# Influence of pomegranate juice on sperm parameters and fertility in mice

O. Amini Rad [1] M.A. Khalili, PhD [2] H.R. Soltani Gord Faramarzi [3]

Medical Student [1] , Research & Clinical Center for infertility [2] , Shahid Sadughi Medical University of Yazd , Medical Student [3] , Islamic Azad University of Yazd , Yazd , Iran.

(Received 27 Sep, 2008 Accepted 8 Jul, 2009)

## ABSTRACT

**Introduction:** Sperm fertilization depends on a number of factors such as sperm count, motility and morphology. A variety of factors, including free radicals, may disturb the sperm characteristics. Elements such as vitamins C & E and polyphenols have anti-oxidental effects. Since sperms are weak in overcoming free radicals; the aim of this study was to determine the effect of (PJ) on sperm count, morphology, motility and fertility in mice.

**Methods:** In an experimental study, 20 male mice were studied with regard to their sperm parameters and fertility potential. Sperms were categorized into three groups with respect to their motility including progressive, non-progressive, immotile. Mice were divided into control group (n=10) and experimental group (n=10), randomly. The experimental group received 20% pomegranate juice for 1 month and one generation from each group was selected. By means of SPSS, Mann-Whitney test was used to compare the two groups.

**Results:** The results showed that pomegranate juice consumption increased sperm count in cases (49.7±13.6) companed to control group (34.2±15.1). The difference was statistically significant (P=0.014). The rate of non progressive motility in case group was decreased when compared with control group (P=0.007). In addition, the normal morphology of cases improved significantly (P=0.001). The rate of fertility increased from 5.5±3.3 to 10.0±1.3 in case mice (P=0.007).

**Conclusion:** Pomegranate juice is able to improve the quality of sperm parameters, as well as fertility potential in mice. Probably, intake of this antioxidant by infertile men improves the quality of their sperm parameters.

*Correspondence:*
*O. Amini Rad.*
*Research & Clinical Center for Infertility, Shahid Sadughi Medical University of Yazd.*
*Yazd, Iran*
*Tel:+98 913 1568644*
*Email:*
*Omid_amini2007@yahoo.com*

**Key words:** Pomegranin Protein, Punica Granatum – Sperm Capacitation – Sperm Count – Sperm Motility - Fertility

# بررسی تأثیر مصرف آب انار بر پارامترهای اسپرم و پتانسیل باروری در موش

**امید امینی‌راد [۱] دکتر محمدعلی خلیلی [۲] حمیدرضا سلطانی گردفرامرزی [۳]**

[۱] دانشجوی پزشکی، [۲] مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهیدصدوقی یزد [۳] دانشجوی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یزد

مجله پزشکی هرمزگان سال سیزدهم شماره سوم پاییز ۸۸ صفحات ۱۹۳-۱۸۸

## چکیده

***مقدمه:*** *باروری یک اسپرم به پارامترهای مختلفی نظیر تعداد، تحرک و مرفولوژی آن بستگی دارد که عوامل متعددی بر آن اثر می‌گذارند. رادیکال‌های آزاد از جمله این عوامل به شمار می‌آیند. عناصری همچون ویتامین E و C و پلی فنول خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. با توجه به ضعف مایع سمن در دفاع آنتی اکسیدانی و وجود مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فوق در آب انار، این مطالعه با هدف تعیین اثر مصرف آب انار بر پارامترهای اسپرم و پتانسیل باروری در موش صورت گرفته است.*

***روش کار:*** *در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۰ رأس موش نر بالغ به روش تصادفی انتخاب و با هدف بررسی تغییرات تعداد، تحرک (تعداد اسپرم های پیش‌رونده، غیرپیش‌رونده و بی‌تحرک) ، مورفولوژی (شکل و اندازه طبیعی) و پتانسیل باروری اسپرم بدنبال مصرف آب انار با غلظت ۲۰ درصد، در دو گروه ۱۰ تایی تقسیم‌بندی شدند. نتایج با آزمون آماری من‌ویتنی با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.*

***نتایج:*** *مصرف آب انار به طور معنی‌داری تعداد کل اسپرم در گروه مورد (۱۳/۶±۴۹/۷) را نسبت به گروه شاهد (۲/۱±۳۴/۱۵) افزایش داد ($P<0/05$). همچنین درصد اسپرم‌های غیر پیشرونده در گروه مورد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P=0/014$). مورفولوژی اسپرم‌ها ($P=0/001$) و همچنین تعداد موالید زنده موش‌های ماده هم قفس با موش های نر مورد مطالعه نیز در دو گروه مورد بررسی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P=0/007$).*

***نتیجه‌گیری:*** *به نظر می‌رسد مصرف آب انار در بهبود وضعیت پارامترهای اسپرم مؤثر است. بنابراین تجویز آن با توجه به گیاهی بودن آن، جهت بهبود وضعیت اسپرم مردان نابارور پیشنهاد می‌گردد.*

***کلیدواژه‌ها:*** *آب انار – پتانسیل باروری اسپرم – تعداد اسپرم – تحرک اسپرم – باروری*

نویسنده مسئول:
امید امینی راد
مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری
دانشگاه علوم پزشکی شهیدصدوقی یزد
یزد - ایران
تلفن: ۹۱۳۱۵۶۸۶۴۴ ۹۸+
پست الکترونیکی:
Omid_amini2007@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۷/۷/۶ اصلاح نهایی: ۸۸/۴/۳ پذیرش مقاله: ۸۸/۴/۱۷

**مقدمه:**

باروری یک اسپرم به پارامترهای مختلفی نظیر تعداد، تحرک و مرفولوژی آن بستگی دارد (۳-۱)، که بنابر مطالعات صورت گرفته، پارامترهای مذکور تا حد قابل توجهی نسبت به رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیرند (۴). در این میان (ROS) Reactive Oxygen Species از جمله قوی‌ترین رادیکال‌های آزاد به شمار می‌آید (۵). در طرف مقابل رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها وجود دارند که تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپید را کنترل، لاشه‌خواری و سرکوب می‌کنند (۵). در بررسی‌های صورت گرفته، مقادیر ناچیزی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مؤثر بر ROS و دیگر رادیکال‌های آزاد در اسپرم شناخته شده‌اند (۶). در میان آنتی‌اکسیدان‌های موجود، امروزه منابع گیاهی، توجه بسیاری از پژوهشگران را جلب کرده است که از جمله مطالعات مشابه صورت گرفته می‌توان به بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاهانی نظیر توت سیاه، تمشک و پرتقال اشاره کرد. در این میان انار از خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌تری برخوردار است (۷). انار میوه‌ای است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی (۸)، ضد سرطانی (۹)، ضد آپوپتوتیک (۱۰)، خاصیت محافظت از سلول‌های قلبی (۱۱) و ضدهیپرلیپیدمی (۱۲) را دارد. آب انار تازه غنی از ویتامین C و ترکیبات پلی فنولیک مثل آنتوسیانین، پونیکالژین، الاجیک اسید و گالیک اسید است (۵). همچنین پیش از این نیز مطالعاتی در خصوص اثرات ویتامین‌هایی نظیر ویتامین E و C بر پارامترهای اسپرم صورت گرفته است (۱۳). با توجه به ضعف مایع سمن در خصوص دفاع آنتی اکسیدانی (۱۴،۱۵) و همچنین با توجه به مطالعات مشابه پیشین در مورد اسپرم و عوامل مؤثر بر پارامترهای آن (۱۸-۱۶) و اثرات

فیزیولوژیک بررسی شده در مورد آب انار (۱۹) این مطالعه با هدف بررسی اثرات آب انار بر پارامترهای اسپرم و پتانسیل باروری در موش آزمایشگاهی صورت گرفته است.

## روش کار:

مطالعه حاضر، یک مطالعه تجربی بوده که طی آن تعداد ۲۰ رأس موش نر بالغ به روش تصادفی انتخاب و با هدف بررسی تغییرات تعداد، تحرک (تعداد اسپرم‌های پیشرونده، غیرپیشرونده و بی‌تحرک)، مورفولوژی (شکل و اندازه طبیعی) اسپرم و پتانسیل باروری بدنبال مصرف آب انار، در دو گروه دهتایی تقسیم‌بندی شدند بدین صورت که ابتدا موش‌ها به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط آزمایش، در خانه حیوانات با درجه حرارت کنترل شده (۲۲-۲۴ درجه سانتیگراد) و سیکل نوری ۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی نگهداری شدند. سپس گروه شاهد (n=۱۰) آب و غذای معمولی و گروه مورد (n=۱۰) فقط از آب انار تازه ٪۲۰ (۲۰) و غذای معمولی استفاده کردند (۲۱). این کار به مدت یک دوره اسپرماتوژنز موش یعنی یک ماه به طول انجامید. بعد هر یک از موش‌های هر دو گروه با یک موش ماده بالغ بصورت جداگانه در یک قفس قرار گرفتند تا از لحاظ پتانسیل باروری نیز بررسی شوند (۵). پتانسیل باروری یعنی توانایی تشکیل شدن جنین و چون موش‌های ماده آب انار مصرف نکرده‌اند، بهبود این پارامتر نشان‌دهنده افزایش تعداد اسپرم‌های سالم خواهد بود. برای بررسی این پارامتر تعداد نوزادان شمارش شدند. بعد از کشتن موش‌ها به روش قطع نخاعی، از قسمت دمی یکی از اپی‌دیدیم‌های آنها اتوپسی بعمل آمد و نمونه در ظرف کشت فالکن حاوی ۱۰۰۱µ محیط کشت T6 ( اسمولاریتی ۲۶۵ -۲۶۰ و PH ۴/۲-۷/۷) باز شد تا اسپرم‌ها آزاد شوند. محیط کشت بطور تازه تهیه شده و قبل از استفاده در انکوباتور ۳۷ درجه گرم شده بود. ۲ نمونه ۱۰۱ µ بعد از مخلوط کردن و یکدست‌سازی محیط کشت، از آن گرفته و در دو طرف لام تمیز ریخته شد. به یکی ۵ µl رنگ گیمسا اضافه شد تا مرفولوژی اسپرم‌ها بهتر سنجیده شود و به دیگری چیزی اضافه نشد تا از آن، جهت شمارش و تحرک اسپرم استفاده شود. لام را در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ×400 گذاشته و در چند شان میکروسکوپی به صورت تصادفی، اسپرم‌ها شمرده و از اعداد حاصله میانگین گرفته شد. سپس با دستگاه شمارنده تعداد ۱۰۰ اسپرم در ۳ دسته پیشرونده (progressive)، حرکت غیرپیشرونده (non prog) و بی‌تحرک (immotile) جای گرفتند. اسپرم پیشرونده شامل اسپرم‌هایی است که با ضربات شلاقی دم خود حرکت رو به جلو دارند. اسپرم با حرکت غیرپیشرونده اسپرم‌هایی هستند که فقط دم آنها حرکت دارد ولی سر آنها ثابت است و اسپرم بی‌تحرک هیچ حرکتی ندارد (۲۲). در آخر به کمک دستگاه کانتر و با استفاده از نمونه رنگ‌آمیزی شده، تعداد ۱۰۰ اسپرم به ۲ گروه طبیعی و غیرطبیعی تقسیم شدند. اسپرم‌ها با سر داسی شکل، دم صاف و هسته پررنگ طبیعی تلقی شده و بقیه غیرطبیعی دسته‌بندی شدند (۲۲). عمل شمارش چند بار تکرار و سپس از آنها میانگین گرفته شد. در نهایت نتایج پارامترهای اسپرم در میکروسکوپ نوری در دو گروه مقایسه شدند و تعداد، تحرک، مرفولوژی و پتانسیل باروری با تست آماری mann-whitney u و نرم‌افزار SPSS v.14 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

## نتایج:

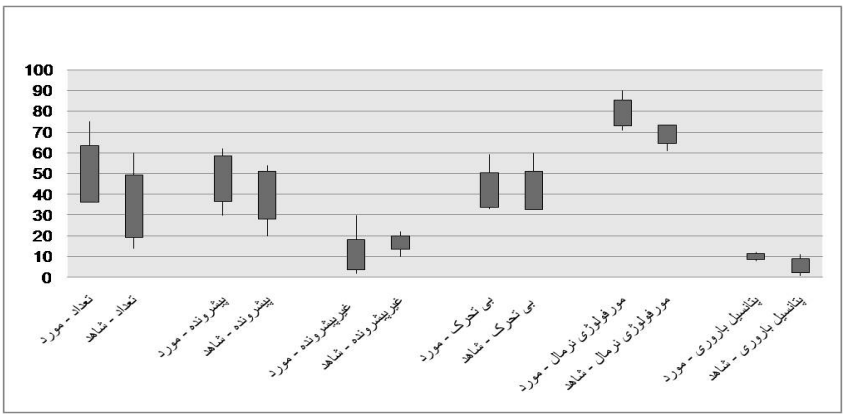
میانگین تعداد کل اسپرم‌ها در گروه مورد ۱۳/۶۱±۴۹/۷ و در گروه شاهد ۱۵/۱۸ ± ۳۴/۲۶ بدست آمد که ارتباط معنی‌داری (P=۰/۰۱۴) را از نظر تعداد اسپرم در دو گروه مورد بررسی بعد از مصرف آب انار نشان می‌دهد. از طرفی درصد اسپرم‌های طبیعی به عنوان شاخصی برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و ملاحظه شد که میانگین درصد اسپرم‌های گروه مورد (۶/۲۶ ± ۷۹/۱) بطور معنی‌داری از میانگین درصد اسپرم‌های گروه شاهد (۹/۵±۶۸/۴) کمتر می‌باشد (P=۰/۰۰۱).

همانطور که در نمودار شماره ۱ نیز به آن اشاره شده است، درصد اسپرم‌های پیشرونده به عنوان شاخصی برای ارزیابی قدرت تحرک اسپرم در دو گروه مورد و شاهد بررسی شد که میانگین این درصد در گروه مورد ۱۱/۱±۴۷/۵۵ و در گروه شاهد ۱۱/۵۷±۳۹/۵ بدست آمد که ارتباط معنی‌داری از این نظر در دو گروه مورد و شاهد وجود نداشت، در حالی که کاهش معنی‌داری از نظر درصد اسپرم‌های غیرپیشرونده در گروه مورد نسبت به گروه شاهد ملاحظه شد (P=۰/۰۰۷) (جدول شماره ۱). از این نظر نیز میانگین درصد اسپرم‌های غیرپیشرونده در گروه مورد (۷/۷۹±۱۰/۳) و در گروه شاهد (۷/۳۹±۱۶/۳) بود. همچنین میانگین درصد اسپرم‌های بی‌تحرک نیز در دو گروه مورد بررسی ارتباط معنی‌داری نداشتند. در نهایت قدرت باروری اسپرم موش‌ها از نظر تعداد موالید زنده موش‌های ماده هم قفس آنها بررسی شد و میانگین تعداد موالید

زنـده در گـروه مـورد ۱/۳۳±۱۰ و در گـروه شـاهد ۳/۳۷±۵/۵ بدست آمد (نمودار شماره ۱) که ارتباط معنی‌داری از نظر تعـداد موالید زنده در موش‌های ماده هم قفس با موش‌هـای نـر مـورد مطالعه بدنبال مصرف آب انار در دو گروه مورد بررسیمشاهده شد (P=۰/۰۰۷).

**جدول شماره ۱- نتایج حاصل از پارامترهای اسپرم و پتانسیل باروری در دو گروه مورد و شاهد**

| پارامترهای اسپرم | Min | | Max | | Mean±SD | | P-value |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | مورد | شاهد | مورد | شاهد | مورد | شاهد | |
| تعداد (۱۰۶ ×) | ۳۷ | ۱۴ | ۷۵ | ۶۰ | ۴۹/۱۳±۷/۶۱ | ۳۴/۱۵±۲۶/۱۸ | ۰/۰۱۴ |
| پیشرونده | ۳۰ | ۲۰ | ۶۲ | ۵۴ | ۴۷/۱۱±۵۵/۱ | ۳۹/۱۱±۵/۵۷ | ۰/۰۸۸ |
| غیرپیشرونده | ۲ | ۱۰ | ۳۰ | ۲۲ | ۱۰/۷±۳/۷۹ | ۱۶/۳±۷/۳۹ | ۰/۰۰۷ |
| بی‌تحرک | ۳۳ | ۳۳ | ۵۹ | ۶۰ | ۴۲/۸±۱۵/۳۷ | ۴۱/۹±۸/۳۴ | ۰/۷۳۰ |
| مرفولوژی طبیعی | ۷۱ | ۶۱ | ۹۰ | ۷۳ | ۷۹/۶±۱/۲۶ | ۶۸/۴±۹/۵ | ۰/۰۰۱ |
| پتانسیل باروری | ۸ | ۱ | ۱۲ | ۱۱ | ۱±۱۰/۳۳ | ۵/۳±۵/۳۷ | ۰/۰۰۷ |




**نمودار شماره ۱- شاخص‌های پراکندگی پارامتهای اسپرم در دو گروه مورد و شاهد**

## بحث و نتیجه‌گیری:

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف آب انار در بهبود بعضی پارامترهای اسپرم مؤثر است و می‌تواند پارامترهای تعداد، تحرک غیرپیشرونده و مرفولوژی طبیعی اسپرم را به طور معنی‌داری بهبود بخشد. Turk و همکاران در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ بر روی رت انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که آب انار با غلظت ۱۰۰٪ بر هر سه پارامتر مذکور، اثر معنی‌داری دارد و غلظت ۷۵٪ فقط بر پارامتر تعداد اسپرم مؤثر بوده و بر سایر پارامترها بی‌اثر می‌باشد. همین طور دوز ۲۵٪ بر هیچ پارامتری اثر نداشت. این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر تا حدود زیادی همخوانی دارد با این تفاوت که در مطالعه حاضر تنها دوز ۲۰ درصد آب انار، آن هم در موش سوری مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در گزارشات Turk آمده است که آب انار با خاصیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از ترکیبات فنولیک و ویتامین E و C، ملاتونین و لیکوپن خود باعث حذف رادیکال‌های آزاد می‌شود چون رادیکال‌های آزاد که در واکنش‌های روزمره بدن نیز تولید می‌شود را مسئول پراکسیداسیون لیپید غشا، کاهش تحرک اسپرم، آسیب به آن و در نهایت ناتوانی اسپرم در باروری تخمک و ایجاد یک حاملگی مؤثر (۲۳)، می‌دانند. (۵). این فرضیه توسط عده‌ای از محققین تأیید شده است (۲۳-۲۶) از طرفی ویتامین E (۲۷) و ویتامین C (۲۸) دو آنتی‌اکسیدان مؤثر در حذف رادیکل‌های آزاد هستند که در آب انار نیز به میزان قابل‌توجهی وجود دارند (۲۹). Acharya و همکارانش در سال ۲۰۰۷ موش‌ها را به کمک کادمیوم، در معرض یک استرس اکسیداتیو قرار دادند و شاهد کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پارامتر تعداد اسپرم و همچنین افزایش درصد اسپرم‌های غیرطبیعی بودند اما بعد از تجویز ویتامین E و C به این موش‌ها دریافتند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تعداد کل اسپرم افزایش یافته است و از

درصد اسپرم‌های غیرطبیعی نیز کاسته شده است (۱۳). لازم به ذکر است که پیش از این Zhang و Zheng در کشور چین نیز به نتایج مشابهی دست یافته بودند (۱۶). همچنین مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آب انار کاهش معنی‌داری را در درصد اسپرم‌های غیرپیشرونده و غیرطبیعی ایجاد می‌کند. به نظر Mazzilli و همکارانش، اسپرم‌های غیرپیشرونده و بی‌تحرک و غیرطبیعی همچون WBC، می‌توانند آنیون سوپراکسید تولید کنند (۱۷) که خود یک عامل اکسیداتیو است و می‌تواند باعث کاهش پارامترهای اسپرم از جمله تحرک شود (۱۸). همانطور که در نتایج ملاحظه شد آب انار علاوه بر تأثیر بر پارامترهای اسپرم به طور معنی‌داری نیز در افزایش تعداد موالید زنده در موش‌های ماده هم قفس با موش‌های نر مورد مطالعه، مؤثر است. ناگفته نماند که در تعیین تعداد موالید زنده موش‌های ماده هم قفس با موش‌های نر مورد مطالعه علاوه بر قدرت باروری موش‌های نر، توان باروری موش‌های ماده نیز مؤثر بوده است و همچنین عدم حاملگی گروهی از موش‌های ماده بدنبال طی شدن مدت زمان از پیش تعیین شده خود از مهم‌ترین محدودیت‌های مطالعه حاضر به شمار می‌آید. در نهایت با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر به نظر می‌رسد مصرف آب انار در بهبود وضعیت پارامترهای اسپرم مؤثر بوده و تجویز آن با توجه به اینکه گیاهی بوده و در دسترس‌می باشد جهت بهبود وضعیت اسپرم مردان نابارور پیشنهاد می‌گردد.

## References منابع


1. Check JH. Value of sperm morphology. *Fertile Steril*. 1995;8:571-576.
2. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. VI.Semen quality and certain other factors in relation to ease of conception. *Fertil Steril*. 1953;4:10-33.
3. Esmael zadeh S, Farsi M, Bijany A. Effects of sperm morphology on pregnancy rate in IUI cycles. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2007;8:205-212. [Persian]
4. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod*. 2001;16:1912-1921.
5. Türk G, Sönmez M, Aydin M, Yüce A, Gür S, Yüksel M, et al. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nutr*. 2008;27:289-296.
6. Esfandiari N, Sharma RK, Saleh RA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J Androl*. 2003;24:862-870.
7. Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M, Coleman R, Gaitini D, Nitecki S, et al. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Exp Clin Res*. 2002;28:49–62.
8. Ricci D, Giamperi L, Bucchini A, Fraternale D. Antioxidant activity of Punica granatum fruits. *Fitoterapia*. 2006;77:310–312.
9. Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-KappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer*. 2005;113:423-433.
10. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG,et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem*. 2005;16:360-367.

11. Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, Daubenmier JJ, Chew MH, Marlin R, et al. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart disease. *Am J Cardiol*. 2005;96:810-814.

12. Fuhrman B, Volkova N, Aviram M. Pomegranate juice inhibits oxidized LDL uptake and cholesterol biosynthesis in macrophages. *J Nutr Biochem*. 2005;16:570-576.

13. Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reprod Toxicol*. 2008;25:84-88.

14. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 1995;42:334-346.

15. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48:835-850.

16. Zheng RL, Zhang H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. *Free Radic Biol Med*. 1997;22:581-586.

17. Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil Steril*. 1994;62:862-868.

18. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TI, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertil Steril*. 2008;89:1183-1190.

19. Zarban A, Malekaneh M, Reza boghrati M. Antioxidant properties pomegranate juice and its scavenging effect on free radicals. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 2007;14:19-26. [Persian]

20. Boateng J, Verghese M, Shachelford L, Walker LT, Khatiwada J, Ogutu S, et al. Selected fruits azoxymethane (AOM)-induced aberrant crypt foci (ACF) in fisher 344 male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45:725-732.

21. Kempinas WD, Suarez JD, Roberts NL, Strader LF, Ferrell J, Goldman JM, et al. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. *Biol Reprod*. 1995;59:897-904.

22. World Health Organization. WHO laboratory manual for examination human semen and Semen-cervical mucus Interaction. Cambridge: Cambridge university press; 1999.

23. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ Jr, et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Repord*. 2001;16:1922-1930.

24. de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod*. 1997;2:48-54.

25. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:1-7.

26. Henkel R. The impact of oxidants on sperm functions. *Andrologia*. 2005;37:205-206.

27. Sönmez M, Yüce A, Türk G. The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod Toxicol*. 2007;23:226-231.

28. Sönmez M, Türk G, Yüce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*. 2005;63:2063-2072.

29. El-Nemr SE, Ismail IA, Ragab M. Chemical-composition of juice and seeds of pomegranate fruit. *Nahrung-Food*. 1990;34:601-606.