جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات انجماد سریع بر روی آپوپتوزیس در اسپرم افراد بارور و نابارور الیگواسپرم

دکتر تهمینه پیروی[۱]، دکتر مجتبی کریمی‌پور[۲]، دکتر جعفر سلیمانی‌راد[۳]، دکتر معرفت غفاری[٤]

تاریخ دریافت ۸٤/۰٤/۲۱، تاریخ پذیرش۸٤ /۰۷/۱۳

چکیده

زمینه و اهداف: فسفولیپیدها به صورت نامتقارن بین نیمه داخلی و خارجی غشای پلاسمایی سلول‌های زنده توزیع شده‌اند. طی مراحل اولیه آپوپتوز عدم تقارن غشا از بین می‌رود و فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی به سطح خارجی غشای پلاسمایی جابه‌جا می‌گردد. هدف مطالعه حاضر، ارزیابی اثر انجماد سریع بر روی آپوپتوز اسپرم در مردان بارور و نابارور می‌باشد.

مواد و روش : در این مطالعه نمونه‌های سیمن از ۲۰ مرد نابارور الیگواسپرم و ۱۰ مرد بارور بعد از ٤۸ ساعت دوری از مقاربت به طریق استمنا، جمع‌آوری شد. بعد از آنالیز براساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی نمونه‌ها به دو بخش مساوی تقسیم شدند. بخش اول نمونه‌ها، در افراد نابارور الیگواسپرم و بارور از نظر آپوپتوزیس، توسط Annexin-V-Flous Staining Kit بررسی شدند و قسمت دوم نمونه‌ها در هر دو گروه به طریق انجماد سریع در محیط نگهداری اسپرم انسان منجمد و بعد از دو هفته ذوب و از نظر آپوپتوزیس مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج توسط Paired t-test و Independent t-test آنالیز گردید.

یافته‌ها: بعد از انجماد سریع-ذوب، درصد میانگین اسپرم‌های آپوپتوتیک در افراد نابارور حدود شش برابر و در افراد بارور حدود سه برابر افزایش یافته است. این اختلاف افزایش درصد اسپرم‌های آپوپتوتیک در افراد نابارور الیگواسپرم و افراد بارور قبل و بعد از انجماد سریع از نظر آماری معنی دار است.

نتیجه گیری: انجماد سریع-ذوب می‌تواند عدم تقارن غشاء را از بین ببرد و باعث آپوپتوز گردد. بنابراین باعث کاهش تعداد اسپرم‌های عملکردی در دسترس برای روش‌های کمک باروری (ART) می‌گردد.

گل واژگان: آپوپتوز، انجماد سریع، ذوب، اسپرم، افراد بارور و نابارور

مجله پزشکی ارومیه، سال شانزدهم، شماره چهارم، ص۲۱۱-۲۰۵، زمستان ۱۳۸٤

آدرس مکاتبه: ارومیه- پردیس نازلو، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی، دکتر تهمینه پیروی، تلفن: ۲۷۷۰٦۹۸
E-mail: tpeirouvi@yahoo.co.uk

مقدمه

شاید بتوان آغاز تحقیق بر روی آپوپتوز را به تحقیقات کر[۵]، ویلی[٦]، کوری[۷] در سال ۱۹۷۲ نسبت داد(۱). واژه آپوپتوز ریشه یونانی دارد و از دو بخش آپو[۸] به معنای "دور"، "دور از" و پتوزیس[۹] به معنای "افتادن، ریزش کردن" تشکیل شده است(۲).

آپوپتوزیس مکانیسم فیزیولوژیکی مرگ سلولی و کنترل کننده رشد و هموستاز ارگانیسم‌های پر سلولی است (۳). به عبارت دیگر، نوعی از مرگ سلولی است که با تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی همراه است و یک سلول در حالی از بین می‌رود که پیرامون آن را نسج حاوی سلول‌های زنده فرا گرفته است (٤). سلول در حین آپوپتوزیس تغییر شکل می‌یابد و تغییر شکل سلول

---

[۱] استادیار گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
[۲] استادیار گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
[۳] استاد گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
[٤] استادیار گروه غدد تولید مثل و جنین شناسی پژوهشکده ابن سینا، تهران

[5] Kerr
[6] Wyllie
[7] Curri
[8] APO
[9] Ptosis

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

همراه با فشرده شدن محتویات سلولی به هم، پیکنوزه شدن هسته و تراکم کروماتین به صورت یک توده یکنواخت در مجاورت غشا هسته است(۵). درضمن گاهی هسته قطعه قطعه شده[1] و غشای سلول جوانه می‌زند[2] که کل پدیده را زیوزس[3] می‌نامند(٦).

ممکن است تورم میتوکندری بسیار ناچیز باشد و یا اصلاً ایجاد نشود (۷). فسفولیپید فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی به نیمه خارجی غشاء جابه‌جا می‌شود (۸،۱۰). آپوپتوزیس تحت کنترل سیستم ژنتیک قرار دارد و به وسیله عوامل خارجی و یا داخلی مانند هورمون‌ها، لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک، داروهای ضد سرطان، اشعه گاما یا ماورای بنفش، گروهی از سیتوکین‌ها به نام فاکتورهای مرگ، و فقدان فاکتورهای بقا القا می‌گردد(۱۱). روند آپوپتوزیس می‌تواند بسیار سریع انجام گیرد و در عرض چند دقیقه تمام مراحل را طی نماید (٤). اختلال در پدیده آپوپتوز در نحوه بیماری زایی گروهی از بیماری‌های بافت همبندی، کلیه، و سایر اعضاء مشاهده شده است و حاصل توقف پدیده آپوپتوز می‌تواند توده‌های بدخیم باشد(۱۲).

انجماد اسپرم انسان با استفاده از روش بخار نیتروژن مایع و ذخیره آن در ۱۹٦ ^{o}c ـ سال ۱۹٦۳ ابداع شد (۱۳). انجماد اسپرم روشی را فراهم نموده تا قبل از شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی ناحیه تناسلی، اسپرم به صورت منجمد نگهداری شود و در هنگام نیاز به افراد آزواسپرم غیرانسدادی اهدا گردد. انجماد اسپرم از نظر زمانی این امکان را می‌دهد تا بررسی‌های لازم از نمونه منی اهدا کننده از جمله عفونت HIV و هپاتیت B قبل از انجام لقاح به عمل آید(۱٤،۱٦). به رغم به کارگیری انجماد اسپرم، تاکنون اطلاعات بسیار کمی در رابطه با اثرات انجماد بر آپوپتوزیس که نقش مهمی در باروری دارند در دسترس است. در این مطالعه سعی بر آن است که با روشن کردن ارتباط بین میزان آپوپتوزیس اسپرم و انجماد، از این رابطه برای بهبود روش انجماد اسپرم استفاده شود.

مواد و روش‌ها

در این بررسی تجربی-مداخله‌ای مایع منی از ۲۰ مرد نابارور الیگواسپرم با تراکم اسپرم کمتر از ٦ ۱۰ـ۲۰ و۱۰ مرد بارور با تراکم اسپرم بیشتر از $۱۰^{٦}$×۱۰۰ بعد از ٤۸ ساعت دوری از مقاربت به طریق استمنا به داخل ظرف پلاستیکی دهان گشاد که توسط آزمایشگاه در اختیار شخص گذاشته شد در اطاق نمونه گیری بیمارستان الزهرا دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز جمع‌آوری گردید. افراد الیگواسپرم برای درمان و افراد بارور (افراد دارای حداقل یک فرزند و دارای اسپرموگرام طبیعی بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی) به صورت داوطلبانه به آن مرکز مراجعه می‌نمودند. به منظور Liquifaction ، نمونه‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در انکوباتور (۳۷°c) بدون CO_2 (Memmert, Germany) نگهداری شد. پس از برگشت مایع منی به حالت مایع، آنالیز آن انجام شد. نمونه‌ها از نظر حجم، تعداد اسپرم، حرکت اسپرم‌ها و مورفولوژی توسط دستگاه سیمن آنالیزر (Sperm Quality Analyzer, Medical Eletronics System, USA) براساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی(WHO ۱۹۹۹)(۱۷) آنالیز شدند. بعد از آنالیز نمونه‌ها به دو قسمت مساوی تقسیم شدند.

قسمت اول نمونه‌ها در افراد نابارور الیگواسپرم و بارور از نظرآپوپتوزیس توسط Annexin-V-Flous Staining Kit (Roche, Penzberg Germany) بررسی شدند و قسمت دوم نمونه‌ها در هر دو گروه به طریق انجماد سریع[4] (۱۸) در محیط نگهداری اسپرم انسان (HSPM) (فرتی پرو، بلژیک) آماده در ازت مایع منجمد و بعد از دو هفته ذوب و از نظر آپوپتوزیس مورد بررسی قرار گرفتند. برای عمل انجماد سریع ۵۰۰ میکرولیتر مایع منی Liquify شده در داخل کرایوتیوب ۱/۸ میلی لیتر که در پشت آن مشخصات بیمار نوشته شده بود ریخته شد. به آن ۳۵۰ میکرولیتر محیط اسپرم فریز Human Sperm Preservation Medium (HSPM) با ترکیب گلیسرول، ٤٪ HSA و Hepes بر اساس دستورالعمل به آرامی اضافه و مخلوط شد. بلافاصله کرایوتیوب در معرض بخار ازت مایع در فاصله ۲۰ سانتیمتر به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در مرحله آخر کرایوتیوب به داخل تانک ازت مایع منتقل شد. بعد از گذشت دو هفته نمونه‌ها ذوب[5] گردیدند. برای ذوب نمودن نمونه‌ها کرایوتیوب‌ها را از داخل تانک ازت مایع خارج و به داخل یک ظرف حاوی نیتروژن مایع منتقل گردیدند و بعد از۳۰ ثانیه از ظرف ازت مایع خارج گردیده و به داخل یک ظرف آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه منتقل شدند تا نمونه‌ها به صورت مایع در آیند. برای بررسی آپوپتوزیس در این مطالعه

[1] Karyorexis
[2] Budding Phenomenon
[3] Zeiosis
[4] Vitrification
[5] Thaw

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مایع منی تازه و مایع منی بعد از انجماد سریع-ذوب حاوی ۱×۱۰۶ اسپرم با فسفات بافرسالین[1] به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد با ۲۰۰g سانتریفوژ (Beckman Avanti ۳۰, USA) شد. مایع رویی خارج و رسوب ته لوله (Pellet) در ۱۰۰ میکرولیتر، محلول Annexin-V-flous (حاوی ۲۰ میکرولیتر Annexin-V-flous و ۲۰ میکرولیتر پروپیدیوم ید) نشاندار سوسپانسیونه شد. سپس به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر از نمونه بر روی لام گذاشته و با لامل پوشانده شد. سپس با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX5, Japan) با طول موج ۵۰۰-٤۵۰ نانومتر مطالعه و عکس برداری گردید. بعد از رنگ آمیزی اسپرمها با کیت Annexin-V-flous Staining به دو صورت آپوپتوتیک و نکروتیک شمارش شدند و نتایج حاصل از شمارش اسپرمها قبل و بعد از انجماد در هر دو گروه آزمایش و کنترل توسط آزمون تی مزدوج و آزمون تی مستقل آنالیز گردید.

نتایج

در این مطالعه اثرات انجماد سریع-ذوب بر آپوپتوز در اسپرم افراد بارور ونابارور الیگو اسپرم مورد بررسی قرار گرفته و نتایج به دست آمده به شرح زیر می‌باشد.

نتایج حاصل از آنالیز منی در مردان الیگواسپرم و بارور در جدول شماره۱ خلاصه شده است. نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی اسپرمها قبل و بعد از انجماد برای ارزیابی آپوپتوزیس که توسط کیت Annexin-V-Fluos Staining انجام شده در جدول۲ نشان داده شده است. با توجه به این که در مراحل اولیه آپوپتوزیس فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی غشا به نیمه خارجی جابه‌جا می‌شود، Annexin V نشاندار شده با ماده فلورسنت در حضور یون کلسیم به فسفاتیدیل سرین در نیمه خارجی غشا متصل و رنگ سبز فلورسنت ایجاد می‌کند. در اسپرم‌های رنگ آمیزی شده برای آپوپتوز در بررسی حاضر غشا اسپرم در ناحیه سر، تنه، و قسمت معینی از دم به رنگ سبز فلورسنت دیده می‌شود (شکل۱).

پروپیدیوم ید برای رنگ آمیزی اسید نوکلئیک به کار می‌رود و تا زمانی که غشا سلول یکپارچگی خود را از دست نداده قادر به نفوذ در سلول نیست. وقتی که غشا سلول صدمه دید پروپیدیوم ید وارد سلول شده و DNA را رنگ می‌نماید و سر اسپرم به رنگ قرمز دیده می‌شود. به این طریق می‌توان سلول‌های آپوپتوتیک را از سلول‌های نکروتیک تشخیص داد(۲).

همان طوری که در جدول شماره۲ ملاحظه می‌گردد، پس از انجماد سریع مایع منی به مدت دو هفته و ذوب آن، آنالیز مایع منی نشان داد درصد میانگین اسپرم‌های آپوپتوتیک در افراد نابارور حدود شش برابر افزایش یافته و در افراد بارور حدود سه برابر افزایش یافته است. این اختلاف افزایش درصد اسپرم‌های آپوپتوتیک در افراد نابارور الیگواسپرم و افراد بارور قبل و بعد از انجماد سریع از نظر آماری معنی دار است.

همچنین پس از انجماد سریع مایع منی به مدت دو هفته و ذوب آن، آنالیز مایع منی نشان داد درصد میانگین اسپرم‌های نکروتیک در افراد نابارور حدود صد برابر افزایش یافته و در افراد بارور حدود سیصدوپنجاه برابر افزایش یافته است. این اختلاف افزایش درصد اسپرم‌های نکروتیک در افراد نابارور الیگواسپرم و افراد بارور قبل و بعد از انجماد سریع از نظر آماری معنی دار است.

قبل از انجماد سریع از نظر آماری اختلاف معنی داری بین میانگین اسپرم‌های آپوپتوتیک افراد نابارور الیگواسپرم و افراد بارور نیست. پس از انجماد سریع مایع منی به مدت دو هفته و ذوب آن , درصد میانگین اسپرم‌های آپوپتوتیک درافراد نابارور الیگواسپرم به ٤/۳۵ ±۲۲/۰۲ و در افراد بارور به ۲/۷۸±۱۱/٦۱ افزایش یافته است. اختلاف درصد میانگین اسپرم‌های آپوپتوتیک دربین افراد نابارور الیگواسپرم و افراد بارور از نظر آماری معنی دار نیست.

همچنین در زمان قبل از انجماد سریع درصد میانگین اسپرم‌های نکروتیک در افراد نابارور الیگواسپرم ۵/۱٦± ۳۰/٤ و درافراد بارور ۳/۲٦ ±۱۸/۸۷ می‌باشد. از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین میانگین افراد نابارور الیگواسپرم و افراد بارور وجود ندارد. بعد از انجماد سریع مایع منی به مدت دو هفته و ذوب آن، آنالیز مایع منی نشان داد درصد میانگین اسپرم‌های نکروتیک در افراد نابارور الیگواسپرم به ۳/۳۸ ±٦۱/۲ و در افراد بارور به٤/۳۲ ±٦۷/۷۵ افزایش یافته است. اختلاف درصد میانگین اسپرم‌های آپوپتوتیک در بین افراد نابارور الیگواسپرم و افراد بارور قبل از نظر آماری معنی دار نیست.

[1] PBS

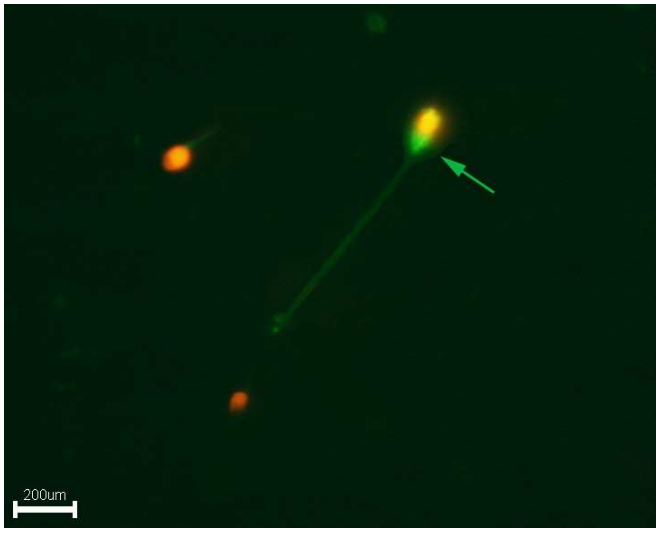
جدول شماره۱: پارامترهای آنالیز نمونه‌ها در افراد الیگواسپرم (n =۲۰) و افراد بارور (n =۱۰) در شرایط قبل از انجماد سریع

پارامترهای مورد مطالعه	افراد الیگواسپرم n=۲۰		افراد بارور n=۱۰		مقادیر نرمال تعیین شده توسط سازمان بهداشت جهانی (۱۹۹۹)
	دامنه	میانگین	دامنه	میانگین	
حجم (میلی لیتر)	۳/۹	۱/۵–۷	۲/۳۷	۱/۵–٤	≥ ۲
تراکم اسپرم($۱۰^{٦}$/ml)	۱۳/۷	۱–۱۹	۱۲۳/۷	۱۰۰ –۱۸۰۰	≥۲۰
حرکت (a+b)	٪٤٤/٤	۱۰–۷۰	٪۷۵	۵۰–۸۰	≥۵۰
مورفولوژی طبیعی	٪۲۵/۵	۱۰–٤۰	٪٤۳/۷	٤۰–۷۰	≥۱۵
قابلیت حیات(تست ائوزین)	٪۵۰/۹	۲۰–۹۰	٪۷۵	٦۰–۹۰	≥۷۵

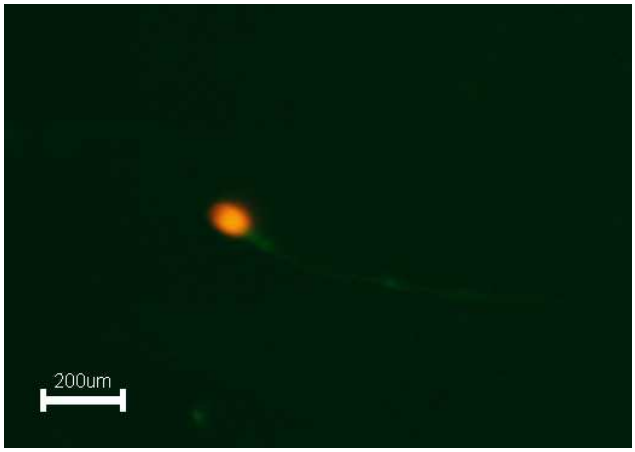
جدول شماره۲: آنالیز مایع منی در افراد نابارور و بارور قبل و بعد از انجماد بر اساس رنگ آمیزی سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک.

تعداد اسپرم بر حسب M/ml		سلول‌های آپوپتوتیک	سلول‌های نکروتیک
افراد نابارور الیگواسپرم n=۲۰	قبل از انجماد	۳/۹٤ ± ۰/۷٤	۳۰/٤ ± ۵/۱٦
	بعد از انجماد	۲۲/۰۲± ٤/۳۵	٦۱/۲± ۳/۳۸
	P_V	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
افراد بارور n=۱۰	قبل از انجماد	۲/۸٤± ۱/۰۹	۱۸/۸۷± ۳/۲٦
	بعد از انجماد	۱۱/٦۱ ± ۲/۷۸	٦۷/۷۵± ٤/۳۲
	P_V	۰/۰۲۹	۰/۰۰۱

ارقام ذکر شده به صورت (Mean±SEM) و بر حسب میلیون در هر میلی‌لیتر می‌باشد. n=تعداد افراد



شکل شماره۱: فلش قسمت سر اسپرم آپوپتوتیک را نشان می‌دهد که به رنگ سبز فلورسنت دیده می‌شود. (با درشتنمایی٤۰)



شکل شماره۲: اسپرم نکروتیک را نشان می‌دهد که با پروپیدیوم رنگ گرفته است و در ناحیه سر قرمز دیده می‌شود. (با درشتنمایی ٦٠)

بحث

امروزه به رغم استفاده از پروتکل‌های مدرن برای انجماد مایع منی انسان، اسپرم‌های زنده باقی‌مانده بعد از ذوب مایع منی رضایت بخش نیست و میزان باروری حاصل از اسپرم‌های منی منجمد شده در مقایسه با منی تازه کمتر است(۱۹،۲۱). بنا بر این بررسی پروتکل‌های مختلف انجماد و اثرات و عوارض جانبی آن‌ها برای پی بردن به علل کاهش باروری پس از انجماد از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشد. مطالعه حاضر در همین راستا و برای بررسی اثرات انجماد سریع بر آپوپتوز انجام گرفت.

از آنجا که تعداد زیادی از افراد نابارور که از روش‌های کمک باروری (ART) استفاده می‌کنند الیگواسپرم می‌باشند در بررسی حاضر وضعیت مایع منی در افراد سالم و الیگواسپرم و اثرات انجماد سریع بر پارامتر فوق مطالعه و با یکدیگر مقایسه گردیده است. نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی Annexin V برای ارزیابی آپوپتوز ونکروز در افراد سالم بیانگراین است که پس از انجماد سریع و ذوب تعداد اسپرم‌های آپوپتوتیک و نکروتیک به طور معنی داری افزایش می‌یابد. در افراد الیگواسپرم نیز مشابه افراد سالم، انجماد سریع و ذوب باعث افزایش معنی‌دار سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک می‌گردد. این یافته‌ها بیانگر این است کـــه انجماد سریع-ذوب باعث القا آپوپتوز و همچنین موجب نکروز سلول‌ها هم در افراد بارور و افراد نابارور الیگواسپرم می‌گردد و از این لحاظ اسپرم‌های افراد الیگواسپرم مشابه افراد بارور عمل می‌کنند. نتایج مطالعه حاضر در مورد افراد بارور و نابارور با یافته‌های شوفنر[1] و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۲۲) و دورو[2] و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۲۳) و شن[3] و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۲٤) مطابقت دارد. محققان فوق نیز نشان داده‌اند که انجماد-ذوب بعد از ۲٤ و ٤۸ ساعت باعث افزایش معنی‌دار اسپرم‌های آپوپتوتیک و نکروتیک می‌گردد.

در مورد چگونگی بروز آپوپتوز عقیده کلی بر این است که اسپرم انسان دارای اسیدهای چرب غیر اشباع زیادی در غشای پلاسمایی خود هست(۲۵). دیفیوژن لیپید در غشای پلاسمایی اسپرم منجمد-ذوب شده در مقایسه با اسپرم تازه انسان به طور معنی داری بیشتر است(۲۳) و با عث جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی به نیمه خارجی غشای پلاسمایی می‌شود. که یکی از اولین وقایع بیوشیمیایی آپوپتوزیس می‌باشد و عدم تقارن غشا را بهم می‌زند (۲٦). این امر می‌تواند تعداد اسپرم‌های عملکردی در دسترس برای روش‌های کمک باروری را کاهش دهد.

[1] Schuffner
[2] Duru
[3] Shen

References:

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.
2. Hermann R, Bursch W, Kraupp B: Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease. In: Progress in liver diseases. Boyer JL, Ockner RK, editors. Volume 13, Philadelphia, Saunders, 1995: 1-35.
3. Germain M, Scovassi AI, Poirier GG: Role of poly (ADP-Ribose) polymerase in Apoptosis. In: Cell Death. Szabo C editor. USA, CRC Press, 2000: 209-225.
4. Ortiz A, Cuadrado SG, Lorz C, Egido J: Apoptosis in Renal Diseases. Front Biosci, 1996, 1: 30-47.
5. Aggarwal BB: Apoptosis and Nuclear factor-kappa B: a tale of association and dissociation. Biochem Pharmacol, 2000, 60(8): 1033-1039.
6. Schrevens A,Van Nassauw L, Harrisson F: Histochemical demonstration of apoptotic cells in the chicken embryo using annexin V. Histochem J, 1998, 30(12): 917-922.
7. Kimball JW. (2004) Apoptosis in: Kimball's Biology pages availabled 20 Feb 2004 at WWW.ultranet.com/jkimball/ Biology.
8. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S: Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatedylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum Reprod, 2000, 15(6): 1338-1344.
9. Masson D, Drouineaud V, Moiroux P, Gautier T, Dautin G, Schneider M, et al: Human seminal plasma displays significant phospholipid transfer activity due to the presence of active phospholipid transfer protein. Mol Hum Reprod, 2003, 9(8): 457-464.
10. Muller K, Pomorski T, Muller P, Herrmann A: Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. J Cell Sci, 112(pt1): 11-20, 1999.
11. Nagata S: Apoptosis by death factor. Cell, 1997, 88(3): 355-365.
12. Cotran RS, Kumar V, Collins T: Robbins pathologic basis of disease. 6th Ed, Philadelphia, W B Saunders, 1999: 18-25.
13. Wolf PD: Cryopreservation of sperm. In: Reproductive Medicine and Surgery. Wallach E, Zacur H editors. Mosby, Baltimore, 1995: 795-803.
14. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE: Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. Hum Reprod, 2001, 16(6): 1191-1199.
15. Bandularatne E, Bongso A: Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. J Androl, 2002, 23(2): 242-248.
16. Hammadeh M, Dehn C, Hippach M, Zeginiadou T, Stieber M, George T, et al: Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. J Androl, 2001, 24(2): 66-72.
17. World Health Organization WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th Ed, Cambridge University Press, Cambridge, 1999: 6-23.
18. Hammadeh M, George T, Rosenbaum, Schmidt W: Association between freezing agent and acrosome damage of human

spermatozoa from subnormal and normal semen. Androl, 2001, 33: 331-336.

19. Vayena E, Rowe P, Griffin P: Current practices and controversies in Assisted Reproduction. WHO, Geneva, 2002: 152-165.
20. Esteves SC, Spaine DM, Cedenho AP, Srougi M: Effects of the technique of cryopreservation and dilution / centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. Int Braz J Urol, 2003, 29(2): 133-140.
21. Schuffner A, Morshedi M, Oehninger S: Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: Effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. Hum Reprod, 2001, 16(10): 2148-2153.
22. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S: Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. Fertil Steril, 2001, 75(2): 263-268.
23. Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN: Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. Hum Reprod, 2002, 17 (5): 1266-1273.
24. Ramos L, Wetzels AM: Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. Hum Reprod, 2001, 16(8): 1703-1707.
25. Oosterhuis GE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I: Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality. Fertil Steril, 2000, 74(2): 245-250.