in concentrate 40 μmol and Glutathione in concentrate 1 mm to the sperm freezing media (Sperm Freeze) In minimizing the negative effects which result from sperm rapid freezing and thawing processes.

The study included three types of Infertility patients Normozoospermic, Oligozoospermic, and Asthenozoospermic patients. The Number of patient's was (30) in each case . .
The Mean of age of Normozoospermic patients were (32.2+_1.31) year, Oligozoospermic patients (31.1+_1.29) year and, Asthenozoospermic patients (33.1+_1.23) year. .

The results showed that the sperm activation processes lead to a significant difference ($p<0.05$) in sperm parameters in comparison with these before activation . The present study results showed that sperm activation by using simple layer technique to patients samples of Normozoospermic and Oligozoospermic patients lead to a significant decrease ($p<0.05$) in sperm concentration, round cell concentration , Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent Means and a significant increase ($p<0.05$) in sperm motility forward movement percent , Sperm viability percent and normal sperm morphology percent in comparison with their values before activation . While the sperm activation processes of Asthenozoospermic patients by useing Centrifugation Wash – Out technique lead to a significant decrease

($p<0.05$) in sperm concentration, round cell concentration and abnormal sperm chromatin percent Means and a significant increase ($p<0.05$) in sperm motility forward movement percent, sperm viability percent, normal sperm morphology percent and Malondialdehyde concentration In comparison with their values before activation. .

The present study results showed that sperm rapid freezing processes of patients who were included in the study by using sperm freezing media (Sperm Freeze) and thawing processes after one month from freezing leads to a significant decrease ($p<0.05$) In the sperm concentration, sperm motility forward movement percent, sperm viability percent and normal sperm morphology percent. and a significant increase ($p<0.05$) in the Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent and no significant difference($p<0.05$) in round cell concentration in comparison with their values after activation .

Study of freezing time by calculating sperm parameters in the first month and compared it with second and third months after freezing and thawing in the samples of patients who were included in the study showed there was a there was a significant decrease ($p<0.05$) in the sperm motility forward movement percent and sperm viability percent ,and there was a significant increase ($p<0.05$) in the Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent and no significant difference($p<0.05$) in the sperm concentration, normal sperm morphology percent and round cell concentration Means in the second and third month In comparison with their values after doing the thawing processes after one month from freezing . The study results shows a significant decrease ($p<0.05$) in the sperm motility forward movement percent and sperm viability percent ,and there was a significant increase ($p<0.05$) in the Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent and no significant difference($p<0.05$) in the sperm concentration, normal sperm morphology percent and round cell concentration when comparing third month Means

with second month Means. .

The study results shows that used of sperm Freezing Media (Sperm Freeze) with adding antioxidants like vitamin E or Glutathione in single form or in the mixed form from the tow antioxidants leads to a significant difference ($p<0.05$) in sperm parameters of study included patients , there was a significant increase ($p<0.05$) in the sperm motility forward movement percent s and sperm viability percent ,and there was a significant decrease ($p<0.05$) In The Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent and no significant difference ($p<0.05$) In the sperm concentration, normal sperm morphology percent and round cell concentration In comparison with their Means when used of sperm freezing media (Sperm Freeze) alone . .

It can be concluded from this study that sperm rapid freezing and thawing processes had a negative effect on the semen and sperm parameters and Malondialdehyde concentration and abnormal sperm chromatin percent in all samples of study included patients , and this negative effect of rapid freezing and thawing processes increased with increasing of freezing time , and Adding of antioxidants vitamin E or Glutathione in single form or In the mixed form shows resistance to this negative effect leads to a significant increase ($p<0.05$) In the studying parameters .

Ministry of Higher Education and Scientific Researche
University of Karbala / College of Education for pure science
Department of Biology

Effect of Rapid Freezing and Thawing and Antioxidants addition on Free Radicals levels and Sperm Parameters of sub- fertile Patients

A thesis
Submitted to the Council of the college of Education for pure science \ University of Karbala

In partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy in Biology \ Zoology

By
Hisham Qassim Mohammad Al-Nowainy

M . Sc - 2008

Supervised by

Dr Sahib Y. Almoreshedy — **Ass .Professor**

Dr.Wafak G. al-bazy — **Ass .Professor**

.

2013 A .D **1435 A.H**