تأثير بيروكسيد الهيدروجين وبعض مضادات الأكسدة في معايير النطف البشرية خارج الجسم الحي

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم-جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة

علوم في علوم الحياة/الحيوان

من

صاحب يحيى حسن المرشدي

ربيع الاول ١٤٢٧ نيسان ٢٠٠٦

THE EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE AND SOME ANTIOXIDANT ON HUMAN SPERM PARAMETERS *in vitro*

A Thesis

Submitted to the Council of College of Science, University of Babylon, in Partial Fulfillment of the Requirements for the award of the Degree of Doctor of Philosophy Science in Biology/Zoology Physiology

By

Sahib Yahia Hassen Al-Morshidy

April ٢٠٠٦ **Rabia-١** ١٤٢٧

A STUDY OF EFFECT OF FREE RADICALS AND ANTIOXIDANTS OF HUMAN SPERM PARAMETERS

Athesis

Submitted to the Council of the college of science

University of Babylon

In partial fulfillment of the requirements for the degree

Of doctor of philosophy in Biology reproductive physiology

By

Sahib Yahia Hassen

٢٠٠٦

تأثير بيروكسيد الهيدروجين وبعض مضادات الأكسدة في معايير النطف البشرية خارج الجسم الحي

صاحب يحيى حسن

اقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة اطلعنا على هذه الاطروحة، وقد ناقشنا الطالب صاحب يحيى حسن في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا بأنها جديرة بالقبول وبتقدير( ) لنيل درجة الدكتوراه علوم الحياة- الحيوان.

التوقيع:
رئيس اللجنة:
المرتبة العلمية:
العنوان:
التاريخ: / /٢٠٠٥

التوقيع:
العضو:
المرتبة العلمية:
العنوان:
التاريخ: / /٢٠٠٥

التوقيع:

العضو:

المرتبة العلمية:

العنوان:

التاريخ: / /٢٠٠٥

التوقيع:

العضو:

المرتبة العلمية:

العنوان:

التاريخ: / /٢٠٠٥

التوقيع:

العضو:

المرتبة العلمية:

العنوان:

التاريخ: / /٢٠٠٥

مصادقة مجلس كلية العلوم/ جامعة بابل

التوقيع:

الاسم

المرتبة العلمية:

العنوان:

التاريخ: / /٢٠٠٥

﴿أيحسب الإنسان أن يترك سدى ۞ ألم يك نطفة من منى يمنى ۞ ثم كان علقة فخلق فسوى ۞ فجعل منه الزوجين الذكر والأنثى ۞ أليس ذلك بقدر على أن يحيي الموتى ۞﴾

صدق الله العلي العظيم
القيامة (٣٦-٤٠)

الإهداء

لكَ يا من كنت لي خبزاً وماء

ورداءاً حينما عز الرداء . . . . . ابي

لكِ يا من كنت انت حين يأتي

البرد دفءاً ومع الصيف شتاء . . . . . روح والدتي

ولمن احببتهم من كل قلبي

واحبوا ان يروني في العلاء . . . . . اخوتي

ولسكناي وبيتي وسخاء ووفاء . . . . . زوجتي

ولأغصانيّ ما أهوى بأرض وسماء . . . . . مؤمل وفاطمة ومحمد

اهدي جهدي المتواضع هذا

صاحب

Summary

This study included the examination ٢٠٠ sample of the seminal fluid for the infertile and fertile patients after a period of abstinence of ٣-٥ days. This study aimed at studying the relationship between the reactive oxygen species and sperm parameters, to investigate for men infertility unknown, and this may be possible by studying the hydrogen peroxide (H_2O_2) effect on the sperm parameter and malondialdehyde (MDA) concentration as a final by product of lipid peroxidation process; Moreover, studying the role of antioxidants

represented by vitamin E, C and the glutathione (GSH) in the inhibition of lipid peroxidation process and therefore the preservation of the semen quality. The study included the measurement of malondialdehyde concentration in the seminal plasma for the infertile and fertile patients and the relationship between the sperm parameters and the malondialdehyde concentration. The final part of the study comprised the activation of sperms of the infertile patients who have Asthenozoospermia *in vitro* by centrifugation washout technique and simple layer and by the use of Earl's salt as a culture medium. The concentrations ٠.٠٢ mg/ml (vit. E), ٠.٠٤ mg/ml (vit C) and ٠.٠٦ mg/ml (Gluathione) were added as antioxidants at an incubation period of ٤٥ minutes. The study results had revealed that the addition of the Hydrogen peroxide (H_2O_2) at ٠.١٪ concentration to the seminal fluid samples of infertile patients led to a significant increase ($P<٠.٠٥$) in the malondialdehyde concentration and a significant decrease ($P<٠.٠٥$) of sperm motility percent, grade activity and sperm viability compared to the control represented by the physiological solution. The study results also had revealed a significant increase ($P<٠.٠٥$) of sperm motility percent, grade activity and sperm viability, and a significant decrease ($P<٠.٠٥$) in the malondialdehyde after the addition of vitamin E, vitamin E+ vitamin C and the glutathion and the seminal plasma for the seminal fluid samples which had been induced by hydrogen peroxide compared with the hydrogen peroxide alone.

The results revealed also a significant increase in the malondialdehyde concentration of the seminal plasma (P<٠.٠٥) of the infertile patients with Asthenozoospermia, oligozoospermia, teratozoospermia and necrozoospermia in comparing with the fertile patients and infertile patients with a zoospermia.

The study results revealed a significant increase (P<٠.٠٥) in the malondialdehyde concentration after the activation by the use of Earle's salt compared with the values before the activation, and on the use of centrifugation washout technique, while no difference had been found on the use of simple layer technique. The addition of vitamin E of ٠.٠٤ mg/ml concentration and glutathione ٠.٠٦ mg/ml to the Earl's medium by the use of centrifugation washout technique led to an improvement (P<٠.٠٥) in the sperm motility percent, sperm activity grade, and a significant decrease (P<٠.٠٥) in the malondialdehyde concentration compared with the values in the Earl's medium alone.

We concluded from this study that the addition of hydrogen peroxide to the seminal fluid samples to infertile patients led to a decline in the sperm motility percent, sperm activity grade, and sperm viability. This is because of the increase in the lipid peroxidation activity as the antioxidant had a protective role for the preservation of the semen quality and for the inhibition of the reactive oxygen species. Malondialdeyde concentration increased in

the seminal plasma for the infertile patients compared with fertile patients, as the increase in the malondialdehyde concentration had a negative relationship with sperm concentration, the sperm motility percent, sperm activity grade and sperm viability and a positive relationship with morphologically abnormal sperm percent and leucocytes and phagocytes concentration. The centrifugation process for the seminal fluid samples and for the removal of the seminal plasma showed an increase in the malondialdehyde concentration. The addition of vitamin E on a concentration of ٠.٠٤ mg/ml and the Glutathione on a concentration of ٠.٠٦ mg/ml to Earl's salt on the use of centrifugation washout technique led to an improvement in sperms motility percent or in the sperm activity grade and led to a decrease in the lipid peroxidation activity.

قائمة المختصرات

FSH	**Follicle Stimulating Hormone**
GPX	**Glutathion Peroxidase**
GSSG	**Oxidated Glutathion**
H_2O_2	**Hydrogen Peroxide**
ICSI	**Intracytoplasmic Sperm Injection**
IUI	**Intrauterine Insementaion**
IVF	***In vitro* Fertilization**

LH	**Luteinizing Hormone**
MDA	**Malondialdehyde**
MMP	**Mitochondrial Membrane Potential**
NAC	**N-acetyl-L-Cysteine**
NO	**Nitric Oxide**
$O^{\cdot -}_{2}$	**Superoxide anione**
OAT	**Oligoasthenoteratospermia**
OH	**Hydroxyl Radicals**
$ONOO^{\cdot -}$	**Peroxy Nitrite**
OS	**Oxidative Stress**
PMA	**Phorbol ١٢-Myristate ١٣-acetate**
$ROO^{\cdot -}$	**Peroxyl Radical**
ROS	**Reactive Oxygen Species**
SOD	**Superoxide Dismutase**
TBA	**Thiobarbituric Acid**
TCA	**Trichloroacetic Acid**

الخلاصة

شملت الدراسة فحص ٢٠٠ عينة من السائل المنوي لمرضى العقم والأشخاص الخصيبين بعد فترة امتناع من ٣-٥ أيام حيث جمعت العينات من المختبر الاستشاري لكلية طب الكوفة –جامعة الكوفة وقد هدفت الدراسة الى الكشف عن العلاقة بين الأنواع الاوكسجينية الفعالة Reactive Oxygen Species ومعالم النطف بسبب عدم التوصل بشكل نهائي الى الأسباب المؤدية إلى عقم الرجال وتم ذلك من خلال دراسة تأثير بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen Peroxide (H_2O_2) في معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد Malondialdehyde (MDA) كناتج نهائي لعملية اكسدة الدهون بالاضافة الى ذلك

توضيح دور مضادات الاكسدة المتمثلة بفيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون GSH في تثبيط عملية أكسدة الدهون والحفاظ على نوعية السائل المنوي كما تضمنت الدراسة قياس تركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية لمرضى العقم والأشخاص الخصيبين ومعرفة العلاقة بين معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد. أما الجزء الأخير من الدراسة فقد تضمن تنشيط نطف مرض العقم المصابين بوهن النطف خارج الجسم الحي باستخدام تقنيتي الغسل والنبذ Centrifugation wash-out technique والطبقية البسيطة Simple layer وباستعمال المستنبت ايرل كوسط زرعي ثم اضيفت التراكيز ٠.٠٢ ملغم/مل و٠.٠٤ ملغم/مل و٠.٠٦ ملغم/مل لكل من مضادات الاكسدة التي تمثلت بكل من فيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون GSH وفحصت العينات بعد مدة تحضين ٤٥ دقيقة.

بينت نتائج الدراسة ان إضافة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٠.١% لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين سببت زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد وانخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف قياساً بالسيطرة المتمثلة بالمحلول الفسيولوجي. كما أظهرت النتائج زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف ونقصاناً معنوياً (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد عند إضافة فيتامين E وفيتامين E + فيتامين C والكلوتاثيون والبلازما المنوية لعينات السائل المنوي المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين مقارنة ببيروكسيد الهيدروجين بمفرده.

كما بينت نتائج دراسة تركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية للأشخاص الخصيبين والعقيمين زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية للأشخاص المصابين بوهن النطف وقلة النطف وتشوه النطف وموات النطف مقارنة بالأشخاص الخصيبين والمصابين باللانطفية .

بينت النتائج زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في تركيز المالوندای الديهايد بعد التنشيط باستعمال المستنبت ايرل مقارنة بقيمها قبل التنشيط عند استعمال تقنية الغسل والنبذ في حين لم تلاحظ أي فروق معنوية عند استعمال الطبقية البسيطة. ان إضافة فيتامين E بتركيز ٠.٠٤ ملغم/مل والكلوتاثيون بتركيز ٠.٠٦ ملغم/مل الى المستنبت الزرعي ايرل باستعمال تقنية الغسل والنبذ سبب تحسناً معنوياً (P<٠.٠٥) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف ونقصان معنوي (P<٠.٠٥) في تركيز المالوندای الديهايد مقارنة بقيمها في المستنبت ايرل لوحده.

نستنتج من الدراسة الحالية ان إضافة بيروكسيد الهيدروجين لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين يسبب انخفاضاً في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والعيوشية وذلك يعود الى زيادة فعالية اكسدة الدهون، كما ان مضادات الأكسدة تمتلك دوراً وقائياً للحفاظ على نوعية السائل المنوي وكبح فعل الأنواع الاوكسجينية الفعالة.

يزداد مستوى المالوندای الديهايد في البلازما المنوية للأشخاص العقيمين مقارنة بالأشخاص الخصيبين كما ترتبط الزيادة في مستوى المالوندای الديهايد بعلاقة عكسية مع كل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف وبعلاقة طردية مع كل من النسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية.

تسبب عملية النبذ لعينات السائل المنوي وإزالة البلازما المنوية زيادة في مستوى المالوندای الديهايد وتؤدي إضافة فيتامين E بتركيز ٠.٠٤ ملغم/مل والكلوتاثيون بتركيز ٠.٠٦ ملغم/مل للمستنبت الزرعي ايرل عند استعمال تقنية الغسل والنبذ الى تحسن في كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف وتقلل من فعالية أكسدة الدهون في البلازما المنوية.

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خير الناطقين سيدنا محمد واله الطيبين الطاهرين.

يطيب لي وأنا انهي دراستي ان أتقدم بجزيل شكري وخالص امتناني الى أستاذيّ الفاضلين الدكتور فارس ناجي عبود الهادي والدكتور مفيد جليل عوض لاقتراحهما موضوع الدراسة ومتابعة خطواته طوال فترة الدراسة.

كما أتقدم بالشكر الجزيل الى الدكتور يحيى كاظم السلطاني- كلية الطب- جامعة الكوفة لما قدمه من مساعدة كبيرة في جمع العينات.

ولا يفوتني ان أتقدم بالشكر والامتنان الى رئاسة قسم علوم الحياة وعمادة كلية العلوم ورئاسة جامعة بابل لما قدموه من مساعدة في تسهيل إكمال دراستي.

وأتوجه بالشكر إلى كل من قدم لي المساعدة من أفراد عائلتي وزملائي من طلبة الماجستير والدكتوراه....وشكري وتقديري الى الست ضحى خالد غزالة لجهودها في طباعة الرسالة.

والله ولي التوفيق

توصية الأستاذ المشرف

نشهد أن إعداد هذه الأطروحة جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة- الحيوان.

التوقيع:

اسم المشرف: د.فارس ناجي عبود

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم- جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٠٦

التوقيع:

اسم المشرف: د.مفيد جليل عوض المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: جامعة كربلاء

التاريخ: / / ٢٠٠٦

توصية رئيس القسم

أشارة الى التوصية اعلاه المقدمة من الاستاذين المشرفين، احيل هذه الاطروحة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. كريم حميد رشيد

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية العلوم-جامعة بابل

التاريخ: / /٢٠٠٦

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة والتقويم اطلعنا على هذه الأطروحة، وقد ناقشنا الطالب صاحب يحيى حسن في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا بأنها جديرة بالقبول وبتقدير (امتياز) لنيل درجة الدكتوراه علوم الحياة- الحيوان.

رئيس اللجنة

الاسم: د. كريم حميد رشيد

العنوان: كلية العلوم-جامعة بابل

الدرجة العلمية:أستاذ

التاريخ: / / ٢٠٠٦

عضو اللجنة

الاسم: د. يحيى كاظم السلطاني

العنوان: كلية الطب-جامعة الكوفة

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / / ٢٠٠٦

عضو اللجنة

الاسم: د. قيس سعد شبيب

العنوان: كلية طب الاسنان-جامعة بابل

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / / ٢٠٠٦

عضو اللجنة

الاسم: د. عماد حسن محمود

العنوان: كلية الطب-جامعة بابل

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / / ٢٠٠٦

عضو اللجنة

الاسم: د. انتصار نعمان العزاوي

العنوان: مركز الابحاث الطبية-جامعة النهرين

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / / ٢٠٠٦

عضو اللجنة (المشرف)

الاسم: د. فارس ناجي عبود

العنوان: كلية العلوم-جامعة بابل

الدرجة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / / ٢٠٠٦

عضو اللجنة (المشرف)

الاسم: د. مفيد جليل عوض

العنوان: جامعة كربلاء

الدرجة العلمية:أستاذ

التاريخ: / / ٢٠٠٦

مصادقة عمادة كلية العلوم

التوقيع:

الاسم: د. عودة مزعل زامل

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية العلوم-جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٠٦

قائمة المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
قائمة المختصرات	I
الخلاصة باللغة العربية	II
المحتويات	V
قائمة الجداول	VIII
قائمة الاشكال	IX
الفصل الاول: ١-١ المقدمة	١
الفصل الاول: ١-٢ استعراض المراجع	٤
١-٢-١: الكيمياء الحياتية للسائل المنوي	٤
١-٢-٢: الانواع الاوكسجينية الفعالة	٩
١-٢-٣: مضادات الاكسدة الحيوية	١٣
١-٢-٤: العلاقة بين الاجهاد التأكسدي ومرضى العقم	١٩
١-٢-٥: دور مضادات الاكسدة في علاج مرضى العقم	٢٤
١-٢-٦: العلاقة بين الاجهاد التأكسدي وتقنيات تنشيط النطف البشرية خارج الجسم الحي	٢٧
الفصل الثاني: المواد وطرائق العمل	٣١
٢-١: جمع السائل المنوي البشري	٣١
٢-٢: فحص السائل المنوي البشري	٣١
٢-٢-١: الفحص العياني	٣٢
٢-٢-١-١: الحجم	٣٢
٢-٢-١-٢: اللون	٣٢
٢-٢-١-٣: فترة الاماعة	٣٢
٢-٢-١-٤: الاس الهيدروجيني	٣٣
٢-٢-٢: الفحص المجهري	٣٣
٢-٢-٢-١: تركيز النطف	٣٣
٢-٢-٢-٢: النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف	٣٤
الموضوع	**رقم الصفحة**
٢-٢-٢-٣: النسبة المئوية للنطف غير السوية	٣٥
٢-٢-٢-٤: النسبة المئوية لعيوشية النطف	٣٦
٢-٢-٢-٥: تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية	٣٦
٢-٣: التحليلات الكيموحيوية	٣٧

الموضوع	رقم الصفحة
٣-٢: دراسة العلاقة بين تركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية ومعالم النطف المختلفة.	٥٩
٣-٣: تنشيط النطف	٦٤
الفصل الرابع: المناقشة	٧٤

٢-٣-١: تركيز المالونداي الديهايد	٣٧
٢-٣-٢: تركيز الكولسترول الكلي	٣٨
٢-٣-٣: تركيز البروتين الكلي	٤٩
٢-٤: المواد المستعملة في الدراسة	٤٠
٢-٤-١: مضادات الاكسدة	٤٠
٢-٤-١-١: فيتامين E	٤٠
٢-٤-١-٢: فيتامين C	٤٠
٢-٤-١-٣: الكلوتاثيون	٤٠
٢-٤-٢: بيروكسيد الهيدروجين	٤٠
٢-٤-٣: محلول حامض الخليك ثلاثي الكلور	٤١
٢-٤-٤: محلول حامض الثايوبار بيتيوريك	٤١
٢-٤-٥: المحلول الملحي الفسيولوجي	٤١
٢-٤-٦: المصل البشري المثبط	٤٢
٢-٤-٧: المستنبت المستعمل في تنشيط النطف خارج الجسم الحي	٤٢
٢-٥: التقنيات المستعملة في تنشيط النطف خارج الجسم الحي	٤٤
٢-٥-١: تقنية الغسل والنبذ	٤٤
٢-٥-٢: التقنية الطبقية البسيطة	٤٤
٢-٦: تصميم التجارب	٤٥
٢-٧: التحليل الاحصائي	٤٧
الفصل الثالث: النتائج	٤٨
٣-١: تأثير بيروكسيد الهيدروجين في تركيز المالونداي الديهايد ومعالم النطف خارج الجسم الحي	٤٨

الاستنتاجات	٩٢
التوصيات	٩٢
المصادر	٩٤
الخلاصة باللغة الانكليزية	A

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
٢-١	مكونات مستنبت ايرل المحور المستخدم في تنشيط النطف البشرية خارج الجسم الحي	٤٣
٢-٣	معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد MDA بعد اضافة بيروكسيد	٥٦

	الهيدروجين H_2O_2 بمفرده ومع مضادات الاكسدة لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.	
٣-٣	معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام تقنية الغسل والنبذ للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتركيز المتباينة من فيتامين E.	٦٧
٤-٣	معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام تقنية الغسل والنبذ للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتركيز المتباينة من فيتامينC.	٦٨
٥-٣	معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام تقنية الغسل والنبذ للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتركيز المتباينة من الكلوتاثيون GSH.	٦٩
٦-٣	معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام التقنية الطبقية البسيطة للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتركيز المتباينة من فيتامين E.	٧٠
٧-٣	معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام التقنية الطبقية البسيطة للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتركيز المتباينة من فيتامين C.	٧١
٨-٣	معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام التقنية الطبقية البسيطة للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتركيز المتباينة من الكلوتاثيون.	٧٢

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
١-١	تأثير الاجهاد التأكسدي في وظيفة النطف واحداث حالة العقم	٢٠
٢-٣	النسبة المئوية للنطف المتحركة بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 لعينات السائل المنوي لاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.	٥٠
٣-٣	درجة نشاط النطف بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.	٥١
٤-٣	تركيز المالونداي الديهايد MDA بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.	٥٢
٥-٣	تركيز المالونداي الديهايد MDA بعد اضافة فيتامين E لعينات السائل المنوي المحفزة بواسطة بيروكسيد الهيدروجين للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.	٥٣
٦-٣	تركيز المالونداي الديهايد MDA بعد اضافة فيتامين C لعينات السائل المنوي المحفزة بواسطة بيروكسيد الهيدروجين للاشخاص الخصيبين	٥٤

	بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ْم.	
٣-٧	تركيز المالوندای الديهايد MDA بعد اضافة الكلوتاثيون GSH لعينات السائل المنوي المحفزة بواسطة بيروكسيد الهيدروجين للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ْم.	٥٥
٣-٨	تركيز الكولسترول الكلي بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بمفرده ومع مضادات الاكسدة لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ْم.	٥٥

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
٣-٩	تركيز البروتين الكلي بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بمفرده ومع مضادات الاكسدة لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ْم.	٥٨
٣-١٠	تركيز المالوندای الديهايد MDA في البلازما المنوية لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين والعقيمين.	٦٠
٣-١١	العلاقة بين تركيز النطف وتركيز المالوندای الديهايد MDA في السائل المنوي.	٦١
٣-١٢	العلاقة بين النسبة المئوية للنطف المتحركة وتركيز المالوندای الديهايد MDA في السائل المنوي.	٦١
٣-١٣	العلاقة بين درجة نشاط النطف وتركيز المالوندای الديهايد MDA في السائل المنوي.	٦٢
٣-١٤	العلاقة بين النسبة المئوية لعيوشية النطف وتركيز المالوندای الديهايد MDA في السائل المنوي.	٦٣
٣-١٥	العلاقة بين تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية وتركيز المالوندای الديهايد MDA في السائل المنوي.	٦٣
٣-١٦	العلاقة بين النسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز المالوندای الديهايد MDA في السائل المنوي.	٦٣
٣-١٧	تركيز المالوندای الديهايد MDA قبل التنشيط وبعد التنشيط باستعمال تقنيتي الغسل والنبذ والطبقية البسيطة	٧٣

الفصل الاول CHAPTER ONE

١-١ المقدمة Introduction

ترجع اسباب العقم في الذكور الى عدة اسباب منها حدوث خلل في تكوين النطف او خلل في نضج النطف او انسداد الاقنية الناقلة للمني (Cohen *et al.*, ١٩٨٥). ان عدم انتظام مستوى الهرمونات المسؤولة عن عملية نشأة النطفة يؤدي دوراً اساسياً في حدوث حالات العقم كارتفاع مستوى الهرمون المحفز للجريب Follicle stimulating hormone (FSH) وانخفاض مستوى هرمون الشحمون الخصوي Testosterone، بينما يرافق ارتفاع مستوى هرمون الحليب Prolactin انخفاضاً في عدد النطف وضعفاً في حركتها (Sueldo *et al.*, ١٩٨٥). كما ان الاضطرابات الحاصلة في الخصية نفسها قد تكون سبباً للعقم لدى الذكور كما في القيلة الدوالية Varicocele والاخماج Infection والادوية Drugs والسموم Toxins وشذوذ الصبغيات Chromosomes (كايتون، ١٩٩٧). بالاضافة الى ذلك فان الاضداد Antibodies الموجودة في المسلك التناسلي تكون سبباً للعقم لدى الرجال اذ تؤثر تلك الاضداد في وظائف النطف كالحركة والعيوشية والقابلية على الاخصاب Fertilization (برنوطي، ١٩٩٣).

تنتج النطف كميات قليلة من الانواع الاوكسجينية الفعالة Reactive Oxygen Species (ROS) في ظروف فسيولوجية معينة والتي تعد ضرورية لاتمام عمليات التمكين Capacitation وتفاعل الجسيم الطرفي Acrosome reaction والاخصاب (Griveau and Le Lannou, ١٩٩٧) . بينما تعد الكميات الكبيرة من الانواع الاوكسجينية الفعالة التي تنتج من النطف غير الناضجة وكريات الدم البيض ذات ضرر للنطف السوية نتيجة زيادة فعالية اكسدة الدهون (Agarwal *et al.*, ٢٠٠٣). يحوي السائل المنوي على جزيئات ذات اوزان جزيئية عالية واوزان جزيئية واطئة تعرف بمضادات الاكسدة Antioxidants او نظام الكاسحات Scavengers system تقوم بتوفير طرق حماية للسائل المنوي (Pasqualotto *et al.*, ٢٠٠٠).

هناك توازن بين انتاج الانواع الاوكسجينية الفعالة وبين ميكانيكية الدفاع المتمثلة بمضادات الاكسدة في القناة التكاثرية الذكرية وبالرغم من ذلك ربما يزداد انتاج الانواع الاوكسجينية الفعالة (Sikka, ٢٠٠٤) أو يحصل نقصان في مضادات الاكسدة مما يؤدي الى حصول حالة تدعى بالاجهاد التأكسدي Oxidative stress (OS) (Momen *et al*., ١٩٩٩). يعد الاجهاد التأكسدي ذا اهمية كبيرة لفهم اسباب العقم الذكري (Agarwal and Said, ٢٠٠٣). إذ ترتبط الزيادة في الاجهاد التأكسدي بعلاقة عكسية مع معالم النطف السوية التي تتمثل بالحركة والعيوشية والشكل السوي كما تؤدي الى فشل عمليتي التمكين وتفاعل الجسيم الطرفي (Pasqualotto *et al*., ٢٠٠٠). تستخدم عمليات النبذ المركزي Centrifugation للسائل المنوي لفصل البلازما المنوية عن المكونات الخلوية (Alvarez *et al*., ١٩٩٣) إذ يعد فصل النطف عن البلازما المنوية جزءاً مهماً لزيادة الاخصاب ونجاح عمليات التلقيح داخل الرحم Intrauterine insemination (IUI) والإخصاب خارج الجسم الحي *in vitro* fertilization (IVF) (Mortimer, ١٩٩١). تتضمن التقنيات التقليدية لتحضير النطف البشرية عمليات نبذ مركزي مزدوجة ويعاد تغطية النطف بمستنبت زرعي قبل اختيار النطف ذات الحركة التقدمية (McLaughlin *et al*., ١٩٩٢).

يؤدي تكرار عمليات النبذ المركزي لعينات السائل المنوي إلى زيادة في مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة في الحبيبة النطفية وزيادة مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة ربما يؤدي إلى فشل وظائف النطف وقدرة النطف على الاخصاب (Aitken and Clarkson, ١٩٨٩).

لا تزال بعض اسباب العقم غامضة لذلك تهدف الدراسة الحالية الى اظهار مدى العلاقة بين الانواع الاوكسجينية الفعالة ومعالم النطف من خلال دراسة الاتي:-

١. خلق حالة من عدم التوازن بين الانواع الاوكسجينية الفعالة ومضادات الاكسدة في السائل المنوي للاشخاص الخصيبين من خلال اضافة بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide (H_2O_2) الى عينات السائل المنوي لغرض زيادة الاجهاد التأكسدي ودراسة تأثيره في معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد Malondialdehyde (MDA) ودور مضادات الاكسدة في التقليل من تأثير الاجهاد التأكسدي.

٢. دراسة العلاقة بين مظاهر العقم المختلفة وتركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية وبيان العلاقة بين تركيز المالونداي الديهايد ومعالم النطف ان كانت علاقة سالبة او موجبة.

٣. محاولة الاستفادة من مضادات الاكسدة في تنشيط النطف البشرية خارج الجسم الحي *in vitro* باستعمال تقنيتي الغسل والنبذ والطبقية البسيطة بالاضافة الى ايضاح دور عملية النبذ Centrifugation في التأثير في مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة.

٢-١ استعراض المراجع **Literature Review**

١-٢-١: الكيمياء الحياتية للسائل المنوي **Biochemistry of seminal fluid**

يتكون السائل المنوي في الانسان نتيجة لافرازات الغدد الجنسية المختلفة حيث تشكل افرازات كل من غدة البروستات Prostate gland والحويصلات المنوية Seminal vesicles حوالي ٧٣-٩٣% من حجم القذفة (Abuo-Shakra *et al.*, ١٩٨٩). وتشكل البلازما المنوية Seminal plasma اكثر من ٩٥% من حجم المني المقذوف ويكون البلازما عبارة عن محلول متعادل التوتر Isotonic حيث يقوم بوظيفتين رئيستين وهما عمله كوسط منشط لخلايا النطف غير المتحركة وتجهيز الخلايا بالمواد الغنية بالشوارد (كلوريد الصوديوم والبوتاسيوم)

والنتـــــروجين والفركتـــــوز وكميـــــات قليلـــــة مـــــن الفيتامينـــــات والإنزيمـــــات (Garner and Hafez, ١٩٨٠) إذ تتميز النطف الناضجة بأنها تحتوي على تراكيز عالية من الدهون غير المشبعة في الغشاء البلازمي والتي تكون حساسة للجذور الحرة. وتعتمد آلية الدفاع التي تقلل من تأثير الجذور الحرة بالفيتامينات والإنزيمات الموجودة في النطفـــــــة أو فـــــــي الســـــــائل المنـــــــوي وتشـــــــمل فيتـــــــامين E وفيتامين C وانزيم الكاتليز Catalase والسوبر اوكساید دسميوتيز Superoxide dismutase (SOD) والكلوتاثيون بيروكسيديز Glutathione peroxidase (GPX) بالاضـــــــــــــــافة الـــــــــــــــى الكلوتـــــــــــــــاثيون (Daunter *et al.,* ١٩٨١). ان لمضادات الاكسدة الانزيمية وغير الانزيمية اثراً مهماً في السيطرة على حركة النطف، فقد لوحظ انخفاض معنوي في تركيز كل من فيتامين E والكلوتاثيون في عينات السائل المنوي للاشخاص المصابين بقلة النطف واللانطفية مقارنة بالاشخاص الخصيبين (Bhardwaj *et al.*, ٢٠٠٠). وفي دراسة اخرى وجد بان الحركة التقدميـــــــــة للنطـــــــــف تـــــــــرتبط ارتباطـــــــــاً موجبـــــــــاً بفعالية انزيم SOD في السائل المنوي الذي يعمل على كبح فعل جذور Superoxide anione (O_2^-) وتهاجم هذه الجذور الغشاء الخلوي للنطف وتعمل على حث عملية أكسدة الدهون الموجودة في الغشاء الخلوي للنطف ومن ثم تغير في تركيب هذه الدهون واخيراً تعمل على زيادة اماعية الغشاء الخلوي للنطف (Kurpisz *et al.*, ١٩٩٦). لقد أشارت أحدى الدراسات إلى أن تركيز حامض الاسكوربك Ascorbic acid في السائل المنوي يتراوح ما بين ٢-٣ ملغم/مل ويتحول هذا الحامض إلى حامض الاوكزالك Oxalic acid في أثناء الخزن من خلال عملية غير مسيطر عليها من الإنزيمات حيث لوحظ وجود علاقة طردية بين تركيز الاوكزالات Oxalate والشكل غير السوي لرأس النطف بينما لم تلاحظ أي علاقة بين تركيز الاوكزالات وكل من عدد النطف وحركتها وتركيز كريات الدم البيض كما لوحظ وجود علاقة عكسية بين حجم القذفة وتركيز الاوكزالات (Eiss *et al.*, ٢٠٠٠).

يبدو السائل المنوي متجانساً ذا لون رصاصي براقاً يعكس اللون الأصفر وجود خمج السائل المنوي (Acosta *et al.*, ١٩٨٦). ويعد خمج السائل المنوي احد الأسباب التي تساهم في إحداث العقم ويتم التأكد من وجود الخمج من خلال الكشف عن كريات الدم البيض في السائل المنوي والتي تنتج الأنواع الاوكسجينية الفعالة (Aitken and West, ١٩٩٠; WHO, ١٩٩٣).

يمتاز المني برائحة قوية حادة ويعتقد ان هذه الرائحة ناتجة من اكسدة السبيرمين Spermine المنتج من غدة البروستات (Philipp and Carruthers, ١٩٨٥). يحوي السائل المنوي على العديد من الانزيمات ومنها الفايبرينولايسين fibrinolysin والفايبرينوجينيز fibrinogenase حيث يكون الاول مسؤولاً عن ميوعة السائل المنوي بينما يعمل الاخير على تجلطه.

يحوي السائل المنوي على العديد من الايونات اللاعضوية تشمل الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والمغنيسيوم. ان تركيز الصوديوم في البلازما المنوية أعلى من تركيزه في النطف ويعد الكلوريد الايون اللاعضوي الرئيس في البلازما المنوية ويؤثر ايون البوتاسيوم في حيوية النطف (Garner and Hafez, ١٩٨٠).

إن افرازات غدة البروستات تكون عديمة اللون وحامضية وغنية بالإنزيمات الحالة وخصوصاً الفايبرينولايسين كما تحوي على الكالسيوم والمغنسيوم وقد لوحظ انخفاض في تركيز الكالسيوم والمغنسيوم عند الأشخاص الذين يعانون من قلة النطف وانعدام النطف. وهناك علاقة عكسية بين تركيز هذه الايونات ومعالم النطف الأخرى وبما أن الكالسيوم والمغنسيوم يفرزان بصورة اساسية من البروستات لذلك يمكن تحديد أي تغير في افراز غدة البروستات في السائل المنوي من خلال قياس تركيز هذه الايونات (Homonnai *et al.*, ١٩٧٨). تقوم غدة البروستات بإفراز متعدد الامين ومنها السبيرمين والسبيرمدين حيث اظهرت بعض الدراسات ارتفاعاً في نسبة السبيرمين في الأشخاص الذين يعانون من

قلة النطف، كما توجد علاقة عكسية بين تركيز السبيرمين وكل من النسبة المئوية للنطف المتحركة وحجم القذفة ولم تلاحظ أي علاقة بين تركيز متعدد الأمين والشكل السوي للنطف (Fair *et al.*, ١٩٧٢).

يكون السائل المنوي المفرز من الحويصلات المنوية قاعدياً وذا لون اصفر بسبب وجود الفلافين Flavin ويكون غنياً بالفركتوز الذي يتراوح تركيزه ما بين ٥.٠-٥ ملغم/مل. يعد الفركتوز مصدراً رئيساً للطاقة ويكون استهلاك الفركتوز مفقوداً في حالة اللانطفية أو في حالة انعدام الحركة (Philipp and Carruthers, ١٩٨٥). كما لوحظ ارتفاع في مستوى الفركتوز في حالة قلة النطف مقارنة مع المجاميع السوية. أما في حالة قلة النطف الناتج من انسداد الاقنية الناقلة للمني فان تركيز الفركتوز يساوي تقريباً تركيز الفركتوز عند الأشخاص الخصيبين (Phadke *et al.*, ١٩٧٣). لقد أشارت دراسات اخرى الى وجود علاقة عكسية بين تركيز الفركتوز وحركة النطف (Biswas *et al.*, ١٩٧٨). وينخفض تركيز الفركتوز ويزداد إفراز حامض الفسفوريك بزيادة تركيز كريات الدم البيض في السائل المنوي (Gonzales *et al.*, ١٩٩٢). كما تقوم الحويصلات المنوية بإنتاج وإفراز مواد اخرى غير الفركتوز كالموثين الذي يعمل بشكل مباشر لتحفيز حركة النطف (Gottieb *et al.*, ١٩٨٨).

بالاضافة الى ذلك تفرز الحويصلات المنوية الزنك بهيئة سترات الزنك والذي يؤثر في حركة النطف وفاعلية البلازما المنوية المضادة للبكتريا (Marmar *et al.*, ١٩٧٥). واظهرت نتائج دراسة أخرى إلى وجود علاقة معنوية بين مستوى الزنك والحالات الالتهابية ، إذ لوحظ إن مني الأشخاص الحاوي على ١٠-٢٠ مليون كرية بيضاء قد قابله انخفاض في مستوى الزنك الى ١١.٨ ملغم/١٠٠مل مقارنة بالافراد الطبيعيين.

تتراوح قيم الاس الهيدروجيني للسائل المنوي ما بين ٧.٦-٨.٠ وتكون تقريباً متساوية فهي لا تتأثر بطول فترة الامتناع او قصرها وذلك لانها تتحدد بافرازات الحويصلات المنوية وغدة البروستات (Blackwell and Zaneveld, ١٩٩٢). اما في الاشخاص المصابين بخمج المني فان الاس الهيدروجيني يصبح ٦.٧٩ (Caldamone *et al.*, ١٩٨٠). كما تتحول قيم الاس الهيدروجيني إلى الحامضية بارتفاع مستوى الكالسيوم والزنك والمغنسيوم والاوكزالات (Homonnai *et al.*, ١٩٧٨;Eiss *et al.*, ٢٠٠٠) . يعمل السائل المنوي على تغيير حموضة المهبل وذلك بجعله متعادلاً وان أي تغير في قيمة الاس الهيدروجيني للسائل المنوي يؤثر سلباً في النطف. ففي إحدى الدراسات تم تغير الاس الهيدروجيني للسائل المنوي إلى الحامضية بإضافة حامض الهايدروكلوريك، مما تسبب بفقدان النطف القابلية على الحركة بعد دقيقة واحدة وبعد عشر دقائق قتلت جميعها وكانت نسبة النطف المقتولة تتناسب طردياً مع تركيز ايون الهيدروجين. كما لوحظ انخفاض في كل من حجم القذفة وقيمة الاس الهيدروجيني وتركيز الفركتوز في عينات السائل المنوي للأشخاص الذين يعانون من انعدام النطف الناتج من انعدام وجود الاقنية الناقلة للمني (Eckardstein *et al.*, ٢٠٠٠).

تقدر نسبة البروتينات الموجودة في السائل المنوي ما بين ٣-٧% من كمية البلازما المنوية وتتكسر هذه البروتينات الى حوامض امينية بفعل الانزيمات الحالة التي تبدأ بفعل الفايبرينولايسين ومن ثم الفايبرينوجينيز (Philipp and Carruthers, ١٩٨٥). تفرز خلايا سرتولي عدداً من البروتينات ومنها الترانسفرين Transferrin والسيرولوبلازمين Ceruloplasmin حيث تم قياس نسبة هذه البروتينات في مني الرجال العقيمين والذين يعانون من انعدام النطف الناتج من خلل في عمل خلايا سرتولي ووجد بان نسبة الترانسفرين أعلى من السيرولوبلازمين عند الأشخاص الذين يعانون من قلة النطف ولم تلاحظ أي علاقة بين مستوى هذه البروتينات وحركة النطف (Orlando *et al.*, ١٩٨٥).

يعد السلينيوم مقياساً مهماً لتقدير الخصوبة عند الرجال الذين يعانون من قلة النطف ووهن النطف، حيث أشارت إحدى الدراسات إلى وجود علاقة معنوية موجبة بين عدد النطف وحركتها وتركيز السلينيوم حيث تكون حركة النطف ضعيفة عندما يكون تركيز السلينيوم ٣٥ ملغم/مل بينما تزداد حركة النطف عند التركيز ٦٠-٩٠ ملغم/مل . كما يرافق انخفاض مستوى السلينيوم انخفاض معدل الحمل (Bleau *et al.*, ١٩٨٤).

اظهرت نتائج إحدى الدراسات أن المستوى العالي من هرمون الحليب في السائل المنوي يرافقه انخفاضاً في عدد النطف وضعف في حركتها كما يؤثر المستوى العالي في القابلية الاخصابية للنطف خارج الجسم الحي (Sueldo *et al.*, ١٩٨٥). كما توجد علاقة طردية بين تركيز هرموني LH وFSH وعدد النطف (Biswas *et al.*, ١٩٧٨). ويستخدم قياس مستوى انزيم Alph-glucosidase وهرمون FSH لتشخيص حالة اللانطفية الناتجة من انسداد في الاقنية الناقلة للمني (Guerin *et al.*, ١٩٨٦). وفي دراسة اخرى لوحظ وجود علاقة طردية بين تركيز انزيم Alph-glucosidase والحركة التقدمية للنطف كما وجد انخفاض معنوي في تركيز هذا الإنزيم في السائل المنوي للأشخاص المصابين بقلة النطف مقارنة بالأشخاص الخصيبين (Vilijoen *et al.*, ١٩٩٠).

١-٢-٢ الأنواع الاوكسجينية الفعالة **Reactive Oxygen Species**

تعرف الأنواع الاوكسجينية الفعالة على أنها عوامل مؤكسدة ذات فعالية عالية تعود إلى مجموعة الجذور الحرة Free radicals. أما الجذور الحرة فهي مجموعة من المركبات الكيمياوية موجودة بشكل مستقل ويحتوي على الكترون واحد أو اكثر بشكل منفرد Unpaired electron في غلافه الخارجي. من الانواع الاوكسجينية الفعالة الشائعة المشتقة من الاوكسجين والتي لها دور في التكاثر هي بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide (H_2O_2) وسوبر اوكسيد السائل Superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)

وجــــــــــــــــــــــــــــــــــذور البيروكســــــــــــــــــــــــــــيل Peroxyl (ROO⁻) radicals وجـذور الهيدروكسـيل Hydroxyl (·OH) radicals بالاضـافة الـى الجـذور الحـرة المشتقة من النـايتروجين وهـي بيروكسيد النتريت Peroxy nitrite (ONOO·) واوكسيد النتريك(NO) Nitric oxide (Hertz and Cloarec, ١٩٨٩; Koppenol *et al.*, ١٩٩٢).

تشتق الجذور الحرة وغيرها من الانواع الاوكسجينية الفعالة اما من مصـادر داخليـة كالعمليات الايضية الاساسية الطبيعية الموجودة فـي جسم الكائنـات الحيـة الهوائيـة او نتيجـة التعـرض للاشـعة السـينية والاوزون ودخــان السـكائر او ملوثــات الهــواء والكيمياويــات الصناعية. تتولد الجذور الحرة بشكل مستمر فـي الخلايـا كنتيجـة لتفـاعلات انزيميـة او غيـر انزيمية.

وتعد التفاعلات الانزيميـة مصـدراً للجـذور الحـرة وتشـمل الانزيمـات التـي تشـترك فـي السلسلة التنفسية وفي عملية البلعمـة وفـي صـنع الموثينـات وفـي نظـام السـايتوكروم P٤٥٠. كذلك تتولد الجذور الحرة من التفاعلات غير الانزيمية للاوكسجين مـع المركبـات العضـوية بالإضــافة إلــى ذلــك يمكــن أن تتولــد نتيجــة التعــرض للأشــعة المؤينــة أو نتيجــة العــدوى أو الجروح كجزء من آليات الدفاع (Bagchi and Puri, ١٩٩٨).

تمتاز الأنواع الاوكسجينية الفعالـة بقابليتهـا علـى أكسـدة الـدهون والأحمـاض الامينيـة والكاربوهيدرات بالإضافة إلى إحداث الطفرات فـي الحـامض النـووي منقـوص الأوكسـجين (DNA) . لذا فهـي تعـد عـاملاً مسـبباً لكثيـر مـن الامـراض ولاسيما الأمـراض الالتهابيـة، إذ وجد ازدياد كبير في أعداد الخلايـا العدلـة Neutrophils فـي السـائل المفصـلي للأشـخاص المصـابين بمرض التهاب المفاصل الرثوي Rheumatoid Arthritis وتمتـاز هـذه الخلايـا بقدرتها على انتاج كميات كبيـرة مـن جـذور الاوكسـجين الحـر ولاسيما جـذر الهايدروكسـيل (·OH) الذي يؤدي إلى تجزئـة مركبـات السـائل المفصـلي وفقـدان اللزوجـة المهمـة فـي عمـل المفصـل (Grootoled *et al.*, ١٩٩١). كمـا لوحظ أن وجـود جـذر السـوبر اوكسيد السـالب

($O_2^{\cdot-}$) بتراكيز عالية يكون ساماً جداً للخلية بالإضافة إلى العديد من التأثيرات الضارة فانه يهاجم سلاسل الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) بقوة ويؤكسدها بعملية تسمى بيروكسيدية الدهون Lipid peroxidation (Halliwell, ١٩٩٤). وقد اثبت أن عملية أكسدة الدهون من المسببات الرئيسة للعديد من الحالات المرضية في الإنسان وتطورها إلى مضاعفات حادة، نظراً لما تسببه من ضرر وتدمير لتركيب الأغشية الخلوية، الذي يؤدي إلى فقدان الوظائف الإفرازية والناقلة المرتبطة بالأغشية وهذا يؤدي الى الإصابة بالعديد من الأمراض وأهمها أمراض القلب والأوعية الدموية (Rimm *et al.*, ١٩٩٣).

يعد جذر اوكسيد النتريك ($NO^{\cdot}$) من الجذور النتروجينية الحرة المهمة لتأثيراتها في عدد من العمليات الفسيولوجية وينتج هذا الجذر طبيعياً من الخلايا العضلية الملساء في جدران الأوعية الدموية ويعمل كونه عاملاً مرخياً لعضلات الأوعية الدموية وتقليل ضغط الدم (Vallance *et al.*, ١٩٨٩; Cooke and Tsau, ١٩٩٣) . ويكون إنتاج هذه الجذور بكميات كبيرة ساماً للخلية ويؤدي إلى تلف الأنسجة (Moncada and Higgs, ١٩٩٣) . ولا يقتصر ضرره على هذا الحد فقط. بل وجود جذر السوبر اوكسيد السالب ($O_2^{\cdot-}$) بتراكيز عالية معه يؤدي الى إحداث مرض فرط ضغط الدم Severe Hypertension (Munzel *et al.*, ١٩٩٥). كذلك فقد وجد أن الضرر التأكسدي الذي يصيب البناء الوراثي للخلية قد يساهم في إحداث بعض أشكال السرطان (Wiseman and Halliwell, ١٩٩٦).

تعد طريقة تقدير النواتج النهائية لتأكسد الدهون Estimation of end products of lipid peroxidation من اشهر الطرائق المستخدمة لقياس مستوى الجذور الحرة نظراً لكون الجذور الحرة تملك عمراً نصف قصير لذلك عمد الباحثون لقياس ضرر الجذور الحرة في العينات من خلال نواتج نهائية مستقرة نسبياً. وأن تفاعل الجذور الحرة مع الجزئيات الحيوية كالبروتينات والدهون

والأحماض الامينية ينتج عنه نواتج مستقرة يمكن عدها مؤشراً لفعل الجذور الحرة. استعملت النواتج النهائية لتأكسد الدهون كالمالوندای الديهايد MDA كافضل واسهل طريقة لقياسها (Cederberg, ٢٠٠١).

يتكون المالوندای الديهايد من خلال تحلل بيروكسيد الدهون ويمكن ان تتفاعل جزئية واحدة منه مع جزيئتين من حامض الثايوباربيتيوريك (TBA) ليكون ناتجاً يمتص الضوء عند الطول الموجي ٥٣٢ نانومتر وتعد هده الطريقة من اسهل الطرائق لقياس تأكسد الدهون وتسمى هده التقنية بـ Thiobarbituric acid reactive substances (Halliwell and Gutteridge, ١٩٩٠). ومن ابرز الطرائق الاخرى المستخدمة لتقدير فعالية الجذور الحرة طريقة قياس طيف امتصاص رنين الشوكة الالكترونية Electron spin resinous spectroscopy وتقيس هده الطريقة مجمل تغيرات الطاقة الوجودة بالالكترونات غير المزدوجة استجابة لمجال مغناطيسي خارجي (Pou and Rosen, ١٩٩٠). وهناك ايضاً ذلك طريقة اكسدة حامض اليوريك Uric acid oxidation . إذ يعد اكسدة حامض اليوريك الى الالنتوين الناتج من تفاعل مؤيضات الاوكسجين الفعال $O_2^{\cdot-}$ وH_2O_2 مع حامض اليوريك كمضاد للاكسدة مؤشراً غير مباشر للضرر التأكسدي (AL-Nimer *et al.*, ٢٠٠١).

١-٢-٣ مضادات الاكسدة الحيوية **Antioxidants**

يحتوي السائل المنوي على مصادر لانتاج الجذور الحرة تشمل كريات الدم البيض والنطف غير الناضجة والنطف غير السوية. تتصف الجذور الحرة بكونها عوامل مؤكسدة ذات فعالية عالية تستطيع التفاعل بشدة وبسرعة مع مختلف الجزيئات والمركبات في الخلية كالبروتينات والدهون والكاربوهيدرات والاحماض النووية وبالمقابل يحتوي السائل المنوي على مركبات كيمياوية ذات قوة اختزالية عالية قادرة على اختزال الجذور الحرة وتأخير أو

منع وصول ضررها إلى الجزئيات والمكونات الخلوية القابلة للأكسدة تدعى مضادات الأكسدة الحيوية (Halliwell, ١٩٩٧; Sanocka and Kurpisz, ٢٠٠٤).

تصنف مضادات الأكسدة الحيوية إلى صنفين:

أ-مضادات الاكسدة الانزيمية Enzymatic Antioxidants وتشمل

١. انزيم السوبر اوكسايد ديسميوتيز (SOD). يعمل هذا الإنزيم على حماية النطف من سمية الاوكسجين وعملية اكسدة الدهون اذ يقوم هذا الإنزيم بازالة جذور السوبر اوكسيد السالب ($O_2^{\cdot -}$). كما موضح بالمعادلة الاتية:-

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

وقد اكتشف نوعان من هذا الإنزيم في خلايا اللبائن ، الأول يوجد في المايتوكوندريا ويحتوي على المنغنيز في الموقع الفعال للأنزيم ويرمز له Mn-SOD والآخر يوجد في هيولي الخلية (Cytosol) وبكمية قليلة في الجسيمات الحالة Lysosome ويحتوي على النحاس والزنك في الموقع الفعال ويرمز له Cu-Zn-SOD (Alvarez *et al*., ١٩٨٧; Robbertchi *et al*., ١٩٩٤).

٢. انزيم الكاتليز: يعمل هذا الانزيم مع انزيم الـ SOD على ازالة جذور السوبر اوكسيد السالب ($O_2^{\cdot -}$) المتولد بوساطة نظام NADPH-Oxidase في خلايا الدم البيض وبالتالي التقليل من عملية اكسدة الدهون وحماية النطف خاصة في حالة التهابات القناة البولية التناسلية. اما ميكانيكية عمل هذا الانزيم فهو حث اختزال بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) الى الاوكسجين (O_2) والماء كما في المعادلة الاتية:-

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_2O + O_2$$

(Chance *et al*., ١٩٧٩; Aitken *et al*., ١٩٩٥)

٣- انزيم الكلوتاثيون بيروكسيديز المعتمد على السيلينيوم Selenium dependent GSH peroxidase (Se-GSH-PX)

يعمل هذا الانزيم مضاداً للاكسدة حيث يحتوي على السلينيوم إذ يعمل الكلوتاثيون كواهب للاكترون حيث يزيل جذور البيروكسيل Peroxyl (ROO^-) radicals من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، بعد ذلك يعمل إنزيم الكلوتاثيون ردكتيز Glutathione reductase على إعادة تكوين الكلوتاثيون المختزل reduced Glutathione من الكلوتاثيون المؤكسد Oxidated Glutathione (GSSG) كما موضح في المعادلة الاتية:-

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{Peroxidase-\langle Se \rangle} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{reductase} GSH + NADP^+$$

وبذلك فان هذا الانزيم يعمل بالاشتراك مع انزيم الكلوتاثيون ردكتيز على حماية النطف من تأثير فعالية اكسدة الدهون وبالتالي المحافظة على حركة النطف (Calvin *et al.*, ١٩٨١; Lenzi *et al.*, ١٩٩٤; Sikka, ١٩٩٦).

ب- مضادات الاكسدة غير الانزيمية

Non-Enzymatic Antioxidants

١- فيتامين E

وهو فيتامين ذائب بالدهون موجود في كل الاغشية البيولوجية ويخزن بشكل رئيس في الانسجة الدهنية وفي الكبد والعضلات ويعد فيتامين E من مضادات الاكسدة الاساسية في الجسم. ويحمي الأحماض الدهنية المتعددة عديمة التشبع في أغشية الخلايا من الأكسدة (Bagachi and Puri, ١٩٩٨).

يعد فيتامين E احد مضادات الاكسدة في السائل المنوي ويبلغ تركيزه في البلازما المنوية حوالي ٠.٣٢-٠.٥٢ مايكرومول/لتر (Buettner, ١٩٩٣). يمتلك هدا الفيتامين دوراً كبيراً في الحفاظ على حركة النطف بحالة سوية وذلك يعود إلى إن فيتامين E يعمل على تثبيت سلاسل الاغشية البلازمية لخلايا النطف اذ يعمل بشكل مباشر على معادلة جذور السوبر اوكسيد السالب ($O_2^{\cdot-}$) وبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) والهايدروكسيل ($OH^{\cdot}$) (Bolle *et al.*, ٢٠٠٢; Agarwal, ٢٠٠٤). وبذلك فهو يعمل على تثبيط فعالية اكسدة الدهون ويحافظ على حركة النطف بحالة سوية (Aitken and Clarkson, ١٩٨٨).

٢- فيتامين C

يعد هذا الفيتامين من مضادات الاكسدة الذائبة في الماء ويوجد داخل وخارج الأنظمة البيولوجية الخلوية وهو من أهم مضادات الأكسدة الموجودة في بلازما الدم وذلك لسرعة تفاعله مع اغلب أنواع الأوكسجين الفعال (ROS) لاسيما جذر البايروكسيل (Jialal and Devaraj, ١٩٩٦).

يعد فيتامين C من مضادات الأكسدة الرئيسة في السائل المنوي ويساهم بأكثر من ٦٥% من السعة الكلية لمضادات الأكسدة ويكون تركيزه في السائل المنوي ٣٦٤ مايكرومول/لتر والذي يعادل عشرة اضعاف تركيزه في بلازما الدم ٤٠ مايكرومول/لتر (Lewis *et al.*, ١٩٩٧). كما يعمل فيتامين C بالاشتراك مع فيتامين E على حماية التراكيب الدهنية من عمليات الاكسدة حيث يقوم فيتامين C بإعادة تكوين فيتامين E من خلال إعادة تشكيل جذور التكوفيروكسايل وبذلك يسمح لفيتامين E بان يعمل مرة اخرى كمضاد للاكسدة قاطع للسلاسل

chain-breaking-antioxidants (Buettner, ١٩٩٣). وهذا يفسر وجود فيتامين E بكميات قليلة في السائل المنوي (Lewis *et al.*, ١٩٩٧).

٣- الكلوتاثيون Glutathione

يوجد الكلوتاثيون في مختلف الكائنات الحية كالانسان والحيوان والنبات والاحياء المجهرية ويعد من اوفر مركبات الثايول غير البروتينية الخلوية (Miester and Anderson, ١٩٨٣; Ewadh, ١٩٩٠).

يقدر تركيز الكلوتاثيون في مختلف خلايا اللبائن من ٠.٥-١٠ ملي مول ويوجد بكميات قليلة في السوائل خارج الخلية مثل اللمف والبلازما (Miester and Anderson, ١٩٨٣; Irvine, ١٩٩٦). يقدر عمر النصف للكلوتاثيون داخل الخلية تقريباً ٣-٤ ايام ويوجد معظمه بشكل مختزل وينتقل جزء من الكلوتاثيون المصنع داخل الخلايا الى السوائل الجسمية عبر اغشية الخلايا وقد وجد ان مصدر الكلوتاثيون في الدم هو كريات الدم الحمر التي تحتوي على اكثر من ٩٩% منه (Richie *et al.*, ١٩٩٦). يشارك الكلوتاثيون في العديد من الظواهر الحيوية المهمة وتشمل تكوين البروتينات والنيوكليوتيدات ويساهم ايضاً في فعالية بعض الانزيمات من خلال وجوده كمادة اساسية Substrate او مرافق انزيمي Coenzyme لبعض العمليات الانزيمية في الخلية (Murray *et al.*, ١٩٩٣). ويشكل الكلوتاثيون اكبر مركبات الثايول الخلوية وفرة واحد الانظمة الدفاعية المضادة للاكسدة من خلال عمله كمساعد لعدد من الانزيمات المسؤولة عن ازالة سمية المركبات المؤكسدة كاصناف الاوكسجين الفعال (ROS) مثل انزيم كلوتاثيون بيروكسديز (GPX) (Jacopand Burri, ١٩٩٦). يعد انزيم GPX من الانزيمات الرئيسة التي تعمل على ازالة البيروكسيدات في خلايا اللبائن مثل بيروكسيد الهايدروجين H_2O_2 وبيروكسيد الدهون ROOH وتحويلها الى احماض دهنية هيدروكسيلية اقل فاعلية وتتم هده العملية بوجود الكلوتاثيون GSH بوصفه عاملاً مختزلاً يهب ذرة

الهيدروجين (H^+) لاكمال عملية الاختزال (Zakowski *et al*., ١٩٧٨; Madipati and Marunet, ١٩٨٧).

يعمل الكلوتاثيون GSH على توفير الحماية للنطف من عمليات الاكسدة في البطانة الطلائية المولدة للنطف والبربخ والسائل المنوي بعد عملية القذف (Iruine, ١٩٩٦). اذ ذكر Perry وجماعته (١٩٩٢). ان الخلايا المتواجدة في البربخ تفرز انزيمات مضادة للاكسدة مثل انزيم الـ SOD وGPX التي تعمل على حماية النطف في بلازما البربخ من الضرر التأكسدي الناتج من وجود النطف لفترة طويلة في ذيل البربخ.

وتؤدي خلايا سرتولي Sertoli cells والخلايا المولدة Germ cells دوراً فعالاً في تكوين الكلوتاثيون في الخصية ويتواجد ايضاً الكلوتاثيون في سوائل القناة التكاثرية والبربخ والسائل المنوي بدرجة اقل (Agrawal and Vanha-Perttula, ١٩٨٨). اما Lenzi وجماعته (٢٠٠٠) فقد اشاروا الى وجود تراكيز عالية من الكلوتاثيون في السائل المنوي بينما ذكر Daunter وجماعته (١٩٨١) ان تراكيز الكلوتاثيون في مصل الدم والسوائل البايولوجية الأخرى واطئة مقارنة لما موجود في السائل المنوي.

بالإضافة إلى ما سبق ذكره عن مضادات الأكسدة غير الإنزيمية فهناك أيضا الـCarotenoids و N-acetyl-L-cysteine (NAC) وCoenzyme Q١٠ وCarnitines تعد من مضادات الاكسدة غير الانزيمية حيث يعدّ الـNAC كبادي للكلوتاثيون ويسهل تكوينه الحياتي وهو بذلك يقلل من انواع الاوكسجين الفعالة ويحسن حركة النطف (Baker *et al*., ١٩٩٦). ويقلل من الضرر الحاصل للحامض النووي منقوص الاوكسجين نتيجة زيادة الانواع الاوكسجين الفعالة في الخلايا (Lopes *et al*., ١٩٩٨. اما اشباه الكاروتين فتؤدي دوراً مهماً في حماية الخلايا والاعضاء بسبب قابليتها على كسح جذور السوبر اوكسايد السالب .

يعمل مرافق الانزيم Q١٠ على حماية الدهون من الضرر التأكسدي حيث يعمل على منع اكسدة ايونات السوبر اوكسايد ويحسن من حركة النطف (Lewin and Lavon, ١٩٩٧). اما الكارنتين فهو يعزز من ثبات غشاء الخلية وتؤدي دوراً مهماً في نضج النطف وتطورها ويسبب تحسناً في معالم النطف المتمثلة بالحركة والعيوشية وانخفاضاً في مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة وتركيز كريات الدم البيض (Vicari and Calogero, ٢٠٠١) ومن مضادات الاكسدة غير الانزيمية الاخرى حامض اليوريك وهو الناتج النهائي لايض البيورينات الدي يتحول في اغلب اللبائن وبفعل انزيم اليوركيز Uricase الى الالنتوين Schmidt- Allantoin (Varley *et al*., ١٩٨٠; Nielson, ١٩٩٧).

وقد توصلت أحدى الدراسات إلى اعتبار حامض اليوريك احد المؤشرات المهمة لتحديد الاجهاد التأكسدي من خلال ملاحظة التغير في مستويات حامض اليوريك-النتوين في السائل المنوي وقد بينت الدراسة أن نسبة النتوين إلى حامض اليوريك A/U لمرضى العقم هي أعلى تقريباً بثلاثة اضعاف من عينات السيطرة.

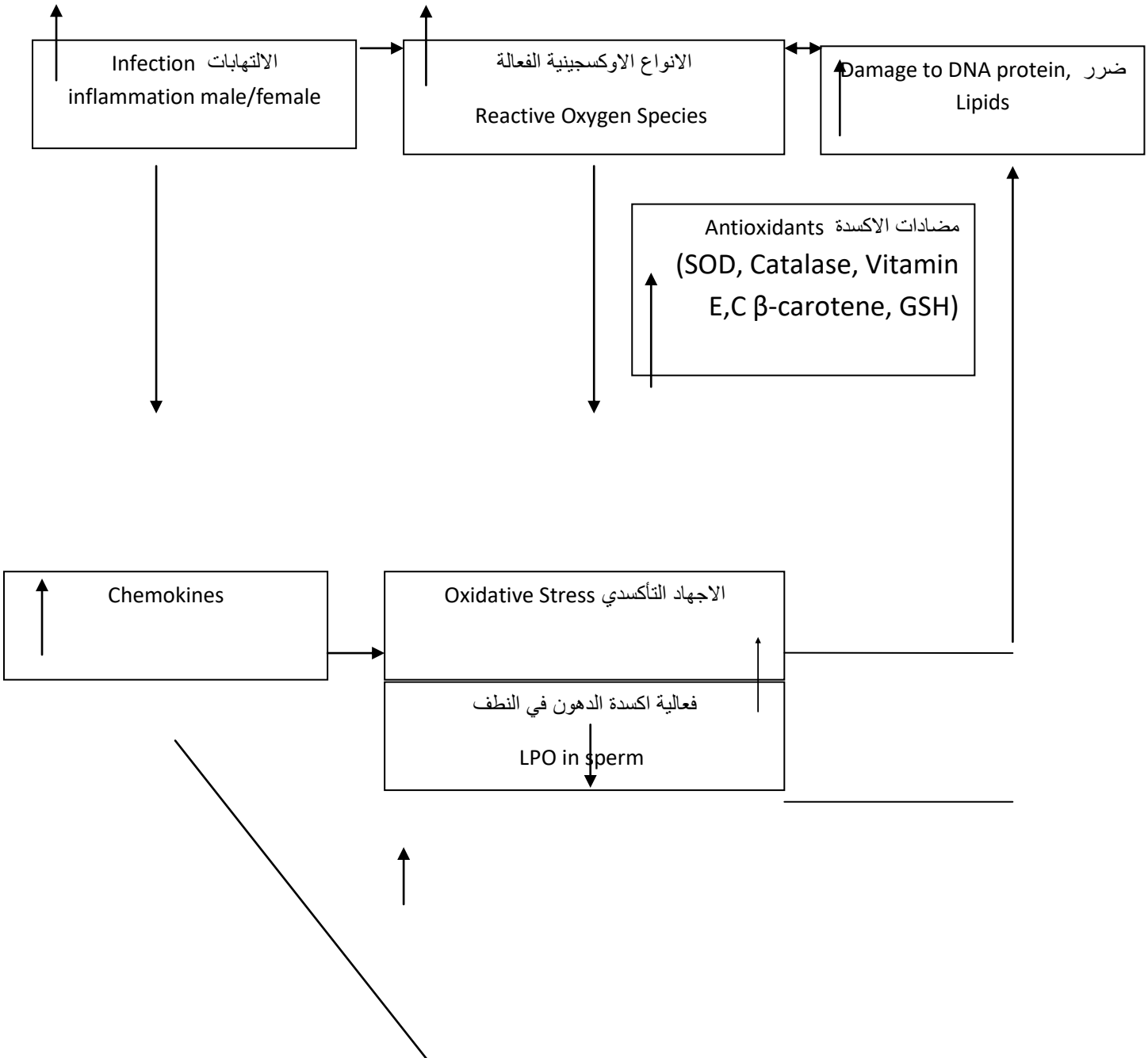
ان العديد من مضادات الاكسدة الحيوية هي تكون خارج خلوية متضمنة عدداً من البروتينات الماسكة للايونات المعدنية تتواجد في بلازما الدم والبلازما المنوية وتعمل هده البروتينات على نقل الايونات مثل الحديد والنحاس وبدلك فهي تمنع هده الايونات من تشكيل الجذور الحرة وتشمل هذه البروتينات الترانسفرين واللاكتوفيرين Lactoferrin والسيرلوبلازمين (Halliwell and Cutteridge, ١٩٩٠; Sanoka and Kurpisz, ٢٠٠٤).

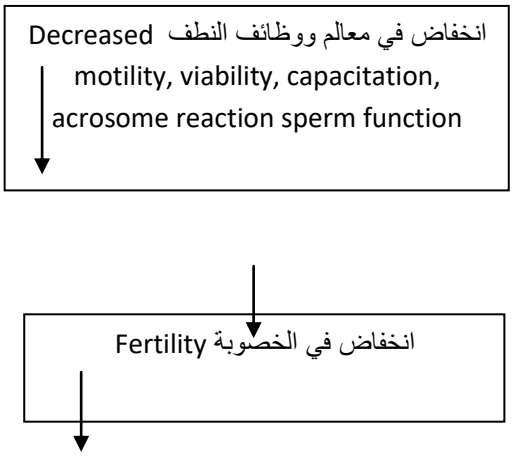
١-٢-٤ العلاقة بين الاجهاد التأكسدي ومرضى العقم

The relationship between oxidative stress and infertile patients

اصبح موضوع الاجهاد التأكسدي من المواضيع المهمة ذات العلاقة بعقم الرجال (Pasqualotto *et al*., ٢٠٠٠). ويعرف بانه حالة اضطراب تحصل بين الانواع الاوكسجينية الفعالة وبين نظام الكاسحات المتمثل بمضادات الأكسدة نتيجة الزيادة في إنتاج

الأنواع الاوكسجينية الفعالة أو الانخفاض في مضادات الأكسدة في القناة التكاثرية (Sikka, ١٩٩٦; Lenzi *et al.*, ٢٠٠٠). يوضح الشكل (١-١) العلاقة بين الاجهاد التأكسدي ووظيفة النطف إذ تكون خلايا النطف في اللبائن غنية بالأحماض الدهنية غير المشبعة ولذلك فهي حساسة لعملية أكسدة الدهون (Sikka, ١٩٩٦) . وتؤدي الزيادة في إنتاج الأنواع الاوكسجينية الفعالة الناتجة من كريات الدم البيض والنطف غير الناضجة إلى زيادة الاجهاد التأكسدي نتيجة زيادة بيروكسيدية الدهون مما تؤثر في معالم النطف وخصوصاً الحركة والشكل وبالتالي فشل وظائف النطف (Aitken *et al.*, ١٩٩٥; Aitken *et al.*, ١٩٩٨).





شكل (١-١): يمثل تأثير الاجهاد التأكسدي في وظيفة النطف واحداث حالة العقم (Sikka, ١٩٩٦)

المتمثلة بعمليتي التمكين وتفاعل الجسيم الطرفي (de Lamirande and Gagnon, ١٩٩٢).بالرغم من آن المستويات الواطئة للانواع الاوكسجينية الفعالة تحفز عمليتي التمكين وتفاعل الجسيم الطرفي (Aitken, ١٩٩٥) وخصوصاً بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 و السوبر اوكساید السالب التي تعمل على زيادة مستوى الادينوسين احادي الفوسفات الحلقي cAMP وتنشيط البروتين كاينيز A (Aitken *et al.*, ١٩٩٨). بالاضافة الى ذلك فان حضن خلايا النطف مع تراكيز واطئة من بيروكسيد الهيدروجين تحفز عمليتي التمكين وتفاعل الجسيم الطرفي وتزيد من قابلية النطف على اختراق البيوض (Saran and Bors, ١٩٨٩; Griveeau and Le Lannou, ١٩٩٧).

اما المستويات العالية من الانواع الاوكسجينية الفعالة فانها تزيد من اكسدة الدهون وتسبب ضرراً للغشاء البلازمي للنطف ينتج عنه انخفاض في حركة النطف (Alvarez and Storey, ١٩٨٢) وتثبيط انزيمات التحلل السكري وضرر لغشاء الجسيم الطرفي (Alvarez and Storey, ١٩٨٤). الذي يعود الى قابلية النطف على اختراق البيوض (Gli-Guzman *et al.*, ٢٠٠١) كما ان الانواع الاوكسجينية الفعالة تعمل على اكسدة البروتينات وكسر الاواصر الهيدروجينية بين القواعد النايتروجينية المشكلة لـ DNA (Sies, ١٩٩٧; Allen and Tresini, ٢٠٠٠). تتواجد كريات الدم البيض العدلة Neutrophils في السائل المنوي بتركيز اقل من ٥٠٠٠ خلية/مل وفي حالة خمج القناة التناسلية يلاحظ ان تركيز هذه الخلايا يزداد وترافق هده الزيادة بفشل وظائف النطف (Baker *et al.*, ٢٠٠٣). يعتمد تشخيص ابيضاض المني Leukocytospermia على اساس تعريف منظمة الصحة العالمية WHO بوجود ١×١٠^{٦} كرية دم بيضاء/مل من السائل المنوي عندها تعد الحالة ابيضاض المني ويؤدي تلوث السائل المنوي بكريات الدم البيض وخصوصاً كريات الدم الحبيبية Granulocytes الى زيادة مستويات الانواع الاوكسجينية الفعالة (Novotny *et al.*, ٢٠٠٣). يشترك ابيضاض المني مع انخفاض فعالية السوبر اوكسايد دسميوتيز وزيادة جزئيات Chemokine (١L-٨-GRO-α) التي تنتج من كريات الدم البيض في السائل المنوي والذي يسبب زيادة الاجهاد التأكسدي أي أن حالة ابيضاض المني تؤدي لانخفاض مضادات الاكسدة الكابحة لفعل الانواع الاوكسجينية الفعالة (Rajasekaran *et al.*, ١٩٩٥; Rajasekaran *et al.*, ١٩٩٦).

يحتوي السائل المنوي على آلية دفاع تقلل من الزيادة في الانواع الاوكسجينية الفعالة تتمثل بمضادات الاكسدة وتشمل السوبر اوكسايد دسميوتيز والكاتليز والكلوتاثيون وفيتامين E وفيتامين C والكاروتين حيث تعمل على حماية النطف من الضرر الناتج من عمليات الأكسدة (de Lamirande and

(Gagnon, ١٩٩٣. وأشارت عدد من الدراسات إلى أهمية الاجهاد التأكسدي في إحداث حالة العقم لدى الرجال من خلال قياس مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة ومضادات الأكسدة اذ وجد أن نسبة وجود الأنواع الاوكسجينية الفعالة في السائل المنوي للرجال العقيمين تتراوح من ٢٥-٤٠% وفي حوالي ٩٦% في السائل المنوي لمرضى العقم المصابين بضرر الحبل الشوكي Spinal Cord Injury) (Iwasaki and Gagnon, ١٩٩٢; de Lamirande *et al*., ١٩٩٥).

وفي دراسة اخرى اجريت لحساب النسبة المئوية لوجود الأنواع الاوكسجينية الفعالة في مرضى العقم والأشخاص الخصيبين أظهرت النتائج أن نسبة وجود الأنواع الاوكسجينية الفعالة في مرضى العقم هي ٥٦.٦% بينما كانت النسبة ٢٠% للأشخاص الخصيبين (Novotny *et al*., ٢٠٠٣). أشار Lewis وجماعته (١٩٩٥) الى أن البلازما المنوية لمرضى العقم تمتلك مستوى واطئاً من مضادات الأكسدة مقارنة بالأشخاص الخصيبين كما أن وجود مستويات عالية من الأنواع الاوكسجينية الفعالة في البلازما المنوية لمرضى العقم يشترك مع وجود مستوى واطئ من مضادات الاكسدة مثل الكلوتاثيون وفيتامين E وفيتامين C كما ذكر Momen وجماعته (١٩٩٩) ان مستوى السعة الكلية لمضادات الاكسدة لمرضى العقم المصابين بمتلازمة قلة ووهن وتشوه النطف Oligoasthenoteratospermia Syndrome (OAT) اقل معنوياً من مستواها للأشخاص الخصيبين كما أن مستوى السعة الكلية لمضادات الأكسدة للأشخاص المصابين بابيضاض المني اقل معنوياً مقارنة بالأشخاص غير المصابين.

لقد ذكر في إحدى الدراسات أن تركيز فيتامين C ينخفض معنوياً في البلازما المنوية لمرضى العقم المصابين بوهن النطف asthenospermia مقارنة بالاشخاص الخصيبين (Lewis *et al*., ١٩٩٧). وهناك عدد من الدراسات اشارت الى ان تركيز المالونداي الديهايد MDA في البلازما المنوية للمرضى المصابين بالتهاب البروستات

المـزمن Chronic prostatitis يـزداد معنويـاً مقارنـة بتركيزهـا فـي البلازمـا المنويـة للاشـــــــــــــــــــــــــــــــخاص الخصـــيبين (Chen *et al*., ١٩٩٨; Pasqualotto *et al*., ٢٠٠٠).

يـرتبط مستوى الأنـواع الاوكسـجينية الفعالـة بدرجـة القيلـة الدواليـة Varicocele إذ أشارت أحدى الدراسات الى أن مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة يزداد مع زيادة الدرجة فـي القيلـة الدواليـة بينمـا لا توجد أي علاقـة واضـحة بـين حجم الخصـية ومستوى الأنـواع الاوكسـجينية الفعالـة (Agarwal, ٢٠٠٤b). بالإضـافة الـى ذلـك فـان مستوى المالونـداي الديهايد للخزعـة Biopsy المـأخوذة مـن الخصـية لمرضـى العقم المصـابين بالقيلـة الدواليـة يزداد معنوياً بزيادة درجة القيلة الدوالية (Koksal *et al*., ٢٠٠٠).

كما لـوحظ أن استئصـال القيلـة الدواليـة Varicocelectomy يسبب نقصـاناً معنويـاً فـي مستويات الأنـواع الاوكسـجينية الفعالـة وزيـادة فعاليـة مضـادات الأكسـدة فـي البلازمـا المنويـة (Mostafa *et al*., ٢٠٠١). وفـي دراسـة اخـرى وجـد أن استئصـال الـدوالي لمرضـــى العقـم يحســن مــن معـدلات نجــاح التلقـيح داخـل الـرحم Intrauterine insemination (IUI) (Baitch *et al*., ٢٠٠١).

يـؤثر التـدخين فـي نوعيـة المنـي وخصوصـاً معـالم النطـف المتمثلـة بتركيـز النطـف والنســـــبة المئويـــــة لحركـــــة النطـــــف والشـــــكل الســـــوي للنطـــــف (Vine *et al*., ١٩٩٦). كمـا يـرتبط التـدخين بعلاقـة طرديـة مـع النسـبة المئويـة للنطـف المتضـررة فـي الحـامض النـووي منقوص الأوكسـجين DNA والـولادات المتعلقـة بالحـالات السرطانية (Fraga *et al*., ١٩٩٦; Sarahan *et al*., ١٩٩٧).

بينت أحدى الدراسـات أن هنـاك علاقـة بين التدخين ومستوى الانـواع الاوكسـجينية الفعالـة فـي السـائل المنـوي لمرضـى العقم حيث لـوحظ زيـادة معنويـة فـي مستوى الأنـواع الاوكسـجينية الفعالـة ونقصـان فـي مسـتويات فيتـامين E لمرضـى العقـم المـدخنين مقارنـة

بمرضى العقم غير المدخنين (Ramadan *et al.*, ٢٠٠٢).

١-٢-٥ دور مضادات الاكسدة في علاج مرضى العقم

Role of antioxidants in treatment of male infertility

هناك عدد من الدراسات اجريت في داخل الجسم الحي *in vivo* او خارج الجسم الحي *In vitro* توضح الدور الوقائي لمضادات الاكسدة في حماية النطف والحفاظ على نوعية السائل المنوي Semen quality او تحسينه حيث اشارت هذه الدراسات إلى أن عمليتي الحفظ والتجميد للنطف البشرية تؤديان الى زيادة في الاجهاد التأكسدي مما يسبب انخفاضاً في النسبة المئوية للنطف المتحركة (Crister *et al.*, ١٩٨٨; Mazzilli *et al.*, ١٩٩٥). بينما ذكرت دراسة اخرى ان حفظ النطف بوجود فيتامين E بتركيز ١٠ ملي مول/لتر حافظ على النسبة المئوية للنطف المتحركة مقارنة بالعينات التي تم حفظها بدون اضافة الفيتامين (Askari *et al.*, ١٩٩٤). كما لوحظ عند اعطاء الاشخاص المصابين بمتلازمة قلة ووهن وتشوه النطف OAT syndrome جرعة ٤٠٠ ملغم/يوم من فيتامين E والسلينيوم Selenium بجرعة ١٠٠ ملغم/يوم عن طريق الفم ولمدة شهر واحد قد سبب زيادة في تركيز فيتامين E والسلينيوم في البلازما المنوية بالاضافة الى تحسن معنوي في معالم النطف التي شملت النسبة المئوية للنطف المتحركة والعيوشية والشكل السوي للنطف (Kodama *et al.*, ١٩٩٧). كذلك وجد أن عملية حفظ النطف في محلول رنكر تسبب زيادة معنوية في مستوى المالونداي الديهايد وتقلل من حركة النطف والعيوشية بينما عند إضافة فيتامين E إلى المحلول حافظ على مستوى المالونداي الدهايد MDA وحركة النطف والعيوشية (Verma and Kanwar, ١٩٩٩).

وفي دراسة اخرى لملاحظة دور فيتامين E وفيتامين C في الحفاظ على حركة النطف خلال عمليات التجميد والاماعة Freeze-Thaw process بعد فترة حضن

ساعتين، وجد ان فيتامين E يقلل من فقدان الحركة للنطف بينما لم يظهر فيتامين C أي اختلاف في النتائج مقارنة مع عينات السيطرة (Askari *et al.*, ١٩٩٤). بينما لوحظ عند اعطاء المدخنين فيتامين C بجرعات ١٠٠ و٢٠٠ ملغم/يوم عن طريق الفم حصول تحسن معنوي في معالم النطف التي تمثلت بالتركيز والشكل السوي والعيوشية (Dawson *et al.*, ١٩٩٢).

يمتلك الكلوتاثيون GSH دوراً علاجياً لمرضى العقم وذلك يعود إلى دوره الوقائي لمكونات الدهون في أغشية الخلايا اذ تبين أن إعطاء مرضى العقم الذين يمتلكون مستوى عالياً من الجذور الحرة جرعة ٦٠٠ ملغم/يوم من الكلوتاثيون عن طريق العضل، يظهر تحسناً معنوياً في النسبة المئوية للنطف المتحركة والشكل غير السوي للنطف والسرعة للنطف بعد فترة شهرين من العلاج (Lenzi *et al.*, ١٩٩٣). وكذلك وجد عند إعطاء جرعات ٢٠٠ ملغم/يوم من فيتامين E و٢٠٠ ملغم/يوم من فيتامين C و٤٠٠ ملغم/يوم من الكلوتاثيون لمرضى العقم لفترة شهرين، اظهرت النتائج زيادة معنوية واضحة في تركيز النطف (Kodama *et al.*, ١٩٩٧). يعتبر إنزيم SOD وإنزيم الكاتليز من مضادات الأكسدة الإنزيمية حيث تعمل على حماية النطف من تأثير الأنواع الاوكسجينية الفعالة مثل السوبر اوكسيد السالب وبيروكسيد الهيدروجين حيث أشارت إحدى الدراسات إلى أن حضن النطف مع إنزيم SOD يقلل معنوياً من فقدان حركة النطف ويثبط تركيز المالونداي الديهايد (Kobyashi *et al.*, ١٩٩١). كما ذكرت دراسة أخرى أن بيروكسيد الهيدروجين هو احد الأنواع الاوكسجينية الفعالة ويسبب ضرراً للنطف عندما يكون بتراكيز عالية وقد اثبتت الدراسة أن إضافة إنزيم الكاتليز بتركيز ٠.٠٨ملغم/ مل إلى النطف يوفر حماية للنطف من تأثير بيروكسيد الهيدروجين (Gagnon *et al.*, ١٩٩١).

اثبتت الدراسات ان هناك دور لمضادات الاكسدة في تحسين معدلات الحمل اذ ذكرت احدى الدراسات ان الكارنتين يمتلك قدرة زيادة فرصة الازواج في زيادة معدلات

الحمل (Vicari and Calogero, ٢٠٠١). كما أشار Suleiman وجماعته (١٩٩٦) الى ان معاملة مرضى العقم المصابين بوهن النطف بفيتامين E عن طريق الفم بجرعة ٦٠٠ ملغم/ يوم أدى إلى زيادة معنوية في معدلات الحمل بنسبة ٢١% من المرضى بينما لم تلاحظ تلك الزيادة في مجاميع السيطرة التي لم تعامل بالفيتامين. اما Comhaire وجماعته (٢٠٠٠) فقد استخدموا علاجاً متكوناً من فيتامين E وNAC أو فيتامين A وE والأحماض الدهنية الأساسية لمرضى العقم وقد لاحظوا تحسناً معنوياً في معدلات الحمل.

يمتلك السلينيوم دوراً واضحاً في تحسين حركة النطف وإعطاء فرصة اكبر لنجاح معدلات الحمل، وذكرت دراسة اجريت على مرضى العقم ان معاملة مرضى العقم بجرعات من السلينيوم بمفرده أو السلينيوم مع فيتامين E وC وA لمدة ثلاثة اشهر يؤدي إلى تحسن معنوي في زيادة معدلات الحمل بعد فترة العلاج (Scott *et al*., ١٩٩٨).

٦-٢-١ العلاقة بين الاجهاد التأكسدي وتقنيات تنشيط النطف البشرية خارج الجسم الحي

The relationship between oxidative stress and in vitro sperm activation techniques

يتكون السائل المنوي البشري من خليط من البلازما المنوية والنطف الناضجة وغير الناضجة وكريات الدم البيض وحطام غير متخصص. خلال عمليات التلقيح داخل الرحم (IUI) والإخصاب خارج الجسم الحي (IVF) تعزل خلايا النطف المتحركة عن الوسط المحيط بها (Tucker and Jansen, ٢٠٠٢).

أن تقنيات عزل النطف يفضل أن تكون سريعة وبسيطة ويتم عزل اكبر كمية ممكنة من النطف المتحركة وان لا تسبب ضرراً أو تغيرات فسيولوجية لخلايا النطف المعزولة كما يجب أن تقلل من النطف الميتة والخلايا الأخرى مثل كريات الدم البيض والبكتريا

وتقلل من إنتاج الجذور الحرة ولذلك يتم اختيار الطريقة للتنشيط اعتماداً على نوعية السائل المنوي (Aitken and Clarkson, ١٩٨٨).

هناك عدد من التقنيات المتوافرة لعزل النطف تشمل الغسل والنبذ centrifugation wash-out والطبقية البسيطة simple layer وعمود صوف الزجاج Glass wool-column والهجرة والجذب الترسيبية sedimentation gravity migration وتدرج الكثافات Density gravity ويتم العزل بهذه التقنيات بدرجات متغايرة (الحربي، ٢٠٠٢) . يتم فصل النطف عن البلازما المنوية بوساطة جهاز المنبذة centrifuge الذي يسبب زيادة في الأنواع الاوكسجينية الفعالة ROS التي تهاجم الغشاء الخلوي للنطف حيث تعمل على حث عملية الأكسدة الذاتية للدهون في الغشاء الخلوي للنطف واخيراً تعمل على زيادة اماعة الغشاء الخلوي للنطف (Shekariz *et al*., ١٩٩٥; Kurpisz *et al*., ١٩٩٦).

وفي دراسة اجريت على مرض العقم للمصابين بقلة النطف حيث تم قياس مستوى الجذور الحرة قبل النبذ وبعد النبذ لعينات السائل المنوي بقوة ٢٠٠ xg و٥٠٠ xg ولزمن ٢ و١٠ دقائق، لوحظ ارتفاع معنوي في مستوى الجذور الحرة بعد النبذ مقارنة بمستواها قبل النبذ. واثبتت الدراسة إن فترة النبذ عندما تكون قصيرة تقلل من تأثير النبذ في مستوى الجذور الحرة (Shekarriz *et al*., ١٩٩٥). كما وجد أن مستوى المالونداي الديهايد يزداد عند نبذ عينات السائل المنوي لأغراض حفظ النطف وبالمقابل فقد لوحظ انخفاض في النسبة المئوية للنطف المتحركة والعيوشية (Verma and Kanwar, ١٩٩٩). تعد تقنية الغسل إحدى التقنيات المستخدمة لتنشيط وعزل النطف ويتم استخدام هذه التقنية باضافة المستنبت الزرعي بعد نبذ عينات السائل المنوي وتسمى تقنية الغسل والنبذ وتؤدي عملية النبذ هذه تؤدي إلى زيادة الأنواع الاوكسجينية الفعالة الناتجة من النطف غير الناضجة وكريات الدم البيض sperm and leukocytes

(Aitken and Clarkson, ١٩٨٩). وقد أوصى الباحث Mortimer (١٩٩١) باستخدام التقنية الطبقية البسيطة وتقنية تدرج بيركول Percoll gradient لغرض التقليل من تأثير الجذور الحرة في عمليات التنشيط. أشارت إحدى الدراسات إلى أن الحبيبة النطفية المتشكلة بعد نبذ عينات السائل المنوي خلال تقنيات تنشيط النطف ربما تؤدي إلى زيادة الأنواع الاوكسجينية الفعالة بحوالي ٢-٥ مرات مقارنة بالمستوى الطبيعي (Aitken and Clarkson, ١٩٨٨). وتوصي منظمة الصحة العالمية World Health Organization WHO باستخدام طريقة السباحة للاعلى المباشرة واستخدام اوساط زرعية متدرجة الكثافة density gradient media للتقليل من مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة الناتجة من عمليات النبذ (WHO, ١٩٩٩). وأكدا Henkel وSchill (٢٠٠٣) على استخدام تقنيات لتنشيط النطف مثل تقنية الهجرة والجذب الترسيبية وتدرج الكثافات وعمود صوف الزجاج وعدم استخدام تقنية الغسل والنبذ لعينات السائل المنوي ذات مستوى عالٍ من الجذور الحرة أو في حالة الاصابة بالتهابات القناة التناسلية. كما أشار باحثون اخرون إلى أن تقنيات الهجرة والجذب الترسيبية وتدرج الكثافات وعمود صوف الزجاج لا تسبب زيادة في إنتاج الجذور الحرة (Tea *et al*., ١٩٨٤; Henkel and Schill, ٢٠٠٣).

وفي دراسة أخرى لوحظ إن زيادة الاجهاد التأكسدي تؤدي إلى زيادة واضحة في الضرر المتسبب للحامض النووي الـ DNA وان استخدام النطف المتأثرة بسبب زيادة الاجهاد التأكسدي للتلقيح داخل السايتوبلازم intracytoplasmic sperm injection (ICSI) يسبب أضراراً عكسية للجنين بعد عملية الغرس (Twigg post-Implantation *et al*., ١٩٩٨).

الفصل الثاني CHAPTER TWO

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

٢-١ جمع السائل المنوي البشري

Human seminal fluid collection

جمعت العينات في اطباق بترية نبذة بطريقة الاستمناء باليد Masturbation بعد مدة امتناع Abstinence من ٣-٥ أيام حيث تم جمع العينات في المختبر الاستشاري في كلية الطب-جامعة الكوفة. وضعت العينات في الحاضنة Incubator بدرجة حرارة ٣٧°م لكي يسمح لها بالاماعة الطبيعية Normal liquefaction.

٢-٢ فحص السائل المنوي البشري

Human seminal fluid Analysis

بعد حدوث الاماعة حيث سجل زمن الاماعة فحصت كل عينة وسجلت بيانات كل من الفحص العياني والمجهري وحسب الاستمارة المبينة فيما يأتي:-

اسم المريض: الاصابة بالامراض الجنسية:

العمر:	التدخين:
نوع العقم:	فترة العقم:
تناول الكحول:	مدة الامتناع الجنسي:
الفحص العياني	Macroscopic examination
حجم العينة:	Volume
اللون:	Colour
مدة الاماعة:	Liquefaction time
الاس الهيدروجيني:	pH
الفحص المجهري	Microscopic examination
تركيز النطف:	Sperm concentration
النسبة المئوية للنطف المتحركة:	Sperm motility percent
درجة نشاط النطف:	Sperm grade activity
النسبة المئوية للنطف غير السوية:	Abnormal sperm percent
النسبة المئوية لعيوشية النطف:	Sperm viability percent
تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية:	Leucocyte and Phagocytes concentration

٢-٢-١ الفحص العياني **Macroscopic examination**

٢-٢-١-١ **الحجم Volume**

يتم قياس حجم السائل المنوي بصورة دقيقة بوساطة الانابيب المختبرية المدرجة، عدت العينة ناقصة الحجم Hypovolumic اذا قل حجمها عن ١.٥ مليلتر، في حين عدت مفرطة الحجم Hypervolumic اذا زاد حجمها عن ٦ مليلتر.

٢-٢-١-٢ اللون Colour

يبدو السائل المنوي متجانساً ذا لون حليبي milky. ويدل اللون الاحمر البني على وجود خلايا الدم الحمر بينما يشير وجود الخيوط المخاطية Mucus streaks مع اللون الاصفر الى الاصابة بالخمج.

٢-٢-١-٣ فترة الاماعة Liquefaction

تم تسجيل الاماعة التامة لعينة السائل المنوي السوي خلال الـ ٦٠ دقيقة الاولى لجمع العينة حيث وضعت العينات في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ºم وتم تقدير قوام (لزوجة) السائل المنوي المتميع من خلال ملاحظة الخيط المخاطي وذلك بسحب العينة بماصة باستور. يعد القوام سوياً عند تدفقه قطرة بعد اخرى من الماصة بينما يعد القوام شاذاً عندما تكون العينة خيطاً اكثر من ٣ سم. استعملت المصطلحات التالية لوصف درجة اللزوجة للمني وهي: سوي Normal، لزج Viscid او لزج جداً Highly Viscid.

٢-٢-١-٤ الاس الهيدروجيني pH

تم قياس الاس الهيدروجيني بعد الاماعة مباشرة بوساطة اشرطة خاصة لهذا الغرض، يكون الاس الهيدروجيني للسائل المنوي نوعا ما قاعدياً يتراوح ما بين ٦.٧-٨.

٢-٢-٢ الفحص المجهري Microscopic examination

اخذت قطرة واحدة من كل عينة ممزوجة جيداً بعد الاماعة التامة ووضعت القطرة على شريحة زجاجية Slide دافئة وغطيت بغطاء الشريحة الزجاجية القياسية Cover slip، فحصت اولاً تحت القوة X ١٠ ومن ثم القوة X٤٠. وتم قياس معالم النطف التالية: تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية والنسبة المئوية لعيوشية النطف وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية.

٢-٢-٢-١ تركيز النطف Sperm concentration

تم تقدير تركيز النطف من معدل عدد النطف في عشرة مجالات field عشوائية وضرب معدل العدد بالعامل $١٠^{٦}$ (Hinting, ١٩٨٩). ويمكن الحصول على التركيز الكلي للدفق بضرب تركيز النطف بحجم الدفق.

يعد المريض مصاباً بقلة النطف Oligozoospermiaعندما يكون تركيز النطف اقل من ٢٠ مليون نطفة في كل مللي لتر واحد من السائل المنوي.

٢-٢-٢-٢ النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف Sperm motility percent and Grade activity

تم حساب مائة نطفة في الحقل المجهري الواحد وسجل معدل عدد النطف المتحركة تقدمياً Progressively والنسبة المئوية للنطف المتحركة. وتعرف النطف بانها ذات حركة تقدمية عندما تظهر حركة وفق حيز معلوم او عند انجازها سرعة خطية Linear velocity تقريبية. اما النطف اللاتقدمية التي لا تقوى على انجاز حركة خطية او قطع مسافة مرئية فلا تبدي سوى ضربات سوطية واهنة. بينما لا تظهر النطف غير المتحركة اية حركة سوطية تذكر بالمرة (Mortimer *et al.*, ١٩٨٨).

وتقدر درجة نشاط النطف على ما يأتي:-

٠- نطف غير متحركة.

١- نطف ذات حركة موضعية.

٢- حركة تقدمية بطيئة.

٣- حركة تقدمية جيدة، حركة خطية مستقيمة.

٤- حركة تقدمية جيدة جداً، حركة خطية مستقيمة.

٥- حركة تقدمية ممتازة، حركة خطية مستقيمة، مفرطة النشاط.

(Hinting, ١٩٨٩).

ويعد المريض مصاباً بوهن النطف Asthenozoospermia عندما تكون النسبة المئوية للنطف المتحركة اقل من ٥٠% ودرجة نشاطها اقل من ٣ لعينة السائل المنوي. (WHO, ١٩٩٢).

٢-٢-٢-٣ النسبة المئوية للنطف غير السوية Abnormal sperm morphology percent

تعد النطف مشوهة عند ملاحظة أي انحراف في تركيبها او شكلها السوي ويكون رأس النطفة السوي بيضوياً ومحدداً بشكل منتظم مع وجود قلنسوة الجسيم الطرفي Acrosomal cap الذي يغطي حوالي ثلثي السطح الخارجي للرأس. اما القطعة الوسطية فتكون اسطوانية الشكل ومستقيمة وذات حدود منتظمة، ويكون الذيل اسطواني الشكل وغير ملتف وذا حدود منتظمة وتشمل التشوهات التي تحدث في رأس النطف الحالات الاتية: وهي الرأس الضخم Macrocephalic، والرأس الصغير Microcephalic والرأس المستدق Tapered head وثنائية الرأس Double head ومستديرة الرأس Round head وغير منتظمة الرأس Amorphous head وذو الجسيم الطرفي المحطم Head with acrosome damage، اما التشوهات في ذيل النطف فتشمل الذيل الثنائي Double tail والذيل المنحني Bent tail والذيل المكسور وعديمة الذيل. اما وجود

القطيرة الهيولية التي تكون على شكل جزيئة دائرية متصلة بالقطعة الوسطية فتدل على خلل في نضج النطف في البربخ او سبب الدفق المتكرر (Acosta *et al.*, ١٩٨٨).

تم حساب مائتي نطفة على الاقل في كل شريحة ومن ثم حسبت النسبة المئوية للنطف غير السوية حسب المعادلة الاتية:-

$$\text{النسبة المئوية للنطف غير السوية} = \frac{\text{عدد النطف غير السوية}}{\text{عدد النطف الكلي}} \times ١٠٠$$

يعد المريض مصاباً بتشوه النطف Tetrazoospermia اذا كانت النسبة المئوية للنطف غير السوية اكثر من ٤٠ %.

٢-٢-٢-٤ النسبة المئوية لعيوشية النطف Sperm viability percent

استعملت صبغة الايوسين Eosin بتركيز ٠.٥ % لحساب النسبة المئوية لعيوشية النطف حيث ان الاساس في عمل هذه الصبغة هو وضع قطرة من هذه الصبغة على شريحة زجاجية ثم وضع قطرة من السائل المنوي وتمزج القطرتان على الشريحة الزجاجية ثم تغطى بغطاء الشريحة. ان النطف الحية يصطبغ غشاؤها الخارجي فقط بالصبغة دون ان تدخل الصبغة الى داخل الخلية على اعتبار ان الغشاء الخلوي يمنع مرورها اما النطف الميتة فسوف تصطبغ كلها بالصبغة على اعتبار ان الغشاء الخلوي لها فقد القابلية على نفاذية مواد دون مواد اخرى وبذلك دخلت الصبغة الى داخل الخلية وجعلتها ذات لون احمر.

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

$$\text{النسبة المئوية لعيوشية النطف} = \frac{\text{عدد النطف الحية}}{\text{عدد النطف الكلي}} \times ١٠٠$$

٢-٢-٢-٥ تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية Leucocyte and Phagocytes concentration

تم حساب تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية في عشرة مجالات مختلفة وضرب المعدل بالعامل $١٠^{٦}$. يعد المريض مصاباً بابيضاض المني Leucocytospermia عندما يكون تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية اكثر من ١×١٠^{٦} كرية دم/مل (WHO, ١٩٩٢).

٢-٣ التحليلات الكيموحيوية Biochemical analysis

يتم فصل البلازما المنوية Seminal plasma عن النطف وذلك بنبذ العينة عن طريق جهاز النبذ centrifuge لمدة ١٥ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة ومن ثم يؤخذ حجم معين من البلازما المنوية لغرض قياس التحليلات الكيموحيوية الاتية:-

٢-٣-١ تركيز المالونداي الديهايد Malondialdehyde concentration تم حساب تركيز المالوندي الديهايد MDA في البلازما المنوية للسائل المنوي حسب

الطريقة الموصوفة في (Muslih *et al.*, ٢٠٠٢) وكانت خطوات طريقة العمل على ما يأتي:-

١. وضع ١٥٠ مايكروليتر من البلازما المنوية للسائل المنوي في انبوبة اختبار زجاجية نظيفة وجافة ثم اضيف اليها ١ سم^{٣} من كل من ١٧.٥% حامض الخليك ثلاثي الكلور TCA و ٠.٦% حامض الثايوباربيتيوريك TBA.
٢. وضعت الانبوبة الزجاجية في حمام مائي مغلي لمدة (١٥) دقيقة ومن ثم بردت.
٣. اضافة ١ سم^{٣} من ٧٠% TCA ثم ترك المزيج في درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠ دقيقة.
٤. فصل الراشح باستعمال جهاز الطرد المركزي لمدة (١٥) دقيقة عند السرعة ٢٠٠٠ دورة/دقيقة.
٥. قراءة الامتصاصية للراشح باستعمال جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي ٥٣٢ نانومتر وحساب تركيز المالونداي 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 ٥٣٢ nm

L: Light bath= ١ cm

E_o: Extiniction Coefficient= ١.٥٦ ×١٠^{٥} M$^{-١}$ cm$^{-١}$

D: Dilution factor = ١ ml/ ٠.١٥ ml=٦.٧

٢-٣-٢ تركيز الكولسترول الكلي **Total cholesterol concentration**

تـم قيـاس تركيـز الكولسـترول الكلـي فـي البلازمـا المنويـة لعينـات السـائل المنـوي باسـتعمال عـدة التحاليـل Kit مـن نـوع Randox المصـنعة مـن شـركة (Randox Laboratories Ltd., Co., Antrim, UK) .

وكانت خطوات قياس الكولسترول الكلي على ما يأتي:-

١. تم سحب ١٠ مايكروليتر من البلازما المنوية والمحلول القياسي واضيف لكل منها ١ مل من الكاشف.
٢. اضيف ١٠ مايكروليتر من الماء المقطر الى ١ مل من الكاشف في انبوبة ثالثة (الكفء) .
٣. مزجت الانابيب جيداً وحضنت لمدة (١٥) دقيقة عند درجة حرارة ٣٧ ºم.
٤. تم قراءة الامتصاصية لكل من المحلول القياسي والبلازما المنوية، مقابل البلانك عند طول موجي ٥٤٦ نانومتر.

تم حساب تركيز تركيز الكولسترول الكلي في البلازما المنوية وفق المعادلة الاتية:

$$\text{تركيز الكولسترول الكلي} = \frac{\text{امتصاصية العينة-امتصاصية الكفء}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي- امتصاصية الكفء}} \times \text{تركيز المحلول القياسي}$$

(ملغم/١٠٠ سم^3)

٢-٣-٣ تركيز البروتين الكلي **Total Protein concentration**

تم قياس تركيز البروتين الكلي في البلازما المنوية للسائل المنوي باستعمال عدة التحاليل Kit من نوع Randox المصنعة من شركة (Randox Laboratories Ltd., Co., Antrim, UK) .

وتسمى هذه الطريقة لقياس تركيز البروتين الكلي بطريقة بايوريت Biurate method وخطوات هذه الطريقة على ما يأتي:-

١- تم اخذ ٢٠ مايكروليتر من البلازما المنوية والمحلول القياسي واضيف لكل منها ١ مل من كاشف البايوريت Biurate reagent.

٢- اضيف ٢٠ مايكروليتر من الماء المقطر الى ١ مل من كاشف البايوريت في انبوبة ثالثة (الكفء) .

٣- مزجت الانابيب جيداً وحضنت لمدة (٣٠) دقيقة عند درجة حرارة ٢٠-٢٥ºم.

٤- تمت قراءة الامتصاصية لكل من المحلول القياسي والبلازما المنوية، مقابل البلانك عند طول موجي ٥٤٦ نانومتر.

تم حساب تركيز تركيز البروتين الكلي في ١٠٠ سم^{٣} من البلازما المنوية وفق المعادلة الاتية:

$$\text{تركيز البروتين الكلي (غم/١٠٠ سم}^{٣}) = \frac{\text{امتصاصية العينة-امتصاصية الكفء}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي- امتصاصية الكفء}} \times \text{تركيز المحلول القياسي}$$

٢-٤ المواد المستعملة في الدراسة

٢-٤-١ مضادات الاكسدة **Antioxidants**

٢-٤-١-١ **فيتامين E** **Vitamin E**

استخدم فيتامين E (المسمى تجارياً فارمافيت E) المصنع من الشركة السورية للدواء Pharmasyr-Damascus-Syria على شكل كبسولات بتركيز ١٠٠ ملغم وتم اذابتها بـ١٠ مل من المحلول الفسيولوجي ٠.٩% او الماء المقطر ومن ثم تم تحضير التراكيز ٠.٢ ملغم/مل و ٠.٤ ملغم/مل و٠.٦ ملغم/مل و٠.٨ ملغم/مل باستعمال المحلول الفسيولوجي للجزء الاول من الدراسة وحضرت التراكيز ٠.٠٢ ملغم/مل و ٠.٠٤ مغم/مل و ٠.٠٦ ملغم/مل في حالة تنشيط النطف باستعمال الماء المقطر.

٢-٤-١-٢ فيتامين C Vitamin C

استخدم فيتامين C (Ascorbic acid) المصنع من الشركة الايرانية للدواء Mehr Darou Tehran-Iran بتركيز ٢٥٠ ملغم وتم اذابتها بـ١٠ مل من المحلول الفسيولوجي ٠.٩% او الماء المقطر ومن ثم تم تحضير التراكيز ٠.٢ ملغم/مل و ٠.٤ ملغم/مل و٠.٦ ملغم/مل و ٠.٨ ملغم/مل للجزء الاول من الدراسة باستخدام المحلول الفسيولوجي واستخدمت التراكيز ٠.٠٢ ملغم/مل و ٠.٠٤ مغم/مل و ٠.٠٦ ملغم/مل في تنشيط النطف باستعمال الماء المقطر.

٢-٤-١-٣ الكلوتاثيون Glutathion

تم استخدام الكلوتايون المختزل المصنع من شركة (Sigma chemical co.) حيث تم وزن ٠.١ غم من الكلوتاثيون واذابتها بـ ١٠ مل من المحلول الفسيولوجي ٠.٩% او الماء المقطر وحضرت التراكيز ٠.٢ و ٠.٤ و٠.٦ و ٠.٨ ملغم/مل للجزء الاول من الدراسة وكانت المادة المذيبة المحلول

الفسيولوجي والتراكيز ٠.٠٢ ملغم/مل و ٠.٠٤ مغم/مل و ٠.٠٦ ملغم/مل في حالة تنشيط النطف واستعمل الماء المقطر كمذيب.

٢-٤-٢ بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide

استخدم بيروكسيد الهيدروجين المصنع من شركة (Fluka chemical co.) على شكل مادة سائلة بتركيز ٣٠% وتم تحضير التراكيز المستخدمة في الدراسة وهي ٠.١% و ٠.٠٨% ٠.٠٦% و ٠.٠٤ % وكانت مادة التخفيف المحلول الفسيولوجي ٠.٩%.

٢-٤-٣ محلول حامض ثلاثي كلور الخليك Trichloroacetic acid (TCA)

تم تحضير محلول حامض ثلاثي كلور الخليك بتركيز ١٧.٥% حيث تم اذابة ١٧.٥ غم من TCA في حجم معين من الماء المقطر واكمل الى ١٠٠ مل من الماء المقطر وتركيز ٧٠% حيث تم اذابة ٧٠ غم من TCA في حجم معين من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠ مل من الماء المقطر.

٢-٤-٤ محلول حامض الثايوباربيتيوريك Thiobarbituric acid (TBA)

تم تحضير محلول حامض الثايوباربيتيوريك بتركيز ٠.٦% باذابة ٠.٦ غم من TBA في حجم معين من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠ مل من الماء المقطر.

٢-٤-٥ المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline

تـم اسـتخدام المحلـول الجـاهز(٥٠٠/ml) Sodium chloride بتركيـز ٠.٩% المحضر من I.V. Production Plant-Mousl-Iraq.

٢-٤-٦ المصل البشري المثبط Inactivated human serum

جهز المستنبت المستعمل في تنشيط النطف خارج الجسم الحي بتقنيتي الطبقية البسيطة والغسل والنبذ بمصل انثوي غير فعال حيث اخذت عينات الدم من النساء في اليوم الثالث عشر من الدورة الحيضية Menstural cycle وتركت العينات حتى تجلطت وفصل المصل عن كريات الدم بوساطة جهاز النبذ بسرعة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة ثم وضع المصل في حمام مائي بدرجة ٥٦ ºم لمدة ٣٠ دقيقة. حفظ المصل بدرجة حرارة ٢٠ ºم لحين استعماله (Shibahara *et al.*,١٩٩٣). يضاف المصل غير الفعال بتركيز ٢٠% الى المستنبت عند تنشيط النطف خارج الجسم الحي.

٢-٤-٧ المستنبت المستعمل في تنشيط النطف خارج الجسم الحي *In vitro* sperm activation media

استعمل مستنبت ايرل Earle's medium لتنشيط النطف خارج الجسم الحي ويظهر الجدول (٢-١) مكونات هذا المستنبت وفيما يأتي خطوات تحضير ١٠٠ ملليلتر منه:-

١. يضاف ملح ايرل (KA١٢-٨NB, Scotland) والامبسيلين وبايروفيت الصوديوم الى ٩٠ مل من الماء المقطر.
٢. تضاف بيكاربونات الصوديوم الى المزيج اعلاه.
٣. تمزج المكونات بصورة تدريجية حتى تذوب جميع المواد.

٤. يضبط الضغط التنافذي ما بين ٢٨٠-٢٩٠ ملي اوزمول/لتر بوساطة مقياس الضغط التنافذي.
٥. يضاف الماء المقطر (ان تطلب الامر) لغرض الحصول على الضغط التنافذي المضبوط.
٦. تضبط قيمة الاس الهيدروجيني ٧.٦ لغرض الحصول على الاس الهيدروجيني المعين، تضاف قطرة من حامض الهيدروكلوريك HCl المخفف (٠.١N)عندما يكون المحلول قاعدياً او قطرة من هيدروكسيد الصوديوم NaOH المخفف (٠.١N)عندما يكون المحلول حامضياً ويضبط الاس الهيدروجيني باستعمال مقياس الـpH (pH meter).
٧. يتم تعقيم المستنبت المحضر بوساطة تعريض المستنبت المحضر الى الاشعة فوق البنفسجية لمدة ٢٠ دقيقة.

جدول (٢-١) مكونات مستنبت ايرل المحور المستخدم في تنشيط النطف البشرية خارج الجسم الحي.

المكونات	الكمية
ملح ايرل	٠.٨٨٤ غم
امبسلين	٠.٠٠٨ غم
بيروفيت الصوديوم	٠.٠٠١ غم
بيكاربونات الصوديوم	٠.٢١ غم
ماء مقطر	لغاية ١٠٠ مل
الاوزمولارية	٢٨٠-٢٩٠ مللي اوزمول/لتر
الاس الهيدروجيني pH	٧.٤
درجة الحرارة	٢٣-٢٥ ^{o}م

٢-٥ التقنيات المستعملة في تنشيط النطف خارج الجسم الحي

Techniques used for *in vitro* human sperm activation

٢-٥-١ تقنية الغسل والنبذ Centrifugation wash-out technique

استعملت تقنية الغسل والنبذ (الهادي، ١٩٩٧) حيث تم مزج ٠.٥ مل من السائل المنوي و٠.٥ مل من المستنبت المحضر والمجهز بالمصل الانثوي غير الفعال بتركيز ٢٠% ثم اجريت عملية النبذ بقوة ٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق بدرجة حرارة الغرفة. ازيل الطافي supernatant بعد عملية النبذ وغطيت الحبيبة بـ٠.٥ مل من المستنبت المستعمل اما في حالة استعمال مضادات الاكسدة مع المستنبت فقد تم اضافة مضادات الاكسدة بثلاثة تراكيز متباينة وهي ٠.٠٢ ملغم/مل و٠.٠٤ ملغم/مل و ٠.٠٦ ملغم/مل لكل من فيتامين E وفيتامين C وكلوتاثيون GSH. ثم وضعت العينات في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ ºم لمدة ٤٥ دقيقة بعد ذلك تم اخذ قطرة واحدة من الجزء العلوي من المستنبت وفحصت بوساطة المجهر تحت قوة ٤٠X حيث تم حساب تركيز النطف المسترجعة والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية والنسبة المئوية لعيوشية النطف وتركيز الخلايا البلعمية وكريات الدم البيض كما تم سحب ٠.١٥ مل من البلازما المنوية للسائل المنوي و٠.١٥ مل من المستنبت قبل اضافة مضادات الاكسدة وبعدها لغرض حساب تركيز المالوندي الديهايد MDA قبل التنشيط وبعد التنشيط باضافة المستنبت بمفرده او مع مضادات الاكسدة.

٢-٥-٢ التقنية الطبقية البسيطة Simple layer technique

تضمنت هذه التقنية تغطية ٠.٢ مل من السائل المنوي بـ ٠.٥ مل من المستنبت المحضر والمجهز بالمصل الانثوي غير الفعال بتركيز ٢٠% في انبوب زرعي مختبري ثم تركت العينة لفترة ٤٥ دقيقة في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ºم وبعد الحضن اخذت قطرة من الجزء العلوي لطبقة المستنبت (Mortimer, ١٩٩٠) اما في حالة اضافة مضادات الاكسدة فقد اضيفت الى المستنبت ثلاثة تراكيز متباينة وهي ٠.٠٢ ملغم/مل و٠.٠٤ ملغم/مل و ٠.٠٦ملغم/مل لكل من فيتامين E وفيتامين C وكلوتاثيون GSH. تم حساب تركيز النطف المسترجعة والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية والنسبة المئوية لعيوشية النطف وتركيز الخلايا البلعمية وكريات الدم البيض. كما تم سحب ٠.١٥ مل من البلازما المنوية للسائل المنوي و٠.١٥ مل من المستنبت قبل اضافة مضادات الاكسدة وبعدها لغرض حساب تركيز المالوندای الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام المستنبت بمفرده او مع مضادات الاكسدة.

٢-٦ تصميم التجارب Experimental Design

قسمت الدراسة الى ثلاثة اجزاء

الجزء الاول: تأثير بيروكسيد الهيدروجين في تركيز المالونداي الديهايد MDA ومعالم النطف خارج الجسم الحي

١- قسمت عينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين الى خمسة اجزاء متساوية وقد اضيف الى الجزء الاول المحلول الفسيولوجي ٠.٩% والى الاجزاء الاخرى تراكيز متباينة من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وهي ٠.١% و ٠.٠٨% و٠.٠٦% و ٠.٠٤% ثم تركت العينات في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ ºم لمدة ١٥ دقيقة. بعد ذلك تم حساب تركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية لعينات السائل المنوي والنسبة

المئوية للنطف المتحركة وقد اختير التركيز الاكثر تأثيراً اعتماداً على نتائج التحليل الاحصائي.

٢- بعد اختيار التركيز الاكثر تأثيراً من بين التراكيز الاربعة بيروكسيد الهيدروجين تم تقسيم عينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين الى خمسة اجزاء متساوية واضيف بيروكسيد الهيدروجين للجزء الاول وعدّ مجموعة سيطرة اما بقية اجزاء السائل المنوي فقد اضيف لها مضادات الاكسدة + بيروكسيد الهيدروجين وكانت التراكيز المستخدمة لمضادات الاكسدة ٠.٢ ملغم/مل و ٠.٤ ملغم/مل و٠.٦ ملغم/مل و ٠.٨ ملغم/مل لكل من فيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون GSH. تركت العينات في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ ºم لمدة ١٥ دقيقة. وقد اختير التركيز الامثل من بين التراكيز الاربعة لمضادات الاكسدة اعتماداً على نتائج التحليل الاحصائي.

٣- بعد اختيار التركيز الاكثر تأثيراً لبيروكسيد الهيدروجين ولمضادات الاكسدة استخدمت هذه التراكيز في هذا الجزء من الدراسة حيث قسمت عينات السائل المنوي الى سبعة اجزاء متساوية واضيف لها على الآتي المحلول الفسيولوجي ٠.٩% وبيروكسيد الهيدروجين وبيروكسيد الهيدروجين+ فيتامين E وبيروكسيد الهيدروجين+ فيتامينC و وبيروكسيد الهيدروجين+ فيتامين E + فيتامينC و وبيروكسيد الهيدروجين+ الكلوتاثيون وبيروكسيد الهيدروجين+ البلازما المنوية لنفس العينات المستخدمة في الدراسة. تركت العينات في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ ºم لمدة ١٥ دقيقة. ثم تم دراسة معالم النطف وحساب تركيز المالونداي الديهايد وتركيز الكولسترول الكلي والبروتين الكلي في البلازما المنوية.

الجزء الثاني: دراسة العلاقة بين تركيز المالونداي الديهايد MDA في البلازما المنوية ومعالم النطف المختلفة.

تم حساب تركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية لعينات السائل المنوي لمظاهر العقم المختلفة والتي شملت الاشخاص الخصيبين وعدت كمجموعة سيطرة ومرضى العقم المصابين باللانطفية Azoospermia وبقلة النطف Oligospermia

وبوهن النطف Asthenospermia وبموات النطف Necrospermia وبتشوه النطف Teratospermia كما تم دراسة نوع العلاقة بين تركيز المالوندای الديهايد ومعالم النطف ان كانت موجبة او سالبة.

الجزء الثالث: تنشيط النطف

استخدمت تقنيتا الغسل والنبذ والطبقية البسيطة في تنشيط عينات السائل المنوي للمرضى المصابين بوهن النطف وشملت الدراسة تنشيط النطف باستخدام الوسط الزرعي ايرل وتم استخدام ثلاثة تراكيز متباينة من مضادات الاكسدة مع محلول ايرل وهي ٠.٠٢ ملغم/مل و٠.٠٤ ملغم/مل و ٠.٠٦ ملغم/مل لكل من فيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون GSH على التوالي. وكانت فترة التحضين بدرجة حرارة ٣٧ ºم لمدة ٤٥ دقيقة لكل عينات السائل المنوي، وتم ملاحظة تأثير هذه المتغيرات من خلال دراسة كل من تركيز المالوندای الديهايد ومعالم النطف التي تمثلت بتركيز النطف المسترجعة والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز الخلايا البلعمية وتركيز خلايا الدم البيض والعيوشية.

٢-٧ التحليل الاحصائي **Statistical Analysis**

استخدم test student واختبار F واختبار معامل الارتباط correlation coefficient للاستدلال على الدلالة المعنوية كما استعمل المعامل المعنوي الاصغري Least significant difference (LSD) في المقارنة بين النتائج بالاضافة الى الطرائق العيارية المستخدمة في تحديد المتوسط Mean والخطأ القياسي Standard Error(SE) (الراوي، ٢٠٠٠).

الفصل الثالث CHAPTER THREE

النتائج Results

٣-١ تأثير بيروكسيد الهيدروجين في تركيز المالونداي الديهايد ومعالم النطف خارج الجسم الحي

بينت نتائج إضافة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٠.١% لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين خلال فترة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م انخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف وزيادة معنوية (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد مقارنة بالسيطرة المتمثلة بالمحلول الفسيولوجي، بينما لم تظهر التراكيز ٠.٠٤% و٠.٠٦% و٠.٠٨% من بيروكسيد الهيدروجين أي فروق معنوية (P>٠.٠٥) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف وتركيز المالونداي الديهايد قياساً بالمحلول الفسيولوجي (الأشكال ٣-٢ و٣-٣ و٣-٤).

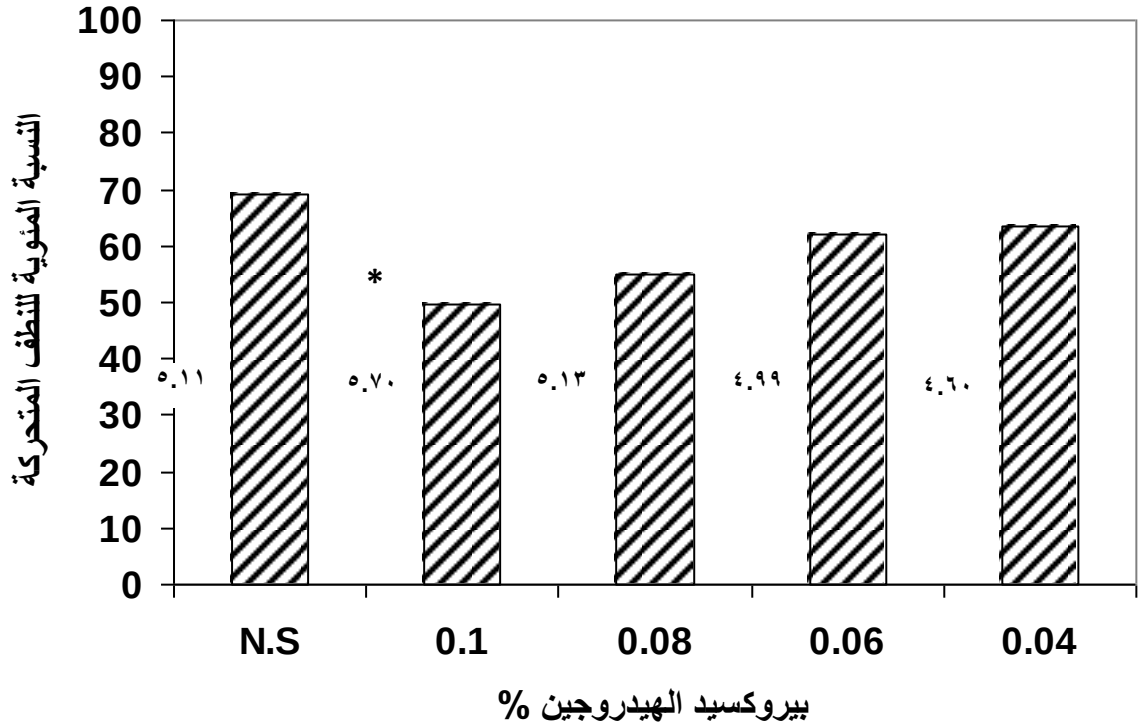
تبين الأشكال ٣-٥ و٣-٦ و٣-٧ تركيز المالونداي الديهايد بعد إضافة تراكيز متباينة من مضادات الأكسدة (فيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون) لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٠.١% بمدة تحضين ١٥ دقيقة، فقد سببت إضافة ٠.٦ ملغم/مل من فيتامين E انخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد مقارنة مع بيروكسيد الهيدروجين بمفرده بينما لم تبين التراكيز ٠.٢ ملغم/مل و٠.٤ ملغم/مل أي فروق معنوية ، كما اظهر التركيز ٠.٤ ملغم/مل من الكلوتاثيون انخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد مقارنة ببيروكسيد الهيدروجين بمفرده في حين لم تظهر التراكيز ٠.٢ ملغم/مل و٠.٦ ملغم/مل أي فروق معنوية.

اما بالنسبة لفيتامين C فقد أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية (P>٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد مقارنة بقيمها ببيروكسيد الهيدروجين بمفرده لكافة التراكيز المستخدمة. سببت إضافة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٠.١% لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد وانخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في معالم النطف التي شملت النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف قياساً بالسيطرة، في حين لم يلاحظ أي فروق معنوية (P>٠.٠٥) في كل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية عند إضافة ٠.١% من بيروكسيد الهيدروجين الى عينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين.

سببت إضافة مضادات الأكسدة المتمثلة بفيتامين E وفيتامين E + فيتامين C والكلوتاثيون والبلازما المنوية لعينات السائل المنوي ذات الجذور الحرة المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين حدوث زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف ونقصاناً معنوياً (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد مقارنة بقيمها عند إضافة ٠.١% من بيروكسيد الهيدروجين بمفرده، بينما لم تظهر كافة مضادات الأكسدة المستعملة في هذه الدراسة فروقاً معنوية (P>٠.٠٥) في تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية مقارنة بقيمها عند اضافة بيروكسيد الهيدروجين بمفرده، أما إضافة فيتامين C لعينات السائل المنوي المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين فلم تظهر أي فروق معنوية (P>٠.٠٥) لكافة معالم النطف المدروسة وتركيز المالونداي الديهايد قياساً ببيروكسيد الهيدروجين بمفرده (جدول ٣-٢).

يشير الشكل (٣-٨) الى تأثير إضافة بيروكسيد الهيدروجين بمفرده أو مع مضادات الاكسدة المستعملة في هذه الدراسة في تركيز الكولسترول الكلي، فقد لوحظ حصول انخفاض معنوي (P<٠.٠٥) في تركيز الكولسترول الكلي بعد إضافة بيروكسيد الهيدروجين بمفرده مقارنة بالمحلول الفسيولوجي. بينما بينت نتائج إضافة مضادات الأكسدة مع بيروكسيد

الهيدروجين عدم وجود فروق معنوية (P>٠.٠٥) في تركيز الكولسترول الكلي مقارنة ببيروكسيد الهيدروجين بمفرده وكذلك بين التراكيز المضافة من مضادات الأكسدة فيما بينها، كما لم تظهر النتائج أي فروق معنوية (P>٠.٠٥) بالنسبة لتركيز البروتين الكلي عند إضافة بيروكسيد الهيدروجين بمفرده او مع مضادات الأكسدة مقارنة مع قيمته قبل المعاملة (شكل ٣-٩).

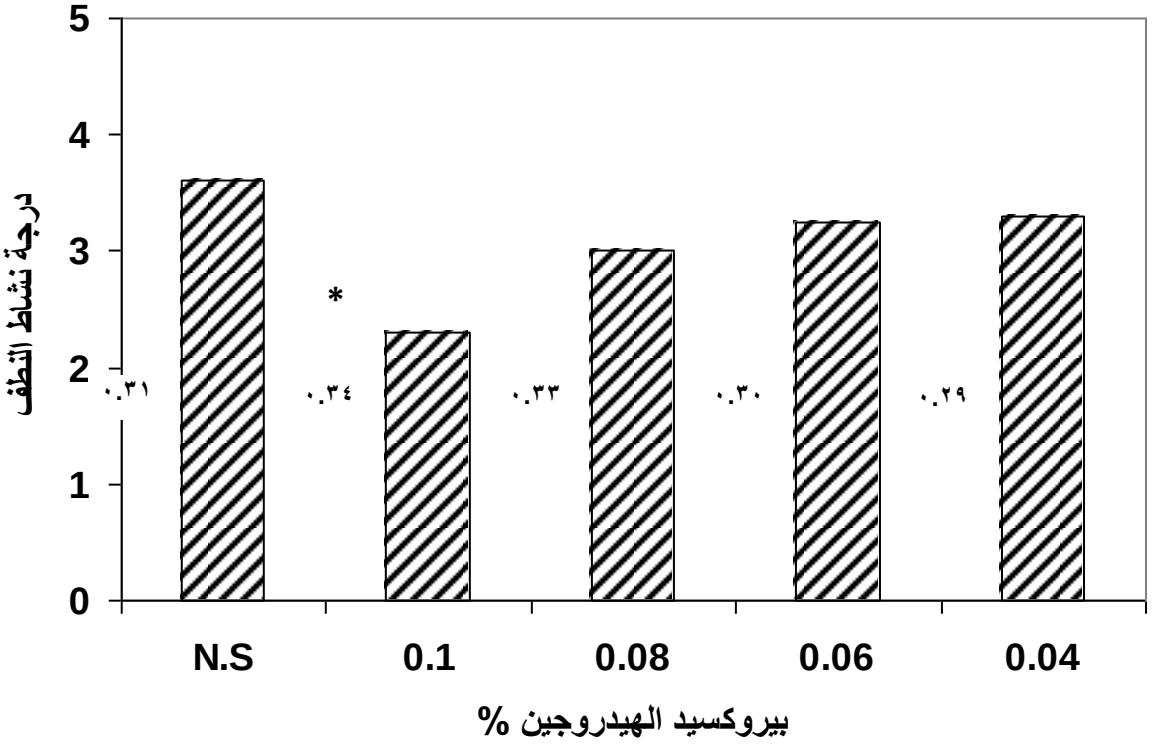


شكل (٣-٢): النسبة المئوية للنطف المتحركة بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.

عدد العينات = ١٠

*** (P<٠.٠٥) فرق معنوي عن المحلول الفسيولوجي**

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي

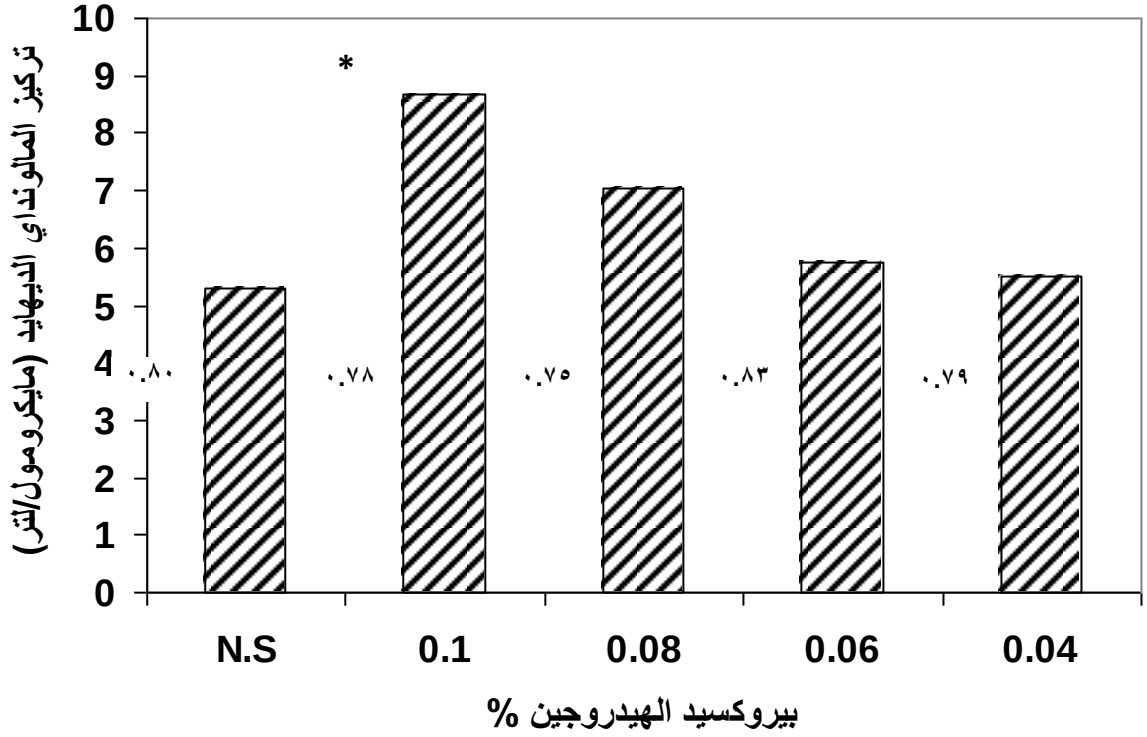


شكل (٣-٣): درجة نشاط النطف بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.

عدد العينات = ١٠

*** (P<٠.٠٥) فرق معنوي عن المحلول الفسيولوجي**

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي

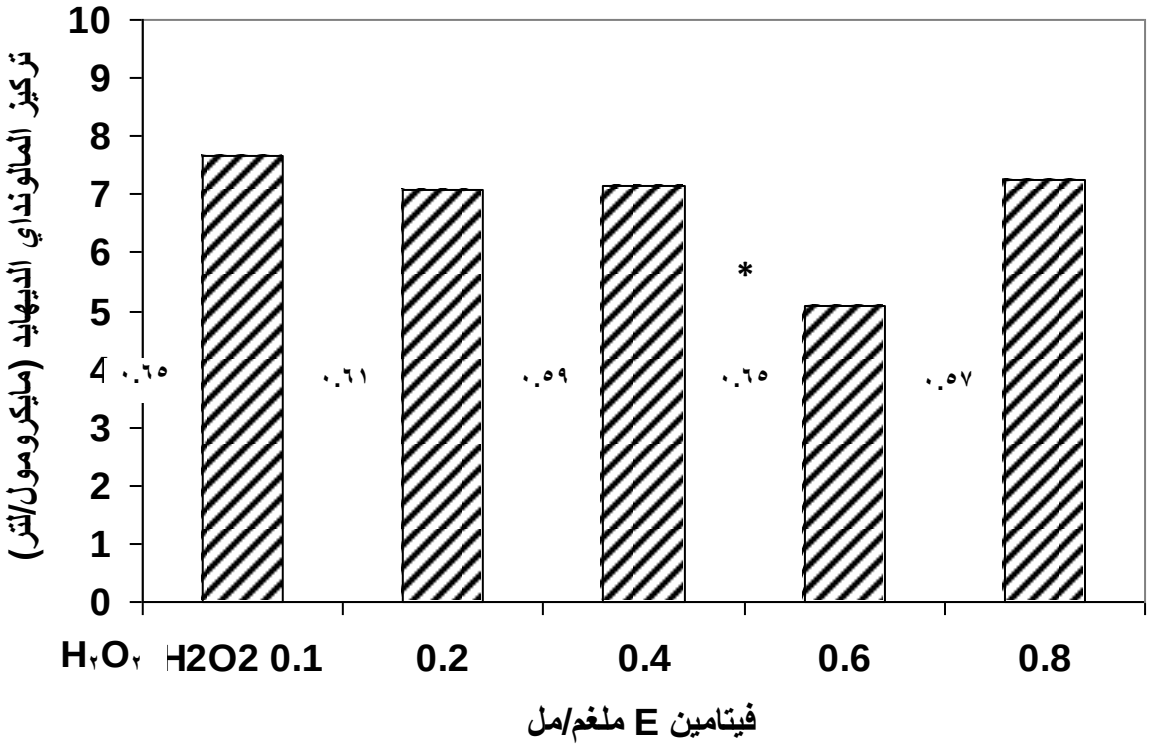


شكل (٣-٤): تركيز المالونداي الديهايد MDA بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.

عدد العينات = ١٠

*** (P<٠.٠٥) فرق معنوي عن المحلول الفسيولوجي**

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي

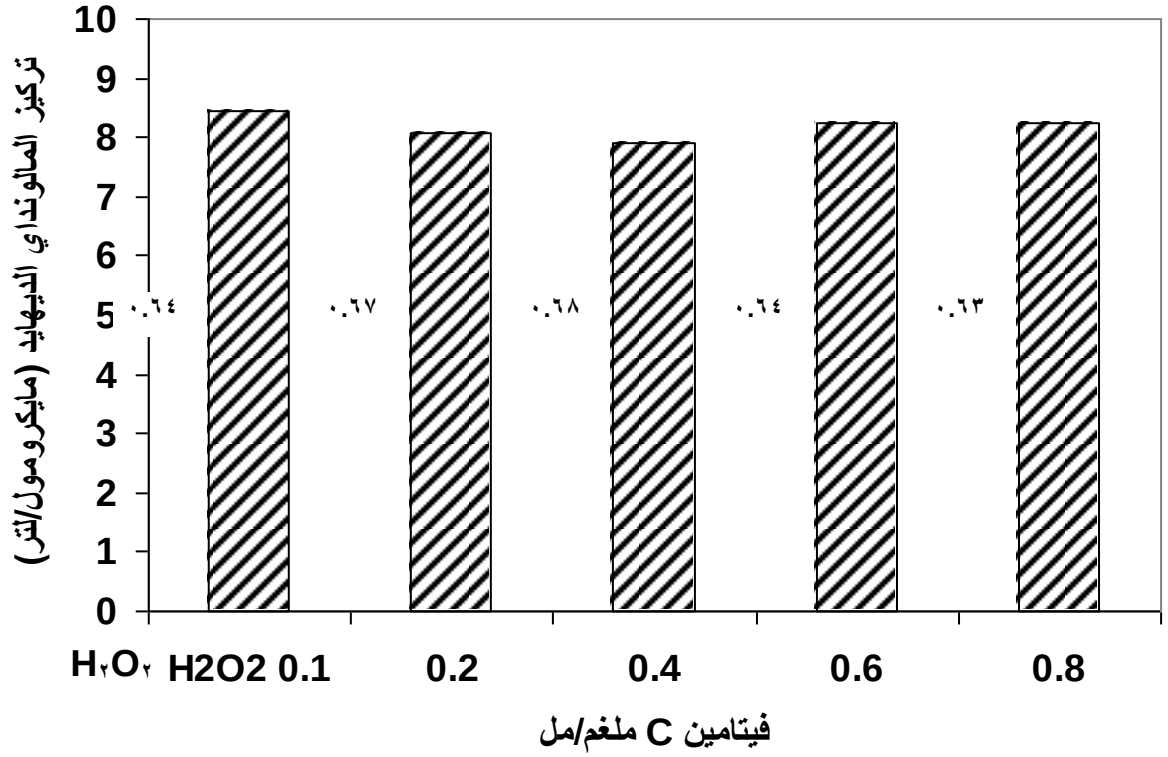


شكل (٣-٥): تركيز المالونداي الديهايد MDA بعد اضافة فيتامين E لعينات السائل المنوي المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.

عدد العينات =١٠

*** (P<٠.٠٥) فرق معنوي عن بيروكسيد الهيدروجين بمفرده**

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي

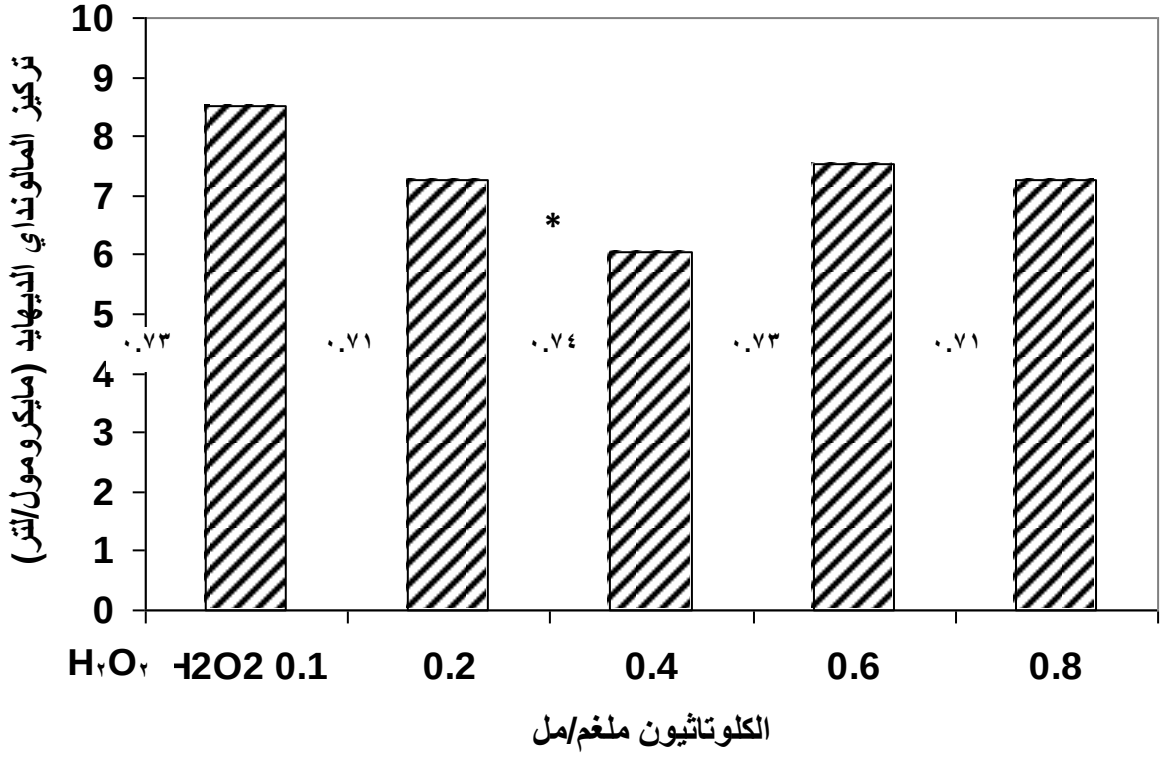


شكل (٣-٦): تركيز المالونداي الديهايد MDA بعد اضافة فيتامين C لعينات السائل المنوي المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.

عدد العينات = ١٠

(P<٠.٠٥) عدم وجود فرق معنوي عن بيروكسيد الهيدروجين بمفرده

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي



شكل (٣-٧): تركيز المالونداي الديهايد MDA بعد اضافة الكلوتاثيون لعينات السائل

المنوي المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.

عدد العينات =١٠

*** (P<٠.٠٥) فرق معنوي عن بيروكسيد الهيدروجين بمفرده**

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي

جدول (٣-٢): معالم النطف وتركيز المالوندای الديهايد MDA بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بمفرده ومع مضادات الاكسدة لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ ْم.

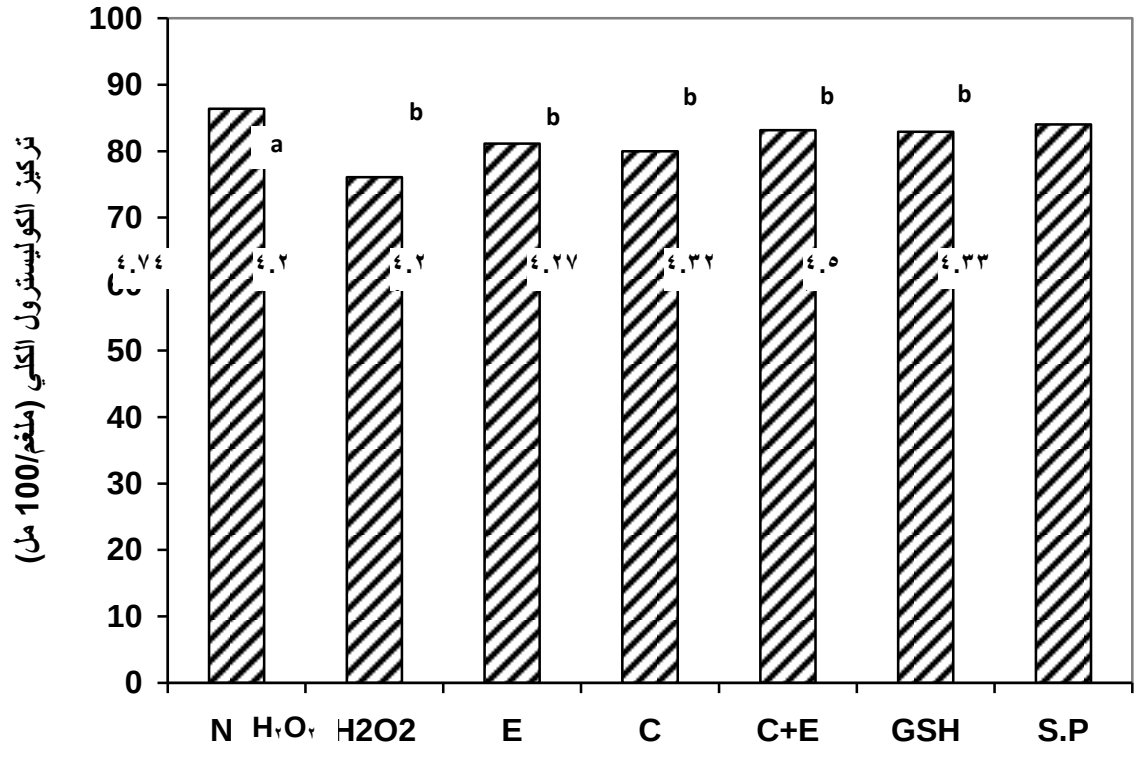
المعالم المدروسة	المحلول الفسيولوجي ٠.٩%	H_2O_2 ٠.١%	مضادات الاكسدة + H_2O_2 (٠.١%)				
			فيتامين E ٠.٦ ملغم/مل	فيتامين C ٠.٤ ملغم/مل	E+C ٠.٦+ ٠.٤ ملغم/مل	الكلوتاثيون ٠.٤ ملغم/مل	البلازما المنوية ١٠٠%
تركيز النطف (×١٠^6/مل)	a ٧٥.٣٠ ±٤.٤٢	a ٧٥.٣٠ ±٤.٣٨	a ٧٥.٢٠ ±٤.٣٧	a ٧٤.٩٠ ±٤.٣٩	a ٧٥.٠٠ ± ٤.٣٠	a ٧٥.١٠ ٧٥.١٠ ±٤.٥٠	a ٧٥.١٠ ±٤.٢٩
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a ٥٨.٢٠ ±٤.١٩	b ٣١.٣٠ ±٣.٤٩	c ٤١.٩ ±٢.٤٩	b ٣٢.٩٠ ±٣.١٨	c ٤٣.٩٠ ±٢.٧٩	c ٤١.٨٠ ±٢.٩٢	c ٤٦.٢٠ ±٢.٩٨
درجة نشاط النطف	a	b	c	b	c	c	c

	٣.٢١ ±٠.١٨	١.٧٤ ±٠.١٧	٢.٢٤ ±٠.١٣	١.٧٣ ±٠.١٧	٢.٦٣ ±٠.١٦	٢.٣٣ ±٠.١٧	٢.٩٨ ±٠.٢٢
النسبة المئوية لعيوشية النطف	a ٨٥.١٠ ±٢.٩٧	b ٥٦.٩٠ ±٤.١١	c ٧٠.٥٠ ±٣.١٩	b ٥٩.٢٠ ±٣.٨١	c ٧٥.٥٠ ±٢.٩٢	c ٧٣.٧٠ ±٣.١١	c ٨٠.٢٠ ±٢.٩٧
النسبة المئوية للنطف السوية	a ٦٨.٣٠ ±٥.٣١	a ٦٧.٧٠ ±٥.٠٨	a ٦٨.٣٠ ±٥.٣٨	a ٦٧.٨٠ ±٥.٣٠	a ٦٩.١٠ ± ٥.٣٠	a ٦٨.٤٠ ±٥.٣٤	a ٦٨.٦٠ ±٥.٢٥
تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية	a ٠.٧٠ ±٢.٢٦	a ٠.٧٠ ±٠.٢٦	a ٠.٥٠ ±٠.٢٢	a ٠.٦٠ ±٠.٢٦	a ٠.٥٠ ±٠.١٦	a ٠.٥٠ ±٠.٢٦	a ٠.٦ ±٠.٢٦
تركيز المالوندای الديهايد مايكرومول/لتر	a ٥.٠٦ ±٠.٦٩	b ٨.٥٥ ±٠.٨٤	c ٥.٨١ ±٠.٦٧	b ٧.٥٠ ±٠.٦٧	c ٥.٧٥ ±٠.٦٥	c ٥.٨٠ ±٠.٧٠	c ٥.٦٨ ±٠.٦٩

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E

عدد العينات =١٠

(P<٠.٠٥) الحروف المتباينة دلالة على المعنوية.



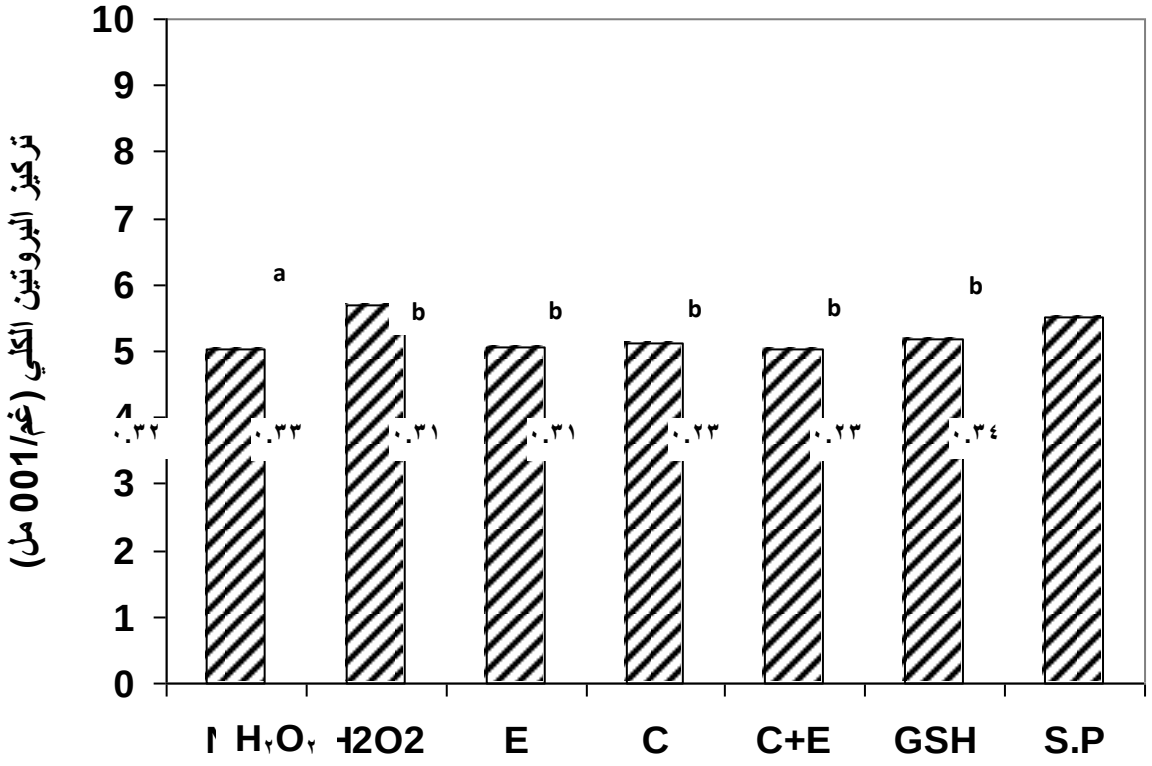
شكل (٣-٨): تركيز الكوليسترول الكلي بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 بمفرده ومع مضادات الاكسدة لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين بمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.

عدد العينات =١٠

a (P<٠.٠٥) فرق معنوي عن المحلول الفسيولوجي

b (P>٠.٠٥) عدم وجود فروق معنوية عن بيروكسيد الهيدروجين بمفرده

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي



شكل (٣-٩): تركيز البروتين الكلي بعد اضافة بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 بمفرده ومع مضادات الاكسدة لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين لمدة تحضين ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧°م.

عدد العينات =١٠

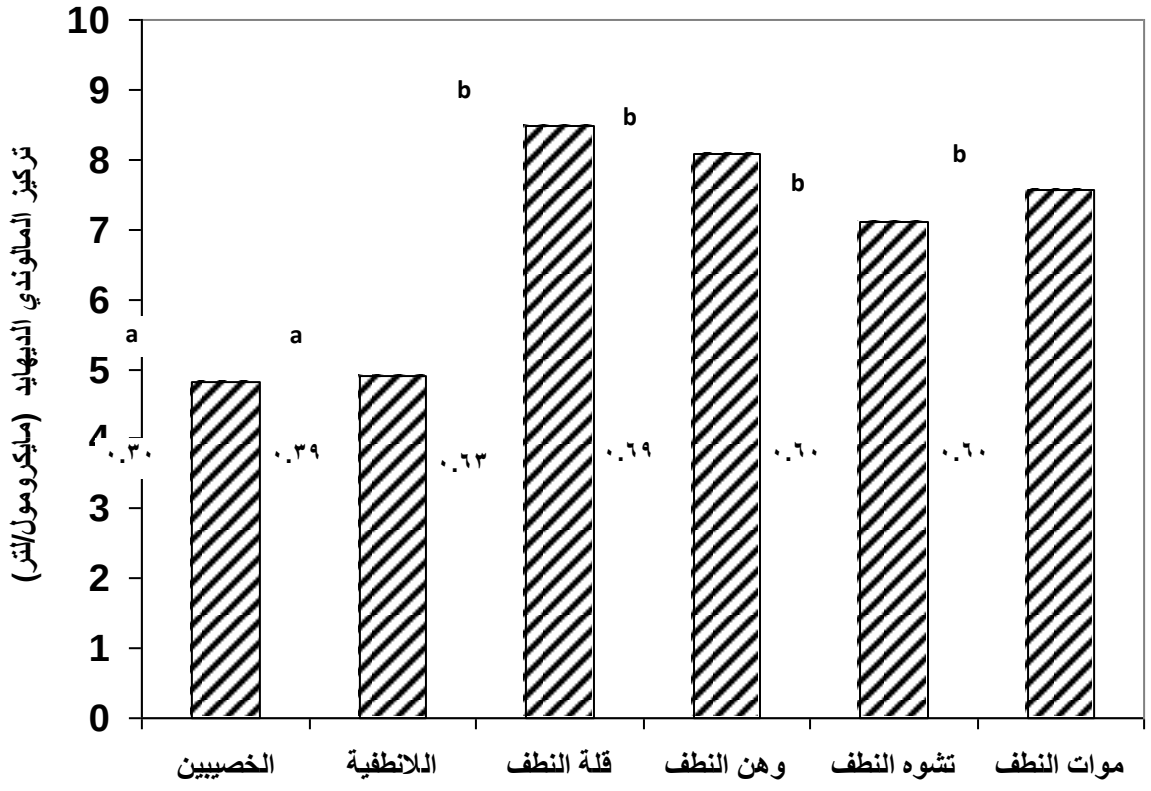
a ($P<0.05$) عدم وجود فرق معنوي عن المحلول الفسيولوجي

b ($P>0.05$) عدم وجود فرق معنوي عن بيروكسيد الهيدروجين بمفرده

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي

٣-٢ دراسة العلاقة بين تركيز المالونداي الديهايد MDA في البلازما المنوية ومعالم النطف المختلفة.

أجريت دراسة لمقارنة تركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين والمصابين بالعقم، اذ يوضح الشكل (٣-١٠) زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد للاشخاص العقيمين المصابين بقلة النطف ووهن النطف وموات النطف وتشوه النطف مقارنة بمرضى اللانطفية والأشخاص الخصيبين، بينما لم تلاحظ اختلافات معنوية (P>٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد بين الاشخاص المصابين باللانطفية والأشخاص الخصيبين. بينت نتائج التحليل الإحصائي لدراسة العلاقة بين معالم النطف في السائل المنوي وتركيز المالونداي الديهايد في البلازما المنوية وجود علاقة سالبة (P<٠.٠١ ,-٠.٧٧ ,-٠.٧٣ ,-٠.٧٦ ,-٠.٧٦=R) بين تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف على التوالي وتركيز المالونداي الديهايد (الأشكال ٣-١١ و٣-١٢ و٣-١٣ و٣-١٤) بينما اظهرت النتائج وجود علاقة موجبة (P<٠.٠١ ,٠.٧٣ ,٠.٥٧ =R) بين النسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية على التوالي وتركيز المالونداي الديهايد (الاشكال ٣-١٥ و٣-١٦).

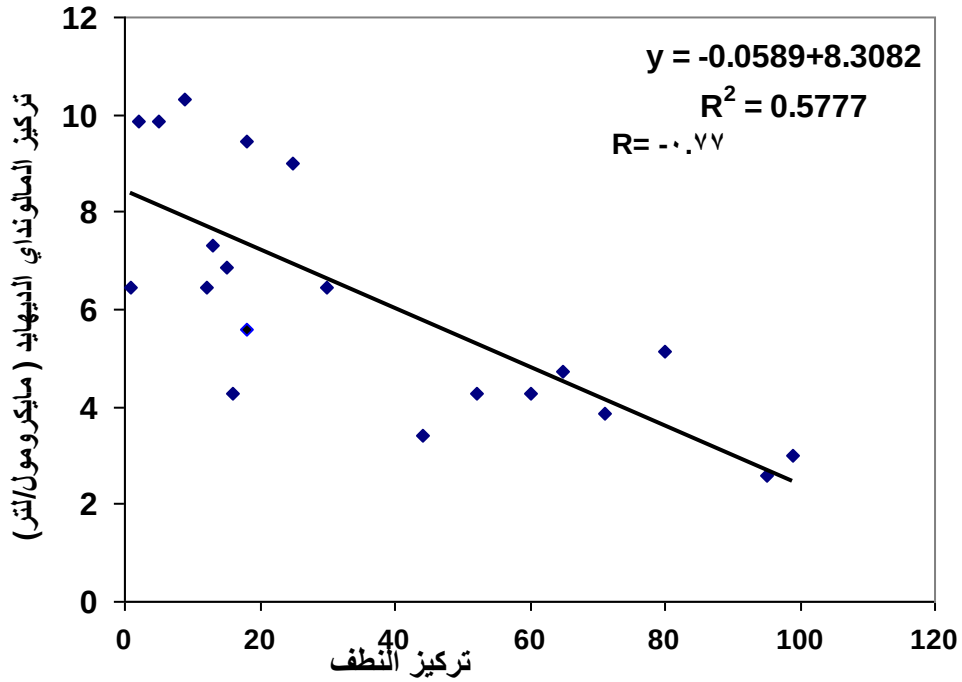


شكل (٣-١٠): تركيز المالونداي الديهايد MDA في البلازما المنوية لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين والعقيمين

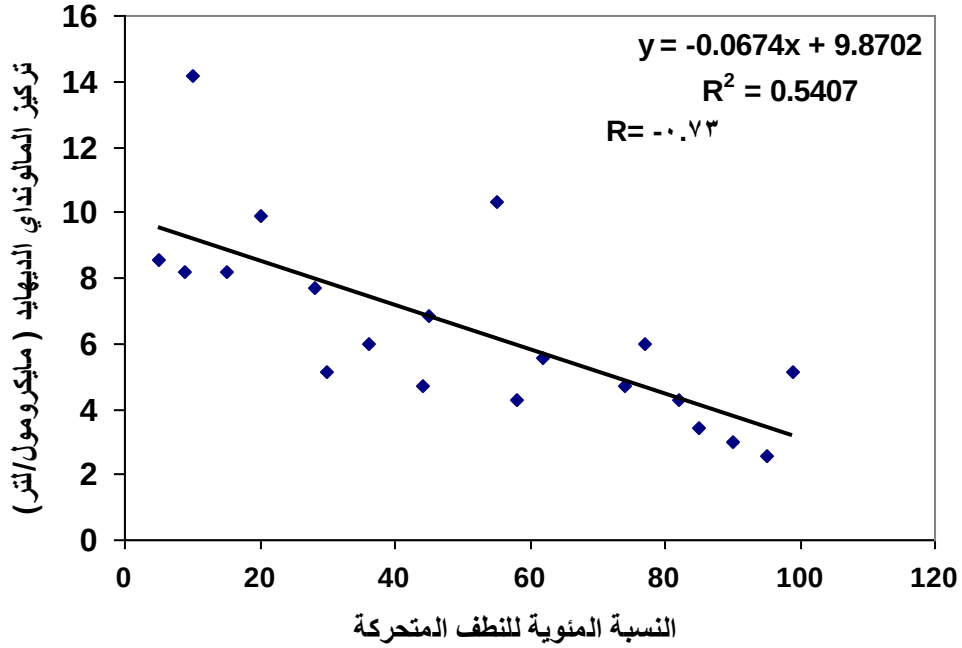
عدد العينات =٢٠

b(P<٠.٠٥) فرق معنوي عن الاشخاص الخصيبين والمصابين باللانطفية

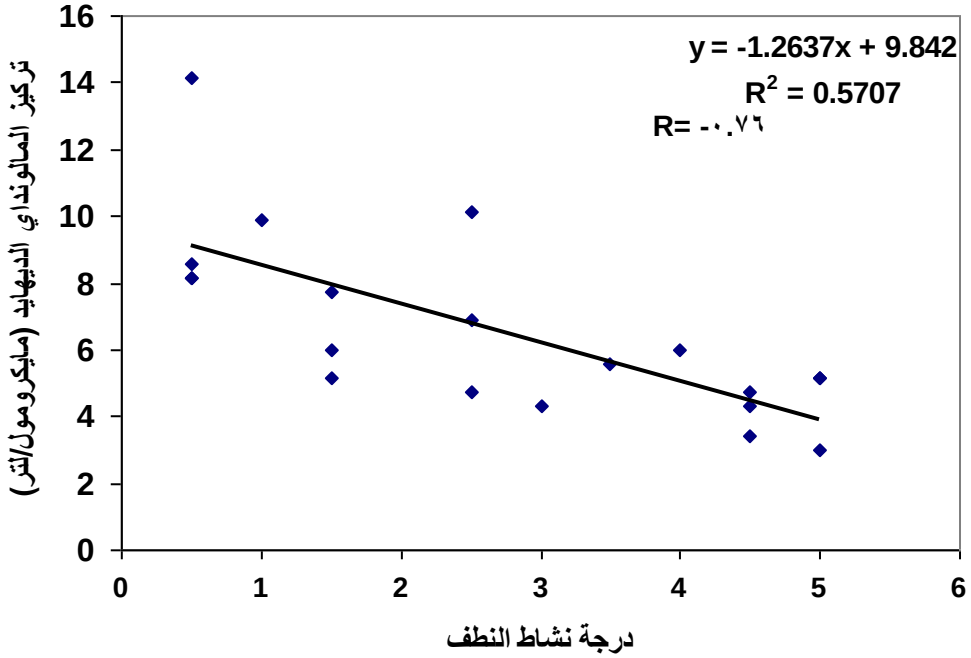
الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي



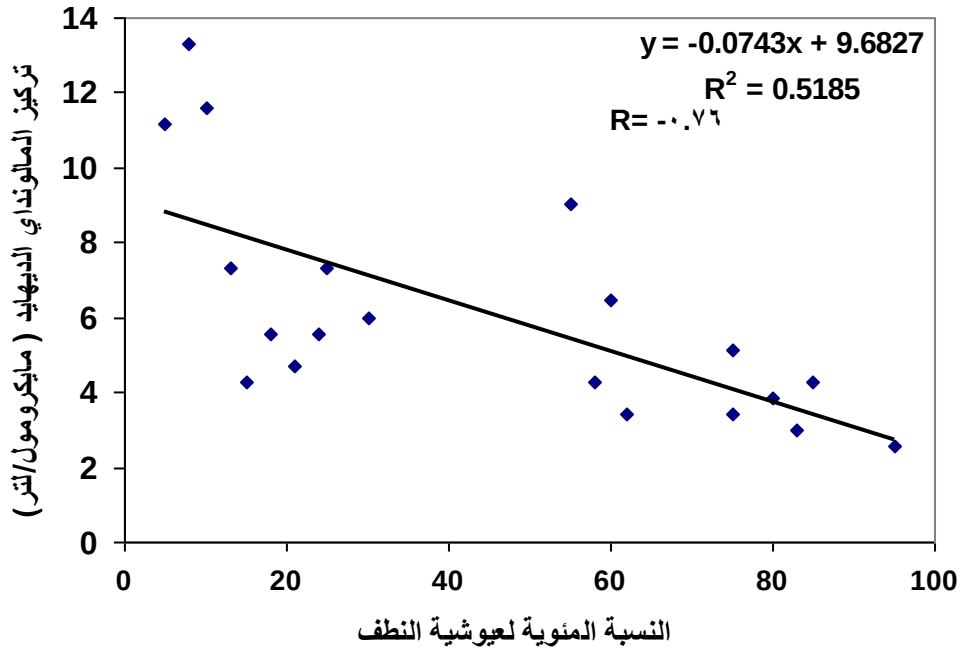
شكل (٣-١١): العلاقة بين تركيز النطف وتركيز المالونداي الديهايد MDA في السائل المنوي



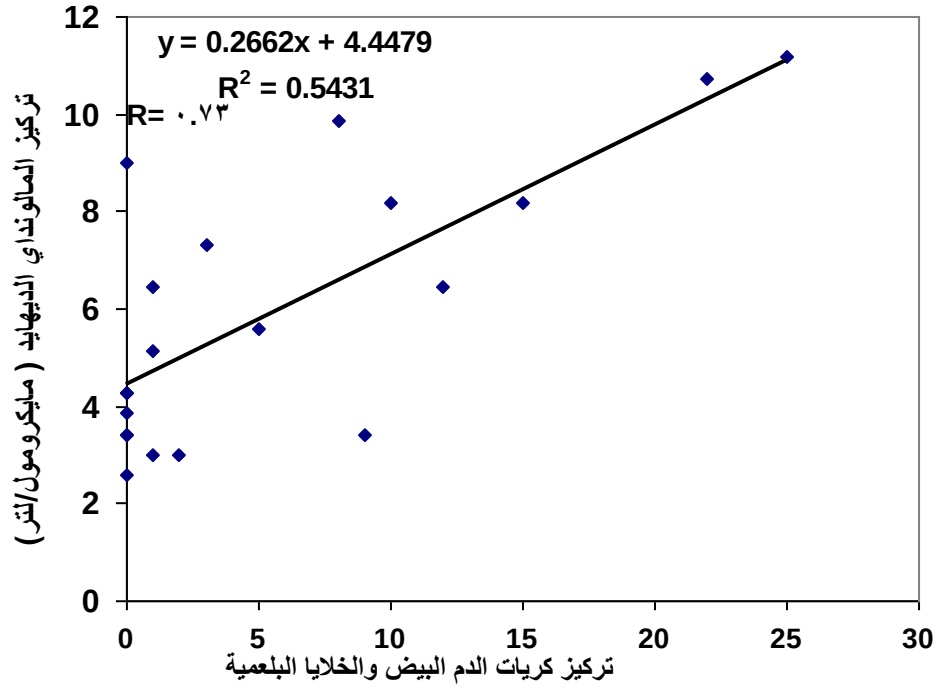
شكل (٣-١٢): العلاقة بين النسبة المئوية للنطف المتحركة وتركيز المالونداي الديهايد MDA في السائل المنوي



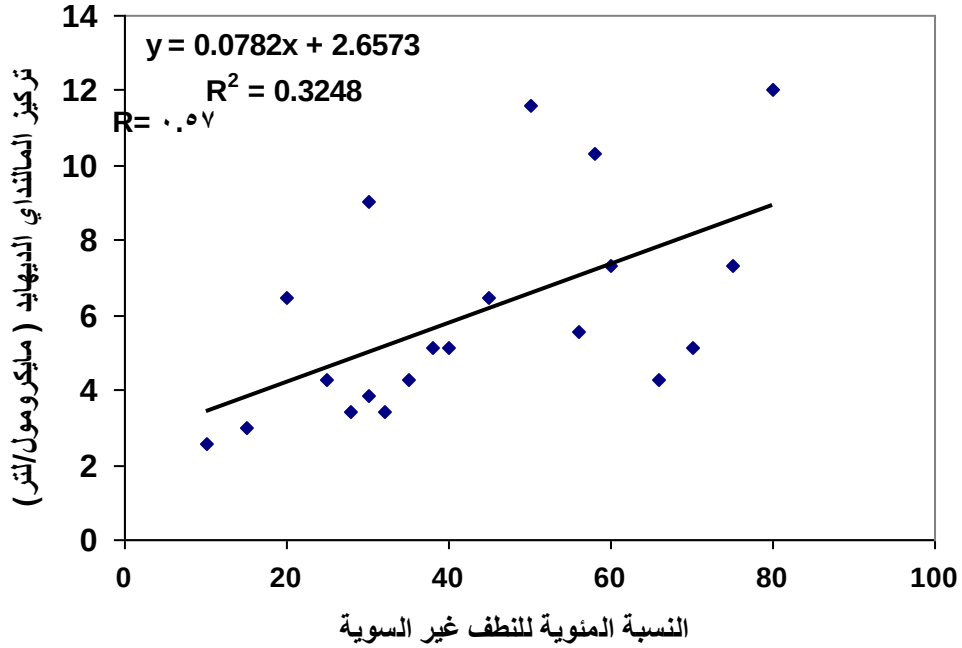
شكل (٣-١٣): العلاقة بين درجة نشاط النطف وتركيز المالونداي الديهايد MDA في السائل المنوي



شكل (٣-١٤): العلاقة بين النسبة المئوية لعيوشية النطف وتركيز المالونداي الديهايد MDA في السائل المنوي



شكل (٣-١٥): العلاقة بين تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية وتركيز المالونداي الديهايد MDA في السائل المنوي



شكل (٣-١٦): العلاقة بين النسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز المالوندای الديهايد MDA في السائل المنوي

٣-٣ تنشيط النطف

تضمن الجزء الثالث من الدراسة تنشيط نطف المرضى المصابين بوهن النطف باستعمال تقنيتي الغسل والنبذ والطبقية البسيطة وباستعمال المستنبت ايرل مضاف إليه فيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون GSH، وقد استعملت ثلاثة تراكيز متباينة لكل من مضادات الاكسدة المستعملة في الدراسة وهي ٠.٠٢ ملغم/مل و٠.٠٤ ملغم/مل و٠.٠٦ ملغم/مل وقد ثبتت معالم النطف وتركيز المالوندای الديهايد بعد فترة تحضين ٤٥ دقيقة.

اظهرت نتائج تنشيط عينات السائل المنوي لمرضى وهن النطف باستعمال المستنبت ايرل وبالطريقتين الغسل والنبذ والطبقية البسيطة تحسناً معنوياً ($P<0.05$) في معالم النطف مقارنة بقيمها قبل التنشيط ولفترة تحضين ٤٥ دقيقة، وقد لوحظ زيادة معنوية ($P<0.05$) في كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف مقارنة بقيمها قبل التنشيط. كما بينت النتائج انخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) في كل من تركيز النطف المسترجعة والنسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية مقارنة بقيمها قبل التنشيط. اما نتائج مقارنة قيم المالوندای الديهايد بعد التنشيط باستعمال المستنبت ايرل، فقد اظهرت النتائج زيادة معنوية ($P<0.05$) في تركيز المالوندای الديهايد بعد التنشيط مقارنة بقيمها قبل التنشيط باستعمال تقنية الغسل والنبذ، في حين اظهرت النتائج باستعمال الطبقية البسيطة عدم وجود فروق معنوية ($P>0.05$) بين تركيز المالوندای الديهايد بعد التنشيط مقارنة بقيمها قبل التنشيط (الجداول ٣-٣ ، ٣-٤، ٣-٥، ٣-٦، ٣-٧، ٣-٨، والشكل ٣-١٧).

ان اضافة فيتامين E بتركيز ٠.٠٤ ملغم/مل الى المستنبت الزرعي ايرل باستعمال تقنية الغسل والنبذ سببت زيادة معنوية ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف المتحركة

ودرجة نشاط النطف وانخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد مقارنة بقيمها في السيطرة المتمثلة بالمستنبت ايرل لوحده، في حين لم يسبب التركيز ٠.٠٤ ملغم/مل من فيتامين E أي فروق معنوية (P>٠.٠٥) في تركيز النطف المسترجعة والنسبة المئوية لعيوشية النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية قياساً بقيمها في المستنبت ايرل لوحده. اما اضافة فيتامين E بتركيز ٠.٠٢ ملغم/مل و٠.٠٦ ملغم/مل الى المستنبت الزرعي ايرل باستعمال تقنية الغسل والنبذ فلم يسبب أي فروق معنوية (P>٠.٠٥) في كافة معالم النطف المدروسة وتركيز المالونداي الديهايد مقارنة بالمستنبت ايرل لوحده (جدول ٣-٣).

بينت نتائج اضافة فيتامين C بتراكيزه الثلاثة (٠.٠٢ و٠.٠٤ و٠.٠٦ ملغم/مل) الى المستنبت الزرعي ايرل باستعمال تقنية الغسل والنبذ عدم وجود فروق معنوية (P>٠.٠٥) في معالم النطف المدروسة كافة وتركيز المالونداي الديهايد مقارنة بقيمها بالسيطرة المتمثلة بالمستنبت ايرل لوحده (جدول ٣-٤).

سببت اضافة الكلوتاثيون بتركيز ٠.٠٦ ملغم/مل الى المستنبت الزرعي ايرل باستعمال تقنية الغسل والنبذ زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف وانخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد مقارنة بقيمها بالمستنبت الزرعي لوحده. ولم يلاحظ أي فروق معنوية (P>٠.٠٥) في كل من تركيز النطف المسترجعة والنسبة المئوية لعيوشية النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية عند استعمال التركيز ٠.٠٦ ملغم/مل من الكلوتاثيون GSH مع المستنبت ايرل مقارنة بالمستنبت ايرل لوحده، كما لم يلاحظ أي فروق معنوية (P>٠.٠٥) في معالم النطف المدروسة كافة وتركيز المالونداي الديهايد باستعمال التراكيز ٠.٠٢ ملغم/مل و٠.٠٤ ملغم/مل من الكلوتاثيون مع المستنبت الزرعي ايرل مقارنة بقيمها عند استعمال المستنبت لوحده (جدول ٣-٥).

تبين (الجداول ٣-٦ و٣-٧ و٣-٨) تنشيط النطف الواهنة باستعمال تقنية الطبقية البسيطة وقد لوحظ من النتائج ان اضافة مضادات الاكسدة المتمثلة بفيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون الى المستنبت الزرعي ايرل وبتراكيزها المتباينة لم تظهر فروقاً معنوية (P>٠.٠٥) عند المقارنة بين معالم النطف المدروسة كافة وتركيز المالونداي الديهايد مع قيمها عند استعمال المستنبت الزرعي لوحده.

جدول (٣-٣): معالم النطف وتركيز المالوندای الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام تقنية الغسل والنبذ للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتراكيز المتباينة من فـيتامين E.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السيطرة (المستنبت ايرل لوحده)	المستنبت ايرل + فيتامين E	
			٠.٠٢ ملغم/مل	٠.٠٤ ملغم/مل	٠.٠٦ ملغم/مل
تركيز النطف	a ٥٩.٦٠ ±٤.٥٣	b ٦.٣٠ ±٠.٥١	b ٦.٧٠ ±٠.٥٩	b ٧.١٠ ±٠.٥٠	b ٦.٥٠ ±٠.٦١
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a ٣٣.٢٠ ±٢.٣٩	b ٧٤.٥٠ ±٢.٩٧	b ٧٨.٠٠ ±٢.٦٠	c ٨٣.٣٠ ±٢.٩١	b ٧٦.٣٠ ± ٢.٤٧
درجة نشاط النطف	a ١.٨٠ ±٠.١٣	b ٣.٩٥ ±٠.١٧	b ٣.٩٥ ±٠.٢٠	c ٤.٦٠ ±٠.٢٠	b ٣.٩٥ ±٠.١٧
النسبة المئوية لعيوشية النطف	a ٦٦.٦٠ ±٣.٣٤	b ٩٤.١٠ ±١.٦٤	b ٩٣.٩٠ ±١.٦٦	b ٩٤.٧٠ ±١.٣٢	b ٩٤.٦٠ ±١.٣٣
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a ٣٠.٥٠ ±٣.٢٠	b ٥.١٠ ±٠.٦٥	b ٤.٤٠ ±٠.٥٢	b ٤.١٠ ±٠.٤٥	b ٤.٤٠ ±٠.٥٢
تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية	a ٦.١٠ ±٠.٨٨	b ٠.٦٠ ±٠.٣٣	b ٠.٤٠ ٠.٢٢	b ٠.٣٠ ٠.٢١	b ٠.٣٠ ±٠.٢١
تركيز المالوندای	a	b	b	a	b

الديهايد مايكرومول/لتر	٦.١٥ ±٠.٧٧	٨.٦٢ ±٠.٨٣	٦.٢٤ ±٠.٨٢	٦.١٥ ±٠.٧٨	٧.٥٥ ±٠.٨٤

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E

عدد العينات =١٠

(P<٠.٠٥) الحروف المتباينة دلالة على المعنوية.

جدول (٣-٤): معالم النطف وتركيز المالوندای الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام تقنية الغسل والنبذ للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتراكيز المتباينة من فيتامينC.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السيطرة (المستنبت ايرل لوحده)	المستنبت ايرل + فيتامين C	
			٠.٠٢ ملغم/مل	٠.٠٤ ملغم/مل	٠.٠٦ ملغم/مل
تركيز النطف	a ٦٩.٥٠ ±٢.٧٠	b ٧.٠٠ ±٠.٣٦	b ٦.٨٠ ±٠.٣٥	b ٦.٨٠ ±٠.٣٥	b ٧.٤٠ ±٠.٣٣
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a ٣٢.٤٠ ±٤.٨٩	b ٦١.٤٠ ±٧.٠٢	b ٥٨.٩٠ ±٦.٩٢	b ٥٨.٩٠ ±٧.٨٣	b ٦٣.٩٠ ± ٧.٠١
درجة نشاط النطف	a ١.٧٥ ±٠.٢٢	b ٣.٥٠ ±٠.٣٧	b ٣.٤٥ ±٠.٣٦	b ٣.٥٠ ±٠.٣٧	b ٣.٥٥ ±٠.٣٨
النسبة المئوية لعيوشية النطف	a ٦٧.٠٠ ±٦.٠١	b ٩٠.١٠ ±٣.٩٣	b ٨٨.٠٠ ±٤.٣٣	b ٩٠.١٠ ±٣.٩٣	b ٩٠.٧٠ ±٣.٧٠
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a ٤٣.٠ ±٣.٣٥	b ٨.١٠ ±٠.٤٨	b ٨.٩٠ ±٠.٥٨	b ١٠.١٠ ±٠.٩٣	b ٨.٧٠ ±٠.٨٥
تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية	a ٨.٥٠ ±١.٠٧	b ١.٧٠ ±٠.٣٠	b ١.٩٠ ±٠.٣٧	b ١.١٠ ±٠.٢٣	b ١.٦٠ ±٠.٣٧
تركيز المالوندای الديهايد مايكرومول/لتر	a ٦.١١ ±٠.٧٥	b ٨.٧٥ ±١.٠١	b ٧.٤١ ±٠.٧٤	b ٧.٤١ ±٠.٧٥	b ٧.١٩ ±٠.٧٩

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E

عدد العينات =١٠

(P<٠.٠٥) الحروف المتباينة دلالة على المعنوية.

جدول (٣-٥): معالم النطف وتركيز المالونداي الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام تقنية الغسل والنبذ للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتراكيز المتباينة من الكلوتاثيون GSH.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السيطرة (المستنبت ايرل لوحده)	المستنبت ايرل + الكلوتاثيون	
			٠.٠٢ ملغم/مل	٠.٠٤ ملغم/مل	٠.٠٦ ملغم/مل
تركيز النطف	a ٦١.٥٠ ±٧٠.٤	b ٦.٤٠ ±٠.٦١	b ٧.٠ ±٠.٤٧	b ٧.٠ ±٠.٤٥	b ٨.٢٠ ±٠.٥٥
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a ٢٨.٧٠ ±٣.٠٨	b ٦٨.٣٠ ±٤.٠٢	b ٧٢.٧.٠ ±٦.٩٢	b ٧٢.٤٠ ±٤.٨٠	c ٧٨.٠ ± ٤.٦٠
درجة نشاط النطف	a ١.٦٥ ±٠.١٨	b ٣.٧٥ ±٠.٢٠	b ٣.٨٥ ±٠.٢٧	b ٣.٨٠ ±٠.٢٩	c ٤.٣٥ ±٠.٢٢
النسبة المئوية لعيوشية النطف	a ٦٠.٩٠ ±٧.٧١	b ٩٠.٥٠ ±٢.٣١	b ٩١.٥٠ ±١.٧٠	b ٩٠.٥٠ ٢.٣١	b ٩١.٦٠ ±٢.٤٤
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a ٤٥.٣٠ ±٤.٣١	b ٨.٤٠ ±٠.٧٦	b ٧.٨٠ ±٠.٦١	b ٨.١٠ ±٠.٨٣	b ٧.٥٠ ±٠.٧٣
تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية	a ٤.٩٠ ±٠.٩١	b ٠.٣٠ ±٠.١٥	b ٠.٤٠ ±٠.٢٢	b ٠.٣٠ ±٠.٤٨	b ٠.١٠ ±٠.٣١
تركيز المالونداي الديهايد مايكرومول/لتر	a ٧.٠٢ ±١.٠٤	b ٩.٥٨ ±١.١٠	b ٧.٧٣ ±١.٠٤	b ٧.٤٥ ±١.٠٧	c ٧.١٥ ±١.١٤

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E

عدد العينات =١٠

(P<٠.٠٥) الحروف المتباينة دلالة على المعنوية.

جدول (٣-٦): معالم النطف وتركيز المالوندای الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام التقنية الطبقية البسيطة للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتراكيز المتباينة من فيتامين E.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السيطرة (المستنبت ايرل لوحده)	المستنبت ايرل + فيتامين E	
			٠.٠٢ ملغم/مل	٠.٠٤ ملغم/مل	٠.٠٦ ملغم/مل
تركيز النطف	a ٤٥.٣٠ ±٣.٩٥	b ٦.٤٠ ±٠.٧٣	b ٦.٠ ±٠.٦٤	b ٧.٠ ±٠.٥٧	b ٦.٨٠ ±٥٩٠.
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a ٢٥.٦٠ ±٣.٣٦	b ٦٢.٩٠ ±٤.٨٧	b ٦٢.٣٠ ±٥.٣٣	b ٦٣.٩٠ ±٤.٦٥	b ٦٢.٤٠ ± ٥.١١
درجة نشاط النطف	a ١.٣٠ ±٠.١٨	b ٣.٣٥ ±٠.٢٥	b ٣.٣٥ ±٠.١٨	b ٣.٤٥ ±٠.٢٧	b ٣.٣٥ ±٠.٢٥
النسبة المئوية لعيوشية النطف	a ٦٢.٦٠ ±٣.٥٩	b ٩١.٣٠ ±١.٥٢	b ٩٢.٣٠ ١.٥٢	b ٩٢.٤٠ ±١.٩٥	b ٩٠.٧٠ ±١.٨٠
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a ٤٩.٢٠ ±٤.٠	b ٦.٥٠ ±٠.٥٤	b ٧.١٠ ±٠.٥٦	b ٦.٢٠ ±٠.٤١	b ٦.٩٠ ±٠.٤٨
تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية	a ٨.٠ ±١.١٦	b ٠.٤٠ ±٠.٢٦	b ٠.٦٠ ±٠.٣٥	b ٠.٣٠ ±٠.٢١	b ٠.٤٠ ±٠.٢٦
تركيز المالوندای الديهايد مايكرومول/لتر	a ٨.٦١ ±٠.٧١	a ٨.٢٧ ±٠.٧١	a ٨.٠١ ±٠.٦٨	a ٧.٩٧ ±٠.٦٩	a ٨.٠١ ±٠.٦٩

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E

عدد العينات =١٠

(P<٠.٠٥) الحروف المتباينة دلالة على المعنوية.

جدول (٣-٧): معالم النطف وتركيز المالوندای الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام التقنية الطبقية البسيطة للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتراكيز المتباينة من فيتامين C.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السيطرة (المستنبت ايرل لوحده)	المستنبت ايرل + فيتامين C	
			٠.٠٢ ملغم/مل	٠.٠٤ ملغم/مل	٠.٠٦ ملغم/مل
تركيز النطف	a ٥١.٦٠ ±٤.٠٥	b ٦.٩٠ ±٠.٧٥	b ٦.٢٠ ±٠.٧٤	b ٦.١٠ ±٠.٦٩	b ٧.٠ ±٠.٧١
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a ٤٢.٢٠ ±٤.٤٤	b ٧٨.٧٠ ±٥.٨٤	b ٧٦.٧٠ ±٥.٦٥	b ٧٧.٢٠ ±٦.٠٦	b ٧٩.٢٠ ± ٥.٣٥
درجة نشاط النطف	a ٢.١٥ ±٠.٢٤	b ٤.٠٥ ±٠.٣٥	b ٤.٠٥ ±٠.٣٥	b ٤.٠٥ ±٠.٣٥	b ٤.١٥ ±٠.٢٩
النسبة المئوية لعيوشية النطف	a ٧٨.٧٠ ±٥.٠٠	b ٩٣.٧٠ ±١.٧٢	b ٩٣.٢٠ ±١.٥٨	b ٩٣.٧٠ ±١.٧٢	b ٩٢.٣٠ ±١.٥١
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a ٣٩.٦٠ ±٤.٧٦	b ٦.٩٠ ±١.١٣	b ٧.٠ ±١.١٨	b ٦.٥٠ ±٠.٨٧	b ٥.٨٠ ±٠.٨٢
تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية	a ٦.١٠ ±١.٧٠	b ٠.٦٠ ±٠.٤٩	b ٠.٧٠ ±٠.٥٩	b ٠.٦٠ ±٠.٤٩	b ٠.٣٠ ±٠.٣٠
تركيز المالوندای الديهايد مايكرومول/لتر	a ٧.١٥ ±٠.٧٤	a ٦.٦٨ ±٠.٧٥	a ٦.٤٢ ±٠.٦٤	a ٦.٥١ ±٠.٦٩	a ٦.١٢ ±٠.٧٢

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E

عدد العينات =١٠

(P<٠.٠٥) الحروف المتباينة دلالة على المعنوية.

جدول (٣-٨): معالم النطف وتركيز المالوندای الديهايد قبل التنشيط وبعد التنشيط باستخدام التقنية الطبقية البسيطة للمرضى المصابين بوهن النطف باستعمال المستنبت الزرعي ايرل والتراكيز المتباينة من الكلوتاثيونGSH.

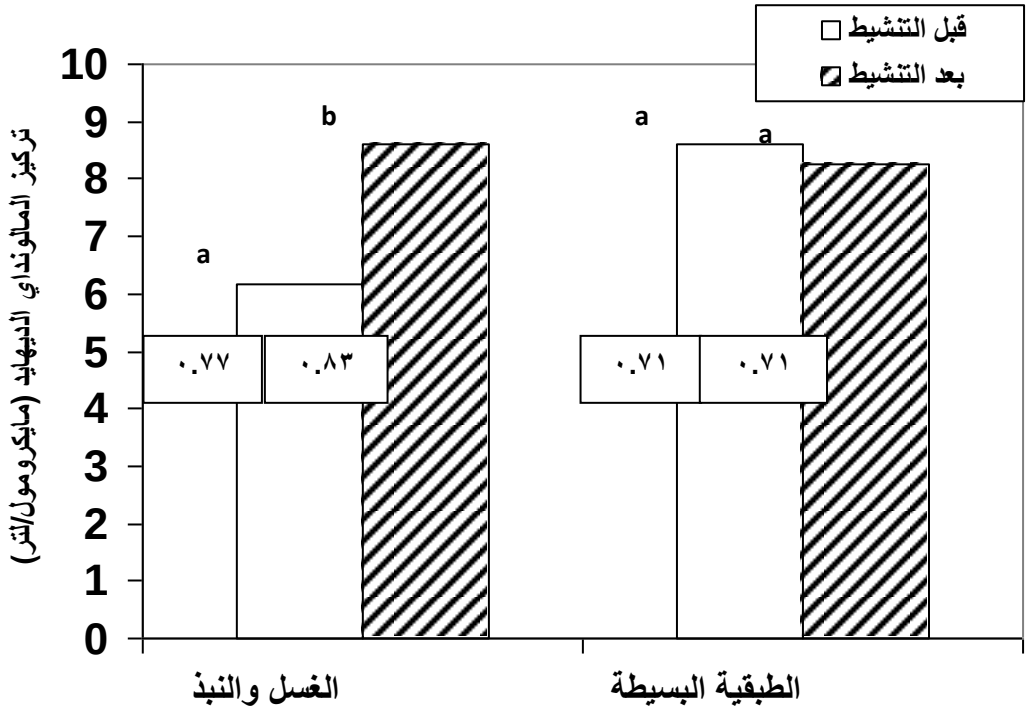
المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السيطرة (المستنبت ايرل لوحده)	المستنبت ايرل + الكلوتاثيون	
			٠.٠٢ ملغم/مل	٠.٠٤ ملغم/مل	٠.٠٦ ملغم/مل

تركيز النطف	a ٥٩.٦٠ ±٨.٠٩	b ٨.١٠ ±١.٠٤	b ٨.٩٠ ±١.٠٧	b ٨.٦٠ ±١.٠٢	b ٩.٥٠ ±١.٠٥
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a ٣٤.٩٠ ±٤.٥٣	b ٧٤.٩٠ ±٥.٨٩	b ٧٥.٣٠ ±٥.٦٦	b ٧٥.٤٠ ±٥.٢٢	b ٧٦.٨٠ ± ٥.٩٧
درجة نشاط النطف	a ١.٩٠ ±٠.٢٧	b ٣.٧٥ ±٠.٣٠	b ٣.٧٠ ±٠.٣٠	b ٣.٨٠ ±٠.٣٠	b ٣.٨٥ ±٠.٣٢
النسبة المئوية لعيوشية النطف	a ٧٢.٠ ±٢.٦٦	b ٩٢.٦٠ ±١.٦٤	b ٩٣.٢٠ ±١.٣٣	b ٩٣.٢٠ ±١.٣٢	b ٩٣.٦٠ ±١.٤٤
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a ٣٨.٥٠ ±٤.٢٨	b ٦.١٠ ±٠.٦٧	b ٦.١٠ ±٠.٦٧	b ٦.٢٠ ±٠.٥٧	b ٥.٦٠ ±٠.٧١
تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية	a ٥.٨٠ ±٠.٩٧	b ٠.٣٠ ±٠.٢١٩	b ٠.٥٠ ±٠.٢٦	b ٠.٦٠ ±٠.٣٣	b ٠.٣٠ ±٠.١٥
تركيز المالونداي الديهايد مايكرومول/لتر	a ٧.١١ ±٠.٨٤	a ٦.٣٨ ±٠.٧٨	a ٦.٢٩ ±٠.٧٢	a ٦.١٠ ±٠.٧٨	a ٦.٢٩ ±٠.٦٨

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E

عدد العينات =١٠

(P<٠.٠٥) الحروف المتباينة دلالة على المعنوية.



شكل (٣-١٧) : يوضح تركيز المالونداي الديهايد MDA قبل التنشيط وبعد التنشيط باستعمال تقنيتي الغسل والنبذ والطبقية البسيطة

b (P<٠.٠٥) فرق معنوي عن قبل التنشيط باستعمال تقنية الغسل والنبذ

الارقام داخل الاعمدة تمثل الخطأ القياسي

الفصل الرابع CHAPTER FOUR

المناقشة Discussion

تضمنت دراسة تأثير إضافة بيروكسيد الهيدروجين لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين لاختيار التركيز الأكثر تأثيراً من بين أربعة تراكيز مضافة واعتماداً على نتائج التحليل الإحصائي، اظهر التركيز ٠.١% زيادة معنوية (P<٠.٠٥) في تركيز المالونداي الديهايد وانخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف لذلك اختير التركيز ٠.١% لهذا الجزء من الدراسة، كما أضيفت

تراكيز متباينة من مضادات الأكسدة المتمثلة بفيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون GSH لعينات السائل المنوي المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٠.١% لغرض اختيار التركيز الامثل من بين تلك التراكيز المتباينة لمضادات الأكسدة. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي انخفاضاً معنوياً (P<٠.٠٥) في تركيز المالوندای الديهايد عند استخدام التركيز ٠.٦ ملغم/مل من فيتامين E والتركيز ٠.٤ ملغم/مل من الكلوتاثيون مقارنة ببيروكسيد الهيدروجين بمفرده ولذلك اختيرت هذه التراكيز للدراسة في حين لم تظهر كافة التراكيز المستخدمة من فيتامين C أي فروق معنوية في تركيز المالوندای الديهايد مقارنة ببيروكسيد الهيدروجين بمفرده لذا كان من الممكن اختيار أي من تلك التراكيز للدراسة وقد اختير التركيز ٠.٤ ملغم/مل.

سببت إضافة بيروكسيد الهيدروجين لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين زيادة معنوية في تركيز المالوندای الديهايد قياساً بالسيطرة المتمثلة بالمحلول الفسيولوجي، وربما يعزى ذلك الى ان إضافة بيروكسيد الهيدروجين الى عينات السائل المنوي سببت زيادة في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة على حساب مستوى مضادات الأكسدة وبالتالي حصلت حالة من عدم التوازن بين مضادات الأكسدة والأنواع الاوكسجينية الفعالة والتي تسمى بالاجهاد التأكسدي وينتج عن هذا الاضطراب في التوازن حصول زيادة في فعالية اكسدة الدهون في السائل المنوي وفي خلايا النطف مما يؤدي الى زيادة في مستوى المالوندای الديهايد كناتج نهائي لعملية أكسدة الدهون. أشارت إحدى الدراسات الى ان التراكيز العالية من بيروكسيد الهيدروجين تحفز اكسدة الدهون في السائل المنوي (Sanocka and Kurpisz, ٢٠٠٤)، كما ذكرت دراسة أخرى ان عملية تحضين النطف البشرية مع بيروكسيد الهيدروجين تسبب انخفاض في كل من انزيم السوبر اوكساید دسميوتيز (SOD) وانزيم الكلوتاثيون بيروكسيديز (GPX) اللذان يعملان على حماية النطف من تأثير فعالية اكسدة الدهون (Griveau *et al.*, ١٩٩٥). تتفق نتائج دراستنا مع ما توصلت اليه دراسة سابقة، حيث لوحظ ارتفاع معنوي في مستوى المالوندای الديهايد بعد تحضين عينات مصل الدم

للمرضى المصابين بأحتشاء العضلة القلبية Myocardial Infraction مع ٠.٥ ملي مول من بيروكسيد الهيدروجين لمدة ١٠ دقائق بدرجة حرارة ٣٧°م (Muslih *et al.*, ٢٠٠٢).

تبين من نتائج الدراسة الحالية لتأثير بيروكسيد الهيدروجين في معالم النطف انخفاض معنوي في كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف بعد تحضين العينات مع بيروكسيد الهيدروجين بتركيز ٠.١%. وربما يعزى هذا الانخفاض في نوعية النطف الى دور بيروكسيد الهيدروجين في زيادة أكسدة الدهون في الغشاء البلازمي للنطف الأمر الذي يسبب زيادة في نفاذية الغشاء البلازمي وعدم السيطرة

على حالة الاستتاب داخل الخلية لخروج الايونات وخصوصاً ايون الكالسيوم الضروري لحركة النطف، إذ تتحسس النطف البشرية للاجهاد التأكسدي نتيجة وجود الأحماض الدهنية غير المشبعة في الغشاء البلازمي ووجود الأواصر المزدوجة في تلك الجزيئات مما يمكن الجذور الحرة من مهاجمتها وبدء عملية الأكسدة للدهون وتجمع بيروكسيدات الدهون في الغشاء البلازمي (Aitken *et al.*, ١٩٩٢). كما ان فقدان وظيفة النطف الناتج من أكسدة الدهون يعكس التأثير السلبي لبيروكسيدات الدهون في نفاذية الغشاء البلازمي وتثبيط فعالية الانزيمات المرتبطة بالغشاء مثل Ca^{+2} / Mg^{+2}-ATPases التي تحافظ على مستوى الكالسيوم في الخلية (Irvine, ١٩٩٦). بالإضافة الى ذلك فان الأنواع الاوكسجينية الفعالة تسبب انخفاضاً في حركة النطف وفقدان الطاقة داخل الخلايا ونقصاناً في جهد الغشاء في المقتدرات Mitochondrial membrane potential (MMP) والذي يؤدي الى انخفاض النسبة المئوية لعيوشية النطف (De Lamirande and Gagnon, ١٩٩٢; Wang *et al.*, ٢٠٠٣). تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه Kovalski وجماعته (١٩٩٢) ان حضن النطف البشرية مع ١٣-acetate (PMA) ١٢-Myristate Phorbol لتحفيز

خلايا الدم البيض العدلة لانتاج الانواع الاوكسجينية الفعالة والتي تؤدي بدورها الى انخفاض حركة النطف بمدة ساعة من الحضن ويعدّ بيروكسيد الهيدروجين وجذور الهايدروكسيل مسؤولة بشكل رئيس عن فقدان الحركة.

بينت نتائج الدراسة الحالية الدور الواضح لمضادات الأكسدة المتمثلة بفيتامين E وفيتامين E+ فيتامين C والكلوتاثيون والبلازما المنوية في حدوث انخفاض معنوي في تركيز المالونداي الديهايد والزيادة المعنوية في كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف عند إضافة تلك المضادات لعينات السائل المنوي المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين وربما يعود السبب في ذلك الى الدور الوقائي لمضادات الأكسدة في تثبيط عملية أكسدة الدهون المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين مما ينتج عنه انخفاض في تركيز المالونداي الديهايد وتحسن واضح في معالم النطف.

لقد أشارت عدة دراسات الى قدرة فيتامين E على تقليل مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة المتولدة نتيجة إضافة بيروكسيد الهيدروجين لعينات السائل المنوي باستعمال تقنية تدرج بيركول إذ يعد فيتامين E من الفيتامينات الذائبة في الدهون لذا يمكن ان ينفذ من خلال الغشاء البلازمي للنطف ويثبط الضرر الناتج من الأنواع الاوكسجينية الفعالة ويحافظ على سلامة الغشاء البلازمي للنطف ويقلل من مستوى المالونداي الديهايد ويسبب زيادة في حركة النطف وقابلية النطف على اختراق اغلفة البيضة (Aitken and Clarkson, ١٩٨٩; Donnelly *et al*., ١٩٩٩). ويؤدي إضافة فيتامين E بتركيز ١٠ ملي مول الى الوسط الزرعي glycerol-test-yolk buffer (TYB) الخاص بتجميد النطف الى زيادة في حركة النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف (Askari *et al*., ١٩٩٤). يشترك فيتامين E وفيتامين C في حماية الدهون من عمليات الأكسدة حيث يعمل فيتامين C على إعادة تشكيل فيتامين E من خلال إعادة ازدواج جذور Tocopheroxyl radicals وبذلك يسمح لفيتامين E بالقيام بوظيفته مرة اخرى كمضاد

للاكسدة لذلك يسبب العمل التآزري لفيتامين C وفيتامين E على منع الضرر التأكسدي للنطـــف

(Buettner, ١٩٩٣).

وأشار Agarwal (٢٠٠٤a) الى ان المزج بين مضادات الأكسدة يكون مفيد جداً في علاج مرضى العقم. كما أظهرت نتائج إحدى الدراسات أن إعطاء مرضى العقم جرعات من فيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون لمدة شهرين من العلاج يسبب تحسناً في معالم النطف وانخفاضاً في تركيز المالونداي الديهايد (Kodama *et al.*, ١٩٩٧). يمتلك الكلوتاثيون دوراً وقائياً لحماية النطف من تأثير زيادة فعالية أكسدة الدهون إذ بينت إحدى الدراسات أن الكلوتاثيون يقلل من مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة ويحافظ على حركة النطف عند إضافته الى النطف المضاف لها الـ PMA المحفز لزيادة الأنواع الاوكسجينية الفعالة (Baker *et al.*, ١٩٩٦). كما ان معاملة مرضى العقم المصابين بالتهابات القناة التناسلية والقيلة الدوالية بالكلوتاثيون يسبب زيادة معنوية في حركة النطف والعيوشية وعدد النطف والشكل السوي للنطف (Lenzi *et al.*, ١٩٩٣). يحتوي السائل المنوي على عدد من مضادات الأكسدة الإنزيمية مثل إنزيم السوبر اوكسايد دسميوتيز (SOD) والكاتليز والكلوتاثيون بيروكسديز (GPX) بالإضافة الى مضادات الأكسدة غير الإنزيمية مثل فيتامين C وفيتامين E والبايروفيت والكلوتاثيون والكارنتين (Saleh and Agarwal, ٢٠٠٢). تعمل مضادات الأكسدة في السائل المنوي على كسح الجذور الحرة وحماية النطف من تأثير الزيادة في الاجهاد التأكسدي (Smith *et al.*, ١٩٩٦). وبذلك فأن انخفاض تركيز المالونداي الديهايد ربما يعود الى الدور الوقائي لمضادات الأكسدة في البلازما المنوية في التقليل من مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة وبالتالي انخفاض تركيز المالونداي الديهايد. وتؤدي البلازما المنوية دوراً في زيادة حركة النطف والعيوشية وذلك كما أشار إليه Kovalski وجماعته (١٩٩٢) حيث أشاروا الى ان البلازما المنوية تحافظ على مستوى حركة النطف وتقلل من مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة عندما تضاف الى النطف المحفزة لزيادة الأنواع الاوكسجينية الفعالة بوساطة الـPMA . بالإضافة الى ذلك

فأن البلازما المنوية تحتوي على مصادر الطاقة المتمثلة بالكلوكوز والفركتوز والبايروفيت الضرورية لبقاء النطف حية إذ تعتمد عيوشية النطف وحركة النطف الناضجة على تلك المصادر وبعض المواد الأخرى من خارج الخلية (Page *et al.*, ١٩٨١).

ان إضافة فيتامين C لعينات السائل المنوي المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين لم تظهر أي فروق معنوية في تركيز المالوندالديهايد ومعالم النطف المدروسة كافة وربما يعزى ذلك الى ان فيتامين C من الفيتامينات الذائبة في الماء ويقلل من عمليات الأكسدة خارج الخلية ويمتلك تأثيراً قليلاً داخل الغشاء أو داخل الخلية (Hammerstedt, ١٩٩٣). وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت إليه إحدى الدراسات حيث لوحظ ان تجميد النطف البشرية لفترة طويلة يسبب انخفاضاً من ٥٠-٦٠% في النسبة المئوية للنطف المتحركة ويعود ذلك الى دور التجميد في تثبيط عمل الجهاز الإنزيمي داخل النطف الذي يعمل على معادلة الأنواع الاوكسجينية الفعالة وعند إضافة فيتامين C للعينات المجمدة لم يفلح في المحافظة على معالم النطف المتمثلة بالنسبة المئوية لحركة النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف من تأثير عمليات التجميد (Askari *et al.*, ١٩٩٤).

ان عدم حصول فروق معنوية في كل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية بعد إضافة بيروكسيد الهيدروجين بمفرده أو مع مضادات الأكسدة لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين، قد تعود الى حقيقة مفادها ان بيروكسيد الهيدروجين أو مضادات الأكسدة تؤثر في الصفات النوعية للسائل المنوي التي تشمل حركة النطف ودرجة نشاط النطف والعيوشية ولا تؤثر في الصفات الكمية التي تشمل عدد النطف وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية والنسبة المئوية للنطف غير السوية.

تنخفض وظيفة النطف عند زيادة فعالية أكسدة الدهون في غشاء النطف الناتجة من الزيادة الحاصلة في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة (Aitken *et al.*, ١٩٩٣). وتعد الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة مصادر لعملية الابتداء في أكسدة الدهون لذا اصبح من الضروري تقييم احد أشكال الدهون والمتمثل

بالكولسترول الكلي في المني البشري. سببت إضافة بيروكسيد الهيدروجين بمفرده لعينات السائل المنوي في دراستنا الحالية انخفاضاً معنوياً في تركيز الكولسترول الكلي وربما يعزى ذلك الانخفاض الى دور بيروكسيد الهيدروجين في زيادة فعالية أكسدة الدهون الذي ينتج عنها انخفاض في تركيز الكولسترول الكلي والدهون الأخرى إذ يعد اختزال الكولسترول الكلي في الغشاء الخلوي للنطف خطوة حاسمة في حدوث عملية التمكين ويؤدي الى انخفاض نسبة الكولسترول/الدهون المفسفرة وهذا بدوره يؤدي الى تغير استقرارية الغشاء وجعله أكثر نفاذية (Hoshi *et al.*, ١٩٩٠).

كما أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية في تركيز البروتين الكلي بعد إضافة بيروكسيد الهيدروجين بمفرده أو مع مضادات الأكسدة لعينات السائل المنوي للاشخاص الخصيبين. تشير بعض الدراسات الى ان زيادة الأنواع الاوكسجينية الفعالة يؤدي الى زيادة في مستوى البروتين في السائل المنوي إذ بينت إحدى الدراسات حصول زيادة معنوية في مستوى البروتين الكلي عند تحضين عينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين والمصابين بوهن النطف لمدة ساعتين وثلاث ساعات (الجبوري، ٢٠٠٤). وفي دراسة أخرى لمقارنة تركيز البروتين الكلي في السائل المنوي للأشخاص الخصيبين والمصابين بقلة النطف لوحظ زيادة غير معنوية في تركيز البروتين الكلي للأشخاص المصابين بقلة النطف مقارنة بالأشخاص الخصيبين (Gregoire and Moran, ١٩٧٣). كما أشار Mann (١٩٦٤) الى ان النطف ربما تحرر الإنزيمات الداخلية في حالة تحطم الغشاء الخلوي للنطف بوساطة النبذ السريع أو تغير في تركيب هذا الغشاء بوساطة فعل الجذور الحرة في أثناء مدة الخزن مما يؤدي الى زيادة في تركيز الإنزيمات في السائل المنوي إضافة إلى ذلك فأن إزالة الكولسترول بفعل الجذور الحرة يسبب عدم ثبات الغشاء الخلوي للنطف مما يؤدي إلى هجرة البروتينات الضرورية لعمليتي التمكين والجسيم الطرفي (Nolan and Hammerstedt, ١٩٩٧). وتتفق ما أشارت إليه الدراسات أعلاه مع نتائج دراستنا الحالية إذ سببت إضافة بيروكسيد الهيدروجين لعينات السائل المنوي زيادة غير معنوية في تركيز البروتين الكلي وهذا ربما يعود الى ان زيادة فعالية أكسدة الدهون

تغير من نفاذية الغشاء البلازمي للنطف الأمر الذي يؤدي الى تسرب الإنزيمات أو البروتينات داخل الخلية الى البلازما المنوية.

بينت نتائج دراستنا زيادة معنوية في مستوى المالونداي الديهايد في البلازما المنوية لمرضى العقم المصابين بوهن النطف وقلة النطف وتشوه النطف وموات النطف مقارنة بالأشخاص الخصيبين والمصابين باللانطفية وربما يعزى ذلك الى وجود النطف الواهنة وغير الناضجة وكريات الدم البيض والخلايا البلعمية والنطف ذات الشكل غير السوي في القناة التكاثرية والسائل المنوي لمرضى العقم والتي تسبب زيادة في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة وكناتج نهائي لعملية أكسدة الدهون تزداد المالونداي الديهايد في البلازما المنوية لمرضى العقم في حين يمتلك الأشخاص الخصيبين نطفاً سوية وعدداً قليلاً من كريات الدم البيض والخلايا البلعمية والتي تنتج كميات قليلة من الجذور الحرة كذلك الأشخاص المصابين باللانطفية حيث لا يمتلكون نطفاً في سائلهم المنوي إذ أشارت إحدى الدراسات إلى أن المستويات المرتفعة من الأنواع الاوكسجينية الفعالة تشير الى وجود كريات الدم البيض والخلايا البلعمية أو وجود نطف واهنة وغير ناضجة (Novotny *et al.*, ٢٠٠٣). وأشارت دراسة أخرى إلى أن الأنواع الاوكسجينية الفعالة تزداد في حالة الاشخاص المصابين بتشوه النطف وخلال مراحل تطور النطف ويكون أعلى مستوى للأنواع الاوكسجينية الفعالة في الأجزاء التي تحتوي على نطف مصابة بتشوه الرأس والنطف غير الناضجة (Gil-Guzman *et al.*, ٢٠٠١). كما ذكر Baker وجماعته (٢٠٠٣) ان النطف غير الناضجة والنطف غير السوية ذات القطيرات الهيولية تنتج مستويات عالية من الأنواع الاوكسجينية الفعالة، كما ان وجود القطيرة الهيولية التي تكون على شكل جزيئة دائرية متصلة بالقطعة الوسطية يدل على خلل في نضج النطف في البربخ أو بسبب الدفق المتكرر (Acosta *et al.*, ١٩٨٨).

ان موات النطف قد ينتج من مرور النطف أو خزنها في البربخ وتعرف هذه الحالة بموت النطف البربخي Epididymal necrozoospermia ويحدث نتيجة للعوامل

المحيطية غير الملائمة التي تتعرض لها النطف في أثناء مرورها أو خزنها في البربخ والتي ربما تعود الى الإنزيمات الحالة التي تفرزها القطيرات الهيولية أو ارتفاع حرارة كيس الصفن التي تؤثر في ذيل البربخ بصورة كبيرة (Kretser *et al.*, ١٩٩٨; Mallidis *et al.*, ٢٠٠٠). كما لوحظ ارتفاع مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة في البلازما المنوية لمرضى العقم المصابين بوهن النطف وقلة النطف وتشوه النطف وابيضاض المني والمصابين بمتلازمة OAT مقارنة بالأشخاص الخصيبين والأشخاص المصابين باللانطفية (Momen *et al.*, ١٩٩٩; Novotny *et al.*, ٢٠٠٣). لقد لوحظ زيادة مستوى المالونداي الديهايد وفعالية البروتين كاينيز في مرضى العقم المصابين بقلة النطف (Huszar and Vigue, ١٩٩٤). وأشارت دراسة أخرى الى ان عينة السائل المنوي للأشخاص المصابين بوهن النطف تحتوي على نسبة عالية من المالونداي الديهايد مقارنة بعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين (Suleiman *et al.*, ١٩٩٦). كما يمكن ان تعزى الزيادة في مستويات المالونداي الديهايد لمرضى العقم الى انخفاض في مستوى مضادات الأكسدة في القناة التناسلية الأمر الذي يجعل مستويات الأنواع الاوكسجينية أعلى. أما بالنسبة للأشخاص الخصيبين فهناك ميكانيكية دفاع ضد الجذور الحرة لحماية النطف تتواجد داخل خلايا النطف وخارجها وتحمي النطف من الجهد التأكسدي الناشئ في مرحلة نشأة النطفة وخلال خزن النطف في البربخ وبعد القذف (Ahotupa and Huntaniemi, ١٩٩٢).

وتوصلت إحدى الدراسات إلى أن ٤٠% من عينات السائل المنوي للأشخاص المصابين بالعقم تحتوي على مستويات عالية من الأنواع الاوكسجينية الفعالة على العكس من الأشخاص الخصيبين والمصابين باللانطفية لم تلاحظ تلك المستويات العالية في سائلهم المنوي (Iwasaki and Gagnon, ١٩٩٢). اوضحت الدراسة الحالية العلاقة بين مستوى المالونداي الديهايد ومعالم النطف المتمثلة بتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية

وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية حيث لوحظ وجود علاقة عكسية بين تركيز المالونداي الديهايد وكل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والنسبة المئوية لعيوشية النطف أي ان الزيادة الحاصلة في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة تسبب انخفاضاً في تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة والنسبة المئوية لعيوشية النطف وربما يعود السبب في ذلك الى ان زيادة الاجهاد التأكسدي يسبب ضرراً للـ DNA ويسرع من عملية Apoptosis في الخلايا المولدة والذي يؤدي الى اختزال في المراحل المبكرة لنشأة النطفة مما ينتج عنها انخفاض في عدد النطف (Kodama *et al.*, ١٩٩٧; Agarwal *et al.*, ٢٠٠٣).

تعمل الأنواع الاوكسجينية الفعالة على تحفيز عملية أكسدة الدهون في الغشاء البلازمي للنطف وتسبب انخفاضاً في حركة النطف بسبب أحداث الضرر لتركيب المحور (Saleh and Agarwal, ٢٠٠٢). كما تسبب التراكيز العالية من بيروكسيد الهيدروجين زيادة في فعالية اكسدة الدهون وموت النطف (Sanocka and Kurpisz, ٢٠٠٤). ويعود ذلك الى دور الجذور الحرة في التأثير في وظيفة المتقدرات حيث لوحظ في إحدى الدراسات أن هناك اختلافاً معنوياً في جهد الغشاء البلازمي للمتقدرات MMP للنطف ذات الحركة التقدمية والنطف الأقل حركة وقد يكون من أسباب قلة جهد الغشاء البلازمي للمتقدرات هي تحسس جينوم المتقدرات الى الهجوم من الجذور الحرة (John *et al.*, ٢٠٠٠). بالاضافة الى ذلك فأن عيوشية النطف ترتبط ارتباطاً مباشراً بفعالية انزيم ATP ase . $Ca^{+٢}$ حيث تنخفض فعالية الأخير بزيادة مدة التحضين التي ترافق عادة بزيادة مستوى الجذور الحرة والتي تؤدي الى التأثير في عيوشية النطف (Engel *et al.*, ١٩٩٩; Khanduja *et al.*, ٢٠٠١).

أما بالنسبة لتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية والنسبة المئوية للنطف غير السوية فقد بينت نتائج الدراسة علاقة طردية بين تلك المعالم وتركيز المالونداي الديهايد

حيث أشارت إحدى الدراسات إلى أن الاجهاد التأكسدي يحدث في مرضى العقم بوجود عدد قليل من كريات الدم البيض والخلايا البلعمية ويتراوح بين ٠.٥-١ ×١٠^٦/مل ويزداد الجهد التأكسدي مع زيادة عدد كريات الدم البيض (Sharma *et al.*, ٢٠٠١). وأشارت دراسات أخرى الى ان حالة تشوه النطف تحدث بسبب الاضطراب الحاصل في نشأة النطفة وينتج عنه الشكل غير السوي للنطف والذي يعزز إنتاج الأنواع الاوكسجينية الفعالة من النطف عن طريقة ميكانيكية داخلية، تتعلق بأنزيم Glucose-٦-phosphate dehydrogenase (Aitken, ١٩٩٩; Agarwal and Said, ٢٠٠٤).

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت إليه دراسات سابقة حيث ذكرت احدى الدراسات ان هناك علاقة عكسية بين مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة وتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة وعلاقة طردية مع الشكل غير السوي للنطف (Agarwal *et al.*, ١٩٩٤). وبينت دراسات أخرى وجود علاقة طردية بين مستوى الأنواع الأوكسجينية الفعالة وتركيز كريات الدم البيض والنطف غير المتحركة (Iwasaki and Gagnon, ١٩٩٢; Mazzilli *et al.*, ١٩٩٤; Dabit *et al.*, ١٩٩٧).

أظهرت نتائج تنشيط النطف الواهنة باستعمال المستنبت ايرل وبتقنيتي الغسل والنبذ والطبقية البسيطة تحسناً معنوياً في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف مقارنة بقيمها قبل التنشيط وهذه النتيجة تتفق مع ما توصلت إليه دراسات سابقة، فقد أشارت أحدى الدراسات إلى أن تنشيط نطف المرضى المصابين بوهن النطف المعتدل والحاد باستعمال التقنية الطبقية البسيطة وتقنية الغسل والنبذ قد سببت زيادة معنوية في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف (الحربي، ٢٠٠٢). ويعزى التحسن المعنوي في حركة ونشاط النطف الى استخدام المستنبت ايرل عند إجراء التنشيط خارج الجسم الحي حيث يحتوي المستنبت ايرل على ايونات عديدة مثل الصوديوم والبايروفيت والمغنسيوم والكالسيوم والبيكاربونات والتي تعمل كمصادر للطاقة إضافة الى عملها على تحفيز عملية التمكين التي يتنج عنها زيادة في حركة النطف ونشاطها

(Al-Taee, ١٩٩٤). وهذا ما أكده الهادي (١٩٩٧) حيث ذكر ان لاستخدام المستنبت ايرل والمستنبت هام أف-١٠ الأثر في الزيادة المعنوية للنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف، كما يعمل البايروفيت على زيادة النسبة المئوية لعيوشية النطف (Lahansteiner *et al.*, ١٩٩٩). ويعد وجود ايونات الكالسيوم ضرورياً لحركة النطف حيث يلاحظ وجود علاقة طردية بين تركيز الكالسيوم وحركة النطف فقد لوحظ بأن إضافة الكالسيوم بشكل كلوريد الكالسيوم بتركيز ١ ملي مول الى المستنبت الزرعي هام آف-١٠ سبب زيادة معنوية في النسبة المئوية لحركة النطف ودرجة نشاط النطف (Fakih *et al.*, ١٩٨٦). أما البيكاربونات فتعمل على السيطرة على حركة النطف من خلال زيادة استهلاك الاوكسجين (Okamura *et al.*, ١٩٨٥). أما إضافة مصل الدم أو الالبومين البشري الى المستنبت فانه يقلل من التأثير المؤذي لقوة النبذ على حركة النطف حيث والتي تعمل على تحطيم غشاء النطف وتسرب المواد الحية خارجها بينما يعمل مصل الدم بتغطية جزيئاته للغشاء الخلوي للنطف التي ينتج عنها منع حدوث تحطم غشاء النطف المغسولة (Makler and Jakobi, ١٩٨١). ويستخدم الألبومين في عمليات تنشيط النطف لكونه يعمل مضاداً للأكسدة حيث يجهز مجاميع الثايول Thiol groups الضرورية لفعالية مضادات الأكسدة (Ernster, ١٩٩٣). أظهرت نتائج دراستنا زيادة معنوية في النسبة المئوية لعيوشية النطف باستعمال المستنبت ايرل وبالتقنيتين الغسل والنبذ والطبقية البسيطة مقارنة بقيمها قبل التنشيط وقد تعزى الزيادة في النسبة المئوية لعيوشية النطف الى ان فحص عينات التنشيط يتم في الجزء الأعلى من المستنبت حيث يكون مستوى الجذور الحرة اقل مقارنة بالطبقات السفلى للحبيبات النطفية (Henkel and Schill, ٢٠٠٣).

وتتفق نتائج دراستنا مع ما توصلت إليه دراسات سابقة حيث أشار الجبوري (٢٠٠٤) الى حدوث زيادة معنوية في النسبة المئوية لعيوشية النطف عند استعمال المستنبت هام آف-١٠ مقارنة بقيمها قبل التنشيط.

بينت نتائج الدراسة الحالية انخفاضاً معنوياً في تركيز النطف المسترجعة باستعمال تقنيتي الغسل والنبذ والطبقية البسيطة باستعمال المستنبت ايرل مقارنة بقيمها قبل التنشيط وهذا يتفق مع ما توصلت إليه دراسات سابقة (الجراح، ٢٠٠٢؛ الهادي، ١٩٩٧)، حيث أشاروا إلى أن تقنية الغسل والنبذ تعمل على تقليل عدد النطف المسترجعة وربما يعود السبب في ذلك الى بقاء النطف الميتة والنطف غير المتحركة في الحبيبية النطفية المترسبة وعدم قدرتها على الصعود الى الجزء الاعلى من المستنبت (Check *et al.*, ١٩٩٣). كما أشار السلطاني (١٩٩٧) الى ان تقنية الطبقية البسيطة تعمل على اختزال تركيز النطف المسترجعة وربما يعود السبب الى بقاء النطف غير المتحركة والميتة في قعر أنبوبة الاختبار لذلك فأن النطف ذات السرعة الجيدة تكون وحدها قادرة على السباحة خلال عمود المستنبت (Harris *et al.*, ١٩٨١; Stovall *et al.*, ١٩٩٤). يعد شكل النطف احد معالم النطف المهمة لحدوث الاخصاب (Mahadevan and Trounson, ١٩٨٤).

ويرتبط معدل الإخصاب والحمل ارتباطاً وثيقاً بالشكل السوي للنطف حيث يقل معدل الإخصاب عندما تكون النسبة المئوية للنطف السوية مساوية او اقل من ١٤% (Kruger *et al.*, ١٩٨٨). وقد بينت نتائج دراستنا الحالية انخفاضاً معنوياً في النسبة المئوية للنطف غير السوية باستعمال تقنيتي الغسل والنبذ والطبقية البسيطة مقارنة بقيمها قبل التنشيط وربما يعزى ذلك الى ان النطف السوية هي التي تستطيع الصعود الى الجزء الأعلى من المستنبت حيث يتم الفحص وعادة تكون مستويات الأنواع الاوكسجينية الفعالة اقل مقارنة بالحبيبة النطفية حيث تستقر الخلايا الواهنة وذات الشكل غير السوي (Henkel and Schill, ٢٠٠٣). وتتفق الدراسة الحالية مع ما توصلت إليه دراسة سابقة إذ أشار الحربي (٢٠٠٢) الى ان استعمال المستنبت ايرل وبالتقنيتين الغسل والنبذ والطبقية البسيطة لتنشيط نطف المرض المصابين بوهن النطف الحاد والمعتدل يقلل من النسبة المئوية للنطف غير السوية. أدى استخدام تقنيتي الغسل والنبذ والطبقية البسيطة في دراستنا الحالية الى اختزال تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية مقارنة بتركيزها في العينات

الأصلية وربما يعود الاختزال الحاصل في تركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية باستعمال تقنية الطبقية البسيطة الى بقاء هذه الخلايا في قعر الأنبوبة لكونها غير متحركة ولا يمكنها الوصول للأعلى ولا توجد قوة تساعدها على السباحة خلال عمود المستنبت فتعمل قوة جاذبية الأرض على بقائها في قعر الأنبوبة وأشار Harris وجماعته (١٩٨١) الى ان الزيادة الحاصلة في النسبة المئوية للنطف المتحركة باستخدام التقنية الطبقية البسيطة تعود الى إزالة كريات الدم البيض والخلايا البلعمية والنطف غير المتحركة. وينتج عن اختزال كريات الدم البيض اختزال الاجهاد التأكسدي. (Shekarriz *et al.,* ١٩٩٥).

بينت الدراسة الحالية الدور الواضح لجهاز النبذ في زيادة مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة حيث أظهرت النتائج زيادة معنوية في مستوى المالوندای الديهايد باستعمال تقنية الغسل والنبذ مقارنة بقيمها قبل التنشيط في حين لم تلاحظ فروق معنوية في مستوى المالوندای الديهايد عند استخدام التقنية الطبقية البسيطة مقارنة بقيمها قبل التنشيط وربما يعزى ذلك الى تأثير عملية نبذ عينات السائل المنوي في نفاذية غشاء النطف وزيادة مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة، كما إن إزالة البلازما المنوية يعني إزالة مضادات الأكسدة الموجودة في البلازما المنوية وبالتالي تؤدي تلك العوامل الى 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. بينما عند استعمال التقنية الطبقية البسيطة فأن البلازما المنوية لا تزال وكما معروف فأن البلازما المنوية تحوي مضادات الأكسدة والتي بدورها تعمل على كبح فعل الأنواع الاوكسجينية الفعالة. وتتفق نتائج دراستنا مع ما توصلت إليه Twigg وجماعته (١٩٩٨) حيث لاحظوا زيادة معنوية في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة باستعمال تقنية الغسل والنبذ مقارنة بقيمها قبل التنشيط، في حين لاحظوا انخفاض غير معنوي في مستوى الانواع الاوكسجينية الفعالة عند استعمال التقنية الطبقية البسيطة مقارنة بقيمها قبل التنشيط. كما بينت الدراسة انخفاضاً معنوياً في فعالية مضادات الأكسدة مقارنة بالعينات الأصلية وذلك يعود الى إزالة البلازما المنوية وعمليات النبذ المركزي لعينات السائل المنوي. بالإضافة الى ذلك فأن عملية النبذ لعينات السائل المنوي تنشط

كريات الدم البيض بتركيز اقل من ١×١٠٦/كرية لإنتاج الأنواع الاوكسجينية الفعالة حيث ان لكريات الدم البيض القابلية على تكوين اوكسيد النتريك NO الذي يقلل من حركة النطف (Shekarriz *et al.*, ١٩٩٥). ان اضافة N-G monomethyl- L arginine المثبط لتكوين اوكسيد النتريك في تنشيط النطف باستعمال تقنية الغسل والنبذ أدى الى تحسين النسبة المئوية للنطف المتحركة وهذا ما يؤكد تكوين اوكسيد النتريك من النطف نفسها علاوة على الخلايا البلعمية (Perera *et al.*, ١٩٩٦). وأشارت دراسة أخرى إلى أن عمليات النبذ لعينات السائل المنوي تسبب زيادة في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة الناتجة من الحبيبة النطفية وكريات الدم البيض (Aitken and Clarkson, ١٩٨٩).

تنخفض نسبة النطف المتحركة عند إجراء عملية النبذ لعينات السائل المنوي ويعود ذلك الى التأثير المباشر لعمليات النبذ في غشاء النطف أو نتيجة الزيادة الحاصلة في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة (Aitken and Clarkson, ١٩٨٩; Mortimer, ١٩٩١; Alvarez *et al.*, ١٩٩٣). كما لوحظ من نتائج دراستنا انخفاض معنوي في تركيز المالوندالديهايد عند إضافة فيتامين E بتركيز ٠.٠٦ ملغم/مل والكلوتاثيون بتركيز ٠.٠٤ ملغم/مل الى المستنبت ايرل وباستخدام تقنية الغسل والنبذ مقارنة بالمستنبت ايرل لوحده ويعود ذلك الى دور فيتامين E والكلوتاثيون في تثبيط فعالية أكسدة الدهون والحفاظ على المستوى الطبيعي لحركة النطف، حيث أشارت بعض الدراسات الى ان عملية النبذ لعينات السائل المنوي تسبب ضرراً كبيراً للنطف وتؤدي الى إنتاج الأنواع الاوكسجينية الفعالة ويتم تجنب ذلك الضرر بإضافة مضادات الأكسدة الى المستنبت الزرعي (Aitken and Clarkson, ١٩٨٩). أو باستخدام البلازما المنوية نفسها (Twigg *et al.*, ١٩٩٨).

وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت إليه دراسات سابقة إذ توصلت إحدى الدراسات الى قدرة فيتامين E على تثبيط فعالية أكسدة الدهون المحفزة بوساطة بيروكسيد الهيدروجين

المضاف الى النطف البشرية باستعمال تقنية تدرج بيركول (Donnelly *et al.*, ١٩٩٩). كما أشارت دراسة أخرى إلى أن إضافة فيتامين E الى عينات السائل المنوي باستعمال تقنية تدرج بيركول يسبب انخفاضاً معنوياً في مستوى المالونداي الديهايد وزيادة معنوية في قدرة النطف على اختراق اغلفة البيضة (Aitken and Clarkson, ١٩٨٩). وبينت دراسة أخرى دور الكلوتاثيون في زيادة النسبة المئوية للنطف المتحركة لمرضى العقم المصابين بابيضاض المني باستعمال تقنية الغسل والنبذ مقارنة بقيمها عند استخدام محلول التنشيط Tyrode's solution لوحده في حين لم تظهر النتائج أي فروق معنوية عند استعمال التقنية الطبقية البسيطة (Gandini *et al.*, ١٩٩٣). كما ذكر Lenzi وجماعته (٢٠٠٠) ان الكلوتاثيون يحافظ على حركة النطف في الحبيبة النطفية من تأثير الزيادة في مستوى الأنواع الاوكسجينية الفعالة الناتجة من النطف المتضررة أو كريات الدم البيض.

المصادر باللغة العربية

الجبوري، عقيل حنظل (٢٠٠٤). استعمال الاندروجينات في تنشيط النطف البشرية في الزجاج. رسالة ماجستير، كلية العلوم/جامعة بابل.

الجراح، ابتسام عباس ناصر (٢٠٠٢). دراسة تأثير استخدام بعض الهرمونات في تنشيط النطف في الزجاج للمرضى المصابين بوهن النطف. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل.

الجليلي، محمود (١٩٧٨). المعجم الطبي الموحد، الطبعة الثانية. مطبعة المجمع العلمي العراقي. بغداد.

الحربي، نهى يعرب محسن (٢٠٠٢). دراسة لمقارنة تقنيات تنشيط النطف في الزجاج لمرضى العقم المصابين بقلة ووهن النطف. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل.

الراوي، خاشع الراوي. (٢٠٠٠). مدخل الى الاحصاء، الطبعة الثانية، كلية الزراعة والغابات. جامعة الموصل.

السلطاني، يحيى (١٩٩٧). تنشيط النطف خارج الجسم لمرضى العقم المصابين بقلة النطف وابيضاض المني باستخدام المستنبتات الزرعية والهرمونات المحرضة للقند، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم-جامعة بغداد

السلطاني، يحيى (٢٠٠٥). قاموس الغدد الصم والتناسل، الطبعة الاولى. مطبعة الضياء للطباعة والتصميم، النجف.

الهادي، فارس ناجي عبود (١٩٩٧). استخدام التقنية المزدوجة الترسيبية في تنشيط مرضى العقم المصابين بوهن النطف. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بغداد.

برنوطي، رمزي (١٩٩٣). المني البشري والعقم. الطبعة الاولى، مطبعة الشركة الوطنية للتوزيع والنشر. بغداد.

كايتون. (١٩٩٧). الفسيولوجيا الطبية والفسيولوجيا المرضية، العدد الثالث، ترجمة حسان احمد قيحة، المركز التقني المعاصر، ابن النفيس.

المصادر باللغة الانكليزية

Abou-Shakra, F.R.; Ward, N.I. and Everand, D.M. (١٩٨٩). The role of trace element in male infertility. Fertile. Steril, ٥٢: ٣٠٧-٣١٠.

Acosta, A.A.; Oehninger, S.;, Morshedi, M.; Swanson, R.J.; Scott, R. and Irvianni, F. (١٩٨٨). Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of the male factor. Obstet. and Glynecol. Survey: ١-١٨.

Acosta, A.A.; Vem, J.V.; Mayer, J.F.; Stercker, J.F.; Swanson, R.J.; Pleban, P.; Yuan, J.; Chllick, C. and Brugos, S. (١٩٨٦). Estimation of the male fertility by examination and testing of spermatozoa in: *In vitro* Fertilization. Jones, H.W.; Jones, G.S.; Hodgen, G.D. and Rosenwaks, Z. (eds.). William and Wilkins. Los Angeles, P: ١٢٦-١٥٦.

Agarwal, A. (٢٠٠٤ a). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive BioMedicine online, ٨: ٦١٦-٦٢٧.

Agarwal, A. (٢٠٠٤b). Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testic size, fertile.steril. ٨٢: ١٦٨٤-١٦٨٦.

Agarwal, A.; Ikemoto, I. and Loughlin, K.R. (١٩٩٤). Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. J. Urol., ١٥٢: ١٠٧-١١٠.

Agarwal, A. and Said, T.M. (٢٠٠٣). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human reproduction Update; ٢: ٣٣١-٣٤٥.

Agarwal, A. and Said, T.M. (٢٠٠٤). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach BJN. INT, ٩٥:٥٠٣-٥٠٧.

Agarwal, A.; Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. (٢٠٠٣). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertile. Steril., ٧٩: ٨٢٩-٨٤٣.

Agarwal, Y.P. and Vanha-Perttula, T. (١٩٨٨). Glutathione, L-glutamic acid and gamma-glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. International. J. Androl., ١١: ١٢٣-١٣١.

Ahotupa, M. and Huhtaniemi, I. (١٩٩٢). Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. Bio. Reprod., ٤٦: ١١١٤-١١١٨.

Aitken, R.J. (١٩٩٥). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reprod. Fertil. Dev., ٧: ٦٥٩-٦٦٨.

Aitken, R.J. (١٩٩٩). The Amoroso lecture. The human spermatozoon: a cell in crisis. J. Reprod. Fertil., ١١٥: ١-٧.

Aitken, R.J.; Best, D.; Richardson, D.W.; Schats, R. and Simm, G. (١٩٨٣). Influence of caffeine on movement characteristics fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. J. Reprod. Fertil., ٦٧:١٩-٢٧.

Aitken, R.J.; Buckingham, D. and Harkiss, D. (١٩٩٣). Use of axanthin oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. J. Reprod. Fertile., ٩٧:٤٤١-٤٥٠.

Aitken, R.J.; Buckingham, D.; West, K. (١٩٩٢). Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. J. reprod. Fertile., ٩٤: ٤٥١-٤٦٢.

Aitken, R.J. and Clarkson, J.S. (١٩٨٩). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J. Androl., ٩ (٦): ٣٦٧-٣٧٦.

Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. and Fishel, S. (١٩٨٩). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Bio. Repro., ٤١: ١٨٣-١٩٧.

Aitken, R.J.; Gordon, E.; Harkiss, D. (١٩٩٨). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Bio. Reprod., ٥٩: ١٠٣٧-١٠٤٦.

Aitken, R.J.; Paterson, M.; Fisher, H.; Buckingham, D.W. and Van Duin, M. (١٩٩٥). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. J. Cell. Sci., ١٠٨: ٢٠١٧-٢٠٢٥.

Aitken, R.J. and West, K.M. (١٩٩٠). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on percoll gradients. Int. J. Androl., ١٣: ٤٣٣-٤٥١.

Allen, R.G. and Tresini, M. (٢٠٠٠). Oxidative stress and gene regulation. Free Radic. Boil. Med., ٢٨:٤٦٣-٤٩٩.

Al-Nimer, M.S.; Al-M-Muslih, R.K. and Al-Zamely, O.M.Y. (٢٠٠١). A novel detection of allantion as important marker of oxidative stress in the serum of patient with acute myocardial infection. National. J. Chem., ٤: ٦٩٦-٧٠٧.

Al-Taee, H.A.J. (١٩٩٤). 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.; Lasso, J.L.; Blasco, L.; Nunez, R.C.; Heyner, S. Caballero, P.P. and Storey, B. (١٩٩٣). Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up produce without centrifugation extends their motile lifetime. Fertile. Steril., ٥٧:٤٠٩.

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (١٩٨٢). Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa, Bio. Reprod., ٢٧: ١١٠٢-١١٠٨.

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (١٩٨٤). Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. Bio. Reprod., ٣٠: ٣٢٣-٣٣٢.

Alvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L. and Story, B.T. (١٩٨٧). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J. Androl., ٨: ٣٣٨-٣٤٨.

Askari, H.A.; Check, J.H.; Peymer, N. (١٩٩٤). Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of

sperm activity during freeze-thaw process. Arch. Androl., ٣٣: ١١-١٥.

Bagchi, K. and Puri, S. (١٩٩٨). Free radicals and antioxidants in health and disease. La Revue desant de to mediterranee, ٤ (٢): ٣٥٠-٣٦٠: (Review).

Baitch, J.A.; Bedaiwy, M.A.; Pasqualotto, E.B.; Hendin, B.N.; Hallak, J.; Falcone, J.; Baffoe, G. and Faucher. G. (٢٠٠١). Varicocelectomy improves intrauterine in semination success rates in men with varicocele, J. Urol., ١٦٥: ١٥١٠-١٥١٣.

Baker, H.W.; Brindle, J.; Irvine, D.S.; Krutskikh, A. and Aitken, R.J. (١٩٩٦). Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. Fertile. Steril., ٦٥:٤١١-٤١٩.

Baker, M.A.; Krutskikh, A. and Aitken, R.J. (٢٠٠٣). Biochemistry entities involved in reactive oxygen species generation by human spermatozoa. Protoplasma, ٢٢١: ١٤٥-١٥١.

Bhardwaj, M.; Verma, A.; Majumdor, J.; Khanduja, K.L. (٢٠٠٠). Status of vitamin E and reduced glutathione in semen of oligospermia and a zoospermia. Asian. J. Androl., ٢: ٢٢٥-٢٢٨.

Biswas, S.; Ferguson, K.M.; Sedroska, J.; Baffoe, G.; Mansfieldm, M.D. and Kosbab, M.H. (١٩٧٨). Fructose and hormone levels in

semen: Their correlation with sperm count and motility. Fertile. Steril., ٣٠: ٢٠٠-٢٠٤.

Blackwell, J. and Zaneveld, L.J.D. (١٩٩٢). Effect of abstinence on sperm acrosin, hypo osmotic swelling and other semen variables. Fertile. Steril., ٥٨: ٧٩٨-٨٠٢.

Bleau, G.; Lamarbe, J.; Faucher, G.; Roberts, K.D. and Chapeleaine, A. (١٩٨٤). Semen selenium and human fertility. Fertile. Steril., ٥١: ٨٩٠-٨٩٤.

Bolle, P.; Evandri, M.G. and Saso, L. (٢٠٠٢). The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. Contraception, ٦٥: ٣١٣-٣١٥.

Buettner, G.R. (١٩٩٣). The pecking order of free radicals and antioxidants lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. Arch. Biochem. Biophysi., ٣٠٠:٥٣٥-٥٤٣.

Caldamone, A.; Emilson, L.B.V.; Juburi, A. and Cockett, A.T.K. (١٩٨٠). Prostatitis: prostatic secretory dysfunction affecting fertility. Fertile. Steril., ٣٤: ٦٠٢-٦٠٣.

Calvin, H.I.; Cooper, G.W. and Wallace, E.W. (١٩٨١). Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteinrerich structural proteins of the mitochondrial capsule. Gamete. Res., ٤: ١٣٩-١٤٥.

Cederberg, J. (٢٠٠١). Oxidative stress, antioxidantive defecne and outcome of gestation in experimental diabetes pregnancy. M.S.Sci. Thesis. Uppsla Un. Sweden.

Chance, B.; Sies, H. and Boveris, A. (١٩٧٩). Hydroperoxide metabolism in mammalian organ. Physiol. Revi., ٥٩: ٥٢٧-٦٠٥.

Check, J.M.; Zovas, P.M.; Katsoff, D. and Kiefer, D. (١٩٩٣). Effect of percoll discontinous density gradient via saphadex G. Sco gel filteration in sperm (medline) Tohoku. J. Exp. Mead., ١٦٩: ٢٢٥-٢٣١.

Chen, G.W.; Zheng, S.; Wu, Y.L.; Qian, X.M.; Leng, J.; and Cao, X.R.; (١٩٩٨). The study of relationship between seminal leukocyte and sperm function. Chin. J. Androl., ١٢: ٨٢-٨٥.

Church, D.F. and Pryor, W.A. (١٩٩٠). Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health perspec., ٨٧: ٩٧٤١-٩٧٤٥.

Cohen, J.; Edward, R.C.; Fehilly, C.; Fishel, C.; S.; Hewitt, J.; Purdy, J.; Roland, G.; Steptoe, P. and Webster, J. (١٩٨٥). *In Vitro* fertilization: a treatment for male infertility. Fertile. Steril., ٤٣: ٤٢٢-٤٣٢.

Comhaire, F.H.; Christophe, A.B.; Zalata, A.A.; Teter, M. and Gagnon, C. (٢٠٠٠). The effect of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in

subfertile men. Prostaglandins, leukotrienes. Essential fatty acids, ٦٣: ١٥٩-١٦٥.

Cooke, J. P. and Tsao, p.s. (١٩٩٣). Cytoprotective effect of NO-circulation, ٨٨: ٢٤٢١-٢٤٥٧.

Crister, J.K.; Huse-Benda, A.R.; Aaker, D.V. and Iwasaki, A. (١٩٨٨). Cryopreservation of human spermatozoa. The effect of cryoprotectants on motility. Fertile. Steril., ٥٠: ٣١٤-٣٢٠.

Dabit, I.S.; Taher, M.; Khahfeh, A.F.; Sarraf, M. and Dabit, S.S. (١٩٩٧). Importance and effect of reactive oxygen species in male infertility. Abst. ٤th annual meeting of the middle East, Fertility Society. Dubai UAE. ٢٧: ١٧.

Daunter, B.R.; Hill, J.; Hennessey and Mackay, E. V. (١٩٨١). Preliminary report: a possible mechanism for the liquefaction of human seminal plasma and its relationship to spermatozoa motility. Andrologia, ١٣: ١٣١-١٤١.

Dawson, E.B.; Harris, W.A.; Teter, M.C.; Bhardwaj, A. and Verma, A. (١٩٩٢). Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. Fertile. Steril., ٥٨: ١٠٣٤-١٠٣٩. (cited by agarwal, ٢٠٠٤a).

De Lamirande, E. and Gagnon, C. (١٩٩٢). Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes, and II. Depletion of

adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J. Androl., ١٣: ٣٦٨-٣٨٦.

De Lamirande, E. and Gagnon, C. (١٩٩٣). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. Int. J. Andro., ١٦: ٢١-٢٥.

De Lamirande, E. and Gagnon, C. (١٩٩٥). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: abalancing act between beneficial and detrimental effects. Hum. Reprod., ١٠: ١٥-٢١.

De Lamirande, E.; Leduc, B.E.; Iwasaki, A. ; Hassouna, M.; Gagnon, C. (١٩٩٥). Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. Fertil. Steril., ٦٣: ٦٣٧-٦٤٢.

Donnelly, E.T.; McClure, N. and Lewis, S.E. (١٩٩٩). The effect of ascorbate and alph-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. Mutagenesis, ١٤: ٥٠٥-٥١٢.

Eckardstein, S.V.; Cooper, T.G.; Rutsch, K.; Meschede, D.; Horst, J. and Nieschlag, E. (٢٠٠٠). Seminal plasma characterizatics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance requlator (cFTR) gene mutation in men with obstructive a zoospemia. Fertile. Steril., ٧٣: ١٢٢٦-١٢٣١.

Edwadh, M.J. (١٩٩٠). The involvement of thiols in er cells toxicity. Ph. D Thesis, University of Cardiff.

Eiss, M.; Schieferstein, G. and Wahi, R. (٢٠٠٠). Oxalate in human seminal plasma: a possible significance and problem of determination. Fertile. Steril., ٧٣: ٩٦١-٩٦٦.

Engel, S.; Schreiner, I. and Petzoldt, R. (١٩٩٩). Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintaince of progression sperm motility. Andrologia, ٣١(١): ١٧-٢٥.

Ernster, L. (١٩٩٣). Lipid peroxidation in biological membrances: mechanisms and implications. In: Active oxygen lipid peroxides and antioxidants. Ed. Yagi K, CRC press, Boca Raton, ١-٣٨ (Cited by Sikka, ١٩٩٦).

Fair, W.; Cllark, R.B. and Wehner, N. (١٩٧٢). A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human. Fertile. Steril., ٢٣: ٣٨-٤٢.

Fakih, H.; Malclusky, N.; Decherney, A.; Walliman, T. and Huszar, G. (١٩٨٦). Enhancement of human sperm motility and velocity in vitro: effect of calcium and creatine phosphate. Fertile. Steril., ٤٦: ٩٣٨-٩٤٤.

Fraga, C.G.; Motchnik, P.A.; Wyrobeck, A.J.; Rempel, D.M. and Ames, B.N. (١٩٩٦). Smoking and low antioxidant levels increase

oxidative damage to sperm DNA . Mutation. Res., ٣٥١: ١٩٩-٢٠٣.

Gagnon, C.; Iwasaki, A.; De Lamirand, E. and Kovalski, N. (١٩٩١). Reactive oxygen species and human spermatozoa. Ann. N.Y. Acad. Sci., ٦٣٧: ٤٣٦-٤٤٤.

Gandini, L.; Lenzi, A.; Lombardo, F. Dondero, F. (١٩٩٣). Glutathione: In vitro effects on human spermatozoa. In: Neuroendocrine and Intragonal regulation of testicular function. Ed. Marrama, P. (Cited by Sikka, ١٩٩٦).

Garner, D.L. and Hafez, E.S.E. (١٩٨٠). Spermatozoa. In: Reproduction in farm animals. Hafez, E.S.E (ed.) ٤th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, p: ١٨٩-٢٠١.

Garret, C.; Liu, D.Y. and Baker, H.W.G. (١٩٩٧). Selectively of human sperm-zona pellucida binding sperm head morphology. Fertile. Steril., ٦٧: ٣٦٢-٣٧١.

Gil-Guzman, E.G.; Ollero, M.; Lopez, M.C. and Sharma, R.K. (٢٠٠١). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum. Reprod., ١٦: ١٩٢٢-١٩٣٠.

Gomes, E.; Gano, I.P.; Amoroco, B.; Landeras, J.; Ballecteros, A. and Pellicer, A. (٢٠٠٠). Effect of injected spermatozoa

morphology on outcome of intracytoplasmic sperm injection in human. Fertile. Steril., ٧٤: ٨٤٢-٨٤٣.

Gonzales, G.F.; Kortebani, G. and Mazzolli, A.B. (١٩٩٢). Leukocytospermia and function of seminal quality. Fertile. Steril., ٥٧: ١٠٥٨-١٠٦٥.

Gottlieb, C.; Svanbory, K.; Eneroth, P. and Bygdeman, M. (١٩٨٨). Effect of prostaglandin on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphophate content. Fertile. Steril., ٤٩: ٣٢٢-٣٢٧.

Gregoire, A.I. and Moran, M.J. (١٩٧٣). The enzyme activating, protein and fructose content of normal, oligospermia, postvasectomy and infertile a zoospermia men. Fertile. Steril., ٢٤ (٣): ٢٠٨-٢١١.

Griveau, J.F.; Dumon, E.; Renard, P.; Callegar, J.P. and Le Lannou, D. (١٩٩٥). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. J. Reprod. Fertile., ١٠٣: ١٧-٢٦.

Griveau, J.F.; LeLannou, D. (١٩٩٧). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. International Journal of Andrology, ٢٠: ٦١-٦٩.

Grootoled, M.; Henderson, E.B. and Farell, A. (١٩٩١). Damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid exercise of the inflamed rheumatoid arthritis. Biochem. J., ٢٣٢٧: ٤٥٩-٤٦٥.

Guerin, J.F.; BenAli, H.; Rollet, J.; Souchier, C. and Czyba, J.C. (١٩٨٦). A-Glucosidase as a specific epididymal enzyme marker. Its validity for the etiologic diagnosis of a zoospermia. J. Androl., ٧: ١٥٦-١٦٢.

Halliwell, B. (١٩٩٤). Free radicals, antioxidant and disease: Curiosity, cause or sequence ; ٣٤٤: ٧٢١-٧٢٤.

Halliwell, B. (١٩٩٧). Antioxidants: the basic-what the how to evaluate then. Adv. Pharmacol., ٣٨: ٣-١٦.

Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (١٩٩٠). Free radicals biology and medicine, ٢nd ed., Clarendo press, Oxford.

Hammerstedt, R.H. (١٩٩٣). Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation. A review of the effect on design of storge preservation systems. Reprod. Fertile. Dev., ٥: ٦٥٧-٦٩٠.

Harris, S.J.; Milligan, M.P.; Masson, G.M. and Dennis, K. J. (١٩٨١). Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH). Fertil. Steril., ٣٦: ٢١٩-٢٢١.

Henkel, R.R. and Schill, W. (٢٠٠٣). Sperm preparation for ART. Reprod. Biology. Endrocrin., ١: ١٠٨.

Hertz, F. and Cloarec, A. (١٩٨٩). Pharmacology of free radicals . life Sci., ٣٤: ٧١٣-٧٣١.

Hinting, A. (١٩٨٩). Method of semen analysis in: Assessment of human sperm fertilizing ability. Ph. D. thesis, University of Mishigan.

Homonnai, Z.; Matzkin, H.; Faiman, N. ; Pas, G. and Kraicer, P. (١٩٧٨). The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. Fertile. Steril., ٢٩: ٥٣٩-٥٤٢.

Hoshi, K.; Yanaigde, K.; Yoshimastu, M. and Sato, A. (١٩٩٠). Variation in the cholesterol/phospholipids ratio in human spermatozoa and its relation with capacitation. Human. Reproduction, ٥: ٧١-٧٤.

Huszar, G. and Vigue, L. (١٩٩٤). Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. J. Androl., ١٥: ٧١-٧٧.

Irvine, D.S. (١٩٩٦). Glutathione as a treatment for male infertility. Reviews. Reprod., ١: ٦-١٢.

Iwasaki, A. and Gagnon, C. (١٩٩٢). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertile. Steril., ٥٧: ٤٠٩.

Jacob, R.A. and Burri, B.J. (١٩٩٦). Oxidative damage and Am. J. Clin. Nutr., ٦٣: ٩٨٥٥-٩٨٦١.

Jialal, I. and Devaraj, S. (١٩٩٦). Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: clinical biochemistry prespective. Clin. Chem., ٤٢ (٤): ٤٩٨-٥٠٦.

John, J.C.S.; Sakkas, D.; Barratt, C.Z.R. (٢٠٠٠). Role of mitochondrial DNA and sperm survival. J. Androl., ٢١ (٢): ١٥٩-١٩٨.

Khanduja, K.L.; Verma, A. and Bhardwaj, A. (٢٠٠١). Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. Anderologia (Abst.).

Kobayashi, T.; Miyazaki, T.; Natori, M.; Skinner, D.; Sun, J. and Burri, B. (١٩٩١). Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. Hum. Reprod., ٦: ٩٨٧-٩٩١.

Kodama, H.; Yamaguchi, R.; Fukuda, J. *et al*. (١٩٩٧). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertile. Steril., ٦٨: ٥١٩-٥٢٤.

Koksal, I.T.; Tefekli, A.; Usta, M.; Erol, H.; Abbasoglu, S. and Kadioglu, A. (٢٠٠٠). The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. B. J. U. Int., ٨٦: ٥٤٩-٥٥٢.

Koppenol, W.; Moreno, J.; Pryor, W.; Ischiropoulos, H. and Beckman, J.S. (١٩٩٢). Peroxynitrite, acloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. Chemical. Res. In Toxicol., ٥: ٨٣٤-٨٤٢.

Kovalski, N.N.; De Lamirande, E. and Gagnon, C. (١٩٩٢). Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. Fertile. Steril., ٥٨: ٨٠٩-٨١٦.

Kretser, D.M.; Huidobro, C.; Southwick, G.J. and Smith, T.P.D. (١٩٩٨). The role of the epididymis in human infertility. J. Reprod. Fertil. Suppl., ٥٣: ٢٧١-٢٧٥. (Abstr.).

Kruger, T.F.; Acosta, A.; Simmons, K.F.; Swanson, R.J.; Matta, J.F. and Oehniger, S. (١٩٨٨). Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertile. Steril., ٤٩: ١١٢-١١٧.

Kurpisz, M.; Miesel, R.; Sanoka, D. and Jedrzeic, Z. (١٩٩٦). Seminal plasma can be predictive factor for male infertility. Human reproduction, ١١: ٢٢٣-١٢٢٦.

Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Weismann, T. (١٩٩٩). Sperm metabolism of the telost fishes chalcaburnus chalcaoides and

oncarhynchus mykiss and its relation to motility and viability. J. Exper. Zoology, ٢٨٤ (٤): ٤٥٤-٤٦٥.

Lenzi, A.; Gandini, L.; Picardon, M.; Tramer, F.; Sandri, G. and Panfili, E. (٢٠٠٠). Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapics. Front. Biosci., ٥: ١-١٥.

Lenzi, A.; Gluasso, F.; Gandini, L.; Lombardo, F. and Dondero, F. (١٩٩٣). Placebo controlled, double blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. Human. Reprod., ٨: ١٦٥٧-١٦٦٢.

Lenzi, A.; Picardo, M.; Gandini, L.; Lombardo, F.; Terminali, O.; Passi, S. and Dondero, F. (١٩٩٤). Glutathione treatment of dyspermia effect on the lipoperoxidation process. Hum. Reprod., ٩: ٢٠٤٤-٢٠٥٠.

Lewin, A. and Lavon, H. (١٩٩٧). The effect of Coenzyme $Q_{١٠}$ on sperm motility and function. Mol. Asp. Med., ١٨: ٢١٣-٢١٩.

Lewis, S.E.; Boyle, P.M.; Mckinney, K.A.; Young, I. S. and Thompson, W. (١٩٩٥). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertile. Steril., ٦٤: ٨٦٨-٨٧٠.

Lewis, S.E.; Sterling, E.S.; Young, I.S. and Thompson, W. (١٩٩٧). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal

plasma in fertile and infertile men. Fertile. Steril., ٦٧: ١٤٢-١٤٧.

Lopes, S.; Jurisicova, A.; Sun, J.G.; Ross, T. and Sabatini, L. (١٩٩٨). Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Human reproduction, ١٣: ٨٩٦-٩٠٠.

Madipati, K.P. and Marunet, L.J. (١٩٨٧). Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. J. Biol. Chem., ٢٦٢: ١٧٣٩٨-١٧٤٠٤.

Mahadevan, M.M. and Trounson, A.O. (١٩٨٤). Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. Fertile. Steril., ٤٠: ٢٨٧-٢٩٣.

Makler, A. and Jakobi, P. (١٩٨١). Factors affecting sperm motility washing and resuspension of human spermatozoa in various artificial media. Fertile. Steril., ٣٥: ٤٤٢-٤٤٦.

Mallidis, C.; Lim, T.C.; Hill, S.T.; Skinner, D.J.; Brown, D.J.; Johnston, W.I.H. and Baker, H.W.G. (٢٠٠٠). Necrospermia and chronic spinal cord injury. Fertile. Steril., ٧٤: ٢٢١-٢٢٧.

Mann, T. (١٩٦٤). The biochemistry of semen and the male reproductive tract. Physiol. Rev., ٣١: ٢٧-٣١- cited in: Kzeer, D.C. (١٩٩٠). Some biochemical change in human seminal fluid

in relation to sperm counts. Msc. Thesis, College of Medicine, University of Baghdad.

Marmar, J.; Katz, S.; Praiss, D.E. and Debedictis, J. (١٩٧٥). Semen Zinc level in infertile and postvasectomy patient and patient with prostatitis. Fertile. Steril., ٢٦: ١٠٥٧-١٠٦٣.

Mazilli, F.; Ress, B.; Marchesini, M.; Ronconti, C. and Dondero, F. (١٩٩٤). Superoxide in human semen related to seminal parameters and leucocytes. Fertile. Steril., ٦٢: ٨٦٢-٨٦٨.

Mazzilli, F.; Rossi, T.; Sabatini, L.; Miyazaki and Skinner, D. (١٩٩٥). Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species production. Acta. Europea. Fertilitatis, ٢٦: ١٤٥-١٤٨.

McLaughlin, R.H.; Raham, J.K. and Nolan, J.P. (١٩٩٢). Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. Reprod. Fertile., ٩٥: ٥٢٧.

Meister, A. and Anderson, M.E. (١٩٨٣). Glutathione. Ann. Rev. Biochem., ٥٢: ٧١١-٧٦٠.

Momen, M.N.; EL-Khodary, M.; Mostafa, T. and Abu Yossef, H. (١٩٩٩). Total antioxidants status in infertile males with leukocytospermia. Middle East Fertility Society. J., ٤: ٢١٥-٢٢١.

Moncada, S. and Higgs, A. (١٩٩٣). The L-Arginine Nitric oxide pathway.

Mortimer, D. (١٩٩٠). Semen analysis and sperm washing techniques. In: control of sperm motility: Biological clinical Aspects Edited by: Gagnon, C. CRC press, Boca Raton F١: ٢٦٣-٢٨٤.

Mortimer, D. (١٩٩١). Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. Hum. Reprod., ٦: ١٧٣.

Mortimer, D.; Goel, N. and Shu, M.A. (١٩٨٨). Evaluation of the cell soft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. Fertile. Steril., ٥٠: ٩٦٠-٩٦٨.

Mostafa, T.; Anis, T.H.; El-Nashar, A.; Imam, H. and Othman, I.A. (٢٠٠١). Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. Int. J. Androl., ٢٤: ٢٦١-٢٦٥.

Munzel, T.; Sayegh, H. and Freeman, B.A. (١٩٩٥). Evidence for enhanced O_2 production in nitrate tolerance. J. Clin. Inves., ٩٥٤: ١٨٧-١٩٣.

Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A. and Rodwen, V.W. (١٩٩٣). Harper's biochemistry. ٢٣ ed. Edn.; prentice-Hall International Inc., USA; Pp. ٥١:٢٣٢.

Muslih, R.K.; AL-Nimer, M.S. and AL-Zamely, O.M. (٢٠٠٢). The level of malondialdehyde after activation with (H_2O_2) and ($CuSO_4$) and inhibition by desferoxamine and molsidomine in the serum of patients with acute myocardial infarction. National Journal of Chemistry, ٥: ١٣٩-١٤٨.

Nolan, J.P. and Hammerstedt, R.H. (١٩٩٧). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. Faseb. J., ١١: ٦٧٠-٦٨٠.

Novotny, J.; Oborna, I.; Brezinova, J. ; Svobodova, M.; Hrbac, J. and Fingerova, H.(٢٠٠٣). The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. Biomed., ١٤٧: ١٧٣-١٧٦.

Okamura, N.; Tajina, Y. ; Soejina, A.; Masuda, H. and Sugita, Y. (١٩٨٥). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulate the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. Fertile. Steril., ٢٦٠: ٩٦٩٩-٩٧٠٥.

Orlando, C.; Caldini, A.L.; Barni, T.; Wood, W.G.; Strasburger, C.J.; Natali, A.; Maver, A.; Forti, G. and Serio, M. (١٩٨٥). Ceruloplasim and transferin in human seminal plasma: are they an index of seminiferous tubular function. Fertile. Steril., ٤٣: ٢٩٠-٢٩٣.

Page, E.W.; Villec, C.A. and Ville, D.B. (١٩٨١). Spermatozoa, fertilization, fertility and stertility, in human reproduction essential of reproductive and perinatal media, pay, E.W.; Wille, C.A. and Ville, D.B. (eds), W.B. Saunders company, Philadelphia.

Pasqualotto, F.F.; Sharma, R.K. and Nelson, D.R. (٢٠٠٠). Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertile. Steril., ٧٣: ٤٥٩-٤٦٤.

Pereea, D.M.D.; Katz, M.; Heenbanda, S.R. and Marchant, S. (١٩٩٦). Nitric oxide synthase inhibitor NG-monomethyl-L-arginine preserves sperm motility after swim-up. Fertile. Steril., ٦٦: ٨٣٠-٨٣٣.

Perry, A.C.; Jones, R.; Niang, L.S.; Jackson, R.M. and Hall. (١٩٩٢). Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxides whose transcript dose not contain a selenocysteine codon.

Phadke, A.M.; Samant, N.R. and Deral, S.D. (١٩٧٣). Significance of seminal fructose studies in male infertility. Fertile. Steril., ٢٤: ٨٩٤-٩٠٣.

Philipp, E.E. and Carruthers, G.B. (١٩٨٥). Biochemistry of semen. In: Ibnfertility. Philipp, E.E. and Caauthers, G.B. (eds.). William, London, p: ٢٠١-٢٠٢.

Pou, S. and Rosen, G.M. (١٩٩٠). Spin-trapping of superoxide by ٥,٥-dimethyl-L-pyrroline N-oxide: Application to isolated purfused organ. Anal. Biochemistry, ٣٢١: ٣٢٥٠-٣٢٥٦.

Rajasekaran, M.; Hellstrom, W.J. and Sikka, S.C. (١٩٩٦). Quantitative assessment of cytokinase (GRO- and IL-١٠) in human seminal plasma during genitourinary inflammation. Am. J. Reprod. Immune., ٣٦: in pres. (cited by Sikka, ١٩٩٦).

Rajasekaran, M.; Hellstrom, W.J.; Naz, R.K. and Sikka, S.C. (١٩٩٥). Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. Fertil. Steril., ٦٤: ١٦٦-١٧١.

Ramadan, A.; Saleh, M.D.; Agarwal, A.; Rakesh, K.; Sharma, David, R. and Nelson, M.S. (٢٠٠٢). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. Fertile. Steril., ٧٨ (٣): ٤٩١-٤٩٩.

Riche, J.P; Skowronski, L.; Abraham, R. and Leytzinger, Y. (١٩٩٦). Blood glutathione concentration in agrge-scale human study. Clinical. Chemistry., ٤٢: ٦٤-٧٠.

Rimm, E.B.; Stampfer, M.J.; Ascherio, A. and Willeth, W.C. (١٩٩٣). Vitamine E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N. Eng. J. Med., ٣٢٨: ١٤٥٠-١٤٥٧.

Robberchi, W.; Sapp, P.; and Viaane, M.K., (١٩٩٤). Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amytrophic lateral sclerosis. J. Neuro. Chem.., ٦٢: ٣٨٤-٣٨٧.

Saleh, R.A. and Agarwal, A. (٢٠٠٢). Oxidative and male infertility: From research bench to clinical practice. J. Androl., ٢٣: ٧٣٧-٧٥٢.

Sanocka, D.; Kurpisz, M. (٢٠٠٤). Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod. Biol. Endocrinol., ٢: ١٢-٢٥.

Sarahan, T.P.; Prior, P.; Lancashire, R.J.; Faux, S.P.; Hulten, M.A.; and Peck, I.M. (١٩٩٧). Childhood cancer and parental use of tobacco. Deaths from ١٩٧١ to ١٩٧٦. Br. J. Cancer, ٧٦: ١٥٢٥١٥٣١.

Saran, M. and Bors, W. (١٩٨٩). Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. Free Radic. Res. Commun., ٧: ٢١٣-٢٢٠.

Schmidt-Nielson, K. (١٩٩٧). Animal physiology: adaptation and environment. ٥th ed., Cambridge Univ. press, pp. ٣٧٩.

Scott, R.; Macpherson, A.; Yates, R.W. and; Faux, S. (١٩٩٨). The effect

of oral selenium supplementation on human sperm motility. British. J. Urology, ٨٢: ٧٦-٨٠.

Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R.; Thomas, J.R. and Agarwal, A. (٢٠٠١). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. J. Androl., ٢٢ (٤): ٥٧٥-٥٨٣.

Shekarriz, M.; Sharma, R.K.; Thomas, A.J. and Agarwal, A. (١٩٩٥). Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen, J. Assist. Reprod. Genet., ١٢: ٧٠-٧٤.

Shibahara, H.; Burkan, L.J. ; Isojima, S. and Alexander, N.J. (١٩٩٣). Effect of sperm immobilizing antibodies on sperm zona pellucida tight binding. Fertile. Steril., ٦٠: ٥٣٣-٥٣٩.

Sies, H. (١٩٩٧). Antioxidants in disease mechanisms and therapy advance in pharmacology. San Diego. Academic press, ٣٨: ٧٠٧.

Sikka, S.C. (١٩٩٦). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm functional. Fron. Bioscience, ١: ٧٨-٨٦.

Sikka, S.C. (٢٠٠٤). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. Journal of Andrology., ٢٥: ٥-١٨.

Smith, R.; Vantman, D.; Ponce, J.; Escobar, J. and Lissi, E. (١٩٩٦). Total antioxidants capacity of human seminal plasma. Hum. Reprod., ١١: ١٦٥٥-١٦٦٠.

Stovall, D.W.; Guzick, D.S.; Berga, S.L.; Krasnow, J.S. and Zelenik, A.J. (١٩٩٤). Sperm recovery and survival: Two tests that predict in vitro fertilization outcome. Fertile. Steril., ٦٧: ٥٤٢-٥٤٧.

Sueldo, C.E.; Berger, T.; Kletzly, O. and Marss, R.P. (١٩٨٥). Seminal prolactin concentration and sperm reproduction capacity. Fertile. Steril., ٤٣: ٦٣٢-٦٣٥.

Suleiman, S.A.; Ali, M.E.; Zak, Z.M.; Elmalik, E.M. and Nasr, M.A. (١٩٩٦). Lipid peroxidation and human sperm motility: Protective role of vitamin E. J. Androl., ١٧: ٥٣٠-٥٣٧.

Tea, N.T.; Jondet, M. and Scholler, R. (١٩٨٤). A migration-gravity sedimentation method for collecting motile spermatozoa from human semen. In: In vitro fertilization embryo transfer and early pregnancy edited by: Harrison, R.F.; Bonnar, J.; Thompson, W.; MTP press Ltd, and Laqncaster., ١١٧-١٢٠.

Tucker, K.E. and Jansen, C.A.M. (٢٠٠٢). Sperm separation techniques: comparison and evalution of gradient products. In: Proceedings ٢nd International for embrologists: Troubleshooting activities in the ART Lab. Ed. R. Basuray and Mortimer, D. (in press).

Twigg, J.; Irvine, D.S.; Houston, P.; Fulton, N.; Michael, L. and Aitken , R.J. (١٩٩٨). Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: Protective significance of seminal plasma. Mol. Hum. Reprod., ٤: ٤٣٩-٤٤٥.

Valance, P.; Collier, I. and Monocada, S. (١٩٨٩). Effect of endothelium-derived no on peripheral arteriolar tone in man. Lancet, ١١: ٩٩٧-١٠٠١.

Varley, H.; Gowenlock, A.H. and Bell, M. (١٩٨٠). Practical clinical biochemistry: general topics and commoner tests. ٥th ed., vol. ١, W.H.M. Books Ltd. London, pp. ٤٦٥-٤٦٦.

Verma, A. and Kanwar, K.C. (١٩٩٩). Effect of vitamin E on human sperm and lipid peroxidation in vitro. Asian. J. Androl., ١: ١٥١-١٥٤.

Vicari, E. and Calogero, A.E. (٢٠٠١). Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostate-vesiculo-epididymitis. Human Reproduction, ١٦: ٢٣٣٨-٢٣٤٢.

Viljoen, M.H.; Bornman, M.S.; Vander Merwe, M.P. and Duplessis, J. (١٩٩٠). Alpha-glucosidase activity and sperm motility. Androl., ٢٢: ٢٠٥-٢٠٨.

Vine, M.F.; Tse, C.K.; Hu, P.C. and Truong, K.Y. (١٩٩٦). Cigarette smoking and semen quality. Fertile. Steril., ٦٥: ٨٣٥-٨٤٢.

Wang, X.; Sharma, R.K.; Gupta, A.; George, V.; Thomas, A.J.; Falcone, T. and Agarwal, A. (٢٠٠٣). Alteration in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. Fertile. Steril., ٨٠: ٨٤٤-٨٥٠.

Wiseman, H. and Haliwell, B. (١٩٩٦). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen role inflammatory disease and progression to cancer. Biochem. J., ٣١٣: ١٤-٢١.

World Health Organization (WHO). (١٩٩٣). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. ٣rd ed. New York. Cambridge university press. Cambridge.

World Health Organization (WHO). (١٩٩٩). Laboratory manual for examination of human semen and cervical mucus interaction. ٤th ed. Cambridge: university press.

World Health Organization WHO (١٩٩٢). Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. ٣rd edn. Cambridge University press, Cambridge.

Zakowski, J.H.; Forestrom, J.W.; Condell, R.A. and Tappal, A.L. (١٩٧٨). Attachment of seleno-cysteine in the catalytic site of GSH-PX., Biochem. Biophys. Res. Comm., ٨٩: ٢٤٨-٢٥٥.

المصادر باللغة الإنكليزية:-

Abou-Shakra, F.R.; Ward, N.I. & Everand, D.M. (١٩٨٩). The role of trace element in male infertility. Fertile. Steril, ٥٢: ٣٠٧-٣١٠.

Acosta, A.A.; Oehninger, S.;, Morshedi, M.; Swanson, R.J.; Scott, R. & Irvianni, F. (١٩٨٨). Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of the male factor. Obstet. & Glynecol. Survey: ١-١٨.

Acosta, A.A.; Vem, J.V.; Mayer, J.F.; Stercker, J.F.; Swanson, R.J.; Pleban, P.; Yuan, J.; Chllick, C. & Brugos, S. (١٩٨٦). Estimation of the male fertility by examination and testing of spermatozoa in: *In vitro* Fertilization. Jones, H.W.; Jones, G.S.; Hodgen, G.D. & Rosenwaks, Z. (eds.). William & Wilkins. Los Angeles, P: ١٢٦-١٥٦.

Agarwal, A. & Said, T.M. (٢٠٠٣). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Human reproduction Update; ٢: ٣٣١-٣٤٥.

Agarwal, A. & Said, T.M. (٢٠٠٤). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach BJN. INT, ٩٥:٥٠٣-٥٠٧.

Agarwal, A. (٢٠٠٤ a). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reproductive BioMedicine online, ٨: ٦١٦-٦٢٧.

Agarwal, A. (٢٠٠٤). Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testic size, ٨٢: ١٦٨٤-١٦٨٦.

Agarwal, A.; Ikemoto, I. & Loughlin, K.R. (١٩٩٤). Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. J. Urol., ١٥٢: ١٠٧-١١٠.

Agarwal, A.; Saleh, R.A. & Bedaiwy, M.A. (٢٠٠٣). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertile. Steril., ٧٩: ٨٢٩-٨٤٣.

Agarwal, Y.P. & Vanha-Perttula, T. (١٩٨٨). Glutathione, L-glutamic acid and gamma-glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. International. J. Androl., ١١: ١٢٣-١٣١.

Ahotupa, M. & Huhtaniemi, I. (١٩٩٢). Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. Bio. Reprod., ٤٦: ١١١٤-١١١٨.

Aitken, R.J. & Clarkson, J.S. (١٩٨٨). Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J. Androl., ٩ (٦): ٣٦٧-٣٧٦.

Aitken, R.J. & West, K.M. (١٩٩٠). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte

infiltration in fractions of human semen separated on percoll gradients. Int. J. Androl., ١٣: ٤٣٣-٤٥١.

Aitken, R.J. (١٩٩٥). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reprod. Fertil. Dev., ٧: ٦٥٩-٦٦٨.

Aitken, R.J. (١٩٩٩). The Amoroso lecture. The human spermatozoon: a cell in crisis. J. Reprod. Fertil., ١١٥: ١-٧.

Aitken, R.J.; Best, D.; Richardson, D.W.; Schats, R. & Simm, G. (١٩٨٣). Influence of caffeine on movement characteristics fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. J. Reprod. Fertil., ٦٧:١٩-٢٧.

Aitken, R.J.; Buckingham, D. & Harkiss, D. (١٩٩٣). Use of axanthin oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. J. Reprod. Fertile., ٩٧:٤٤١-٤٥٠.

Aitken, R.J.; Buckingham, D.; West, K. (١٩٩٢). Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. J. reprod. Fertile., ٩٤: ٤٥١-٤٦٢.

Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. & Fishel, S. (١٩٨٩). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Bio. Repro., ٤١: ١٨٣-١٩٧.

Aitken, R.J.; Gordon, E.; Harkiss, D. (١٩٩٨). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Bio. Reprod., ٥٩: ١٠٣٧-١٠٤٦.

Aitken, R.J.; Paterson, M.; Fisher, H.; Buckingham, D.W. & Van Duin, M. (١٩٩٥). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. J. Cell. Sci., ١٠٨: ٢٠١٧-٢٠٢٥.

Allen, R.G. & Tresini, M. (٢٠٠٠). Oxidative stress and gene regulation. Free Radic. Boil. Med., ٢٨:٤٦٣-٤٩٩.

Al-Nimer, M.S.; Al-M-Muslih, R.K. & Al-Zamely, O.M.Y. (٢٠٠١). A novel detection of allantion as important marker of oxidative stress in the serum of patient with acute myocardial infection. National. J. Chem., ٤: ٦٩٦-٧٠٧.

Al-Taee, H.A.J. (١٩٩٤). 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 & Storey, ١٩٨٢

Alvarez & Storey, ١٩٨٤

Alvarez, J.G.; Lasso, J.L.; Blasco, L.; Nunez, R.C.; Heyner, S. Caballero, P.P. & Storey, B. (١٩٩٣). Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up produce without centrifugation extends their motile lifetime. Fertile. Steril., ٥٧:٤٠٩.

Alvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L. & Story, B.T. (١٩٨٧). Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J. Androl., ٨: ٣٣٨-٣٤٨.

Askari, H.A.; Check, J.H.; Peymer, N. (١٩٩٤). Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. Arch. Androl., ٣٣: ١١-١٥.

Bagchi, K. & Puri, S. (١٩٩٨). Free radicals and antioxidants in health and disease. La Revue desant de to mediterranee, ٤ (٢): ٣٥٠-٣٦٠: (Review).

Baitch, J.A.; Bedaiwy, M.A.; Pasqualotto, E.B.; Hendin, B.N.; Hallak, J.; Falcone, J. et al., (٢٠٠١). Varicocelectomy improves intrauterine in semination success rates in men with varicocele, J. Urol., ١٦٥: ١٥١٠-١٥١٣.

Baker, H.W.; Brindle, J.; Irvine, D.S. et al., (١٩٩٦). Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. Fertile. Steril., ٦٥: ٤١١-٤١٩.

Baker, M.A.; Krutskikh, A. & Aitken, R.J. (٢٠٠٣). Biochemistry entities involved in reactive oxygen species generation by human spermatozoa. Protoplasma, ٢٢١: ١٤٥-١٥١.

Bhardwaj, M.; Verma, A.; Majumdor, J.; Khanduja, K.L. (٢٠٠٠). Status of vitamin E and reduced glutathione in semen of oligospermia & a zoospermia. Asian. J. Androl., ٢: ٢٢٥-٢٢٨.

Biswas, S.; Ferguson, K.M.; Sedroska, J.; Baffoe, G. ; Mansfieldm, M.D. & Kosbab, M.H. (١٩٧٨). Fructose and hormone levels in semen: Their correlation with sperm count and motility. Fertile. Steril., ٣٠: ٢٠٠-٢٠٤.

Blackwell, J. & Zaneveld, L.J.D. (١٩٩٢). Effect of abstinence on sperm acrosin, hypo osmotic swelling and other semen variables. Fertile. Steril., ٥٨: ٧٩٨-٨٠٢.

Bleau, G.; Lamarbe, J.; Faucher, G.; Roberts, K.D. & Chapeleaine, A. (١٩٨٤). Semen selenium and human fertility. Fertile. Steril., ٥١: ٨٩٠-٨٩٤.

Bolle, P.; Evandri, M.G. & Saso, L. (٢٠٠٢). The controversial efficacy of vitamin E for human male infertility. Contraception, ٦٥: ٣١٣-٣١٥.

Buettner, G.R. (١٩٩٣). The pecking order of free radicals and antioxidants lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. Arch. Biochem. Biophysi., ٣٠٠:٥٣٥-٥٤٣.

Caldamone, A.; Emilson, L.B.V.; Juburi, A. & Cockett, A.T.K. (١٩٨٠). Prostatitis: prostatic secretory dysfunction affecting fertility. Fertile. Steril., ٣٤: ٦٠٢-٦٠٣.

Calvin, H.I.; Cooper, G.W. & Wallace, E.W. (١٩٨١). Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteinrerich structural proteins of the mitochondrial capsule. Gamete. Res., ٤: ١٣٩-١٤٥.

Cederberg, J. (٢٠٠١). Oxidative stress, antioxidantive defecne and outcome of gestation in experimental diabetes pregnancy. M.S.Sci. Thesis. Uppsla Un. Sweden.

Chance, B.; Sies, H. & Boveris, A. (١٩٧٩). Hydroperoxide metabolism in mammalian organ. Physiol. Revi., ٥٩: ٥٢٧-٦٠٥.

Check, J.M.; Zovas, P.M.; Katsoff, D. & Kiefer, D. (١٩٩٣). Effect of percoll discontinous density gradient via saphadex G. Sco gel filteration in sperm (medline) Tohoku. J. Exp. Mead., ١٦٩: ٢٢٥-٢٣١.

Chen, G.W.; Zheng, S.; Wu, Y.L.; Qian, X.M.; Leng, J.; Cao, x.r.; et al (١٩٩٨). The study of relationship between seminal leukocyte and sperm function. Chin. J. Androl., ١٢: ٨٢-٨٥.

Church, D.F. & Pryor, W.A. (١٩٩٠). Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health perspec., ٨٧: ٩٧٤١-٩٧٤٥.

Cohen, J.; Edward, R.C.; Fehilly, C.; Fishel, C.; S.; Hewitt, J.; Purdy, J.; Roland, G.; Steptoe, P. & Webster, J. (١٩٨٥). *In Vitro* fertilization: a treatment for male infertility. Fertile. Steril., ٤٣: ٤٢٢-٤٣٢.

Comhaire, F.H.; Christophe, A.B.; Zalata, A.A.; et al. (٢٠٠٠). The effect of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. Prostaglandins, leukotrienes. Essential fatty acids, ٦٣: ١٥٩-١٦٥.

Cooke, J. P. & Tsao, p.s. (١٩٩٣). Cytoprotective effect of NO-circulation, ٨٨: ٢٤٢١-٢٤٥٧.

Crister, J.K.; Huse-Benda, A.R.; Aaker, D.V. *et al*. (١٩٨٨). Cryopreservation of human spermatozoa. The effect of cryoprotectants on motility. Fertile. Steril., ٥٠: ٣١٤-٣٢٠.

Dabit, I.S.; Taher, M.; Khahfeh, A.F.; Sarraf, M. & Dabit, S.S. (١٩٩٧). Importance and effect of reactive oxygen species in male

infertility. Abst. ٤th annual meeting of the middle East, Fertility Society. Dubai UAE. ٢٧: ١٧.

Daunter, B.R.; Hill, J.; Hennessey & Mackay, E. V. (١٩٨١). Preliminary report: a possible mechanism for the liquefaction of human seminal plasma and its relationship to spermatozoa motility. Andrologia, ١٣: ١٣١-١٤١.

Dawson, E.B.; Harris, W.A.; Teter, M.C.; et al. (١٩٩٢). Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. Fertile. Steril., ٥٨: ١٠٣٤-١٠٣٩.

De Lamirande, E. & Gagnon, C. (١٩٩٢). Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes, and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J. Androl., ١٣: ٣٦٨-٣٨٦.

De Lamirande, E. & Gagnon, C. (١٩٩٣). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. Int. J. Andro., ١٦: ٢١-٢٥.

De Lamirande, E. & Gagnon, C. (١٩٩٥). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: abalancing act between beneficial and detrimental effects. Hum. Reprod., ١٠: ١٥-٢١.

De Lamirande, E.; Leduc, B.E.; Iwasaki, A. et al. (١٩٩٥). Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. Fertil. Steril., ٦٣: ٦٣٧-٦٤٢.

Donnelly, E.T.; McClure, N. & Lewis, S.E. (١٩٩٩). The effect of ascorbate and alph-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. Mutagenesis, ١٤: ٥٠٥-٥١٢.

Eckardstein, S.V.; Cooper, T.G.; Rutsch, K.; Meschede, D.; Horst, J. & Nieschlag, E. (٢٠٠٠). Seminal plasma characterizatics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance requlator (cFTR) gene mutation in men with obstructive a zoospemia. Fertile. Steril., ٧٣: ١٢٢٦-١٢٣١.

Edwadh, M.J. (١٩٩٠). The involvement of thiols in er cells toxicity. Ph. D Thesis, University of Cardiff.

Eiss, M.; Schieferstein, G. & Wahi, R. (٢٠٠٠). Oxalate in human seminal plasma: a possible significance and problem of determination. Fertile. Steril., ٧٣: ٩٦١-٩٦٦.

Engel, S.; Schreiner, I. & Petzoldt, R. (١٩٩٩). Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintaince of progression sperm motility. Andrologia, ٣١(١): ١٧-٢٥.

Ernster, L. (١٩٩٣). Lipid peroxidation in biological membrances: mechanisms and implications. In: Active oxygen lipid

peroxides and antioxidants. Ed. Yagi K, CRC press, Boca Raton, ١-٣٨ (Cited by Sikka, ١٩٩٦).

Fair, W.; Cllark, R.B. & Wehner, N. (١٩٧٢). A correlation of seminal polyamine levels and semen analysis in the human. Fertile. Steril., ٢٣: ٣٨-٤٢.

Fakih, H.; Malclusky, N.; Decherney, A.; Walliman, T. & Huszar, G. (١٩٨٦). Enhancement of human sperm motility and velocity in vitro: effect of calcium and creatine phosphate. Fertile. Steril., ٤٦: ٩٣٨-٩٤٤.

Fraga, C.G.; Motchnik, P.A.; Wyrobeck, A.J.; Rempel, D.M. & Ames, B.N. (١٩٩٦). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA . Mutation. Res., ٣٥١: ١٩٩-٢٠٣.

Gagnon, C.; Iwasaki, A.; De Lamirand, E. & Kovalski, N. (١٩٩١). Reactive oxygen species and human spermatozoa. Ann. N.Y. Acad. Sci., ٦٣٧: ٤٣٦-٤٤٤.

Gandini, L.; Lenzi, A.; Lombardo, F. Dondero, F. (١٩٩٣). Glutathione: In vitro effects on human spermatozoa. In: Neuroendocrine and Intragonal regulation of testicular function. Ed. Marrama, P. (Cited by Sikka, ١٩٩٦).

Garner, D.L. & Hafez, E.S.E. (١٩٨٠). Spermatozoa. In: Reproduction in farm animals. Hafez, E.S.E (ed.) ٤th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, p: ١٨٩-٢٠١.

Garret, C.; Liu, D.Y. & Baker, H.W.G. (١٩٩٧). Selectively of human sperm-zona pellucida binding sperm head morphology. Fertile. Steril., ٦٧: ٣٦٢-٣٧١.

Gomes, E.; Gano, I.P.; Amoroco, B.; Landeras, J.; Ballecteros, A. & Pellicer, A. (٢٠٠٠). Effect of injected spermatozoa morphology on outcome of intracytoplasmic sperm injection in human. Fertile. Steril., ٧٤: ٨٤٢-٨٤٣.

Gonzales, G.F.; Kortebani, G. & Mazzolli, A.B. (١٩٩٢). Leukocytospermia and function of seminal quality. Fertile. Steril., ٥٧: ١٠٥٨-١٠٦٥.

Gottlieb, C.; Svanbory, K.; Eneroth, P. & Bygdeman, M. (١٩٨٨). Effect of prostaglandin on human sperm function in vitro and seminal adenosine triphophate content. Fertile. Steril., ٤٩: ٣٢٢-٣٢٧.

Gregoire, A.I. & Moran, M.J. (١٩٧٣). The enzyme activating, protein and fructose content of normal, oligospermia, postvasectomy and infertile a zoospermia men. Fertile. Steril., ٢٤ (٣): ٢٠٨-٢١١.

Griveau, J.F.; Dumon, E.; Renard, P.; Callegar, J.P. & Le Lannou, D. (١٩٩٥). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. J. Reprod. Fertile., ١٠٣: ١٧-٢٦.

Griveau, J.F.; LeLannou, D. (١٩٩٧). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. International Journal of Andrology, ٢٠: ٦١-٦٩.

Grootveld, M.; Henderson, E.B. & Farell, A. (١٩٩١). Damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid exercise of the inflamed rheumatoid arthritis. Biochem. J., ٢٣٢٧: ٤٥٩-٤٦٥.

Guerin, J.F.; BenAli, H.; Rollet, J.; Souchier, C. & Czyba, J.C. (١٩٨٦). A-Glucosidase as a specific epididymal enzyme marker. Its validity for the etiologic diagnosis of a zoospermia. J. Androl., ٧: ١٥٦-١٦٢.

Gilzman, E.G.; Ollero, M.; Lopez, M.C. & Sharma, R.K. (٢٠٠١). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. Hum. Reprod., ١٦: ١٩٢٢-١٩٣٠.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (١٩٩٠). Free radicals biology and medicine, ٢nd ed., Clarendo press, Oxford.

Halliwell, B. (١٩٩٤). Free radicals, antioxidant and disease: Curiosity, cause or sequence ; ٣٤٤: ٧٢١-٧٢٤.

Halliwell, B.(١٩٩٧). Antioxidants: the basic-what the how to evaluate then. Adv. Pharmacol., ٣٨: ٣-١٦.

Hammerstedt, R.H. (١٩٩٣). Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation. A review of the effect on design of storge preservation systems. Reprod. Fertile. Dev., ٥: ٦٥٧-٦٩٠.

Hankel, R.R. & Schill, W. (٢٠٠٣). Sperm preparation for ART. Reprod. Biology. Endrocrin., ١: ١٠٨.

Harris, S.J.; Milligan, M.P.; Masson, G.M. & Dennis, K. J. (١٩٨١). Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH). Fertil. Steril., ٣٦: ٢١٩-٢٢١.

Hertz, F. & Cloarec, A. (١٩٨٩). Pharmacology of free . life Sci., ٣٤: ٧١٣-٧٣١.

Hinting, A. (١٩٨٩). Method of semen analysis in: Assessement of human sperm fertilizing ability. Ph. D. thesis, University of Mishigan.

Homonnai, Z.; Matzkin, H.; Faiman, N. ; Pas, G. & Kraicer, P. (١٩٧٨). The cation composition of the seminal plasma and prostatic fluid and its correlation to semen quality. Fertile. Steril., ٢٩: ٥٣٩-٥٤٢.

Hoshi, K.; Yanaigde, K.; Yoshimastu, M. & Sato, A. (١٩٩٠). Variation in the cholesterol/phospholipids ratio in human spermatozoa and its relation with capacitation. Human. Reproduction, ٥: ٧١-٧٤.

Huszar, G. & Vigue, L. (١٩٩٤). Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. J. Androl., ١٥: ٧١-٧٧.

Irvine, D.S. (١٩٩٦). Glutathione as a treatment for male infertility. Reviews. Reprod., ١: ٦-١٢.

Iwasaki, A. & Gagnon, C. (١٩٩٢). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertile. Steril., ٥٧: ٤٠٩.

Jacob, R.A. & Burri, B.J. (١٩٩٦). Oxidative damage and Am. J. Clin. Nutr., ٦٣: ٩٨٥٥-٩٨٦١.

Jialal, I. & Devaraj, S. (١٩٩٦). Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: clinical biochemistry prespective. Clin. Chem., ٤٢ (٤): ٤٩٨-٥٠٦.

John, J.C.S.; Sakkas, D.; Barratt, C.Z.R. (٢٠٠٠). Role of mitochondrial DNA and sperm survival. J. Androl., ٢١ (٢): ١٥٩-١٩٨.

Jones, R.L.; Kelly, R.W. & Critchly, H.O.D. (١٩٩٧). Chemokine and cycloxygenase-٢ expression in human endometerium

coincides with leukocyte accumulation. Human. Reprod., ١٢: ١٣٠٠-١٣٠٦.

Khanduja, K.L.; Verma, A. & Bhardwaj, A. (٢٠٠١). Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. Anderologia (Abst.).

Kobayashi, T.; Miyazaki, T.; Natori, M. *et al*. (١٩٩١). Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. Hum. Reprod., ٦: ٩٨٧-٩٩١.

Kodama, H.; Yamaguchi, R.; Fukuda, J. *et al*. (١٩٩٧). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. Fertile. Steril., ٦٨: ٥١٩-٥٢٤.

Koksal, I.T.; Tefekli, A.; Usta, M.; Erol, H.; Abbasoglu, S. & Kadioglu, A. (٢٠٠٠). The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. B. J. U. Int., ٨٦: ٥٤٩-٥٥٢.

Koppenol, W.; Moreno, J.; Pryor, W.; Ischiropoulos, H. & Beckman, J.S. (١٩٩٢). Peroxynitrite, acloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. Chemical. Res. In Toxicol., ٥: ٨٣٤-٨٤٢.

Kovalski, N.N.; De Lamirande, E. & Gagnon, C. (١٩٩٢). Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit

sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. Fertile. Steril., ٥٨: ٨٠٩-٨١٦.

Kretser, D.M.; Huidobro, C.; Southwick, G.J. & Smith, T.P.D. (١٩٩٨). The role of the epididymis in human infertility. J. Reprod. Fertil. Suppl., ٥٣: ٢٧١-٢٧٥. (Abstr.).

Kruger, T.F.; Acosta, A.; Simmons, K.F.; Swanson, R.J.; Matta, J.F. & Oehniger, S. (١٩٨٨). Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. Fertile. Steril., ٤٩: ١١٢-١١٧.

Kurpisz, M.; Miesel, R.; Sanoka, D. & Jedrzeic, Z. (١٩٩٦). Seminal plasma can be predictive factor for male infertility. Human reproduction, ١١: ٢٢٣-١٢٢٦.

Lahnsteiner, F.; Berger, B.; Weismann, T. (١٩٩٩). Sperm metabolism of the telost fishes chalcaburnus chalcaoides and oncarhynchus mykiss and its relation to motility and viability. J. Exper. Zoology, ٢٨٤ (٤): ٤٥٤-٤٦٥.

Lenzi, A.; Gandini, L.; Picardon, M.; Tramer, F.; Sandri, G. & Panfili, E. (٢٠٠٠). Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapics. Front. Biosci., ٥: ١-١٥.

Lenzi, A.; Gluasso, F.; Gandini, L.; Lombardo, F. & Dondero, F. (١٩٩٣). Placebo controlled, double blind, cross-over trial of

glutathione therapy in male infertility. Human. Reprod., ٨: ١٦٥٧-١٦٦٢.

Lenzi, A.; Picardo, M.; Gandini, L.; Lombardo, F.; Terminali, O.; Passi, S. & Dondero, F. (١٩٩٤). Glutathione treatment of dyspermia effect on the lipoperoxidation process. Hum. Reprod., ٩: ٢٠٤٤-٢٠٥٠.

Lewin, A. & Lavon, H. (١٩٩٧). The effect of Coenzyme $Q_{١٠}$ on sperm motility and function. Mol. Asp. Med., ١٨: ٢١٣-٢١٩.

Lewis, S.E.; Boyle, P.M.; Mckinney, K.A.; Young, I. S. & Thompson, W. (١٩٩٥). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertile. Steril., ٦٤: ٨٦٨-٨٧٠.

Lewis, S.E.; Sterling, E.S.; Young, I.S. & Thompson, W. (١٩٩٧). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. Fertile. Steril., ٦٧: ١٤٢-١٤٧.

Lopes, S.; Jurisicova, A.; Sun, J.G.; et al. (١٩٩٨). Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. Human reproduction, ١٣: ٨٩٦-٩٠٠.

Madipati, K.P. & Marunet, L.J. (١٩٨٧). Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. J. Biol. Chem., ٢٦٢: ١٧٣٩٨-١٧٤٠٤.

Mahadevan, M.M. & Trounson, A.O. (١٩٨٤). Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. Fertile. Steril., ٤٠: ٢٨٧-٢٩٣.

Makler, A. & Jakobi, P. (١٩٨١). Factors affecting sperm motility washing and resuspension of human spermatozoa in various artificial media. Fertile. Steril., ٣٥: ٤٤٢-٤٤٦.

Mallidis, C.; Lim, T.C.; Hill, S.T.; Skinner, D.J.; Brown, D.J.; Johnston, W.I.H. & Baker, H.W.G. (٢٠٠٠). Necrospermia and chronic spinal cord injury. Fertile. Steril., ٧٤: ٢٢١-٢٢٧.

Mann, T. (١٩٦٤). The biochemistry of semen and the male reproductive tract. Physiol. Rev., ٣١: ٢٧-٣١- cited in: Kzeer, D.C. (١٩٩٠). Some biochemical change in human seminal fluid in relation to sperm counts. Msc. Thesis, College of Medicine, University of Baghdad.

Marmar, J.; Katz, S.; Praiss, D.E. & Debedictis, J. (١٩٧٥). Semen Zinc level in infertile and postvasectomy patient and patient with prostatitis. Fertile. Steril., ٢٦: ١٠٥٧-١٠٦٣.

Mazilli, F.; Ress, B.; Marchesini, M.; Ronconti, C. & Dondero, F. (١٩٩٤). Superoxide in human semen related to seminal parameters and leucocytes. Fertile. Steril., ٦٢: ٨٦٢-٨٦٨.

Mazzilli, F.; Rossi, T.; Sabatini, L. et al. (١٩٩٥). Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species production. Acta. Europea. Fertilitatis, ٢٦: ١٤٥-١٤٨.

McLaughlin, R.H.; Raham, J.K. & Nolan, J.P. (١٩٩٢). Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. Reprod. Fertile., ٩٥: ٥٢٧.

Meister, A. & Anderson, M.E. (١٩٨٣). Glutathione. Ann. Rev. Biochem., ٥٢: ٧١١-٧٦٠.

Momen, M.N.; EL-Khodary, M.; Mostafa, T. & Abu Yossef, H. (١٩٩٩). Total antioxidants status in infertile males with leukocytospermia. Middle East Fertility Society. J., ٤: ٢١٥-٢٢١.

Moncada, S. & Higgs, A. (١٩٩٣). The L-Arginine Nitric oxide pathway.

Mortimer, D. (١٩٩٠). Semen analysis and sperm washing techniques. In: control of sperm motility: Biological clinical Aspects Edited by: Gagnon, C. CRC press, Boca Raton F١: ٢٦٣-٢٨٤.

Mortimer, D. (١٩٩١). Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. Hum. Reprod., ٦: ١٧٣.

Mortimerm D.; Goel, N. & Shu, M.A. (١٩٨٨). Evalution of the cell soft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. Fertile. Steril., ٥٠: ٩٦٠-٩٦٨.

Mostafa, T.; Anis, T.H.; El-Nashar, A.; Imam, H. & Othman, I.A. (٢٠٠١). Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. Int. J. Androl., ٢٤: ٢٦١-٢٦٥.

Munzel, T.; Sayegh, H. & Freeman, B.A. (١٩٩٥). Evidence for enhanced O_2 production in nitrate tolerance. J. Clin. Inves., ٩٥٤: ١٨٧-١٩٣.

Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A. & Rodwen, V.W. (١٩٩٣). Harper's biochemistry. ٢٣ ed. Edn.; prentice-Hall International Inc., USA; Pp. ٥١:٢٣٢.

Muslih, R.K.; AL-Nimer, M.S. & AL-Zamely, O.M. (٢٠٠٢). The level of malondialdehyde after activation with (H_2O_2) and ($CuSO_4$) and inhibition by desferoxamine and molsidomine in the serum of patients with acute myocardial infarction. National Journal of Chemistry, ٥: ١٣٩-١٤٨.

Nolan, J.P. & Hammerstedt, R.H. (١٩٩٧). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. Faseb. J., ١١: ٦٧٠-٦٨٠.

Novotny, J.; Oborna, I.; Brezinova, J. & *et al.,* (٢٠٠٣). The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. Biomed., ١٤٧: ١٧٣-١٧٦.

Okamura, N.; Tajina, Y. ; Soejina, A.; Masuda, H. & Sugita, Y. (١٩٨٥). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulate the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. Fertile. Steril., ٢٦٠: ٩٦٩٩-٩٧٠٥.

Orlando, C.; Caldini, A.L.; Barni, T.; Wood, W.G.; Strasburger, C.J.; Natali, A.; Maver, A.; Forti, G. & Serio, M. (١٩٨٥). Ceruloplasim and transferin in human seminal plasma: are they an index of seminiferous tubular function. Fertile. Steril., ٤٣: ٢٩٠-٢٩٣.

Page, E.W.; Villec, C.A. & Ville, D.B. (١٩٨١). Spermatozoa, fertilization, fertility and stertility, in human reproduction essential of reproductive and perinatal media, pay, E.W.; Wille, C.A. and Ville, D.B. (eds), W.B. Saunders company, Philadelphia.

Pasqualotto, F.F.; Sharma, R.K. & Nelson, D.R. (٢٠٠٠). Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertile. Steril., ٧٣: ٤٥٩-٤٦٤.

Pereea, D.M.D.; Katz, M.; Heenbanda, S.R. & Marchant, S. (١٩٩٦). Nitric oxide synthase inhibitor NG-monomethyl-L-arginine preserves sperm motility after swim-up. Fertile. Steril., ٦٦: ٨٣٠-٨٣٣.

Perry, A.C.; Jones, R.; Niang, L.S.; Jackson, R.M. & Hall. (١٩٩٢). Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxides whose transcript dose not contain a selenocysteine codon.

Phadke, A.M.; Samant, N.R. & Deral, S.D. (١٩٧٣). Significance of seminal fructose studies in male infertility. Fertile. Steril., ٢٤: ٨٩٤-٩٠٣.

Philipp, E.E. & Carruthers, G.B. (١٩٨٥). Biochemistry of semen. In: Ibnfertility. Philipp, E.E. & Caauthers, G.B. (eds.). William, London, p: ٢٠١-٢٠٢.

Pou, S. & Rosen, G.M. (١٩٩٠). Spin-trapping of superoxide by ٥,٥-dimethyl-L-pyrroline N-oxide: Application to isolated purfused organ. Anal. Biochemistry, ٣٢١: ٣٢٥٠-٣٢٥٦.

Rajasekaran, M.; Hellstrom, W.J. & Sikka, S.C. (١٩٩٦). Quantitative assessment of cytokinase (GRO- and IL-١٠) in human seminal plasma during genitourinary inflammation. Am. J. Reprod. Immune., ٣٦: in pres. (cited by Sikka, ١٩٩٦).

Rajasekaran, M.; Hellstrom, W.J.; Naz, R.K. & Sikka, S.C. (١٩٩٥). Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. Fertil. Steril., ٦٤: ١٦٦-١٧١.

Ramadan, A.; Saleh, M.D.; Agarwal, A.; Rakesh, K.; Sharma, David, R. & Nelson, M.S. (٢٠٠٢). Effect of cigarette smoking on levels

of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. Fertile. Steril., ٧٨ (٣): ٤٩١-٤٩٩.

Riche, J.P; Skowronski, L.; Abraham, R. & Leytzinger, Y. (١٩٩٦). Blood glutathione concentration in agrge-scale human study. Clinical. Chemistry., ٤٢: ٦٤-٧٠.

Rimm, E.B.; Stampfer, M.J.; Ascherio, A. & Willeth, W.C. (١٩٩٣). Vitamine E consumption and the risk of coronary heart disease in men. N. Eng. J. Med., ٣٢٨: ١٤٥٠-١٤٥٧.

Robbercht, W.; Sapp, P.; Viaane, M.K. & et al., (١٩٩٤). Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amytrophic lateral sclerosis. J. Neuro. Chem.., ٦٢: ٣٨٤-٣٨٧.

Saleh, R.A. & Agarwal, A. (٢٠٠٢). Oxidative and male infertility: From research bench to clinical practice. J. Androl., ٢٣: ٧٣٧-٧٥٢.

Sanocka, D.; Kurpisz, M. (٢٠٠٤). Reactive oxygen species and sperm cells. Reprod. Biol. Endocrinol., ٢: ١٢-٢٥.

Sarahan, T.P.; Prior, P.; Lancashire, R.J.; Faux, S.P.; Hulten, M.A.; Peck, I.M. *et al.* (١٩٩٧). Childhood cancer and parental use of tobacco. Deaths from ١٩٧١ to ١٩٧٦. Br. J. Cancer, ٧٦: ١٥٢٥١٥٣١.

Saran, M. & Bors, W. (١٩٨٩). Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. Free Radic. Res. Commun., ٧: ٢١٣-

٢٢٠.

Schmidt-Nielson, K. (١٩٩٧). Animal physiology: adaptation and environment. ٥th ed., Cambridge Univ. press, pp. ٣٧٩.

Scott, R.; Macpherson, A.; Yates, R.W. *et al.* (١٩٩٨). The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. British. J. Urology, ٨٢: ٧٦-٨٠.

Sharma, R.K.; Pasqualotto, F.F.; Nelson, D.R.; Thomas, J.R. & Agarwal, A. (٢٠٠١). Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. J. Androl., ٢٢ (٤): ٥٧٥-٥٨٣.

Shekarriz, M.; Sharma, R.K.; Thomas, A.J. & Agarwal, A. (١٩٩٥). Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen, J. Assist. Reprod. Genet., ١٢: ٧٠-٧٤.

Shibahara, H.; Burkan, L.J. ; Isojima, S. & Alexander, N.J. (١٩٩٣). Effect of sperm immobilizing antibodies on sperm zona pellucida tight binding. Fertile. Steril., ٦٠: ٥٣٣-٥٣٩.

Sies, H. (١٩٩٧). Antioxidants in disease mechanisms and therapy advance in pharmacology. San Diego. Academic press, ٣٨: ٧٠٧.

Sikka, S.C. (١٩٩٦). Oxidative stress and role of antioxidants in normal

and abnormal sperm functional. Fron. Bioscience, ١: ٧٨-٨٦.

Sikka, S.C. (٢٠٠٤). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. Journal of Andrology., ٢٥: ٥-١٨.

Smith, R.; Vantman, D.; Ponce, J.; Escobar, J. & Lissi, E. (١٩٩٦). Total antioxidants capacity of human seminal plasma. Hum. Reprod., ١١: ١٦٥٥-١٦٦٠.

Stovall, D.W.; Guzick, D.S.; Berga, S.L.; Krasnow, J.S. & Zelenik, A.J. (١٩٩٤). Sperm recovery and survival: Two tests that predict in vitro fertilization outcome. Fertile. Steril., ٦٧: ٥٤٢-٥٤٧.

Sueldo, C.E.; Berger, J.P.; Hijollund, H.I.; Kolstad, H.A.; Cordelli, E. & Leter, G. (٢٠٠٠). Sperm chromatin damage impairs human fertility. Fertile. Steril.

Sueldo, C.E.; Berger, T.; Kletzly, O. & Marss, R.P. (١٩٨٥). Seminal prolactin concentration and sperm reproduction capacity. Fertile. Steril., ٤٣: ٦٣٢-٦٣٥.

Sugino, N.; Karube-Harada, A.; Kashida, S. & *et al.,* (٢٠٠١). Reactive oxygen species stimulate prostaglandin F٢ α production in human endometrial stromal cells in vitro. Human. Reprod; ١٦(٩):١٧٩٧.

Suleiman, S.A.; Ali, M.E.; Zak, Z.M.; Elmalik, E.M. & Nasr, M.A. (١٩٩٦).

Lipid peroxidation and human sperm motility: Protective role of vitamin E. J. Androl., ١٧: ٥٣٠-٥٣٧.

Tea, N.T.; Jondet, M. & Scholler, R. (١٩٨٤). A migration-gravity sedimentation method for collecting motile spermatozoa from human semen. In: In vitro fertilization embryo transfer and early pregnancy edited by: Harrison, R.F.; Bonnar, J.; Thompson, W.; MTP press Ltd, & Laqncaster., ١١٧-١٢٠.

Tucker, K.E. & Jansen, C.A.M. (٢٠٠٢). Sperm separation techniques: comparison and evalution of gradient products. In: Proceedings ٢nd International for embrologists: Troubleshooting activities in the ART Lab. Ed. R. Basuray & Mortimer, D. (in press).

Twigg, J.; Irvine, D.S.; Houston, P.; Fulton, N.; Michael, L. & Aitken , R.J. (١٩٩٨). Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: Protective significance of seminal plasma. Mol. Hum. Reprod., ٤: ٤٣٩-٤٤٥.

Valance, P.; Collier, I. & Monocada, S. (١٩٨٩). Effect of endothelium-derived no on peripheral arteriolar tone in man. Lancet, ١١: ٩٩٧-١٠٠١.

Varley, H.; Gowenlock, A.H. & Bell, M. (١٩٨٠). Practical clinical biochemistry: general topics and commoner tests. ٥th ed., vol.

١, W.H.M. Books Ltd. London, pp. ٤٦٥-٤٦٦.

Verma, A. & Kanwar, K.C. (١٩٩٩). Effect of vitamin E on human sperm and lipid peroxidation in vitro. Asian. J. Androl., ١: ١٥١-١٥٤.

Vicari, E. & Calogero, A.E. (٢٠٠١). Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostate-vesiculo-epididymitis. Human Reproduction, ١٦: ٢٣٣٨-٢٣٤٢.

Viljoen, M.H.; Bornman, M.S.; Vander Merwe, M.P. & Duplessis, J. (١٩٩٠). Alpha-glucosidase activity and sperm motility. Androl., ٢٢: ٢٠٥-٢٠٨.

Vine, M.F.; Tse, C.K.; Hu, P.C. & Truong, K.Y. (١٩٩٦). Cigarette smoking and semen quality. Fertile. Steril., ٦٥: ٨٣٥-٨٤٢.

Wang, X.; Sharma, R.K.; Gupta, A.; George, V.; Thomas, A.J.; Falcone, T. & Agarwal, A. (٢٠٠٣). Alteration in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. Fertile. Steril., ٨٠: ٨٤٤-٨٥٠.

Wiseman, H. & Haliwell, B. (١٩٩٦). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen role inflammatory disease and progression to cancer. Biochem. J., ٣١٣: ١٤-٢١.

World Health Organization (١٩٩٢). WHO Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. ٣rd edn. Cambridge University press, Cambridge.

World Health Organization (WHO). (١٩٩٣). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. ٣rd ed. New York. Cambridge university press. Cambridge.

World Health Organization (WHO). (١٩٩٩). Laboratory manual for examination of human semen and cervical mucus interaction. ٤th ed. Cambridge: university press.

Zakowski, J.H.; Forestrom, J.W.; Condell, R.A. & Tappal, A.L. (١٩٧٨). Attachment of seleno-cysteine in the catalytic site of GSH-PX., Biochem. Biophys. Res. Comm., ٨٩: ٢٤٨-٢٥٥.

الاستنتاجات والتوصيات

نستنتج من الدراسة الحالية ما يأتي:-

١. تسبب إضافة بيروكسيد الهيدروجين لعينات السائل المنوي للأشخاص الخصيبين زيادة في فعالية أكسدة الدهون ينتج عنها انخفاض في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف والعيوشية وزيادة في مستوى المالوندای الديهايد.
٢. تمتلك مضادات الأكسدة المتمثلة بفيتامين E والكلوتاثيون دوراً وقائياً في الحفاظ على نوعية السائل المنوي وكبح فعل بيروكسيد الهيدروجين.
٣. تتميز البلازما المنوية للأشخاص العقيمين المصابين بقلة النطف ووهن النطف وتشوه النطف وموات النطف بمستوى عالٍ من المالونداي الديهايد مقارنة بالأشخاص الخصيبين والمصابين باللانطفية.

٤. يرتبط مستوى المالونداي الديهايد بعلاقة عكسية مع كل من تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة والعيوشية ودرجة نشاط النطف وبعلاقة طردية مع كل من النسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز كريات الدم البيض والخلايا البلعمية.

٥. يزداد مستوى المالونداي الديهايد عند استعمال تقنية الغسل والنبذ في تنشيط نطف مرضى العقم المصابين بوهن النطف بسبب عملية النبذ لعينات السائل المنوي وإزالة البلازما المنوية.

٦. لا يتغير مستوى المالونداي الديهايد عند استعمال التقنية الطبقية البسيطة في تنشيط نطف مرضى العقم المصابين بوهن النطف بسبب وجود مضادات الأكسدة في السائل المنوي.

٧. تسبب إضافة فيتامين E بتركيز ٠.٠٤ ملغم/مل والكلوتاثيون بتركيز ٠.٠٦ ملغم/مل للمستنبت ايرل عند استعمال تقنية الغسل والنبذ تحسن في كل من النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف وتقلل من فعالية أكسدة الدهون.

ومن خلال النتائج الحالية نوصي بما يأتي:

١. إضافة اختبار تركيز المالونداي الديهايد MDA Test في البلازما المنوية للاختبارات الأخرى المستعملة لتقييم حالة العقم لدى الرجال لما له من أهمية كبيرة في الكشف عن حالة العقم لدى الرجال وتحديد نوع العلاج المستخدم.

٢. دراسة تأثير بيروكسيد الهيدروجين ومضادات الأكسدة في معالم النطف ومستوى المالونداي الديهايد في الحيوانات المختبرية داخل الجسم *in vivo*.

٣. دراسة العلاقة بين مستويات مضادات الأكسدة المتمثلة بفيتامين E وفيتامين C والكلوتاثيون لعينات السائل المنوي لمظاهر العقم المختلفة ومعالم النطف البشرية.

٤. دراسة العلاقة بين تقنيات تنشيط النطف الأخرى ومستوى المالونداي الديهايد.

٥. عدم استخدام تقنية الغسل والنبذ لعينات السائل المنوي للاشخاص المصابين بوهن النطف عندما يكون مستوى المالونداي الديهايد عالٍ في البلازما المنوية ويستخدم بدلاً عنها التقنية الطبقية البسيطة.

٦. دراسة العلاقة بيم معالم النطف ومستويات المالونداي الديهايد في شطري السائل المنوي.