

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.

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

حسن حسینی بافرانی^۱، حامد حداد کاشانی^{۲*}، فاطمه شابه پور^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: انجماد نمونه منی انسان به عنوان 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 $P < 0.05$ 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 به عنوان آنتی‌اکسیدانی قوی، ROS را مهار می‌کند.

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

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

مقدمه

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 به دنبال کاهش تدریجی دما [۳،۲] اشاره کرد. این تغییرات منجر به از هم گسیختگی غیرقابل برگشت غشاهای هسته‌ای و پلاسمایی و به دنبال آن آشفته‌گی 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) به عنوان 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 اسپرماتوزوآ 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

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 آژواسپرمی 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 مسئول:

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

[۸]. مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌ها اسپرم را در برابر ROS تولیدشده توسط لکوسیت‌ها محافظت می‌نمایند و از قطعه‌قطعه شدن DNA جلوگیری می‌کنند، کیفیت سیمین 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 آندروبیوتیک به‌طور کلی حاوی غلظت‌های بالای ترهالوز (و گاهی دیگر دی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدها) هستند. نشان داده شده است زمانی که 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 اثری 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 عین حال 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 فعالیت 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 گلوکوکورونیداز که از طریق ادرار دفع می‌شوند، تبدیل می‌شود. به‌نظر می‌رسد رزوراترول قابل تحمل است و هیچ سمیتی 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. روبرو شدن ساکارومایسز سرویزه با یک شوک حرارتی ملایم یا قرار گرفتن در مقابل یک بازدارنده پرتوتوزوم باعث ذخیره ترهالوز می‌شود و همچنین به‌طور قابل ملاحظه‌ای بقای سلول‌ها را در مقابله با سیستم مولد رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهد. با این حال زمانی که 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

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 (T5251 - Sigma - Trehalose)، و در مرحله دوم از آنتی‌اکسیدان رزوراترول (R5010 - Sigma - Resveratrol)، 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 بیانی 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):

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 سمیت رزوراترول هنوز تعریف نشده، با این حال 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 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

نمونه‌هاى سيمن + محلول انجمادى.

گروه سوم، چهارم، پنجم، ششم، هفتم و هشتم (گروه انجمادى):

نمونه‌هاى سيمن + غلظت‌هاى مختلف ترهالوز و رزوراترول.

در انتهای هر مرحله پس از شستشوى اسپرم با روش‌هاى استاندارد Pure و Swim up نمونه‌ها را به مدت ۴۵ دقيقه در انکوباتور 37°C انکوبه کردیم. سپس نمونه‌هاى هر گروه از لحاظ پارامترهاى اسپرم بررسى و ارزايى ساختار کروماتيني اسپرم نيز انجام شد. ابتدا سيمن را در تيوب‌هاى موردنظر ريخته، به مقدار مساوى از حجم سيمن به محيط كشت اضافه كرديم و آن را كاملاً مخلوط نموديم و سپس آن را داخل سانترفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقيقه قرار داديم. در ادامه با سمپلر، مايع روى پلاك را كشيديم، بعد به اندازه $100-150\mu\text{L}$ از محيط كشت حاوى غلظت موردنظر را از ديواره ظرف به آرامى روى پلاك تشكيل شده ريختيم، به‌طوري كه پلاك به هم نخورد. سپس آن را به مدت ۶۰-۳۰ دقيقه داخل انکوباتور قرار داديم. در اين مدت اسپرم‌هاى فعال شروع به حركت و شنا كردن به سمت بالا، درون محيط كشت مى‌كنند. پس از انکوباسيون نصف از سطح روى لوله را اسپيره كرده (برداشت كرده)، از آن براى ارزايى پارامترهاى مختلف اسپرم استفاده مى‌كنيم. در روش انجماد، نمونه سيمن را به‌صورت fresh به اندازه موردنظر داخل ميكروتيوب مى‌ريزيم. ۱۰ دقيقه قبل از شروع كار انجماد، محيط انجماد را از يخچال خارج مى‌كنيم تا هم‌دمای محيط شود و ۳۰ دقيقه قبل محيط انجمادهاى اليكوت شده حاوى غلظت‌هاى مختلف را از فریزر خارج مى‌كنيم تا در دمای محيط ذوب شود. محيط فریز را به‌صورت قطره‌قطره بر روى سيمن مى‌ريزيم و هم‌زمان پيچاژ مى‌كنيم. نسبت سيمن به محيط انجمادى ۱ به ۱ است. پس از اضافه كردن محيط انجماد به مدت ۱۰ دقيقه آن را در دمای اتاق مى‌گذاريم. در اين مدت مواد مخلوط شده را داخل نى‌هاى مخصوص فریز اسپرم لود مى‌كنيم. نى‌ها را داخل container و به مدت ۳۰ دقيقه بر روى بخار نيتروژن (7cm بالاتر از سطح نيتروژن مايع) قرار مى‌دهيم. Container ها را داخل نيتروژن مايع غوطه‌ور مى‌كنيم تا حباب داخل آن كاملاً تخلیه شود، سپس آن را به تانك ازلت منتقل مى‌كنيم. در روش گرم كردن پس از گذشت ۲ هفته نى‌ها را از ازلت خارج مى‌كنيم و به مدت ۴۰ ثانيه با دستمال كاغذى به آرامى ماساژ مى‌دهيم. سپس نى‌ها را به مدت ۱ دقيقه داخل آب 30° قرار مى‌دهيم، بعد آن را كاملاً خشك مى‌كنيم و محتوای داخل نى را به تيوب‌هاى موردنظر انتقال مى‌دهيم. براى برداشت محيط انجمادى از اسپرم‌ها يك‌بار شستشو انجام مى‌دهيم. براى شستشو به نسبت ۱ به ۱ محتويات نى را با

Hams F10 حاوى غلظت مخلوط نموده، آن را به مدت ۵ دقيقه با دور ۳۰۰۰ به سانترفیوژ، منتقل مى‌كنيم. پس از سانترفیوژ مايع روى را برداشته، روى پلاك باقى‌مانده به اندازه مناسب از استوك‌هاى موردنظر مى‌ريزيم. در پايان تيوب‌هاى حاوى اسپرم را به مدت ۳۰ دقيقه داخل انکوباتور قرار مى‌دهيم و پس از swim up پارامترهاى اسپرم را بررسى مى‌كنيم.

بررسى غلظت اسپرم

براى مطالعه غلظت اسپرم $150\mu\text{L}$ از نمونه را روى لام مى‌گذاريم، سپس در زير ميكروسكوپ با كمك لام نئوبار تعداد اسپرم‌ها را پس هر آزمون مورد بررسى قرار مى‌دهيم. براى هر نمونه با تغيير مكان ميكروسكپ ۱۰-۷ فریم متعدد گرفته و درصد كل غلظت ثبت شد.

بررسى مورفولوژى اسپرم با رنگ‌آمیزی Diff Quick

حدود $120\mu\text{L}$ از اسپرم به‌صورت اسمیر روى لام كشیده و ۱ تا ۲ دقيقه در انکوباتور 37° انکوبه قرار داده شد. نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درجه به مدت ۲۰ تا ۲۵ ثانيه فيكس شدند. سپس با محلول Diff A به مدت ۲۰ تا ۲۵ ثانيه و بعد با محلول Diff B به مدت ۲۰ تا ۲۵ ثانيه رنگ‌آمیزی مى‌شوند. پس از خشك شدن با استفاده از ميكروسكوپ نوری و با بزرگ‌نمایی $100\times$ توسط روغن امرسيون (در هر نمونه ۱۰۰ عدد اسپرم) بررسى مى‌گردد. براى ارزايى مورفولوژى اسپرم از معيار WHO استفاده مى‌شود [۲۲] كه شامل: الف) ناهنجاری‌هاى مربوط به سر، ب) ناهنجاری‌هاى مربوط به گردن و ج) ناهنجاری‌هاى مربوط به دم مى‌باشد.

بررسى بقای اسپرم

بدین‌منظور حجم مساوى از نمونه اسپرم و رنگ تريپان بلو ($1100\mu\text{L}$) را با هم در يك ميكروتيوب مخلوط نموده، پس از گذشت ۱۰-۵ دقيقه حدود $120\mu\text{L}$ از آن را با سمپلر برداشته، روى لام مى‌گذاريم و سپس يك لامل بر روى آن قرار داده، با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ میزان بقا را مورد ارزايى قرار مى‌دهيم. اگر اسپرم در زمان رنگ‌آمیزی زنده باشد، رنگ تريپان بلو را به خود نيمى‌گیرد، در نتیجه قسمت سر و تنه آن رنگ و حالت روشن‌ترى دارد (سفید براق)؛ در حالى‌كه اسپرم‌هاى مرده به دليل نقص در غشاهای پلاسمای خود رنگ تريپان بلو را به خود گرفته، به رنگ تيره در مى‌آیند.

انجام اسپرموگرام

پس از Liquefaction سيمن، پارامترهاى اسپرم براساس استانداردهاى WHO اندازه‌گیری مى‌شوند [۲۲]. شستشوى اسپرم با روش‌هاى استاندارد Pure و Swim up انجام مى‌شود. ارزايى

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 $P < 0.05$ 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

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

		تعداد	تحرک
گروه‌ها			
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 F₁₀ + ۱۰٪ سرم
 گروه دوم (پس از انجماد): نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت Ham's F₁₀ + ۱۰٪ سرم
 گروه سوم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت Ham's F₁₀ + ۱۰٪ سرم + ترهالوز ۵۰ mM
 گروه چهارم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت Ham's F₁₀ + ۱۰٪ سرم + ترهالوز ۱۰۰ mM
 گروه پنجم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت Ham's F₁₀ + ۱۰٪ سرم + ترهالوز ۲۰۰ mM
 گروه ششم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت Ham's F₁₀ + ۱۰٪ سرم + رزوراترول ۱۰ μM
 گروه هفتم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت Ham's F₁₀ + ۱۰٪ سرم + رزوراترول ۱۵ μM
 گروه هشتم: نمونه اسپرم شسته‌شده + محیط کشت Ham's F₁₀ + 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 ($P \leq 0.0001$) 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

تیمار شده با ترهالوز و رزوراترول گرچه افزایش معناداری نسبت به گروه انجماد دیده نمی‌شود ($P > 0.05$ ، ولی در گروه تیمار شده با ترهالوز ۱۰۰ mM نسبت به سایر گروه‌های تیمار شده 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).

تیمار شده با ترهالوز و رزوراترول گرچه افزایش معناداری نسبت به گروه انجماد دیده نمی‌شود ($P > 0.05$ ، ولی در گروه تیمار شده با ترهالوز ۱۰۰ mM نسبت به سایر گروه‌های تیمار شده 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).

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

متغیر	گروه‌ها	کنترل	انجماد	انجماد+ترهالوز ۵۰	انجماد+ترهالوز ۱۰۰	انجماد+رزوراترول ۱۰	انجماد+رزوراترول ۱۵	*P
*تعداد اسپرم (۱۰ ^۶ /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±۱/۵	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

۰/۰۵ < P از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است. داده‌های داخل جدول به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش شده است.

*تعداد اسپرم (۱۰^۶/mL): تعداد اسپرم براساس ۱۰^۶ 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 ۸۶/۲۷±۱/۵ 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 ۸۰/۹۰±۲/۷ 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 ۵۴/۲۲±۱/۹ 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 ۴۸/۵۰±۲/۳ 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. مسئله 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

می‌توان گفت افزایش تولید ROS و در نتیجه اکسیداتیو و تولید آلدئیدهای 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 صورت گرفته در این خصوص، به نظر 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 تیمار شده 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

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 آنجایی که اسپرم انسان دارای مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است، فوق‌العاده نسبت به لیپید پراکسیداسیون حساس می‌باشد [۲۷]. از سوی دیگر پروکسی نیتريت (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

گروه کنترل انجمادى کاهش معنادارى داشته است. در تحقيقاتى ديگر نشان داده شده كه افزودن سوپراوكسيد ديسموتاز به محيط شستشوى اسپرم مى تواند منجر به افزايش قطعه قطعه شدن DNA گردد [35]. روش هاى مختلف انجماد و فرمول هاى متفاوتى كه در آزمايشگاه هاى مختلف براى انجماد وجود دارد، مى تواند دليل اين تفاوت ها باشد. Katrina Taylor نيز در تحقيقاتش نشان داده است كه افزودن آنتى اكسيدان به محيط انجمادى تنها بر تحرك اثر مثبتى داشته است و بر بقا و شكستگى DNA بى تاثير بوده است [36]. در مطالعه اى نشان داده شده است كه فرآيند فريز - ذوب باعث آسيب معنادارى به كروماتين اسپرم، مورفولوژى و انسجام غشا (membrane integrity) در دو گروه مردان بارور و نابارور مى شود [37]. مطالعه Branco و همكارانش نيز نشان داد كه افزودن آنتى اكسيدان هاى شيميايى Resveratrol و اسيد آسكوربيك به محلول انجمادى سيمن انسان در حفظ ساختار DNA اسپرم در هر دو گروه مردان بارور و نابارور به خصوص در گروه نابارور، پس از انجماد بسيار مؤثر بوده است و با حضور اين دو مكمل تغييرى در شكل و غلظت اسپرم پس از انجماد مشاهده نشد [38]. افزودن ويتامين E به محلول انجمادى اسپرم انساني نيز در مطالعه Taylor و همكارانش در سال 2009 مورد ارزيابى قرار گرفت؛ تاثير مواد فوق بر تحرك اسپرم مشهود بود، هرچند كه در افزايش درصد بقا و حفظ ساختار DNA تاثيرى نداشت [36]. در تحقيق حاضر انجماد و افزودن آنتى اكسيدان ها فاقد اثر معنادارى بر مورفولوژى اسپرم قبل و بعد از فرآيند انجماد و در مرحله انجمادى بر هر كدام از گروه هاى تيمار شده با آنتى اكسيدان بوده است. Garcez و همكارانش نيز در مطالعه خود در سال 2010 تاثير افزودن آنتى اكسيدان شيميايى Resveratrol را به محلول انجمادى اسپرم انسان مورد بررسى قرار دادند، سپس مشاهده نمودند كه غلظت و مورفولوژى اسپرم پس از فرآيند انجماد بدون اثر بر تحرك اسپرم حفظ شده است [39]. اين تحقيق در تعداد، تحرك و بقاى اسپرم در گروه هاى پس از انجماد كه ترهالوز و رزوراترول در دو مرحله انجماد و ذوب به آن ها اضافه شده بود، افزايش نشان داد و اين افزايش هم معنادار بود. به اين ترتيب مطابق با يافته هاى Said و همكارانش در سال 2010 كه بيان كردند در مرحله ذوب و ساعت هاى اوليه آن بيشترين ميزان آسيب به ساختار سلول اسپرم صورت مى گيرد، در اين مطالعه نشان داده شد كه حضور آنتى اكسيدان ها در اين مرحله مى تواند بيشترين تاثير را در کاهش ميزان استرس هاى اكسيداسيون به همراه داشته باشد [40]. گزارش شده است كه نکته ي كليدى در توليد ROS ناشى از اسپرم هاى معيوب يا صدمه ديده مى تواند مربوط به

تكنيك هاى آماده سازى اسپرم باشد. شستشو و swim-up اسپرم همراه با ساترifiوژهاى متعدد منجر به توليد پيش از حد ROS مى شود [41]. بنا بر اين به جاست به منظور ايجاد تعادل بين ROS توليد شده و ميزان به كارگيرى آنتى اكسيدان، سطح مطلوب ROS و همچنين دوز مؤثر آنتى اكسيدان در سمينال پلاسما مشخص گردد، تا افزودن آنتى اكسيدان به مایع سيمن بيشترين تاثير را بر ساختار و عملکرد اسپرم داشته باشد. در مجموع حفظ پارامترهاى اسپرم پس از مراحل انجماد به طور قطعى بر ميزان موفقيت لقاح مؤثر است. از طرفى بقاى اسپرم و پارامترهاى آن پس از انجماد، به فاكترهاى متعددى از جمله عناصر محيط كشت بستگى دارد. مطالعه حاضر و بررسى هاى انجام شده در زمينه تعداد اسپرم هاى متحرك نشان دهنده اين است كه ارتباط واضحى بين تعداد اسپرم هاى متحرك و شكل طبيعى آن ها وجود دارد. طى فرآيند انجماد - ذوب کاهش سطح آنتى اكسيدان و افزايش غلظت ROS، سبب بروز نقص هاى فراوانى در غشا و در نهايت مورفولوژى اسپرم مى گردد. افزايش ناهنجارى هاى مورفولوژيكي سبب افزايش معنادار اسپرم هاى غيرطبيعى و در نتيجه کاهش معنى دار اسپرم هاى طبيعى و تحرك و توانايى بقاى آن ها مى گردد. اين تحقيق نيز همانند ساير تحقيقات نشان داد كه فرآيند انجماد - ذوب به دليل ايجاد عوامل مختلف آسيب زننده به سلول از قبيل شوك سرمايى و استرس اكسيداتيوى، سبب کاهش كيفيت اسپرم و در نتيجه کاهش پتانسيل بارورى مى شود. بنا بر اين در اين تحقيق با بررسى تعداد اسپرم قبل و بعد از انجماد مشاهده گرديد كه پارامترهاى اسپرم مهم ترين مسأله است؛ بنا بر اين ضرورى به نظر مى رسد كه مواد مكمل در جهت ايجاد شرايط مناسب براى حفظ پارامترهاى اسپرم پس از انجماد به كار گرفته شود. Holian و Walter [42] بقا و تكثير كراتينوسيت هاى طبيعى انسان را كه در معرض رزوراترول قرار گرفته بودند، مورد ارزيابى قرار دادند و اين موضوع را دريافتند كه رزوراترول حتى در غلظت هاى كمتر از ميكرومولار هم باعث مهار تكثير اين سلول ها در شرايط آزمايشگاهى مى شود، اما در غلظت هاى بالاتر اثرات سمى بر روى آن ها دارد. طى مطالعه اى كه دانشگاه آلاباما بر روى موش هاىي كه تغذيه حاوى رزوراترول داشتند، انجام داد، کاهش حدود 87 درصد در پيدايش عوامل سرطان پروسات در موش ها مشخص شد و علاوه بر اين سرعت پيشرفت اين سرطان نيز کاهش يافته بود. همچنين از سرطان مري، روده و پستان هم جلوگیری مى كند. به اين دليل كه سرطان پستان از بالا رفتن سطح استروژن در خون ايجاد مى شود، رابطه ي بين رزوراترول و سرطان پستان قابل توجه است و رزوراترول مى تواند سرعت اين سرطان را نيز كم يا متوقف كند. مطالعات ديگر با استفاده از مثبت يا منفى

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 کالاتاز را دارا بودند. نمونه‌های دارای ترهالوز فعالیت گلوکوتانیون پراکسیداز را در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌دهند، اما دوزهای بالای آن (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) فعالیت گلوکوتانیون 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.

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 ۵۰-۱۰۰ میکرومولار رزوراترول باعث کاهش ۷۰-۹۰ درصد تکثیر این سلول‌ها شد و اثرات ضد میتوزی 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 سمیت می‌شود، تغییراتی را نیز در فشار اسمزی محیط ایجاد کند که منجر به تغییر در یکپارچگی غشای پلاسمایی می‌شود و

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

- [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-Slebozinska, 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, Beaudeau 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, Thiagarajan 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, Chelmonska-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 C11-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.

- [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.