

RESEARCH ARTICLE

Effect of Catalase, Superoxide Dismutase, and Glutathione Peroxidase Added in Dog Semen on Sperm Quality after Incubation at 37 °C

Patchanee Sringam¹, Pitakpong Maneeratrungrote¹, Adisak Sangkaew², Sarawut Sringam^{2*}

Abstract

Objective — To determine the effect of enzyme supplementation (catalase; superoxide dismutase, SOD; and glutathione peroxidase, GP) on the motility and viability of dog semen after incubation at 37 °C for 6 hr.

Materials and Methods — Semen was collected by digital manipulation from 8 adult dogs and diluted with tris egg yolk. Diluted semen was divided into 7 treatment groups: (1) diluted semen (a control group), (2) diluted semen + 100 U/ml catalase, (3) diluted semen + 500 U/ml catalase, (4) diluted semen + 100 U/ml SOD, (5) diluted semen + 500 U/ml SOD, (6) diluted semen + 5 U/ml GP, and (7) diluted semen + 15 U/ml GP. All groups were then incubated at 37 °C for 6 hr. To determine sperm quality, the sperm viability and motility were evaluated before and after incubation period.

Results — After incubation for 6 hours, the survival rates of sperm motility in treatment groups 2, 4, and 6 were higher than ($p < 0.05$) those in a control group (74.3, 73.5, and 70.9 vs. 57.8%, respectively). However, the survival rates of sperm viability were not significantly different in all groups except comparing between a control group and group 2 in which the rate was the highest (83.6%). By comparing the survival rate of sperm motility from an individual dog semen, this study showed a significant difference ($p < 0.05$).

Conclusion — The supplementation of enzyme 100 U/ml catalase, 100 U/ml SOD and 5 U/ml GP in dog semen can increase the survival rate of sperm motility after incubation at 37 °C for 6 hr.

KKU Vet J. 2009;19(1):56-63

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

Keywords: Semen; Dog; Spermatozoa Catalase; Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase

¹Department of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen Thailand 40002

²Department of Veterinary Surgery and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen Thailand 40002

*Corresponding author E-mail: sarsri@kku.ac.th

ผลของการเติม catalase, superoxide dismutase และ glutathione peroxidase ในน้ำเชื้อสุ่นัข ต่อคุณภาพของอสุจิภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 37° C

พัชนี ศรีงาม¹, พัทธพงษ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์¹, อติศักดิ์ สังข์แก้ว², สรวุฑ ศรีงาม^{2*}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการเติมเอนไซม์ catalase, superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GP) ต่อการเคลื่อนที่และควมมีชีวิตของอสุจิสุ่นัข ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 37° C นาน 6 ชั่วโมง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ใช้สุ่นัขสมบรูณ์พันธุ์จำนวน 8 ตัว ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยมือ น้ำเชื้อของสุ่นัขแต่ละตัวจะถูกเจือจางด้วยสารละลาย tris egg yolk จากนั้น แบ่งออกเป็น 7 กลุ่มการทดลอง ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ที่มีเฉพาะน้ำเชื้อเจือจางในสารละลาย tris egg yolk กลุ่มที่ 2 ถึงกลุ่มที่ 7 ใช้น้ำเชื้อเจือจางที่เติมด้วย 100 U/ml catalase, 500 U/ml catalase, 100 U/ml SOD, 500 U/ml SOD, 5 U/ml GP และ 15 U/ml GP ตามลำดับ โดยทำการประเมินควมมีชีวิตและการเคลื่อนที่ของอสุจิ ทั้งก่อนและหลังการบ่มน้ำเชื้อ ไว้ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ผลการศึกษา การเติมเอนไซม์ ในกลุ่มที่ 2, 4, และ 6 จะมีอัตราการรอดของการเคลื่อนที่ของอสุจิมากที่สุด (74.3, 73.5 และ 70.9% ตามลำดับ) ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุม (57.8%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนการเติมเอนไซม์ไม่แสดงผลต่ออัตราการรอดชีวิตของอสุจิอย่างเด่นชัด โดยในกลุ่มที่ 2 มีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิสูงสุด (83.6 %) และการเติมเอนไซม์ในน้ำเชื้อสุ่นัขแต่ละตัวที่ใช้ในการทดลอง พบความแตกต่างของอัตราการรอดในด้านการเคลื่อนที่ของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ข้อสรุป การเติมเอนไซม์ catalase ขนาด 100 U/ml, SOD ขนาด 100 U/ml หรือ GP ขนาด 5 U/ml ในน้ำเชื้อสามารถช่วยคงอัตราการรอดของการเคลื่อนที่ของอสุจิในสุ่นัข ได้ดีขึ้นเมื่อนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2552;19(1):56-63

<http://vet.kku.ac.th/journal/>

คำสำคัญ: น้ำเชื้อ สุ่นัข อสุจิ catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase

¹ภาควิชาสัตววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

²ภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

*ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ E-mail: sarsri@kku.ac.th

บทนำ

ปัญหาหนึ่งของการเก็บน้ำเชื้อ คือการเกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) ซึ่งอนุมูลดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ ตลอดเวลาระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาทางเคมีของตัวอสุจิเอง หรือเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อ เมื่อมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ ภายในเซลล์ [1,2] ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่ออสุจิ [3-5] โดยทำให้การเคลื่อนที่ลดลง เยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติไป ความมีชีวิตลดลง แม้ว่าโดยปกติ อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป มีระบบเอนไซม์ต่อต้านอนุมูลอิสระปกป้องตัวเองอยู่แล้ว โดยอยู่ในตัวของอสุจิเอง และในส่วนของน้ำกาม แต่อาจจะไม่เพียงพอต่อการต่อต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น ซึ่งปริมาณและชนิดของเอนไซม์จะมีความแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์ โดยน้ำเชื้อม้าและลามิเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) มากที่สุด [6] ในขณะที่น้ำเชื้อโคมีเอนไซม์ catalase และ glutathione peroxidase (GP) อยู่ค่อนข้างน้อย [7] ในขณะที่น้ำเชื้อสุนัขมี SOD อยู่ไม่สูงมากนัก [8] จึงทำให้เกิดแนวคิด ที่จะใช้สารหรือเอนไซม์ต่างๆ เติมลงในน้ำเชื้อ เพื่อช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์ระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อ สารที่นำมาใช้ในการป้องกันออกซิเดทีฟสเตรส ได้แก่ เอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระ (enzyme scavengers) ชนิดต่างๆ เช่น catalase, SOD, GP หรือการใช้วิตามินชนิดต่างๆ เช่น วิตามินอี, วิตามินซี เป็นต้น อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษา การใช้สารป้องกันออกซิเดทีฟสเตรสในสัตว์หลายชนิด เช่น โค ม้า สุกร แกะ แต่ในสุนัขเท่าที่ทราบ ยังไม่พบรายงานการศึกษามาก่อน

ปัจจุบันการเก็บน้ำเชื้อในสุนัข เพื่อนำไปใช้ในการผสมเทียม มีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น เพราะสามารถนำน้ำเชื้อจากสุนัขพ่อพันธุ์จากสถานที่หนึ่ง ไปใช้ในการผสมเทียมให้กับสุนัขเพศเมียที่อยู่ห่างไกลได้ และยังใช้เป็นวิธีการป้องกันโรคที่สำคัญ คือโรคแท้งติดต่อกันที่อาจติดต่อกันผ่านทางน้ำเชื้อ หรือจากสิ่งคัดหลั่งภายในช่องคลอดของสุนัขเพศเมีย ในการผสมเทียม หากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อให้คงความสามารถในการปฏิสนธิไว้ให้มากที่สุด จะทำให้เกิดผลสำเร็จในการผสมเทียมได้มากขึ้น รายงานการศึกษาที่ผ่านมา มักจะทำการศึกษาน้ำเชื้อที่ทำการแช่เย็น ซึ่งผลการศึกษาโดยส่วนใหญ่ พบว่าการเติมเอนไซม์มักไม่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ และความมีชีวิตของอสุจิอย่างเด่นชัด อย่างไรก็ตาม มีการทดสอบการเติมเอนไซม์ GP ในน้ำเชื้อโค โดยเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอสุจิมีการเคลื่อนที่ดีกว่าการไม่เติมเอนไซม์ [9] ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเติมเอนไซม์ catalase, SOD และ GP ในระดับที่ต่างๆ กันว่ามีผลอย่างไรต่อการเคลื่อนที่ และความมีชีวิตของตัวอสุจิในน้ำเชื้อสุนัข เมื่อนำน้ำเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ภายนอกร่างกาย เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

สุนัขเพศผู้สมบูรณ์พันธุ์ อายุ 2-4 ปี พันธุ์ โกลเด้นรีทรีฟเวอร์ ลาบาดอร์ ปิ๊ก และพูเดิ้ล อย่างละ 2 ตัว น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 80% จึงจะนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) โดยทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำเชื้อในตัวอย่าง จำนวน 7 ทริทเมนต์ และทำการทดลองซ้ำในสุนัขจำนวน 8 ตัว

วิธีการศึกษา

1. ทำการรีดน้ำเชื้อสุนัขด้วยมือ แล้วจึงเจือจางด้วยสารละลาย tris egg yolk (250 mM Tris, 90 mM citric acid และ 70 mM fructose) หลังจากเจือจางน้ำเชื้อแล้ว จึงปรับความเข้มข้นของอสุจิให้มีจำนวนประมาณ 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร และแบ่งน้ำเชื้อเจือจาง 1 มิลลิลิตรไปใช้ในแต่ละกลุ่มการทดลองดังนี้ (1) กลุ่มควบคุม (2) น้ำเชื้อ + 100 U/ml catalase (3) น้ำเชื้อ + 500 U/ml catalase (4) น้ำเชื้อ + 100 U/ml SOD (5) น้ำเชื้อ + 500 U/ml SOD (6) น้ำเชื้อ + 5 U/ml GP และ (7) น้ำเชื้อ + 15 U/ml GP

2. นำน้ำเชื้อเจือจางจากทุกกลุ่มการทดลองเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของอสุจิ และความมีชีวิตของอสุจิ ทั้งก่อนและหลังการทดลอง โดยใช้ผู้ประเมินเพียงคนเดียวตลอดการทดลอง โดยมีวิธีดังนี้

การเคลื่อนที่ของอสุจิ

ทำการหยดน้ำเชื้อ 1 หยดลงบนสไลด์ที่อุ่นไว้ที่ 37°C ปิดทับด้วยกระจกบาง ทำการประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ทำการตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิจาก 5 ตำแหน่งบนสไลด์ และประเมินอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าโดยให้ค่าคะแนนการเคลื่อนที่ตั้งแต่ 0-100%

ความมีชีวิตของอสุจิ

โดยการหยดน้ำเชื้อ 1 หยดลงบนสไลด์ที่อุ่นไว้ที่ 37°C และเติมสี eosin-nigrosin 1 หยด ใช้ไม้จิ้มฟันสะอาดผสมน้ำเชื้อและสีให้เข้ากัน เติมน้ำบนสไลด์ เป่าให้แห้งและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า อสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนอสุจิที่ตายจะติดสีแดงของสี eosin ทำการตรวจนับอสุจิจำนวน 200 ตัวต่อ 1 ตัวอย่างแล้วจึงคำนวณเทียบเป็นร้อยละของอสุจิที่มีชีวิต

นำผลการตรวจวัดที่ได้ มาคิดเป็นอัตราการรอดของความสามารถในด้านการเคลื่อนที่ของอสุจิ และความมีชีวิตของอสุจิ จากสูตร

$$\text{อัตราการรอด} = 100 \times \frac{\text{ผลการตรวจวัดอสุจิหลังการบ่มน้ำเชื้อ}}{\text{ผลการตรวจวัดอสุจีก่อนการบ่มน้ำเชื้อ}}$$

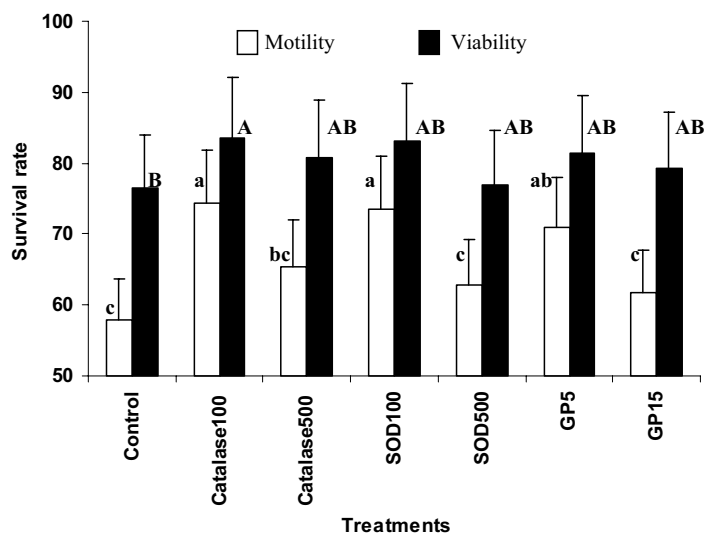
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลของการเติมเอนไซม์ทั้ง 6 กลุ่มและกลุ่มควบคุมต่ออัตราการรอดทั้งการเคลื่อนที่ และความมีชีวิตของสperm โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS [10]

ผลการศึกษา

อัตราการรอดของอสุจิเกี่ยวกับการเคลื่อนที่และความมีชีวิตของอสุจิแสดง (Figure 1) โดยพบว่าการเติมด้วย catalase ขนาด 100 U/ml ในน้ำเชื้อสperm ให้อัตราการรอดของอสุจิสูงที่สุดคือ 74.3% ซึ่งมากกว่าในกลุ่มที่เติมด้วย catalase ในขนาด 500 U/ml (65.4%) กลุ่มที่เติมด้วย SOD ในขนาด 500 U/ml (62.9%) กลุ่มที่เติมด้วย GP ในขนาด 15 U/ml (70%) และกลุ่มที่ไม่มีการเติมด้วยเอนไซม์ (61.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับในกลุ่มที่เติมด้วย SOD ในขนาด 100 U/ml (73.5%) และกลุ่มที่เติมด้วย GP ในขนาด 5 U/ml (70.9%) ในขณะที่อัตราการรอดเกี่ยวกับความมีชีวิตพบว่าการเติมด้วย catalase ในขนาด 100 U/ml ให้อัตราการรอดของอสุจิสูงที่สุดคือ 83.6% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับกลุ่มที่เติมด้วยเอนไซม์กลุ่มอื่นๆ แต่มากกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ (76.4%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Figure 1. Effect of Various Levels of the Enzymes in Dog Semen on the Survival Rate after Incubation at 37°C for 6 hr *In Vitro*



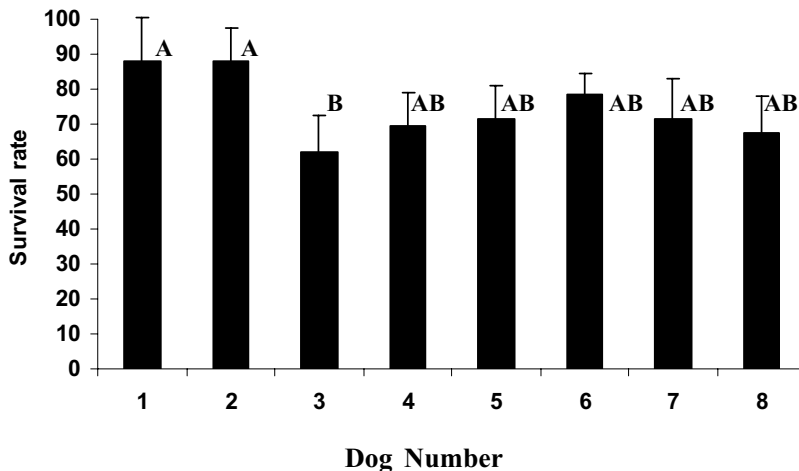
Boxes with different superscripts (A, B or a, b, c) over the same parameters are statistically different from each other ($P < 0.05$). Data are mean \pm SD from 8 dogs.

อัตราการรอดเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของอสุจิของสุนัขแต่ละตัวที่ใช้ในการทดลอง (Figure 2) พบว่าสุนัขหมายเลข 1 และ 2 มีอัตราการรอดสูงกว่าสุนัขตัวที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

วิจารณ์

เมื่อทำการเก็บน้ำเชื้อไว้นานขึ้นจะสามารถตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ SOD มากขึ้น จากก่อนเริ่มการทดลอง แสดงว่าระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อที่ยาวนานขึ้นก่อให้เกิดอนุมูลอิสระที่จะต้องอาศัยเอนไซม์มาทำปฏิกิริยามากขึ้นตาม [11] ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการบ่มน้ำเชื้อสุนัขไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมงเพื่อให้มีโอกาสเกิดภาวะออกซิเดทีฟสเตรส และตรวจผลการทำงานของเอนไซม์ที่จะส่งผลต่อตัวอสุจิได้ดียิ่งขึ้น จากผลการทดลองแสดงให้เห็น ความเสียหายของอสุจิของภายหลังการบ่มน้ำเชื้อมีมากขึ้นในทุกกลุ่มการทดลอง โดยพบว่าอัตราการรอดของการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงอย่างเด่นชัดกว่าอัตราการรอดของความมีชีวิตของอสุจิ และพบว่าน้ำเชื้อที่มีการเติมด้วยเอนไซม์จะให้อัตราการรอดของอสุจิในด้านการเคลื่อนที่และความมีชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้เติมลงในน้ำเชื้อ ยังส่งผลต่ออัตราการรอดของอสุจิเช่นกัน

Figure 2. Survival Rate of Dog Semen After Incubation at 37°C *In Vitro*



Boxes labeled with different superscripts (A, B) are statistically different from each other ($p < 0.05$). Data are mean \pm S.D. from 8 dogs.

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของเอนไซม์ catalase, SOD และ GP ในน้ำเชื้อมีค่าอยู่ที่ 100, 100 และ 5 U/ml ตามลำดับ ในขณะที่การเติมเอนไซม์มากกว่าระดับดังกล่าวไม่ส่งผลต่ออัตราการรอดของอสุจิแต่อย่างใด ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาในน้ำเชื้อแช่เย็นของม้าที่เติมเอนไซม์ catalase ในปริมาณ 200 U/ml ไม่ได้ส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ดีกว่าน้ำเชื้อที่มีการเติม

เอนไซม์ดังกล่าวในปริมาณ 100 U/ml [12] ซึ่งผู้วิจัยพบว่าในเซมินอล พลาสมาของม้ามีค่าการทำงานของเอนไซม์ catalase อยู่สูงถึง 1,400 U/ml แสดงว่าในเซมินอลพลาสมามีเอนไซม์ดังกล่าวเพียงพออยู่แล้ว [13] ในขณะที่การเติม GP ปริมาณ 2 mM ในน้ำเชื้อโค ไม่พบว่าให้ผลแตกต่างจากการเก็บน้ำเชื้อเจีจางด้วยสารละลายที่มีนมเป็นองค์ประกอบ แต่ได้ผลดีหากใช้น้ำยาเจีจางที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ [9] อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้ พบว่าสุนัขแต่ละตัวมีการตอบสนองต่อการเติมเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากขั้นตอนการรีดน้ำเชื้อ ที่ทำให้ได้ความเข้มข้นของอสุจิตั้งต้นที่แตกต่างกัน น้ำเชื้อสุนัขที่ได้จากการเก็บนั้นนำมาจากส่วนที่มีอสุจิเข้มข้น (sperm-rich fraction) ซึ่งพบว่ามีการทำงานของเอนไซม์สูงที่สุด คือมี SOD สูงถึง 411 U ต่ออสุจิ 1,000 ล้านตัว ในขณะที่น้ำเชื้อส่วนที่เหลือครั้งสุดท้าย (postspermic fraction) มี SOD เพียง 10.3 U ต่ออสุจิ 1,000 ล้านตัว ซึ่งปริมาณที่ตรวจพบดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ในกรณีที่มีน้ำเชื้อที่มีปริมาณของอสุจิที่ผิดปกติสูง [8] อย่างไรก็ตาม หากทำการแยกส่วนที่เป็นเซมินอลพลาสมาออกจากน้ำเชื้อสุนัข จะทำให้อสุจิมีความเสียหายมากขึ้นจากความเป็นพิษของอนุมูลอิสระ [14]

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเติมเอนไซม์ catalase, SOD และ GP ในปริมาณ 100, 100 และ 5 U/ml ตามลำดับ สามารถช่วยในการคงอัตราการรอดของอสุจิเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ได้เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความรู้พื้นฐานในด้านชนิดและระดับของเอนไซม์ที่มีอยู่ในน้ำเชื้อของสุนัข การตรวจวัดระดับของอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างที่มีการเก็บรักษาน้ำเชื้อและปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง จะช่วยเพิ่มขีดความสามารถในการเก็บน้ำเชื้อของสุนัขเพื่อนำไปใช้ในการผสมเทียมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Jones R, Mann T. Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1973;184:103-107.
2. Alvarez JG, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod.* 1982;27:1102-1108.
3. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod.* 1995;10(1):15-21.
4. Aitken RJ. The human spermatozoon: a cell in crisis? The Amoroso lecture. *J Reprod Fertil.* 1999; 115:1-7.
5. Saleh RA, Agarwall A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl.* 2002;23:737-752.

6. Menella MR, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalyzed lipid-peroxidation reactions in semen. *Biochem J.* 1980;191: 289-297.
7. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev.* 2000;55:282-288.
8. Cassani P, Martha TB, O'Flaherty C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Anim Reprod Sci.* 2005;86:163-173.
9. Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci.* 2002;71(1-2):13-23.
10. SAS. SAS User's Guide for PC Computers. SAS Inst., Cary Nc, USA. 1988.
11. Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. *Theriogenology.* 2005;63(5):1354-1365.
12. Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumbe J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology.* 2001;56(4):577-589.
13. Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IK. Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res.* 2000;61(9):1026-1030.
14. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis Ph, Ververidis HN, et al. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. *Theriogenology.* 2008;70(5): 827-835.

