

氧化损伤及抗氧化剂在人精液冷冻保存中的研究进展

李家兴, 张元峰, 张荣贵*

重庆医科大学附属第二医院泌尿外科, 重庆

收稿日期: 2022年1月23日; 录用日期: 2022年2月14日; 发布日期: 2022年2月24日

摘要

不论是在体精液, 还是射出精液, 或者冷冻保存的精液, 其都面临一个重要的问题——氧化应激损伤, 并且, 冷冻保存的精液由于时间较长、自身抗氧化剂的消耗等问题, 在实际应用中, 人为地添加额外的抗氧化剂已成为常态。为此, 本文综述了人精液冷冻保存过程中氧化应激的产生和危害、常见抗氧化剂的应用及其研究进展, 为临床应用及实践提供参考。

关键词

人精液, 冷冻保存, 氧化损伤, 抗氧化剂

Research Progress of Oxidative Damage and Antioxidants in Cryopreservation of Human Semen

Jiaxing Li, Yuanfeng Zhang, Ronggui Zhang*

Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing

Received: Jan. 23rd, 2022; accepted: Feb. 14th, 2022; published: Feb. 24th, 2022

Abstract

No matter *in vivo* semen, ejaculated semen or cryopreserved semen, they all face an important problem—oxidative stress injury. Moreover, frozen semen has some problems, such as long time, consumption of its own antioxidants and so on, it has become normal to artificially add additional

*通讯作者。

antioxidants in practical application. This paper reviews the generation and harm of oxidative stress during human semen cryopreservation, the application and research progress of common antioxidants, so as to provide reference for clinical application and practice.

Keywords

Human Semen, Cryopreservation, Oxidative Damage, Antioxidant

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

随着近几年我国低生育率及不育人口的增多,辅助生殖技术得到更多人的重视,其中人精子冷冻保存技术发挥着重要的作用。然而冷冻精液受到的氧化损伤是一个普遍存在的问题,这对育龄期不育男性日益增长的生育需求以及精子库和科研的工作人员们都将是一次巨大的挑战。为促进辅助生殖技术的研究及临床应用,本文对人精液冷冻保存过程中氧化应激的产生和危害、常见抗氧化剂的应用及其研究综述如下。

2. 精液氧化物质的产生

2.1. 概述

对于需氧型生物而言,我们绝大部分细胞都需要氧气的参与来提供能量,氧代谢时时刻刻都在发生,三大能源物质又源源不断的提供反应底物。在氧代谢的过程中,会产生一些具有氧化作用的物质,又称之为活性氧(ROS),如:羟自由基、超氧阴离子、过氧化物等[1]。正常生理情况下,细胞产生的 ROS 水平较低,能够在清除的过程中保持动态平衡,而当 ROS 产生过多或者清除能力下降时,其将与细胞的正常组织发生氧化应激反应,导致细胞损伤。

同样,精子作为男性的生殖细胞,由于自身的运动需要更多的氧气参与来提供能量,不论在体还是离体,都极易发生氧化应激损伤。并且在冷冻保存的精液中,由于保存的时间较长、自身抗氧化剂的消耗等问题,这种损伤较为明显。在健康男性精液冷冻前后的对照实验中发现,精液冷冻过程中温度的逐渐降低会导致精子产生大量活性氧[2],此外,精液低温保存过程诱导低温休克和渗透胁迫,进而提高活性氧(ROS)的生成速率[3]。尽管低水平的 ROS 在精子运动、获能和顶体反应中起重要作用[4] [5],但是我们仍不能忽视其对精子细胞造成的损害,尤其对于冷冻保存的精子。

2.2. 来源

人类精子产生 ROS 的主要来源是精液中的白细胞和形态异常的精子[4],此外,辅助生殖技术中精子的制备、冻融等过程均会产生 ROS。

2.2.1. 白细胞

冷冻保存的精液样本被白细胞污染时,ROS 在降温过程中升高尤为明显,并且在冷冻前去除精液样本中的白细胞或使用抗氧化剂可以改善精子的存活率和功能[6]。同样作为运动类型的细胞,白细胞依赖它的氧化能力获能,此外在炎症爆发时,会产生大量的 ROS,一方面可以起到防御的作用,另一方面会

引起自身组织或细胞的损害，当精液中含有较多白细胞或冷冻保存的精液受细菌污染时，其大量的 ROS 势必会对人精子造成损害。

2.2.2. 异常精子

目前研究发现精子产生 ROS 的途径主要有两种：精子质膜上的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶系统与精子发生氧化还原反应的线粒体膜系统[4]。正常情况下，精子处于氧化与抗氧化的平衡状态，当活性氧和抗氧化剂之间失衡时，使精子发生氧化应激损伤。研究表明，精子活性氧的产生与正常形态精子比例呈显著负相关，与精子头部无定形、顶体受损、中段缺陷、细胞质滞留、尾部缺陷和精子畸形指数评分呈正相关[7]。目前认为形态异常的精子产生过多的 ROS 可能与异常的细胞质有关。在冷冻的精子中，冷冻-解冻引起精子质膜 NADPH 氧化酶的改变和线粒体电子传递链的改变，从而促进活性氧的产生[8]。

2.2.3. 冷冻精子

如上所述，对于离体行冷冻保存的精子，冷冻与解冻本身会促进 ROS 的产生。冷冻保存对精子功能的不利影响是由于 ROS 的产生增加[9]。尽管人类精子冷冻损伤的可能机制被认为是多因素的，但在冷冻和解冻过程中过量的 ROS 产生已经被证明是一个重要的促成因素[10]。Saleem [11]等人研究发现，人类精液的冷冻保存会显著降低精子的总抗氧化能力水平。此外，精浆中抗氧化剂储存库的减少，精子的抗氧化防御机制能力减弱，氧化物与抗氧化剂之间的失衡同样也有利于活性氧产生，从而使精子发生氧化应激损伤。

3. 精子氧化的危害

3.1. 精子过氧化反应

精子的过氧化反应可按照反应底物的不同分为脂质过氧化和蛋白质过氧化。人精子特别容易受到脂质过氧化的影响，这是由精子细胞的结构特性所决定的，人精子质膜含有丰富的多不饱和脂肪酸，在氧化应激时这种脂肪酸会发生 β 氧化，其中间产物脂质过氧化物会继续引发这种反应，并且当 ROS 产生过多时，又会与精子质膜上的多不饱和脂肪酸发生过氧化反应[12]，这种连锁的链式反应导致精子膜系统受损，进而使得精子细胞膜的通透性增加和流动性降低，最终导致精子细胞的功能障碍和结构受损。此外，精子细胞中只含少量抗氧化剂[13]，如：超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，谷胱甘肽等，并且冷冻后抗氧化剂的活性会减弱或丧失[14]。另外精子与人体其它细胞不同的是，其具有有限的修复机制[15]。以上各种因素使得冷冻保存过程中的精子容易发生脂质过氧化反应。由于该反应最后转化为丙二醛，其浓度可以反映精子发生脂质过氧化损伤的程度[16]。

3.2. 精子 DNA 损伤

精子 DNA 完整性对于成功将正确的遗传物质传递给下一代至关重要。不孕男性与正常的男性相比，其精液对冻融诱导的 DNA 损伤更为敏感，他们的精液在冷冻保存后 DNA 片段显著增加[17]。冷冻保存会诱导染色质不稳定，DNA 链断裂和精子中的细胞凋亡[18]。在冷冻和解冻精液样品过程中发现精子 DNA 损伤的原因主要与氧化应激有关[19]。活性氧通过修饰所有碱基，产生无碱基位点、染色质 DNA 交联、DNA 链断裂、DNA 碱基氧化、染色体缺失、移码、双着丝粒以及染色体重排等，导致 DNA 损伤显著增加[20]。Ribas 等人提出了单链 DNA 碎片(SSSDF)可能与氧化应激 DNA 损伤有关，并且将广泛地分布在基因组中，而双链 DNA 碎片(DSSDF)与某种具有非广泛方式作用的酶活性相关[21]。最近的研究发现，冷冻后单链 DNA 断裂的精子百分率增加了 10%，而 DSSDF 并没有统计学意义上的增加，并

且 SSSDF 与生育力降低有关, 而 DSSDF 与流产风险增加相关, 这表明, 冷冻保存可能会影响精子细胞的妊娠能力, 而不会增加相关的流产风险[22]。

3.3. 精子线粒体损伤

精子运动的原动力来自线粒体产生的能量, 其精子的运动能力与线粒体的功能直接相关。在精子冻融过程中会产生过量的 ROS 已被证实, ROS 诱导线粒体膜脂质过氧化, 从而改变 ATP 酶的活性, 损害线粒体的呼吸链功能, 减少三羧酸循环产生的能量, 最终损害精子的活力[23]。除此之外, 与核 DNA 相比, 由于线粒体内的 DNA 缺乏蛋白质的保护, 其更容易与 ROS 发生反应, 若线粒体 DNA 无法继续编码蛋白质合成, 能量的生成将会受阻, 导致精子的运动功能发生障碍。同时, 由于精子运动所需的能量主要由线粒体中发生的三羧酸循环提供, 当线粒体的功能受到损害时, 因无法继续进行电子链的传递, 内部会产生过量的活性氧, 从而损伤线粒体、质膜等, 最终损害精子的活力和受精能力。

3.4. 精子动力与活力下降

精子的动力与活力是衡量精子受精能力的常用指标。研究表明, 冷冻保存可降低精子运动力和精子活力[24], 与新鲜精液相比, 冷冻解冻后的精子的运动性和存活率下降, 其最可能的原因是线粒体活性的丧失[17] [25], 尽管冷冻精子运动性下降不完全是氧化损伤引起, 但是由它造成的损伤仍不可忽视。研究发现, 精子冷冻过程中氧化产生的高活性化合物会诱导 DNA 片段化, 并最终降低精子的活力和存活率[26]。并且 Georges [27]等人发现, DNA 碎片率与精子的前向运动以及正常形态呈显著负相关, 与非前向运动以及空泡化的精子呈显著正相关。

4. 常用抗氧化剂

抗氧化剂根据其性质可分为两类: 酶类和非酶类。精液中含有酶类抗氧化剂, 如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、谷胱甘肽还原酶(GRD)和过氧化氢酶(CTA) [6]等; 以及非酶类抗氧化剂, 如维生素 E (生育酚) [28]、维生素 C (抗坏血酸) [29]、褪黑素[5] [30]、谷胱甘肽[31]、辅酶 Q (泛醌) [32] [33]、L-肉碱[34] [35] [36]等。此外, 在精液冷冻解冻过程中常用的天然抗氧化剂, 如: 白藜芦醇[37] [38]、姜黄素[39]、绿原酸[40]、锌[41]等。在精液冷冻保存过程中使用较多的是非酶类抗氧化剂。

4.1. 酶类抗氧化剂

精液中的抗氧化酶起着重要的抗氧化作用, 在精子细胞中, 各种抗氧化酶不仅单独发挥着抗氧化作用, 而且还具有相互的协同效应。一项研究发现, 联合补充 SOD 和 CTA 对防止活性氧引起的精子膜脂质过氧化有很大帮助, 从而使冷冻解冻后的精子参数有较好的恢复, 但是单独补充并没有精子参数的明显恢复[6], 这可能与多种酶之间的协同抗氧化效应有关。

4.2. 非酶类抗氧化剂

1) 维生素 E (生育酚)是一种脂溶性维生素, 这决定了它主要在膜系统内起作用, 其主要通过断裂自由基链来发挥它的抗氧化作用, 通过清除过氧化物和自由基来抑制膜脂质过氧化[4]。然而在一项研究中却发现维生素 E 添加到冷冻保存介质中仅仅改善了人精子解冻后的动力, 精子活力和 DNA 碎片并没有明显改变[28]。

2) 维生素 C (抗坏血酸)具有水溶性, 作为生育男性精浆中最主要的抗氧化剂, 其主要通过抵消 H_2O_2 和 O_2 的不利影响而起到清除 ROS 的作用[42]。Esmat [29]等人发现维生素 C 可以减轻冷冻对精子参数、染色质质量和凋亡率的不利影响。但是, 在一项精子体外研究中发现, 较高浓度的维生素 C ($>20 \mu M$)对

精子的质量，特别是对精子活力有负面影响[43]。

3) 褪黑素是一种由人松果体分泌的吲哚胺类激素，其具有重要的生理功能。研究表明在冷冻保存的人精液中添加褪黑素，会促进 Bcl-2 和 Nrf-2 及其下游基因的表达，从而增强精子对冷冻损伤的抵抗力[30]。同时，进一步研究发现褪黑素可以上调热休克蛋白家族基因的表达[44]，其中热休克蛋白 90 (HSP90)已被证明可以修复冻融造成的染色体损伤，并保持 DNA 的完整性[45]。不仅如此，褪黑素还可以提高精子活力和存活率，保护精子膜完整性，增强精子抗氧化酶活性，有效抑制 ROS 的产生，降低细胞内活性氧，减少冷冻精子的脂质过氧化损伤[5]。将褪黑素与咖啡因联合应用于冷冻前和解冻后的精液，可以有效改善精液质量，这种作用对于低质量的精液效果更好[46]。

4) L-肉碱在线粒体内含量丰富，是脂肪酸进入线粒体内膜的活化剂，能够促进脂肪酸的 β 氧化。研究表明，L-肉碱可以通过调节碳水化合物代谢来保护细胞膜免受 ROS 损伤，并维持膜结构的稳定性[34]。同时也有报道称添加 L-肉碱可以提高人类精子的活力和存活率，但对冷冻后的精子 DNA 氧化并没有影响[35]。在一项类似的研究中发现，L-肉碱在减少精子 DNA 氧化损伤方面没有显著效果[36]。然而值得注意的是，较高浓度的 L-肉碱(50 mg/ml)对精子质量尤其是精子活力有负面影响[47]，因此在实际应用中需关注抗氧化剂的毒性效应。

5) 辅酶 Q (泛醌)是一种脂溶性醌类化合物，广泛存在于各种膜结构中，在线粒体内的辅酶 Q 起着调节呼吸链中电子传递的重要功能。辅酶 Q 可直接消除 ROS，并且对脂过氧化有显著的抑制作用。作为一种人体内有效的抗氧化剂，可以显著改善不育患者的精液参数(精子密度和活力显著改善， $p = 0.01$) [48]。此外，辅酶 Q 能提高冻融精子的动力学参数，尤其对于冷冻的少弱精子更为明显[32]。在一项研究中发现，将辅酶 Q 与 L-肉碱单独或联合添加到精子培养基中，均可以显著减少冷冻后精子 ROS 的产生，且单独添加 L-肉碱对精子活力改善最有效[33]。然而值得说明的是，在这项研究中，联合应用辅酶 Q 与 L-肉碱对冷冻前精子 ROS 的减少并不显著，这可能与冷冻前精液本身抗氧化剂储备有关。

6) 谷胱甘肽是机体重要的水溶性抗氧化剂与自由基清除剂，是由三种氨基酸组成的三肽化合物，它可以将过氧化氢转化为水，并在谷胱甘肽还原酶作用下保持还原状态。在精子细胞中与 GPX、GRD 共同组成一套抗氧化体系。研究发现，在人精液冻融过程中加入 5MM 的谷胱甘肽能减少过氧化氢和超氧阴离子的含量、降低精子脂质过氧化损伤、减少 DNA 断裂[31]。

7) 白藜芦醇是一种从植物中提取的天然抗氧化剂，能够防止人精液冷冻保存诱导的氧化损伤，且这种作用不依赖于剂量，但是它不能恢复精子的运动[49]。研究发现，白藜芦醇的抗氧化效应主要是因为它对活性氧(尤其是过氧化氢)的清除[37]。Shabani [38]等人发现白藜芦醇对精子的防护效应很可能是通过刺激 AMP 活化蛋白激酶而引起的，但其具体的机制有待进一步研究。其它天然抗氧化剂也有类似的作用。在冷冻培养基中添加姜黄素对人类精子参数和精子 DNA 具有保护作用，可对抗冻融过程中引起的氧化损伤[39]。绿原酸是一种具有潜力的天然抗氧化物，最近研究发现，绿原酸对精子活力和 DNA 完整性没有不利影响，并且可以防护过氧化氢导致的氧化应激损伤[40]。

5. 讨论与小结

在人精液冷冻保存与解冻过程中，精子损伤是复杂且多因素的，氧化应激损伤仅仅只是众多损伤因素中的一种，但是我们仍然不能忽视这种不可逆损伤对精子产生的不利影响。在冷冻精液中添加适量的抗氧化剂可以减少精子受到 ROS 的损伤，然而并不能达到完全的预防。对于离体的精液，受到氧化应激的胁迫应该是从离体那一刻就已经开始，在随后的空气暴露、精液制备、离心等过程会进一步加重因 ROS 引起的损伤，因此冷冻精液抗氧化应激不应该只停留在冷冻与解冻这两阶段。

冷冻解冻本身会降低抗氧化剂的活性，如超氧化物歧化酶[14]或谷胱甘肽[50]与精液冷冻保存后活性

明显降低, 在实际应用中抗氧化剂的添加应该考虑其本身的耗损以及精液的总抗氧化能力水平。抗氧化剂的含量并不是越高越好, 它是一把双刃剑, 较高浓度的抗氧化剂对精子有不利影响[43] [47]。最近研究发现, 冷冻前具有高抗氧化剂的精液样本, 解冻后精子活力恢复率较低[51]。此外, 不同的冷冻方式也影响精液的氧化水平, 传统的慢速冷冻暴露时间较长, 由氧化应激带来的累积效应不可忽视, 有研究显示, 在没有冷冻保护剂的液氮中进行快速冷冻, 其精子 DNA 损伤最接近使用新鲜人类精液样本获得的结果[52]。因此在冷冻技术的发展中, 除了探索更好的冷冻方案外, 未来的研究还应关注在冻融过程中控制过量的 ROS 生成和增强抗氧化能力保护。

参考文献

- [1] Aitken, R.J., Clarkson, J.S. and Fishel, S. (1989) Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and Human Sperm Function. *Biology of Reproduction*, **41**, 183-197. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.1.183>
- [2] Wang, A.W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D.J. and Loughlin, K.R. (1997) Reactive Oxygen Species Generation by Seminal Cells during Cryopreservation. *Urology*, **49**, 921-925. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(97\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(97)00070-8)
- [3] Agarwal, A., Saleh, R.A. and Bedaiwy, M.A. (2003) Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction. *Fertility and Sterility*, **79**, 829-843. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
- [4] Hardi, D. (2007) Production of ROS and Its Effects on Mitochondrial and Nuclear DNA, Human Spermatozoa, and Sperm Function. *Medical Journal of Indonesia*, **16**, 127-133. <https://doi.org/10.13181/mji.v16i2.268>
- [5] Deng, S.L., Sun, T.C., Yu, K., Wang, Z.-P., Zhang, B.-L., Zhang, Y., *et al.* (2017) Melatonin Reduces Oxidative Damage and Upregulates Heat Shock Protein 90 Expression in Cryopreserved Human Semen. *Free Radical Biology & Medicine*, **113**, 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.342>
- [6] Rossi, T., Mazzilli, F., Delfino, M. and Dondero, F. (2001) Improved Human Sperm Recovery Using Superoxide Dismutase and Catalase Supplementation in Semen Cryopreservation Procedure. *Cell and Tissue Banking*, **2**, 9-13. <https://doi.org/10.1023/a:1011592621487>
- [7] Beygi, Z., Forouhari, S., Mahmoudi, E., Hayat, S.M.G. and Nourimand, F. (2021) Role of Oxidative Stress and Antioxidant Supplementation in Male Fertility. *Current Molecular Medicine*, **21**, 265-282. <https://doi.org/10.2174/1566524020999200831123553>
- [8] Agarwal, A., Prabakaran, S.A. and Said, T.M. (2005) Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. *Journal of Andrology*, **26**, 654-660. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05016>
- [9] Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T. and Rodrigues, J.L. (2002) Current Status of Sperm Cryopreservation: Why Isn't It Better? *Theriogenology*, **57**, 327-344. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4)
- [10] Chatterjee, S. and Gagnon C. (2001) Production of Reactive Oxygen Species by Spermatozoa Undergoing Cooling, Freezing, and Thawing. *Molecular Reproduction and Development*, **59**, 451-458. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>
- [11] Ali, B.S., Alawneh, R.F. and Ayman, A.-A. (2016) Human Semen Cryopreservation Reduces the Seminal Antioxidant Reservoir. *New Zealand Journal of Medical Laboratory Science*, **70**, 3-6.
- [12] Aitken, R.J. and Baker, M.A. (2006) Oxidative Stress, Sperm Survival and Fertility Control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **250**, 66-69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>
- [13] Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (1995) Differential Incorporation of Fatty Acids into and Peroxidative Loss of Fatty Acids from Phospholipids of Human Spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, **42**, 334-346. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080420311>
- [14] Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (1994) Mechanism of Superoxide Dismutase Loss from Human Sperm Cells during Cryopreservation. *Journal of Andrology*, **15**, 255-265.
- [15] Storey, B.T. (1997) Biochemistry of the Induction and Prevention of Lipoperoxidative Damage in Human Spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, **3**, 203-213. <https://doi.org/10.1093/molehr/3.3.203>
- [16] Cadet, J., Davies, K.J.A., Medeiros, M.H., Di Mascio, P. and Wagner, J.R. (2016) Formation and Repair of Oxidatively Generated Damage in Cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, **107**, 13-34. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.049>
- [17] Li, Z., Lin, Q., Liu, R., Xiao, W. and Liu, W. (2010) Protective Effects of Ascorbate and Catalase on Human Spermatozoa during Cryopreservation. *Journal of Andrology*, **31**, 437-444. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.007849>
- [18] Adiga, S.K., Khan, Z., Upadhy, D., Kalthur, G. and Kumar, P. (2009) Ability of Deoxyribonucleic Acid-Damaged Sperm to Withstand Freeze-Thaw-Induced Damage during Cryopreservation. *Fertility and Sterility*, **92**, 959-963.

- <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1754>
- [19] Thomson, L.K, Fleming, S.D, Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., Zieschang, J.A. and Clark, A.M. (2009) Cryopreservation-Induced Human Sperm DNA Damage Is Predominantly Mediated by Oxidative Stress Rather than Apoptosis. *Human Reproduction*, **24**, 2061-2070. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep214>
- [20] Agarwal, A. and Said, T.M. (2005) Oxidative Stress, DNA Damage and Apoptosis in Male Infertility: A Clinical Approach. *BJU International*, **95**, 503-507. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05328.x>
- [21] Ribas-Maynou, J., Garcia-Peiro, A., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J., Benet, J., *et al.* (2012) Alkaline and Neutral Comet Assay Profiles of Sperm DNA Damage in Clinical Groups. *Human Reproduction*, **27**, 652-628. <https://doi.org/10.1093/humrep/der461>
- [22] Ribas-Maynou, J., Fernandez-Encinas, A., Garcia-Peiro, A., Prada, E., Abad, C., Amengual, M.J., *et al.* (2014) Human Semen Cryopreservation: A Sperm DNA Fragmentation Study with Alkaline and Neutral Comet Assay. *Andrology*, **2**, 83-87. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00158.x>
- [23] Kim, S., Hooper, S., Agca, C. and Agca, Y. (2016) Post-Thaw ATP Supplementation Enhances Cryoprotective Effect of Iodixanol in Rat Spermatozoa. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **14**, Article No. 5. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0141-5>
- [24] Satirapod, C., Treetampinich, C., Weerakiet, S., Wongkularb, A., Rattanasiri, S. and Choktanasiri, W. (2012) Comparison of Cryopreserved Human Sperm from Solid Surface Vitrification and Standard Vapor Freezing Method: On Motility, Morphology, Vitality and DNA Integrity. *Andrologia*, **44**, 786-790. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01267.x>
- [25] O'Connell, M., McClure, N. and Lewis, S.E. (2002) The Effects of Cryopreservation on Sperm Morphology, Motility and Mitochondrial Function. *Human Reproduction*, **17**, 704-709. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>
- [26] Opuwari, C.S. and Henkel, R.R. (2016) An Update on Oxidative Damage to Spermatozoa and Oocytes. *BioMed Research International*, **2016**, Article ID: 9540142. <https://doi.org/10.1155/2016/9540142>
- [27] Raad, G., Bakos, H.W., Bazzi, M., Mourad, Y., Fakhri, F., Shayya, S., *et al.* (2021) Differential Impact of Four Sperm Preparation Techniques on Sperm Motility, Morphology, DNA Fragmentation, Acrosome Status, Oxidative Stress, and Mitochondrial Activity: A Prospective Study. *Andrology*, **9**, 1549-1559. <https://doi.org/10.1111/andr.13038>
- [28] Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K. and Burton, P. (2009) Effect of Antioxidant Supplementation of Cryopreservation Medium on Post-Thaw Integrity of Human Spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, **18**, 184-189. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60254-4](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60254-4)
- [29] Mangoli, E., Talebi, A.R., Anvari, M., Taheri, F., Vatanparast, M., Rahiminia, T., *et al.* (2018) Vitamin C Attenuates Negative Effects of Vitrification on Sperm Parameters, Chromatin Quality, Apoptosis and Acrosome Reaction in Neat and Prepared Normozoospermic Samples. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, **57**, 200-204. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.02.006>
- [30] Singh, A.K. and Haldar, C. (2016) Melatonin Modulates Glucocorticoid Receptor Mediated Inhibition of Antioxidant Response and Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **436**, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.024>
- [31] Ghorbani, M., Vatannejad, A., Khodadadi, I., Amiri, I. and Tavilani, H. (2016) Protective Effects of Glutathione Supplementation against Oxidative Stress during Cryopreservation of Human Spermatozoa. *CryoLetters*, **37**, 34-40.
- [32] Ngeamvijawat, J., Sawangchaeng, A., Kiatpongsan, S., *et al.* (2017) Roles of Coenzyme Q10 on Sperm Quality in Frozen-Thawed Samples of Men with Oligoasthenozoospermia. *Human Reproduction*, **32**, Article No. i158.
- [33] Chavoshi Nezhad, N., Vahabzadeh, Z., Allahveisie, A., Rahmani, K., Raoofi, A., Rezaie, M.J., *et al.* (2021) The Effect of L-Carnitine and Coenzyme Q10 on the Sperm Motility, DNA Fragmentation, Chromatin Structure and Oxygen Free Radicals During, before and after Freezing in Oligospermia Men. *Urology Journal*, **18**, 330-336. <https://doi.org/10.22037/uj.v16i7.6400>
- [34] Gülçin, İ. (2006) Antioxidant and Antiradical Activities of L-Carnitine. *Life Sciences*, **78**, 803-811. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.103>
- [35] Zhang, W., Li, F., Cao, H., Li, C., Du, C., Yao, L., *et al.* (2016) Protective Effects of L-Carnitine on Asthenozoospermic Human Semen Samples during Cryopreservation. *Zygote*, **24**, 293-300. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000180>
- [36] Banihani, S., Agarwal, A., Sharma, R. and Bayachou, M. (2014) Cryoprotective Effect of L-Carnitine on Motility, Vitality and DNA Oxidation of Human Spermatozoa. *Andrologia*, **46**, 637-641. <https://doi.org/10.1111/and.12130>
- [37] Dani, C., Bonatto, D., Salvador, M., Pereira, M.D., Henriques, J.A. and Eleutherio, E. (2008) Antioxidant Protection of Resveratrol and Catechin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 4268-4272. <https://doi.org/10.1021/jf800752s>
- [38] Shabani Nashtaei, M., Amidi, F., Sedighi Gilani, M.A., Aleyasin, A., Bakhshalizadeh, S., Naji, M., *et al.* (2017) Pro-

- protective Features of Resveratrol on Human Spermatozoa Cryopreservation May Be Mediated through 5' AMP-Activated Protein Kinase Activation. *Andrology*, **5**, 313-326. <https://doi.org/10.1111/andr.12306>
- [39] Santonastaso, M., Mottola, F., Iovine, C., Colacurci, N. and Rocco, L. (2021) Protective Effects of Curcumin on the Outcome of Cryopreservation in Human Sperm. *Reproductive Sciences*, **28**, 2895-905. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00572-9>
- [40] Noto, D., Collodel, G., Cerretani, D., Signorini, C., Gambera, L., Menchiari, A., *et al.* (2021) Protective Effect of Chlorogenic Acid on Human Sperm: *In Vitro* Studies and Frozen-Thawed Protocol. *Antioxidants*, **10**, Article No. 744. <https://doi.org/10.3390/antiox10050744>
- [41] Kotdawala, A.P., Kumar, S., Salian, S.R., Thankachan, P., Govindraj, K., Kumar, P., *et al.* (2012) Addition of Zinc to Human Ejaculate Prior to Cryopreservation Prevents Freeze-Thaw-Induced DNA Damage and Preserves Sperm Function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **29**, 1447-1453. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9894-8>
- [42] Lewis, S.E., Sterling, E.S., Young, I.S. and Thompson, W. (1997) Comparison of Individual Antioxidants of Sperm and Seminal Plasma in Fertile and Infertile Men. *Fertility and Sterility*, **67**, 142-147. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)81871-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)81871-7)
- [43] Donnelly, E.T., McClure, N. and Lewis, S.E. (1999) Antioxidant Supplementation *in Vitro* Does Not Improve Human Sperm Motility. *Fertility and Sterility*, **72**, 484-495. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00267-8)
- [44] Shi, H., Tan, D.X., Reiter, R.J., Ye, T., Yang, F. and Chan, Z. (2015) Melatonin Induces Class A1 Heat-Shock Factors (HSFAs) and Their Possible Involvement of Thermotolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Pineal Research*, **58**, 335-342. <https://doi.org/10.1111/jpi.12219>
- [45] Flores, E., Cifuentes, D., Fernández-Novell, J.M., Medrano, A., Bonet, S., Briz, M.D., *et al.* (2008) Freeze-Thawing Induces Alterations in the Protamine-1/DNA overall Structure in Boar Sperm. *Theriogenology*, **69**, 1083-1094. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.022>
- [46] Karimfar, M.H., Niazvand, F., Haghani, K., Ghafourian, S., Shirazi, R., Bakhtiyari, S., *et al.* (2015) The Protective Effects of Melatonin against Cryopreservation-Induced Oxidative Stress in Human Sperm. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **28**, 69-76. <https://doi.org/10.1177/0394632015572080>
- [47] Banihani, S., Sharma, R., Bayachou, M., Sabanegh, E. and Agarwal, A. (2012) Human Sperm DNA Oxidation, Motility and Viability in the Presence of L-Carnitine during *in Vitro* Incubation and Centrifugation. *Andrologia*, **44**, 505-512. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01216.x>
- [48] Safarinejad, M.R. (2010) Efficacy of Coenzyme Q10 on Semen Parameters, Sperm Function and Reproductive Hormones in Infertile Men. *Journal of Urology*, **182**, 237-248. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.02.121>
- [49] Garcez, M.E., dos Santos Branco, C., Lara, L.V., Pasqualotto, F.F. and Salvador, M. (2010) Effects of Resveratrol Supplementation on Cryopreservation Medium of Human Semen. *Fertility and Sterility*, **94**, 2118-2121. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.058>
- [50] Gadea, J., Molla, M., Selles, E., Marco, M.A., Garcia-Vazquez, F.A. and Gardon, J.C. (2011) Reduced Glutathione Content in Human Sperm Is Decreased after Cryopreservation: Effect of the Addition of Reduced Glutathione to the Freezing and Thawing Extenders. *Cryobiology*, **62**, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.12.001>
- [51] Banihani, S.A. and Alawneh, R.F. (2019) Human Semen Samples with High Antioxidant Reservoir May Exhibit Lower Post-Cryopreservation Recovery of Sperm Motility. *Biomolecules*, **9**, Article No. 111. <https://doi.org/10.3390/biom9030111>
- [52] Vutyavanich, T., Piromlertamorn, W. and Nunta, S. (2010) Rapid Freezing versus Slow Programmable Freezing of Human Spermatozoa. *Fertility and Sterility*, **93**, 1921-1928. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.04.076>