Original Article

Effects of trehalose and resveratrol on sperm cell parameters after cryopreservation

Hassani-Bafrani H, Haddad-Kashani H*, Shabehpour F

Anatomical Sciences Research Center, Basic Sciences Research Institute, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R. Iran.

Received: 2019/11/24 | Accepted: 2020/02/22

Abstract:

Background: Freezing human semen is considered an effective technique in assisted reproductive techniques (ART). During cryopreservation, sperm cells are exposed to chemical and physical stress, resulting in damage to the axonum, increased morphological deficits in the middle segment, and decreased sperm motility. In this study, the effects of trehalose and resveratrol antioxidants on sperm parameters during freezing and thawing processes were evaluated.

Materials and Methods: A cross-sectional study was performed on 40 normal semen samples divided into 7 groups. The effects of these antioxidants on sperm parameters were investigated by computer analysis (CASA) and sperm chromatin (SCD) evaluation. It should be noted that $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results: Group 3 (freezing and treating with 100 mM trehalose) showed the highest percentage of motility, acrosome membrane integrity, and plasma membrane integrity compared to the control group and had healthier DNA after thawing and fewer survival of sperm.

Conclusion: According to the results, it can be concluded that trehalose samples in general improve the quality of semen and even after thawing it is involved in maintaining sperm motility. Resveratrol causes toxicity at high concentrations and causes undesirable changes in osmotic pressure, but at low concentrations it has beneficial effects on sperm survival and inhibits ROS as a potent antioxidant.

Keywords: Cryopreservation, Sperm, Antioxidant, Trehalose, Resveratrol

***Corresponding Author:**
Email: hamedir2010@gmail.com
Tel: 0098 913 743 0153
Fax: 0098 315 554 0021

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2020; Vol. 24, No 3, Pages 270-281

Please cite this article as: Hassani-Bafrani H, Haddad-Kashani H, Shabehpour F. Effects of trehalose and resveratrol on sperm cell parameters after cryopreservation. ***Feyz*** 2020; 24(3): 270-81.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

تأثیرات ترهالوز و رزوراترول بر پارامترهای سلول اسپرم پس از فرآیند انجماد

حسن حسنی بافرانی [۱]، حامد حداد کاشانی [۲*]، فاطمه شابه‌پور [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: انجماد نمونه منی انسان به‌عنوان یک روش مؤثر در تکنیک‌های کمک‌باروری (ART) محسوب می‌شود. در طی روند انجماد، سلول‌های اسپرم در معرض استرس‌های فیزیکی و شیمیایی قرار می‌گیرند و در نتیجه آسیب به آکسونم، افزایش نقایص مورفولوژیکی قطعه میانی و کاهش تحرک اسپرم ایجاد می‌گردد. به این ترتیب در این مطالعه، تأثیرات آنتی‌اکسیدان‌های ترهالوز و رزوراترول بر پارامترهای اسپرم در طی فرآیندهای انجماد و ذوب مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: مطالعه مقطعی بر روی ۴۰ نمونه طبیعی مایع منی که در ۷ گروه تقسیم شده بودند، انجام گرفت. اثرات آنتی‌اکسیدان‌های مذکور بر پارامترهای اسپرم با روش‌های آنالیز کامپیوتری (CASA) و ارزیابی کروماتین اسپرم (SCD) بررسی گردید. لازم به ذکر است $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: گروه ۳ (تیمار محیط انجمادی و شستشو با ترهالوز ۱۰۰ میلی مولار)، بیشترین درصد تحرک، سالم بودن غشای آکروزوم و بی‌نقص بودن غشای پلاسمایی را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد و پس از ذوب نیز دارای DNA سالم بیشتری بود و کمتر بقای اسپرم را دچار مشکل می‌کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان بیان داشت که به‌طور کلی نمونه‌های دارای ترهالوز میزان کیفیت سیمن را بهبود می‌بخشند و حتی بعد از ذوب هم در حفظ تحرک اسپرم نقش دارند. رزوراترول هم در غلظت‌های پایین اثرات مفیدی روی بقای اسپرم دارد و به‌عنوان آنتی‌اکسیدانی قوی، ROS را مهار می‌کند.

واژگان کلیدی: انجماد، اسپرم، آنتی‌اکسیدان، ترهالوز، رزوراترول

دو ماه‌نامه علمی ـ پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۳، مرداد-شهریور ۱۳۹۹، صفحات ۲۸۱-۲۷۰

مقدمه

انجماد اسپرم انسان یکی از مؤثرترین راه‌ها برای حفظ توانایی تولیدمثل در مردان است و برای موارد مختلفی استفاده می‌شود؛ این موارد شامل ذخیره اسپرم قبل از رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و وازکتومی می‌باشد که مایع منی آن‌ها از نظر بیماری‌های هپاتیت و HIV بررسی می‌شود و جهت ذخیره اسپرم افراد آزواسپرمی عمل برداشت اسپرم از بیضه یا تخلیه اسپرم از اپیدیدیم به طریق زیرپوستی انجام می‌گردد. طی حفاظت انجمادی، سیمن تحت شوک سرمایی و فشار اسمزی قرار می‌گیرد و منجر به تغییراتی در شکل اسپرم، آسیب به میتوکندری، آکروزوم و دُم اسپرم می‌شود. حرکت اسپرم به تغییرات انجماد حساس‌تر است [۱].

۱. استاد، مرکز تحقیقات علوم تشریح، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات علوم تشریح، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. مرکز تحقیقات علوم تشریح، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**
کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریح، پژوهشکده علوم پایه، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

تلفن: ۰۹۱۳۷۴۳۰۱۵۳ **دورنویس:** ۰۳۱۵۵۵۴۰۰۲۱

پست الکترونیک: hamedir2010@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۳ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۸/۱۲/۳

فاکتورهای زیادی منجر به این تغییرات زیان‌آور می‌شوند که از آن جمله می‌توان به تشکیل یخ داخل سلولی، افزایش فشار اسمزی و افزایش غلظت محلول به‌دنبال کاهش تدریجی دما [۳،۲] اشاره کرد. این تغییرات منجر به از هم‌گسیختگی غیرقابل‌برگشت غشاهای هسته‌ای و پلاسمایی و به‌دنبال آن آشفتگی اندامک‌های داخل سلولی و تمرکز نامناسب کروماتین می‌شود. با این‌که مکانیسم‌های زیادی در ارتباط با آسیب اسپرماتوزوآ در طی انجماد وجود دارد، ولی از این میان تولید بیش از حد متابولیت‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) به‌عنوان مهم‌ترین فاکتور ذکر شده است. ROS در مایع منی توسط اسپرم (مخصوصاً نابالغ یا ناقص) و لوکوسیت‌ها تولید می‌شود. اگرچه مقدار کمی ROS برای عملکرد طبیعی اسپرم لازم است، ولی در صورتی‌که مقدار آن بالاتر رود باعث اختلال در عملکرد اسپرم می‌شود [۴]. اسپرم انسانی سوپراکسید آنیون (O_2^-) تولید می‌کند که به هیدروژن پروکساید (H_2O_2) تبدیل می‌شود [۵]. سوپراکسید و هیدروژن پروکساید این توانایی را دارند که به رادیکال هیدروکسیل (OH^-) تبدیل شوند و به اجزای سلولی آسیب وارد کنند [۶]. مکانیسم صدمه ROS به اسپرماتوزوا همچنین شامل آسیب اکسیداتیو به غشای لیپیدی اسپرم است که منجر به پراکسیداسیون لیپید (LPO) می‌شود [۷]. پلاسمای مایع منی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیماتیک و غیرآنزیماتیک است که اثرات تخریبی اکسیداتیوها را کم می‌کند

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

[۸]. مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌ها اسپرم را در برابر ROS تولیدشده توسط لکوسیت‌ها محافظت می‌نمایند و از قطعه‌قطعه شدن DNA جلوگیری می‌کنند، کیفیت سیمن را بهبود می‌بخشند، آسیب ناشی از انجماد اسپرم را کاهش داده، از بلوغ زودرس اسپرم جلوگیری و تحریک کلی را برای این سلول‌ها ایجاد می‌کنند [۹]. به این ترتیب طیفی از مواد محافظتی که اکثراً شامل آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شوند، به‌منظور کاهش آسیب‌های ناشی از انجماد به کار گرفته شده‌اند [۱۰]. ترهالوز، قندی دی‌ساکارید و غیراحیاکننده است که دارای دو واحد گلوکز متصل به هم در یک پیوند گلیکوزیدی می‌باشد [۱۲،۱۱]. موجودات آنیدروبیوتیک به‌طور کلی حاوی غلظت‌های بالای ترهالوز (و گاهی دیگر دی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدها) هستند. نشان داده شده است زمانی‌که نماتود آفلنکوس به آرامی آب از دست می‌دهد، به همان اندازه ۲۰ درصد از وزن خشک آن تبدیل به ترهالوز می‌شود. توانایی این موجودات برای زنده ماندن در نبود آب ارتباط قوی را با سنتز ترهالوز نشان می‌دهد [۱۲،۱۱]. غشای پلاسمایی جزئی کلیدی از سلول است و باید در طول انجماد محافظت شود. این کار توسط غشاهای مصنوعی، به‌عنوان مثال وزیکول‌های ورقه‌ای انجام می‌شود و آسیب ایجادشده به‌وسیله مخلوط شدن و ادغام را کاهش می‌دهد. همچنین یک‌سری از محافظت‌کننده‌های انجماد مثل ترهالوز و سوکروز نسبت به گلیسرول اثر محافظتی بیشتری دارند [۱۲،۱۱]. بنابراین این قندها احتمالاً در جلوگیری از تغییرات زیان‌آور در غشا در طول کم‌آبی نقشی کلیدی دارند. به‌علاوه قندها عملکردهای بسیاری برای اسپرم دارند؛ مانند انرژی را برای سلول اسپرم در طول انکوباسیون فراهم می‌کنند، فشار اسمزی را حفظ می‌کنند، مثل یک محافظ عمل کرده، سیالیت غشای اسپرم را افزایش می‌دهند، به اسپرماتوزوآ این قابلیت را می‌دهند تا آسیب‌های ناشی از انجماد – ذوب را تحمل کند. انجماد پوست جنین انسان توسط ترهالوز نیز گزارش شده است. بسیاری از مطالعات دیگر نیز اثرات مثبت ترهالوز را در حفظ سلول‌های خشک‌شده [۱۲،۱۱] و لیپوزوم‌ها نشان داده‌اند. مکانیسمی که به‌وسیله آن ترهالوز سلول‌ها را از کم‌آبی یا انجماد محافظت می‌کند، به‌نظر می‌رسد که شامل برقراری ثبات در پروتئین‌ها و غشاهای سلولی است؛ اگرچه طبیعت این مکانیسم هم‌چنان مبهم باقی مانده است، برخی مطالعات بر این باورند که توقف آسیب در سیالیت غشای سلول عامل آن می‌باشد [۱۲،۱۱].

رزوراترول

رزوراترول پلی‌فنلی طبیعی است که توسط گونه‌های مختلف گیاهی در پاسخ به آسیب، تابش اشعه فرابنفش و حمله‌های قارچی سنتز می‌شود. رزوراترول و فلاونوئیدها توسط گیاهان و از یک مسیر مشترک سنتز می‌شوند. همچنین رزوراترول یک فیتوآلکسین است [۱۲،۱۱]. رزوراترول در دوزهای پایین خود بقای سلول را فراهم می‌کند، مانند محافظت قلبی و عصبی؛ و در عین‌حال دوزهای بالای آن باعث افزایش مرگ سلولی در درمان سرطان می‌شود. یکی از فعالیت‌های بیولوژیکی رزوراترول پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن است و به‌دلیل این‌که تعامل بیشتری با رادیکال‌های آزاد در تغییر لایه لیپیدی دارد، قادر است خود را به غشاهای پروکسیدازی سفت و سخت برساند و سیالیت غشا را افزایش دهد. بنابراین، رزوراترول در غشاهای سلول در برابر پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب DNA ایجادشده توسط ROS اثری محافظتی نشان می‌دهد. Blond و همکارانش نشان دادند که در میکروزوم‌های کبد موش صحرایی، در پراکسیداسیون وابسته به NADPH یا غیرآنزیمی، غلظت موردنیاز رزوراترول در مقایسه با کوئرکتین برای تولید ۵۰ درصد مهار پراکسیداسیونی حدود سه برابر کمتر بود. به علاوه این آنتی‌اکسیدان، متابولیسم لیپوپروتئین را تنظیم و تجمع پلاکتی را مهار و به‌طور کل فعالیتی درمانی را اعمال می‌کند. اعتقاد بر این است که تغییر در خواص لیپوپروتئین‌هایی با چگالی کم توسط اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع (PUFA) نقش مهمی را در تصلب شرائین ایفا می‌کند. اکسیداسیون روی کاتابولیسم بخش پروتئینی ذرات مضر LDL (APO B) توسط سیستم گیرنده‌های APO B/E تأثیر می‌گذارد، بنابراین نقش محافظتی غذاهای غنی از ترکیبات فنلی به خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نسبت داده شده است. با توجه به مطالعات زیاد درون سلولی، رزوراترول به‌صورت مکمل به خوبی جذب، به سرعت متابولیزه و به‌طور عمده به سولفونات و ترکیبات گلوکورونیداز که از طریق ادرار دفع می‌شوند، تبدیل می‌شود. به‌نظر می‌رسد رزوراترول قابل تحمل است و هیچ سمّیتی ایجاد نمی‌کند. ترهالوز، قندی دی‌ساکارید و غیراحیاکننده است که دارای دو واحد گلوکز متصل به هم در یک پیوند گلیکوزیدی می‌باشد. این قند در طیف وسیعی از موجودات، شامل: باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها، حشرات، بی‌مهرگان و گیاهان پست و عالی وجود دارد. [۱۳]. یکی از نقش‌های ترهالوز حفاظت سلول‌ها در برابر رادیکال‌های اکسیژن است. روبه‌رو شدن ساکارومایسز سرویزیه با یک شوک حرارتی ملایم یا قرار گرفتن در مقابل یک بازدارنده پروتئوزوم باعث ذخیره ترهالوز می‌شود و همچنین به‌طور قابل ملاحظه‌ای بقای سلول‌ها را در مقابله با سیستم مولد رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. با این‌حال زمانی‌که سلول‌ها به دمای طبیعی رشدشان برگردانده می‌شوند، هم حجم ترهالوز و هم مقاومت آن به استرس اکسیژنی به سرعت کاهش پیدا می‌کند [۱۴]. ترهالوز و سوکروز هر دو قندهای غیراحیاکننده‌ای هستند که شباهتی عمده

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

در سنتز و عملکردشان وجود دارد. هر دو در سیتوزول سلول‌ها ذخیره می‌شوند و ممکن است در سلول‌های مربوط به خودشان بسته به شرایط مختلف محیطی در غلظت‌های بالا حضور پیدا کنند. همچنین انجماد پوست جنین انسان توسط ترهالوز گزارش شده است و لیپوزوم‌ها آن را نشان داده‌اند. مکانیسمی که ترهالوز به‌وسیله آن، سلول‌ها را از کم‌آبی یا انجماد محافظت می‌کند، به‌نظر می‌رسد که شامل: برقراری ثبات در پروتئین‌ها و غشاهای سلولی باشد؛ اگرچه طبیعت این مکانیسم هم‌چنان مبهم باقی مانده است، برخی مطالعات بر این باورند که توقف آسیب در سیالیت غشای سلول باعث آن می‌باشد [۱۵]. رزوراترول پلی‌فنلی طبیعی است که توسط گونه‌های مختلف گیاهی در پاسخ به آسیب، تابش اشعه فرابنفش و حمله‌های قارچی سنتز می‌شود؛ اگرچه مکانیسم دقیق سمّیت رزوراترول هنوز تعریف نشده، با این‌حال غلظت‌های بالای رزوراترول از تشکیل F1 پمپ پروتونی F0/F1-ATPase غشای درونی میتوکندری که مسؤول سنتز ATP از ADP در مسیر فسفوریلاسیون اکسیداتیو می‌باشد، جلوگیری می‌کند. [۱۶]. Li و همکارانش نشان دادند ROS در فرآیند انجماد باعث صدماتی می‌شود و آسکوربات (ascorbate) و کاتالاز (catalase) در محیط انجمادی با کنترل سطح ROS، آسیب‌های ناشی از انجماد را کاهش می‌دهند [۱۷]. Branco و همکارانش نیز اثرات رزوراترول و اسید آسکوربیک را بر آسیب DNA ناشی از فرآیند انجماد بررسی کردند و نشان دادند رزوراترول این آسیب را در هر دو گروه مردان بارور و نابارور؛ و اسید آسکوربیک تنها در گروه مردان نابارور کاهش داده است [۱۸]. در تحقیقی دیگر ویتامین E را در محیط انجماد گروهی از مردان آزو اسپرم اثر دادند و اثرات مثبت آن را بر حرکت اسپرم و حفظ ساختار DNA بعد از ذوب مشاهده کردند [۱۹]. در طی تحقیقی که توسط Fatma و همکارانش انجام شد، اثر روغن هسته خرما را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان بر بهبود کیفیت اسپرم طی آسیب وارده توسط H_2O_2 بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که میزان تحرک و بقای اسپرم افزایش و واکنش آکروزومی بهبود یافته است [۲۰]. در تحقیقی در دانشگاه خرم‌آباد زعفران را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان گیاهی در رژیم غذایی تعدادی مرد غیربارور اثر دادند و مشاهده کردند میزان تحرک و شکل اسپرم بهبود یافته است [۲۱]. از مطالب فوق این نتیجه به‌دست می‌آید که استفاده از یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی برای حفظ کیفیت اسپرم در برابر فرآیند انجماد – ذوب در مراحل انجماد اسپرم امری لازم و ضروری می‌باشد. نمونه‌های سیمن دارای ترهالوز، تحرک و بقای اسپرم‌های منجمدشده پستانداران را بهبود می‌بخشند [۲۱]. در حالتی که آب سلول کاهش می‌یابد، ترهالوز در جلوگیری از تغییرات آسیب‌رسان به غشا نقش کلیدی دارد؛ و عمل آن به جایگزین کردن آب در غشای اسپرم مربوط می‌شود [۲۱]. هم‌چنین حالت پایداری را در پروتئین‌ها و لیپیدهای غشا در طول استرس‌ها ایجاد می‌کند؛ شرایطی مانند: انجماد، گرما، خشکی و استرس اکسیداتیو [۲۱]. ترهالوز در شرایط هایپرتونیک با گلیسرول اثر سینرژیک دارد و مانند یک محافظ از تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی جلوگیری می‌کند [۲۱]. بنابراین در این مطالعه تلاش بر آن است تا از ترهالوز و رزوراترول برای بهبود پارامترهای کیفی و کیفیت کروماتین اسپرم انسان پس از فرآیند انجماد – ذوب استفاده گردد. با توجه به تأثیرات ترهالوز و رزوراترول بر کیفیت پارامترهای اسپرم، در این مطالعه به بررسی تأثیر این ترکیبات بر کیفیت اسپرم می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها

جامعه پژوهش از ۴۰ بیمار مرد بارور مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری تشکیل شده است که ۲۵ تا ۴۵ سال دارند و براساس استانداردهای WHO نرمال هستند [۲۲] و برای درمان ناباروری همسرانشان به مرکز باروری و ناباروری مراجعه و موافقت خود را برای همکاری با طرح اعلام نمودند. در این مطالعه هر فرد تحت تیمار یک روش درمانی قرار گرفت و از هرکدام یک بار نمونه‌گیری انجام شد. به این ترتیب که چهل نفر به گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی شدند و بر روی اسپرم هر فرد ۶ مدل تیمار صورت گرفت. نمونه‌های گرفته‌شده در ظروف پلاستیکی استریل مخصوص، جمع‌آوری شد. پس از مایع‌شدن نمونه‌ها (liquefaction)، اسمیر لام خشک از نمونه، جهت بررسی پارامترهای اسپرم تهیه و براساس استانداردهای سازمان بهداشت جهانی تعیین شد. در مرحله اول از آنتی‌اکسیدان ترهالوز (Trehalose - Sigma - T5251)، و در مرحله دوم از آنتی‌اکسیدان رزوراترول (Resveratrol – Sigma - R5010)، استفاده شد. از تمامی افراد شرکت‌کننده در این طرح، رضایت‌نامه اخلاقی گرفته شد. نمونه‌های به‌دست‌آمده مطابق معیارهای WHO بارور محسوب شدند [۲۲]. در کلیه مراحل تحقیق، اصول بیانیه هلسینکی و مصوبات کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی رعایت شد و اطلاعات بیماران محرمانه باقی ماند.

روش اجرای آزمایش

گروه اول (گروه کنترل):

نمونه‌های سیمن + محیط کشت Ham's F-10 + ۱۰ درصد سرم.

گروه دوم (گروه کنترل انجماد):

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

نمونه‌های سیمن + محلول انجمادی.
گروه سوم، چهارم، پنجم، ششم، هفتم و هشتم(گروه انجمادی): نمونه‌های سیمن + غلظت‌های مختلف ترهالوز و رزوراترول.
در انتهای هر مرحله پس از شستشوی اسپرم با روش‌های استاندارد Pure و Swim up نمونه‌ها را به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور $37^{\circ}C$ انکوبه کردیم. سپس نمونه‌های هر گروه از لحاظ پارامترهای اسپرم بررسی و ارزیابی ساختار کروماتینی اسپرم نیز انجام شد. ابتدا سیمن را در تیوب‌های موردنظر ریخته، به مقدار مساوی از حجم سیمن به محیط کشت اضافه کردیم و آن را کاملاً مخلوط نمودیم و سپس آن را داخل سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم. در ادامه با سمپلر، مایع رویی پلاک را کشیدیم، بعد به اندازه ۱۰۰۱-۵۰۰μ از محیط کشت حاوی غلظت موردنظر را از دیواره ظرف به آرامی روی پلاک تشکیل‌شده ریختیم، به‌طوری‌که پلاک به هم نخورد. سپس آن را به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه داخل انکوباتور قرار دادیم. در این مدت اسپرم‌های فعال شروع به حرکت و شنا کردن به سمت بالا، درون محیط کشت می‌کنند. پس از انکوباسیون نصف از سطح رویی لوله را اسپیره کرده (برداشت کرده)، از آن برای ارزیابی پارامترهای مختلف اسپرم استفاده می‌کنیم. در روش انجماد، نمونه سیمن را به‌صورت fresh به اندازه موردنظر داخل میکروتیوب می‌ریزیم. ۱۰ دقیقه قبل از شروع کار انجماد، محیط انجماد را از یخچال خارج می‌کنیم تا هم‌دمای محیط شود و ۳۰ دقیقه قبل محیط انجمادهای الیکوت‌شده حاوی غلظت‌های مختلف را از فریزر خارج می‌کنیم تا در دمای محیط ذوب شود. محیط فریز را به‌صورت قطره‌قطره بر روی سیمن می‌ریزیم و هم‌زمان پیپتاژ می‌کنیم. نسبت سیمن به محیط انجمادی ۱ به ۱ است. پس از اضافه کردن محیط انجماد به‌مدت ۱۰ دقیقه آن را در دمای اتاق می‌گذاریم. در این مدت مواد مخلوط‌شده را داخل نی‌های مخصوص فریز اسپرم لود می‌کنیم. نی‌ها را داخل container و به‌مدت ۳۰ دقیقه بر روی بخار نیتروژن (۷cm بالاتر از سطح نیتروژن مایع) قرار می‌دهیم. Containerها را داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور می‌کنیم تا حباب داخل آن کاملاً تخلیه شود، سپس آن را به تانک ازت منتقل می‌کنیم. در روش گرم کردن پس از گذشت ۲ هفته نی‌ها را از ازت خارج می‌کنیم و به‌مدت ۴۰ ثانیه با دستمال کاغذی به آرامی ماساژ می‌دهیم. سپس نی‌ها را به‌مدت ۱ دقیقه داخل آب ۳۰° قرار می‌دهیم، بعد آن را کاملاً خشک می‌کنیم و محتوای داخل نی را به تیوب‌های موردنظر انتقال می‌دهیم. برای برداشت محیط انجمادی از اسپرم‌ها یک‌بار شستشو انجام می‌دهیم. برای شستشو به نسبت ۱ به ۱ محتویات نی را با Hams F10 حاوی غلظت مخلوط نموده، آن را به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ به سانتریفیوژ، منتقل می‌کنیم. پس از سانتریفیوژ مایع رویی را برداشته، روی پلاک باقی‌مانده به اندازه مناسب از استوک‌های موردنظر می‌ریزیم. در پایان تیوب‌های حاوی اسپرم را به‌مدت ۳۰ دقیقه داخل انکوباتور قرار می‌دهیم و پس از swim up پارامترهای اسپرم را بررسی می‌کنیم.

بررسی غلظت اسپرم

برای مطالعه غلظت اسپرم ۵μl از نمونه را روی لام می‌گذاریم، سپس در زیر میکروسکوپ با کمک لام نئوبار تعداد اسپرم‌ها را پس هر آزمایش مورد بررسی قرار می‌دهیم. برای هر نمونه با تغییر مکان میکروسل ۱۰-۷ فریم متعدد گرفته و درصد کل غلظت ثبت شد.

بررسی مورفولوژی اسپرم با رنگ‌آمیزی Diff Quick

حدود ۲۰μl از اسپرم به‌صورت اسمیر روی لام کشیده و ۱ تا ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷° انکوبه قرار داده شد. نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درجه به‌مدت ۲۰ تا ۲۵ ثانیه فیکس شدند. سپس با محلول Diff A به‌مدت ۲۰ تا ۲۵ ثانیه و بعد با محلول Diff B به‌مدت ۲۰ تا ۲۵ ثانیه رنگ‌آمیزی می‌شوند. پس از خشک شدن با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× توسط روغن امرسیون (در هر نمونه ۱۰۰ عدد اسپرم) بررسی می‌گردد. برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم از معیار WHO استفاده می‌شود [۲۲] که شامل: الف) ناهنجاری‌های مربوط به سر، ب) ناهنجاری‌های مربوط به گردن و ج) ناهنجاری‌های مربوط به دم می‌باشد.

بررسی بقای اسپرم

بدین‌منظور حجم مساوی از نمونه اسپرم و رنگ تریپان بلو (۱۰۰μl) را با هم در یک میکروتیوب مخلوط نموده، پس از گذشت ۱۰-۵ دقیقه حدود ۲۰μl از آن را با سمپلر برداشته، روی لام می‌گذاریم و سپس یک لامل بر روی آن قرار داده، با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ میزان بقا را مورد ارزیابی قرار می‌دهیم. اگر اسپرم در زمان رنگ‌آمیزی زنده باشد، رنگ تریپان بلو را به خود نمی‌گیرد، در نتیجه قسمت سر و تنه آن رنگ و حالت روشن‌تری دارد (سفید براق)؛ در حالی‌که اسپرم‌های مرده به‌دلیل نقص در غشاهای پلاسمایی خود رنگ تریپان بلو را به خود گرفته، به رنگ تیره در می‌آیند.

انجام اسپرموگرام

پس از Liquefaction سیمن، پارامترهای اسپرم براساس استانداردهای WHO اندازه‌گیری می‌شوند [۲۲]. شستشوی اسپرم با روش‌های استاندارد Pure و Swim up انجام می‌شود. ارزیابی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

پارامترهای اسپرم (تعداد، تحرک، مورفولوژی و بقای اسپرم) طبق معیارهای WHO [۲۲] بررسی می‌گردد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها پس از جمع‌آوری و ورود به نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶، از طریق آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌های تکراری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. لازم به ذکر است $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مایع منی ۴۰ نفر که به مراکز نازایی بیمارستان شهید بهشتی کاشان مراجعه نموده بودند و براساس معیارهای استاندارد WHO و Kruger criteria (Motility>60% and morphology>15%) دارای اسپرم طبیعی بودند، از لحاظ پارامترهای کلاسیک اسپرم، مانند حجم، رنگ، ویسکوزیته تعداد و تحرک، مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی‌های مختلف بر روی نمونه‌های اسپرم نشان‌دهنده تأثیر مثبت ترهالوز و رزوراترول بر روی تعداد اسپرم‌ها پس از انجماد می‌باشد. پس از بررسی دوزهای مختلف ترهالوز و رزوراترول مطابق جدول ۱، دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار از ترهالوز و ۱۰ و ۱۵ میکرومولار از رزوراترول به‌عنوان دوز منتخب از مرحله قبلی جهت ادامه مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ ترهالوز تأثیر کیفی بهتری بر پارامترهای اسپرم داشتند، اما افزایش میزان دوز دارویی تأثیر سوء بر پارامترهای اسپرم داشت. همچنین در مورد رزوراترول دوزهای ۱۰ و ۱۵ تأثیر مناسب‌تری نسبت به دوزهای دیگر داشتند. در این مطالعه تعداد اسپرم براساس $۱۰^۶$ در هر میلی‌لیتر مایع منی محاسبه گردیده است.

جدول شماره ۱- مقایسه‌ی میانگین تعداد پارامترهای اسپرم در بین گروه‌های مختلف آزمایشی پس از تیمار با آنتی‌اکسیدان‌های ترهالوز و رزوراتول

گروه‌ها		تعداد	تحرک
کنترل		۶۵/۶۲± ۱/۱۷	۸۷/۲۷± ۱/۵۳
انجماد		۵۳/۶۲± ۱/۵	۷۸/۲۲± ۲/۴
Trehalose	mM۵۰	۵۱/۶۲± ۱/۷	۸۰/۷۰± ۲/۹
	mM۱۰۰	۶۲/۲۵± ۱/۷	۸۸/۴۰± ۲/۱
	mM۲۰۰	۳۸/۰۵± ۰/۱۰	۶۸/۹۰± ۰/۵۲
Resveratrol	µM۱۰	۴۷/۵۵± ۱/۴	۵۴/۴۰± ۱/۲
	µM۱۵	۳۶/۱۵± ۱/۶	۳۸/۱۲± ۲/۲
	µM۵۰	۳۰/۱۰± ۰/۱۴	۲۵/۰۹± ۰/۴۶

گروه اول (کنترل قبل از انجماد): نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت $Ham´s\ F_{10}$ + ٪۱۰ سرم

گروه دوم (پس از انجماد): نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت $Ham´s\ F_{10}$ + ٪۱۰ سرم

گروه سوم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت $Ham´s\ F_{10}$ + ٪۱۰ سرم + ترهالوز ۵۰ mM

گروه چهارم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت $Ham´s\ F_{10}$ + ٪۱۰ سرم + ترهالوز ۱۰۰ mM

گروه پنجم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت $Ham´s\ F_{10}$ + ٪۱۰ سرم + ترهالوز ۲۰۰ mM

گروه ششم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت $Ham´s\ F_{10}$ + ٪۱۰ سرم + رزوراترول ۱۰ µM

گروه هفتم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت $Ham´s\ F_{10}$ + ٪۱۰ سرم + رزوراترول ۱۵ µM

گروه هشتم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت $Ham´s\ F_{10}$ + ٪۱۰ سرم + رزوراترول ۵۰ µM

ارزیابی و مقایسه اسپرموگرام نمونه‌های اسپرمی بین گروه‌های مختلف آزمایشی

مقایسه میزان تعداد در گروه‌های مختلف آزمایشی

تعداد اسپرم‌ها پس از مرحله انجماد به‌صورت معنی‌داری ($P\leq۰/۰۰۰۱$) کاهش یافت، این کاهش به‌خاطر اثرات مضر انجماد است که بر روی تعداد اسپرم‌های زنده در مرحله Swim up به‌جای می‌گذارد. در این مطالعه در تعداد اسپرم‌ها در گروه‌های تیمارشده با ترهالوز و رزوراترول گرچه افزایش معناداری نسبت به گروه انجماد دیده نمی‌شود $P>۰/۰۵$، ولی در گروه تیمارشده با ترهالوز ۱۰۰mM نسبت به سایر گروه‌های تیمارشده افزایش دیده می‌شود که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثر مثبت آنتی‌اکسیدانی بر محیط انجمادی باشد. این مطالعه نشان داد که ترهالوز ۱۰۰ تأثیر بهبوددهندگی بهتری بر پارامترهای اسپرم نسبت به سایر دوزهای دارویی دارد (جدول شماره ۲).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین پارامترهای اسپرم در بین گروه‌های مختلف آزمایشی پس از انجماد و تیمار با آنتی‌اکسیدان‌های ترهالوز و رزوراترول

متغیر / گروه ها	کنترل	انجماد	انجماد+ترهالوز ۵۰	انجماد+ترهالوز ۱۰۰	انجماد+رزوراترول ۱۰	انجماد+رزوراترول ۱۵	*P
*تعداد اسپرم (10^6/mL)	۶۵/۶۲±۱/۱۷	۵۳/۴±۱/۵	۵۱/۶۲±۱/۷	۶۱/۲۵±۱/۷	۴۷/۵۵±۱/۴	۳۶/۱۵±۱/۶	۰
درصد تحرک اسپرم	۸۶/۲۷±۱/۵	۷۸/۲۲±۲/۴	۸۰/۷۰±۲/۹	۸۸/۴۰±۲/۱	۵۴/۴۰±۱/۲	۳۸/۱۲±۲/۲	۰
درصد بقای اسپرم	۸۰/۹۰±۲/۷	۶۴/۳۰±۲/۴	۶۰/۱۷±۲/۱	۷۶/۴۷±۱۱/۵	۷۰/۷۲±۳/۳	۴۹/۹۲±۲/۳	۰
درصد مورفولوژی طبیعی	۵۴/۲۲±۱/۹	۴۹/۷۰±۲/۵	۳۰/۵۷±۲/۱	۴۴/۳۰±۲/۰	۳۳/۰۵±۱/۹	۲۰/۸۲±۲/۴	۰
درصد پراکندگی کروماتین	۴۸/۵۰±۲/۳۳	۵۴/۰۵±۳/۳	۳۶/۶۰±۱/۹	۲۰/۲۰±۲/۵	۳۲/۰۷±۱/۹	۵۰/۶۷±۳/۶	۰

*$P<0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است. داده‌های داخل جدول به‌صورت انحراف‌معیار ± میانگین گزارش شده است.

*تعداد اسپرم (10^6/mL): تعداد اسپرم براساس 10^6 در هر میلی‌لیتر مایع منی محاسبه گردیده است.

مقایسه میزان تحرک در گروه‌های مختلف آزمایشی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در گروه کنترل، درصد تحرک اسپرم‌ها ۱/۵±۸۶/۲۷ بوده که نسبت به سایر گروه‌های مورد آزمایش تغییر معناداری نداشته است $P>0/05$. گرچه در گروه‌های انجمادی نسبت به گروه کنترل افزایش دیده می‌شود که می‌تواند به‌خاطر کاهش شدید تعداد اسپرم‌ها به‌دنبال فرآیند انجماد باشد که در مرحله swim up تعداد اسپرم‌های متحرک به‌شدت کاهش می‌یابد.

طبق جدول شماره ۲، درصد تحرک در گروه‌های آزمایشی محیط انجمادی + تیمار محیط انجمادی با ترهالوز ۱۰۰mM نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معناداری نشان داده است $P<0/05$. این مقدار افزایش می‌تواند ناشی از اثر آنتی‌اکسیدانی ترهالوز در مرحله پس از انجماد باشد که این افزایش در این گروه در مورد پارامتر تعداد هم دیده شد.

مقایسه قابلیت بقای اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی

مطابق با نتایج به‌دست‌آمده در گروه کنترل، قابلیت بقای اسپرم‌ها ۲/۷±۸۰/۹۰ بوده است که پس از انجماد این مقدار کاهش یافته و این کاهش معنادار بوده است $P<0/05$. قابلیت بقای پس از انجماد در گروه انجمادی + تیمار با ترهالوز ۱۰۰mM نسبت به سایر گروه‌ها و حتی گروه انجمادی افزایش معنادار نشان داده است $P<0/05$؛ ولی نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداده است $P>0/05$ که این موضوع بیانگر تأثیر مثبت ترهالوز ۱۰۰ میلی‌مولار بر پارامتر افزایش بقا می‌باشد.

مقایسه میزان مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف آزمایشی

مطابق با نتایج به‌دست‌آمده، در گروه کنترل، میزان مورفولوژی طبیعی اسپرم ۱/۹±۵۴/۲۲ بود که پس از انجماد در گروه انجمادی + تیمار محیط انجمادی با ترهالوز ۵۰mM و گروه انجمادی + تیمار محیط انجمادی با رزوراترول ۱۵μM اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید.

مقایسه پراکندگی کروماتین اسپرم (SCD) در گروه‌های مختلف آزمایشی

مطابق با نتایج، درصد پراکندگی نمونه‌های سالم ۲/۳±۴۸/۵۰ بود که در آن نسبت به سایر گروه‌ها در مرحله انجمادی کاهش معناداری $P<0/05$ مشاهده شد. همچنین در گروه‌های انجمادی بین گروه کنترل انجماد در مقایسه با سه گروه تیمار افزایش معناداری $P<0/05$ دیده شد؛ که شاید به این دلیل باشد که آنتی‌اکسیدان‌ها تا مقداری از تخریب DNA جلوگیری کرده‌اند.

بحث

اساسی‌ترین و رایج‌ترین آزمایش مورد استفاده در زمینه پیش‌بینی باروری، بررسی کیفیت پارامترهای اسپرم می‌باشد [۲۳]. نظر به این‌که افزایش کیفیت اسپرماتوزوآ، رابطه مستقیمی با موفقیت در باروری دارد و اسپرم‌هایی با تحرک بالا و مورفولوژی نرمال منجر به افزایش میزان باروری می‌گردند، پس می‌توان با جداسازی اسپرم‌های پرتحرک و سالم، گامی مهم در افزایش میزان موفقیت IVF برداشت. بنابراین در این مطالعه سعی شد تا با استفاده از روش Swim up به اسپرم‌هایی با کیفیت بالا دست یابیم. مسأله مهم دیگر که کیفیت اسپرماتوزوآ را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد، افزایش سطح ROS در مایع منی می‌باشد؛ افزایش تولید ROS و ایجاد استرس اکسیداسیون، سبب لیپید پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی اسپرم و همچنین آسیب به ویژگی‌های حرکتی اسپرم‌ها و ساختار کروماتین می‌شوند و در نهایت توانایی باروری اسپرم را کاهش می‌دهند [۲۴]. برای همین در این مطالعه سعی شد با استفاده از اثرات آنتی‌اکسیدان‌های ترهالوز و رزوراترول در ضمن فرآیند انجماد و

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

ذوب، کیفیت اسپرم‌های Swim up شده را در بالاترین سطح پس از انجماد حفظ نماییم.

بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها بر پارامترهای اسپرمی پس از فرآیند انجماد – ذوب

طی فرآیند انجماد – ذوب، کاهش سطح آنتی‌اکسیدان و افزایش غلظت ROS رخ می‌دهد که سبب نقص‌های فراوانی در غشا و در نهایت مورفولوژی اسپرم می‌گردد. افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی سبب افزایش معنادار اسپرم‌های غیرطبیعی و در نتیجه کاهش معنی‌دار تحرک و توانایی بقای اسپرم‌ها می‌شود [۲۵]. در تحقیق حاضر تعداد اسپرم‌ها پس از انجماد نیز بررسی و نشان داده شد که تغییرات شدید دمایی طی انجماد یک پدیده طبیعی نیست که سلول بتواند خود را با آن تطبیق دهد و به دنبال این تغییرات کاهش تعداد اسپرم ایجاد می‌شود. اسپرم یک سلول هوازی است و طی عمل سوخت‌وساز خود، رادیکال آزاد تولید می‌نماید و این عملکرد را در طول مدت انجماد به‌صورت مداوم حفظ می‌کند؛ بنابراین به‌دلیل کاهش سطح آنتی‌اکسیدان موجود در مایع منی، توازن طبیعی بین تولید ROS و سطح آنتی‌اکسیدان در اسپرم به هم می‌خورد و به این ترتیب به‌دلیل عدم تعادل ایجادشده، تغییرات مخربی در کیفیت ساختار اسپرم و عملکرد آن ایجاد خواهد شد. در طی تکنیک‌های پردازش اسپرم، بخشی از حجم سمینال پلاسما (که حاوی انواع آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد) برداشته می‌شود؛ همچنین به‌دلیل سانتریفیوژهای مکرر، تولید ROS نیز افزایش می‌یابد [۲۵]. علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در زمینه شناخت بیولوژی انجماد و استفاده از روش‌های گوناگون در انجماد اسپرم، هنوز هم درصد موفقیت لقاح و باروری با اسپرم منجمد – ذوب‌شده پایین است. در تحقیق حاضر نیز همانند سایر تحقیقات نشان داده شد که فرآیند انجماد – ذوب به‌دلیل وجود عوامل مختلف آسیب‌زننده به سلول از قبیل شوک سرمایی و استرس اکسیداتیو، سبب کاهش کیفیت اسپرم و در نتیجه کاهش پتانسیل باروری می‌شود. غشای اسپرم نسبت به پراکسید هیدروژن H_2O_2 فوق‌العاده نفوذپذیر می‌باشد و به‌نظر می‌رسد که مهم‌ترین عامل آسیب‌رسان به اسپرم همین H_2O_2 است که افزایش آن باعث لیپید پراکسیداسیون غشا می‌شود [۲۶] و از آن‌جایی‌که اسپرم انسان دارای مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است، فوق‌العاده نسبت به لیپید پراکسیداسیون حساس می‌باشد [۲۷]. از سوی دیگر پروکسی نیتریت (ONOO) نیز یک اکسیدکننده قوی است که سبب اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود و با ایجاد تغییرات اکسیداتیوی اسیدهای آمینه سبب غیرفعال شدن و دژنره شدن پروتئین‌ها و تخریب DNA می‌گردد [۲۸-۳۰]. بنابراین می‌توان گفت افزایش تولید ROS و در نتیجه اکسیداتیو و تولید آلدهیدهای سیتوتوکسیک، سبب تغییرات بیوشیمیایی غشا می‌شود و با تخریب غشا و آسیب به آکروزوم و فرآیند تولید ATP، موجب کاهش تحرک و توان بقای اسپرم‌ها می‌گردد [۳۲،۳۱]. در نتیجه با توجه به مطالعات صورت‌گرفته در این خصوص، به‌نظر می‌رسد که مکانیسم دفاعی اسپرم برای محافظت از ساختار سلولی‌اش در مقابل استرس‌های اکسیداسیون طی فرآیند انجماد و ذوب ظرفیت و کارایی لازم را ندارد؛ بنابراین ضروری است که برای جبران کمبود سپر دفاعی، آنتی‌اکسیدان‌های خارجی به اسپرم اضافه گردد. در سال‌های اخیر تلاش محققان بر این بوده است که با افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط شستشوی اسپرم، میزان ROS حاصل از سانتریفیوژهای مکرر و استرس‌های اکسیداتیو حاصل از آن را طی آماده‌سازی اسپرم کاهش دهند [۲۹] زیرا به‌خاطر فرآیند انجماد – ذوب تعداد اسپرم به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. چون در فرآیند swim up با اسپرم متحرک روبه‌رو هستیم، بنابراین این کاهش را می‌توان به تعداد اسپرم‌های متحرک نسبت داد و کاهش آن را طی فرآیند انجماد – ذوب به‌خاطر نقص فعالیت میتوکندری دانست [۲۵]. در این تحقیق میزان تحرک گروه‌های انجمادی که با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار ترهالوز تیمار شده بودند، نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داده است. درواقع افزودن آنتی‌اکسیدان ترهالوز بر پارامتر حرکتی و بقای اسپرم اثر معناداری داشته است. در تحقیقی دیگر اثر مثبت آنتی‌اکسیدان را روی پارامتر حرکت و بقای اسپرم نشان داده‌اند [۱۷]. در تحقیق حاضر با بررسی میزان پراکندگی کروماتین اسپرم قبل و پس از انجماد، مشخص شد که درصد میزان آن در گروه کنترل پس از انجماد به‌طور معناداری افزایش یافته است که این نشان‌دهنده وارد شدن صدمه به کروماتین اسپرم طی مرحله انجماد است. علاوه بر اثرات منفی ROS بر حرکت و بقای اسپرم، ROS می‌تواند به DNA هسته اسپرم نیز آسیب برساند [۱۷]. در این تحقیق بین گروه کنترل انجماد و ۳ گروه تیمارشده با آنتی‌اکسیدان تغییرات معناداری دیده شد؛ به‌طوری‌که در گروه ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار از ترهالوز و ۱۰ میکرومولار از رزوراترول درصد کمتری از پراکندگی کروماتین را داشتیم. از طرفی Jiang در سال ۲۰۰۵ گزارش کرده است که فرآیند انجماد بر DNA اسپرم اثر نامطلوبی ندارد [۳۳] و Donnelly در سال ۲۰۰۱ گزارش کرده است که تنها اسپرم‌های مردان نابارور اثر منفی انجماد را بر روی DNA نشان داده‌اند [۳۴]. همچنین در این تحقیق نشان داده شده که میزان قطعه‌قطعه شدن DNA در گروه‌های تیمار محیط انجمادی با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار از ترهالوز و ۱۰ میکرومولار از رزوراترول نسبت به

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

گروه کنترل انجمادی کاهش معناداری داشته است. در تحقیقی دیگر نشان داده شده که افزودن سوپراکسید دیسموتاز به محیط شستشوی اسپرم می‌تواند منجر به افزایش قطعه‌قطعه شدن DNA گردد [۳۵]. روش‌های مختلف انجماد و فرمول‌های متفاوتی که در آزمایشگاه‌های مختلف برای انجماد وجود دارد، می‌تواند دلیل این تفاوت‌ها باشد. Katrina Taylor نیز در تحقیقاتش نشان داده است که افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط انجمادی تنها بر تحرک اثر مثبتی داشته است و بر بقا و شکستگی DNA بی‌تأثیر بوده است [۳۶]. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که فرآیند فریز - ذوب باعث آسیب معناداری به کروماتین اسپرم، مورفولوژی و انسجام غشا (membrane integrity) در دو گروه مردان بارور و نابارور می‌شود [۳۷]. مطالعه Branco و همکارانش نیز نشان داد که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی Resveratrol و اسید آسکوربیک به محلول انجمادی سیمن انسان در حفظ ساختار DNA اسپرم در هر دو گروه مردان بارور و نابارور به‌خصوص در گروه نابارور، پس از انجماد بسیار مؤثر بوده است و با حضور این دو مکمل تغییری در شکل و غلظت اسپرم پس از انجماد مشاهده نشد [۳۸]. افزودن ویتامین E به محلول انجمادی اسپرم انسانی نیز در مطالعه Taylor و همکارانش در سال ۲۰۰۹ مورد ارزیابی قرار گرفت؛ تأثیر مواد فوق بر تحرک اسپرم مشهود بود، هرچند که در افزایش درصد بقا و حفظ ساختار DNA تأثیری نداشت [۳۶]. در تحقیق حاضر انجماد و افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها فاقد اثر معناداری بر مورفولوژی اسپرم قبل و بعد از فرآیند انجماد و در مرحله انجمادی بر هرکدام از گروه‌های تیمارشده با آنتی‌اکسیدان بوده است. Garcez و همکارانش نیز در مطالعه خود در سال ۲۰۱۰ تأثیر افزودن آنتی‌اکسیدان شیمیایی Resveratrol را به محلول انجمادی اسپرم انسان مورد بررسی قرار دادند، سپس مشاهده نمودند که غلظت و مورفولوژی اسپرم پس از فرآیند انجماد بدون اثر بر تحرک اسپرم حفظ شده است [۳۹]. این تحقیق در تعداد، تحرک و بقای اسپرم در گروه‌های پس از انجماد که ترهالوز و رزوراترول در دو مرحله انجماد و ذوب به آن‌ها اضافه شده بود، افزایش نشان داد و این افزایش هم معنادار بود. به این ترتیب مطابق با یافته‌های Said و همکارانش در سال ۲۰۱۰ که بیان کردند در مرحله‌ی ذوب و ساعت‌های اوّلیه آن بیشترین میزان آسیب به ساختار سلول اسپرم صورت می‌گیرد، در این مطالعه نشان داده شد که حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در این مرحله می‌تواند بیشترین تأثیر را در کاهش میزان استرس‌های اکسیداسیون به همراه داشته باشد [۴۰]. گزارش شده است که نکته‌ی کلیدی در تولید ROS ناشی از اسپرم‌های معیوب یا صدمه‌دیده می‌تواند مربوط به تکنیک‌های آماده‌سازی اسپرم باشد. شستشو و swim-up اسپرم همراه با سانتریفیوژهای متعدد منجر به تولید بیش از حد ROS می‌شود [۴۱]. بنابراین به‌جاست به‌منظور ایجاد تعادل بین ROS تولیدشده و میزان به‌کارگیری آنتی‌اکسیدان، سطح مطلوب ROS و همچنین دوز مؤثر آنتی‌اکسیدان در سمینال پلاسما مشخص گردد، تا افزودن آنتی‌اکسیدان به مایع سیمن بیشترین تأثیر را بر ساختار و عملکرد اسپرم داشته باشد. در مجموع حفظ پارامترهای اسپرم پس از مراحل انجماد به‌طور قطعی بر میزان موفقیت لقاح مؤثر است. از طرفی بقای اسپرم و پارامترهای آن پس از انجماد، به فاکتورهای متعددی از جمله عناصر محیط کشت بستگی دارد. مطالعه حاضر و بررسی‌های انجام‌شده در زمینه تعداد اسپرم‌های متحرک نشان‌دهنده این است که ارتباط واضحی بین تعداد اسپرم‌های متحرک و شکل طبیعی آن‌ها وجود دارد. طی فرآیند انجماد - ذوب کاهش سطح آنتی‌اکسیدان و افزایش غلظت ROS، سبب بروز نقص‌های فراوانی در غشا و در نهایت مورفولوژی اسپرم می‌گردد. افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی سبب افزایش معنادار اسپرم‌های غیرطبیعی و در نتیجه کاهش معنی‌دار اسپرم‌های طبیعی و تحرک و توانایی بقای آن‌ها می‌گردد. این تحقیق نیز همانند سایر تحقیقات نشان داد که فرآیند انجماد - ذوب به‌دلیل ایجاد عوامل مختلف آسیب‌زننده به سلول از قبیل شوک سرمایی و استرس اکسیداتیو، سبب کاهش کیفیت اسپرم و در نتیجه کاهش پتانسیل باروری می‌شود. بنابراین در این تحقیق با بررسی تعداد اسپرم قبل و بعد از انجماد مشاهده گردید که پارامترهای اسپرم مهم‌ترین مسأله است؛ بنابراین ضروری به‌نظر می‌رسد که مواد مکمل در جهت ایجاد شرایط مناسب برای حفظ پارامترهای اسپرم پس از انجماد به کار گرفته شود. Holian و Walter [۴۲] بقا و تکثیر کراتینوسیت‌های طبیعی انسان را که در معرض رزوراترول قرار گرفته بودند، مورد ارزیابی قرار دادند و این موضوع را دریافتند که رزوراترول حتی در غلظت‌های کمتر از میکرومولار هم باعث مهار تکثیر این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌شود، اما در غلظت‌های بالاتر اثرات سمّی بر روی آن‌ها دارد. طی مطالعه‌ای که دانشگاه آلاباما بر روی موش‌هایی که تغذیه حاوی رزوراترول داشتند، انجام داد، کاهش حدود ۸۷ درصد در پیدایش عوامل سرطان پروستات در موش‌ها مشخص شد و علاوه بر این سرعت پیشرفت این سرطان نیز کاهش یافته بود. همچنین از سرطان مری، روده و پستان هم جلوگیری می‌کند. به این دلیل که سرطان پستان از بالا رفتن سطح استروژن در خون ایجاد می‌شود، رابطه‌ی بین رزوراترول و سرطان پستان قابل توجه است و رزوراترول می‌تواند سرعت این سرطان را نیز کم یا متوقف کند. مطالعات دیگر با استفاده از مثبت یا منفی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

بودن سلول‌های سرطانی پستان، نشان دادند که رزوراترول با استرادیول برای اتصال به گیرنده‌های استروژنی رقابت می‌کند. در حالتی که استروژن مثبت سرطان پستان انسان (MCF-7) وجود دارد، رزوراترول در غلظت‌های بالا از گسترش سلولی آن جلوگیری می‌کند [۴۳]. Zou و همکارانش اثرات رزوراترول را بر تکثیر و کنترل چرخه سلولی سلول‌های عضله صافی که کشت داده شده بود، مورد بررسی قرار دادند؛ غلظت‌های ۱۰۰-۵۰ میکرومولار رزوراترول باعث کاهش ۹۰-۷۰ درصد تکثیر این سلول‌ها شد و اثرات ضدمیتوزی آن از طریق القای آپوپتوز صورت نگرفته است، بلکه به‌نظر می‌رسد مربوط به مسدود کردن فاز G1/S در چرخه سلولی باشد [۴۴]. اخیراً در مطالعات داخل سلولی مدل‌های حیوانی نشان داده شده است که رزوراترول قدرت تولید اسپرم را در موش‌های صحرایی با تحریک محور هیپوتالاموسی – هیپوفیزی – گنادی و بدون القای عوارض جانبی افزایش می‌دهد [۴۵]. در خرگوش نیز رزوراترول به‌وسیله افزایش سطح تستوسترون خون می‌تواند اثر مثبت بر روی تعداد اسپرم‌های بیضه و تحرک اسپرم‌های اپیدیدیم داشته باشد [۴۶]. از آن‌جا که رزوراترول یک مولکول استروژن‌مانند است و اثر آن بر گیرنده‌های استروژن اثبات شده، این احتمال وجود دارد که رزوراترول پاسخ hCG-LH را از طریق گیرنده‌های استروژن نیز تغییر دهد [۴۷]. رزوراترول دارای یک اثر افزایشی (در غلظت کم) بر hCG در تحریک تولید تستوسترون می‌باشد. در مطالعات دیگران [۴۸] با استفاده از سلول PC12 (سلول تومور کرومافینی آدرنال موش صحرایی) اثرات رزوراترول در طول اکسیداسیون چربی ناشی از آهن و اتانول آزمایش شد؛ این سلول‌ها برای سلول‌های عصبی دوپامینرژیک به‌عنوان mode1 در نظر گرفته شدند و نسبت به یون‌های فلزی سنگین و حمله رادیکال‌های آزاد بسیار حساس بودند. در نتیجه مشاهده کردند که رزوراترول سلول‌ها را از استرس پیش‌اکسیداتیو و آسیب بافتی محافظت می‌کند. علاوه بر این Chan و همکارانش نشان دادند که ترکیبی از ترانس رزوراترول و ویتامین‌های C یا E در حفاظت از سلول‌ها مؤثرتر از هر سه این آنتی‌اکسیدان‌ها به‌تنهایی می‌باشد [۴۹]. در کل ممکن است غلظت بالای رزوراترول، مثلاً ۲۰۰ میکرومولار غیر از این‌که باعث سمّیت می‌شود، تغییراتی را نیز در فشار اسمزی محیط ایجاد کند که منجر به تغییر در یکپارچگی غشای پلاسمایی می‌شود و بقای اسپرم را کاهش می‌دهد. همچنین غلظت‌های پایین رزوراترول در روش‌هایی مانند ICSI-IVF یا انجماد سیمن، می‌تواند اثرات مفیدی بر روی بقای کلی اسپرم و وضعیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشد و نیز به‌عنوان یک مهارکننده برای ROS و ادامه‌دهنده متابولیک به‌کار برده شود. نقش رزوراترول در رژیم غذایی برای جلوگیری از بیماری‌های قلبی – عروقی تأیید شده است، فقط باید مطالعات بالینی انجام شود که از رزوراترول خالص به شکل دارویی مناسب برای اثبات این موضوع که می‌تواند در درمان سرطان‌ها هم مفید باشد، استفاده گردد.

نتیجه‌گیری

نمونه‌های سیمن با طیفی از دوزهای ترهالوز (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) رقیق شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های دارای ترهالوز ۱۰۰ میلی‌مولار، بیشترین درصد تحرک، سالم بودن غشای آکروزوم و بی‌نقص بودن غشای پلاسمایی را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. هیچ تفاوتی در تحرک اسپرم بین گروه‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده نشد. غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با گروه‌های دیگر، بیشترین مقدار کالاناز را دارا بودند. نمونه‌های دارای ترهالوز فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهند، اما دوزهای بالای آن (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز را در مقایسه با دوز ۵۰ میلی‌مولار کاهش می‌دهند. در نتیجه نمونه‌های دارای ترهالوز، استرس اکسیداتیو ایجادشده به‌وسیله انجماد – ذوب را کاهش می‌دهند و میزان کیفیت سیمن را بهبود می‌بخشند و همچنین ویژگی آنتی‌اکسیدانی ترهالوز، تأثیر آن را در حفاظت انجمادی غشا نشان می‌دهد. اثر غلظت‌های پایین رزوراترول در ارتباط با القای ژن‌ها برای فسفوریلاسیون اکسیداتیو و سیر تکاملی میتوکندری اثبات شده است و به غیر از آنتی‌اکسیدان بودن، می‌تواند انرژی را برای سوخت‌وساز اسپرم فراهم کند و در نتیجه بقای اسپرم را بهبود بخشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از طرحی با شماره ۹۱۰۲ بود و نویسندگان مقاله از حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References:

[1] Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. ***Mol Reprod Dev*** 2017; 84(10): 1039-52.

[2] Brotherton J, Cryopreservation of human semen ***Arch Androl*** 1990; 25(2): 181-59

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

[3] Vaz CR, Lamim T, Salvador RA, Batschauer APB, L Amaral VL, Til D. Could cryopreserved human semen samples be stored at-80˚C? ***JBRA Assist Reprod*** 2018; 22(2): 108.
[4] Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. ***Bioessays*** 1994; 16(4): 259-67.
[5] Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT, Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. ***J Androl*** 1987; 8(5): 338-48.
[6] De Iuliis, GN, Wingate JK, Koppers AJ, McLaughlin EA, Aitken RJ. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. ***J Clin Endocrinol Metab*** 2006; 91(5): 1968-75.
[7] Sharma RK, Agarwal A, Role of reactive oxygen species in male infertility. ***Urology*** 1996; 48(6): 835-50.
[8] van Overveld FW, Haenen GR, Rhemrev J, Vermeiden JP, Bast A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. ***Chem Biol Interact*** 2000; 127(2): 151-61.
[9] Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska**,** E, Madsen FC, Oxidative stress, antioxidants, and animal function. ***J Dairy Sci*** 1993; 76(9): 2812-23.
[10] Yoshimoto T, Nakamura S, Yamauchi Sh, Muto N, Nakada T, Ashizawa K, et al. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic acid 2-O-alpha-glucoside. ***Cryobiology*** 2008; 57(1): 30-6.
[11] Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SSR, Said TM, Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. ***Reprod Biomed Online*** 2004; 8(6): 616-27.
[12] Bathgate R, Eriksson BM, Thomson PC, Maxwell WMC, Evans G. Field fertility of frozen-thawed boar sperm at low doses using non-surgical, deep uterine insemination. ***Anim Reprod Sci*** 2008; 103(3-4): 323-35.
[13] Belzile JP, Sabalza M, Craig M, Clark E, Morello CS, Spector DH. Trehalose, an mTOR-independent inducer of autophagy, inhibits human cytomegalovirus infection in multiple cell types. ***J VIROL*** 2016; 90(3): 1259-77.
[14] Melzer ES, Sein CE, Chambers JJ, Siegrist MS. DivIVA concentrates mycobacterial cell envelope assembly for initiation and stabilization of polar growth. ***Cytoskeleton*** 2018; 75(12): 498-507.
[15] Lau UY, Trehalose Glycopolymers for Protein and Cell Stabilization. ***UCLA, ProQuest Dissertations Publishing*** 2016. 10027115
[16] Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot Ch, Beaudeux J-L, Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. ***Mol Nutr Food Res*** 2010; 54(1): 7-16.
[17] Li Z, Lin Q, Liu R, Xiao W, Liu W. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. ***J. Androl***, 2010; 31(5): 437-44.
[18] Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M**.** Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen ***Cryobiology*** 2010; 60(2): 235-7.
[19] Kalthur G, Raj S, Thiyagarajan A, Kumar S, Kumar P, Kumar Adiga S. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. ***Fertil Steril*** 2011; 95(3): 1149-51.
[20] Fatma BA, Nozha CF, Ines D, Hamadi A, Basma H, Leila AK, Sperm quality improvement after date seed oil in vitro supplementation in spontaneous and induced oxidative stress. ***Asian J Androl*** 2009; 11(3): 393-8.
[21] Heidary M, Vahhabi S, Reza Nejadi J, Delfan B, Birjandi M, Kaviani H, et al. Effect of saffron on semen parameters of infertile men. ***Urol J*** 2008; 5(4): 255-9.
[22] Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, MahmoudAMA, WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. 2000: ***Cambridge University Press***.
[23] Nicholson C, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E, Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. ***Hum Reprod*** 2000; 15(3): 662-6.
[24] Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Chełmonska-Soyta AC, Kurpisz M. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. ***Int J Androl*** 1997; 20(5): 255-64.
[25] O'Connell M, McClure N, Lewis S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. ***Hum Reprod*** 2002; 17(3): 704-9**.**
[26] Ball BA, Vo A, Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C1l-BODIPY581/591. ***J Androl*** 2002; 23(2): 259-69.
[27] 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(3): 334-46.
[28] Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. ***Hum Reprod*** 2003; 18(5): 1023-8.
[29] Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. ***Fertil Steril*** 2001; 76(5): 892-900.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]

[30] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. ***J Cell Biol*** 1992; 119(3): 493-501.
[31] Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. ***J Androl*** 2000; 21(6): 895-902.
[32] Lass A, Akagbosu F, and Brinsden P, Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. ***Hum Reprod Update*** 2001; 7(4): 370-7**.**
[33] Jiang MX, Zhu Y, Zhu ZY, Sun QY, Chen DY. Effects of cooling, cryopreservation and heating on sperm proteins, nuclear DNA, and fertilization capability in mouse. ***Mol Reprod Dev*** 2005; 72(1): 129-34.
[34] Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SEM. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. ***Hum Reprod*** 2001; 16(6): 1191-9.
[35] Zini A, Fischer M A, Mak V, Phang D, Jarvi K. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. ***Urological Research*** 2002; 30(5): 321-3.
[36] Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. ***Reprod Biomed Online*** 2009; 18(2): 184-9.
[37] Hammadeh M, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. ***Int J Androl*** 1999; 22(3): 155-62.
[38] Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. ***Cryobiology*** 2010; 60(2): 235-7.
[39] Garcez ME, dos Santos Branco C, Lara LV, Pasqualotto FF, Salvador M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. ***Fertil Steril*** 2010; 94(6): 2118-21.
[40] Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. ***Reprod Biomed Online*** 2010; 21(4): 456-62.
[41] Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin K. Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swim-up and L4 filtration. ***Arch Androl*** 1994; 32: 169.
[42] Holian O. Walter R. Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. ***J Cell Biochem*** 2001; 81(S36): 55-62.
[43] Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. ***J Steroid Biochem Mol Biol*** 2005; 94(5): 431-43.
[44] Zou J, Huang Y, Chen Q, Wang N, Cao K, Hsieh TC, et al. Suppression of mitogenesis and regulation of cell cycle traverse by resveratrol in cultured smooth muscle cells. ***Int J Oncol*** 1999; 15(4): 647-98.
[45] Juan ME, González-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodríguez-Gil JE, Planas JM. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. ***J Nutr*** 2005; 135(4): 757-60.
[46] Shin S, Jeon JH, Park D, Jang MJ, Choi JH, Choi BH, et al. trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. ***Arch Pharm Res*** 2008; 31(1): 83-7.
[47] Levenson AS, Gehm BD, Pearce ST, Horiguchi J, Simons LA, Ward III JE et al. Resveratrol acts as an estrogen receptor (ER) agonist in breast cancer cells stably transfected with ER α. ***Int J Cancer*** 2003; 104(5): 587-96.
[48] Yang T, Wang Li, Meixiao Z, Lirong Z, Lianhe Y. Properties and molecular mechanisms of resveratrol: a review. Die Pharmazie-An ***Int J Pharm Pharm Sci*** 2015; 70(8): 501-6.
[49] Chan MM, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A, Fong D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. ***Biochem Pharmacol*** 2000; 60(10): 1539-48.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-10]