Original Article

The effect of rapid freezing on the expression of *SPAG5* and *SPAG9* in human spermatozoa

Faraji S[1,2], Rashki-Ghaleno L[2], Sharafi M[2], Hezavehei M[2], Totonchi M[3], Shahverdi A[2*], Fathi R[2*]

1- Department of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Basic Science and Advanced Technologies in Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, I.R. Iran.
3- Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2020/05/20 | Accepted: 2020/10/12

Abstract:

Background: Sperm associated antigens (SPAGs) play an important role in the incidence of various cancers including breast, lung, liver, and bladder. SPAGs are also important in sperm functions, such as motility. However, it seems that sperm cryopreservation as one of the assisted reproductive techniques (ART), can affect the expression of these genes. This study aimed to evaluate the effect of freezing on the expression of human *SPAG* 5 and *9* in human spermatozoa.

Materials and Methods: In the present experimental study, twelve semen samples in terms of normozoospermic parameters were collected from individuals referred to the Royan Institute, and progressive motile sperms were isolated by density gradient centrifugation (DGC). Each sample was divided into two, non-frozen (control) and frozen groups. After rapid freezing and three-day storage in liquid nitrogen, samples were thawed in tap water and incubated for 2 hours of recovery-time in a CO_2 incubator. RNA extraction in both groups was performed using TRIzol; and *SPAG5* and *9* were evaluated by Real-time PCR technique.

Results: Based on statistical analysis, the expression of *SPAG5* decreased significantly in the frozen group compared to the control group ($P \leq 0.05$); In contrast, there was no significant difference in the expression of *SPAG9* between the control and frozen groups.

Conclusion: Considering the cold shock in the future of cell, a significant reduction in *SPAG5* expression in the frozen group may indicate probable influences in the derived fetus.

Keywords: Sperm, Antigen, Cryopreservation

***Corresponding Author**
Email: rfathi79@royaninstitute.org
Tel: 0098 21 235 62246
Fax: 0098 21 23 562178

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, December, 2020; Vol. 24, No 5, Pages 508-515

Please cite this article as: Faraji S, Rashki-Ghaleno L, Sharafi M, Hezavehei M, Totonchi M, Shahverdi A, et al. The effect of rapid freezing on the expression of *SPAG5* and *SPAG9* in human spermatozoa. ***Feyz*** 2020; 24(5): 508-15.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-22]

بررسی تأثیر انجماد سریع بر بیان ژن‌های *SPAG5* و *SPAG9* اسپرم انسانی

سمانه فرجی [۱]، لیلا راشکی قلعه‌نو [۲]، محسن شرفی [۳]، مریم هزاوه‌ای [۴]، مهدی توتونچی [۵]، عبدالحسین شاهوردی [۶]، روح‌الله فتحی [۷*]

خلاصه:

سابقه و هدف: آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم (SPAG)، نقش مهمی در بروز سرطان‌های مختلف، مانند سرطان سینه، ریه، کبد و مثانه دارند. همچنین SPAGها اهمیت بالایی در عملکردهای اسپرم، همچون تحرک دارند. با این‌حال به‌نظر می‌رسد انجماد اسپرم به‌عنوان یکی از روش‌های کمک‌باروری می‌تواند بر بیان این ژن‌ها تأثیرگذار باشد. هدف مطالعه حاضر، ارزیابی اثر انجماد، بر بیان *SPAG*های ۵ و ۹ اسپرم انسانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، ۱۲ نمونه نرمال از نظر پارامترهای طبیعی اسپرم، از منی مردان مراجعه‌کننده به پژوهشگاه رویان جمع‌آوری گردید و با روش سانتریفیوژ گرادیان، غلظت اسپرم‌های دارای تحرک مؤثر بالا جداسازی شد. نمونه‌ها به دو گروه غیرانجمادی (گروه کنترل) و گروه انجمادی تقسیم شدند. پس از انجماد به روش سریع و نگهداری برای سه روز در تانک نیتروژن، نمونه‌ها زیر شیر آب سرد ذوب شدند و به‌مدت دو ساعت در انکوباتور دارای CO2 قرار گرفتند. استخراج RNA در هر دو گروه با استفاده از ترایزول صورت گرفت و ارزیابی ژن‌های *SPAG9* و *SPAG5* با روش Real-time PCR انجام شد.

نتایج: براساس تجزیه و تحلیل آماری، بیان *SPAG5* در گروه انجمادی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($P\leq$۰/۰۵)؛ در مقابل تفاوت معنی‌داری در بیان ژن *SPAG9* بین گروه کنترل و انجمادی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن شوک حاصل از سرما در آینده سلول، کاهش بیان معنی‌دار *SPAG5* در گروه انجمادی می‌تواند بیانگر بروز اثرات احتمالی آن در جنین حاصل باشد.

واژگان کلیدی: اسپرم، آنتی‌ژن، انجماد

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۵، آذر - دی ۱۳۹۹، صفحات ۵۱۵-۵۰۸

مقدمه

آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم (SPAGs)، اوّلین‌بار با عنوان پروتئین‌های غشایی اسپرم، شناسایی و مطرح شدند. تا به امروز ۱۸ نوع از این آنتی‌ژن‌ها با دامنه وزن مولکولی ۷۱-۲۴ کیلو دالتون شناسایی شده‌اند [۱].

آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم انسانی، از پروتئین‌های مهم و حیاتی اسپرم هستند که در باروری، تحرک، حفظ انسجام ساختاری دم، شکل‌گیری سلول و پیام‌رسانی دخیل می‌باشند. تاکنون به نقش هشت SPAG در ناباروری اشاره شده است [۲]. آنتی‌ژن اختصاصی اسپرم نوع ۵، محصول ژن *SPAG5* است که روی کروموزوم ۱۷ و در موقعیت 17q11.2 قرار دارد و دارای ۲۴ اگزون می‌باشد و بیان گسترده‌ای در بیضه دارد و در بافت‌های دیگر مانند جفت، کبد، پانکراس، تیموس و روده بزرگ نیز بیان بسیار کمی داراست (Uniprot; GeneCards). از نقش‌های عملکردی این پروتئین در سلول می‌توان به نقش در تقسیم سانتریول‌ها، تنظیم فعالیت سپاراز و جزء ضروری دوک میتوزی که مستلزم جداسازی کروموزوم‌های طبیعی در مرحله آنافاز است، اشاره نمود. نتایج مطالعات، حاکی از آن است که افزایش بیان ژن *SPAG5* می‌تواند پیش‌آگهی مناسبی برای تشخیص سرطان سینه باشد [۳]. آنتی‌ژن اختصاصی اسپرم نوع ۹ نیز محصول ژن *SPAG9* است که روی کروموزوم ۱۷ و در موقعیت 17q21.33 قرار دارد و دارای ۳۴ اگزون می‌باشد و بیان گسترده‌ای در بیضه داراست (Uniprot; GeneCards). از نقش‌های عملکردی این پروتئین در سلول می‌توان به نقش در تنظیم مثبت چرخه سلولی، فعال کردن JUN kinase، اسپرماتوژنز و تنظیم مثبت تمایز سلول‌های عضلانی و عصبی اشاره کرد. این پروتئین به

۱. دانش‌آموخته گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه و فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

۲. دانشجوی دکتری بیولوژی تولیدمثل، گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. پسادکتری، گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

۵. دانشیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

۶. استاد، گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

۷. استادیار، گروه جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

تهران، بزرگراه رسالت، انتهای خیابان بنی‌هاشم شمالی

تلفن: ۰۲۱ ۲۳۵۶۲۰۰۰ **دورنویس:** ۰۲۱ ۲۲۳۰۶۴۸۱

پست الکترونیک: rfathi79@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۲/۳۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۹/۷/۲۱

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-22]

شدت در انواع مختلفی از تومورها از جمله انواع سرطان‌های پروستات، معده، اندومتر، کبد، ریه و استخوان افزایش بیان دارد [۱۳-۴] و پاسخ ایمنی را در میزبان فعال می‌کند. از عملکردهای دیگری که به این پروتئین نسبت داده شده، می‌توان به تسهیل مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی کلیه، نشانگر اوّلیه سرطان سینه، سرویکس و لوکمی حاد میلوئیدی (AML) اشاره کرد [۱۴]. آنتی‌ژن اختصاصی اسپرم نوع ۱، محصول ژن *SPAG1* است که روی کروموزوم ۸ و در موقعیت 8q22.2 قرار دارد و دارای ۲۱ اگزون می‌باشد. بیان *SPAG1* در ریه، روده بزرگ، کلیه، بیضه و همچنین بیان بسیار بالای آن در مغز گزارش شده است. از نقش‌های عملکردی این پروتئین در سلول می‌توان به ایفای نقش در باروری، سرهم‌بندی سیتوپلاسمی بازوهای داینئین در مژه، اتصال به GTP و نیز GTPase در سلول، اشاره کرد (Uniprot; GeneCards). انجماد از جمله فرآیندهای مؤثر در روش‌های کمک‌باروری می‌باشد که امروزه برای حفظ و ذخیره اسپرم کاربرد وسیعی دارد [۱۵]. همان‌طور که در بیشتر مطالعات انجام‌شده ذکر شده است، فرآیند انجماد، سلول را دچار چالش‌هایی می‌کند که ممکن است آسیب‌هایی را برای سلول به همراه داشته باشد و یا در بیان ژن‌ها و پروتئین‌های سلولی تغییراتی ایجاد نماید [۱۸-۱۶]. تاکنون مطالعات بسیاری بر روی انجماد اسپرم انسانی انجام شده است که تعداد قابل توجهی از آن‌ها به تغییرات پروتئینی پرداخته‌اند. تنها در یک مورد از این گزارشات از آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم نام برده شده است. Bogle و همکاران در سال ۲۰۱۷ در گزارشی تحت عنوان «شناسایی تغییرات پروتئینی اسپرم‌های انسانی در طی فرآیند انجماد»، به بررسی تغییرات پروتئینی اسپرم، پس از انجماد و در مرحله ذوب اسپرم، پرداخته‌اند. در این گزارش به مقایسه نتایج انکوباسیون اسپرم در دو درجه دمای متفاوت در فرآیند ذوب پرداخته و گزارش شده است که در هر مرحله از فرآیند انجماد، تغییرات پروتئینی قابل‌توجهی رخ می‌دهد که می‌تواند قابلیت باروری اسپرم را تحت تأثیر قرار دهد و آن را مختل نماید. در میان پروتئین‌هایی که در این گزارش دستخوش تغییر شده بودند، تنها از آنتی‌ژن SPAG 17 نام برده شده است [۱۹]. طبق مطالعات اخیر، نقش این پروتئین‌ها در سرطان‌ها غیرقابل انکار می‌باشد و این موضوع به اهمیت بررسی نقش و جایگاه این عوامل در اسپرم می‌افزاید. هرگونه اختلال در بیان و عملکرد این پروتئین‌ها موجب انواع مختلفی از سرطان‌ها از جمله سرطان‌های سینه، تخمدان، ریه، پانکراس، کبد، کلیه، مثانه، روده بزرگ و پروستات می‌شود [۲]. در میان سرطان‌ها، سرطان سینه بیشترین توجه را به خود جلب کرده است و در اکثر مقالاتی که به موضوع بیان ژن‌های مؤثر در سرطان سینه پرداخته‌اند، *SPAG*های ۵ و ۹ بیشترین گزارش‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. از این‌رو در مطالعه حاضر به اثرگذاری سرما بر بیان ژن در *SPAG*های ۵ و ۹ پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

انتخاب و جمع‌آوری نمونه: این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه رویان با شماره (IR.ACECR.ROYAN.REC.1397.231) تأیید شده است. همچنین همه افراد به‌واسطه فرم رضایت‌نامه، از استفاده از نمونه‌های مایع منی و داده‌های بالینی آن‌ها برای اهداف تحقیق مطلع بودند و اطلاعات آن‌ها نیز محرمانه بود. تعداد ۱۲ نمونه با حجم ۲ml از منی نورمواسپرمیک با در نظر گرفتن معیارهای ورود و خروج و با توجه به مطالعات مشابه، در بازه زمانی خرداد تا مردادماه سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند [۲۰،۱۹]. این نمونه‌ها پس از ۳ الی ۴ روز خودداری زوجین از مقاربت از طریق استمنا، جمع‌آوری شدند و سپس در ظروف پلاستیکی استریل که از نظر نداشتن اثرات سمی روی اسپرم کنترل شده بودند، قرار گرفتند و هر نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا مایع‌شدگی صورت پذیرد. سپس آنالیز اوّلیه مایع سمینال طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰) انجام شد [۲۱]. از مشخصات نمونه‌های مورد استفاده می‌توان به این موارد اشاره نمود: گرانروی و مورفولوژی طبیعی اسپرم بالاتر از چهار درصد، غلظت اسپرمی مابین ۱۰۰ تا ۱۲۰ میلیون در میلی‌لیتر و میزان تحرک کلی اسپرم بالاتر از ۷۰ درصد باشد. پس از مایع‌شدگی، نمونه را به دو قسمت مساوی تقسیم کردیم و به منظور جداسازی اسپرماتوزوئیدهای زنده و با تحرک مؤثر بالا، هر بخش به‌صورت جداگانه با روش سانتریفیوژ گرادیان غلظت شستشو داده شد. یکی از قسمت‌ها به‌عنوان گروه تازه برای استخراج RNA به آزمایشگاه برده شد و سپس با روش Real time PCR هر دو ژن موردنظر آنالیز شدند. قسمت دیگر نیز به‌عنوان گروه انجمادی، منجمد شد و پس از سه روز ذوب گردید. پس از ذوب، فرآیند استخراج RNA و بررسی بیان ژن‌ها با روش Real time RCR و مطابق با گروه تازه انجام شد. سانتریفیوژ گرادیان غلظت: برای حذف اسپرم‌های دارای تحرک کم و بی‌تحرک، لکوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیال، از روش سانتریفیوژ گرادیان غلظت دولایه Allgrad (۹۰-۴۵ درصد) استفاده شد. از آن‌جایی که اسپرم سالم و بالغ، چگالی بیشتری نسبت به سایر سلول‌ها دارد، پس از سانتریفیوژ به‌صورت رسوب در انتهای فالکون تجمع پیدا می‌کند. به منظور رسوب اسپرم، از دو لایه Allgrad (شرکت Lightglobal، کشور آمریکا) ۴۵ درصد و ۹۰ درصد با محیط کشت HTF دارای

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-22]

۵ درصد سرم آلبومین انسانی (شرکتSigma، کشور آمریکا) استفاده شد و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. پس از آن اسپرم‌های جمع‌آوری‌شده با دو بار تکرار همراه با سه میلی‌لیتر محیط HTF سرم‌دار به مدت پنج دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm شسته شدند تا باقی‌مانده Allgrad نیز از آن‌ها جدا شود [۲۲]. فرآیند انجماد و ذوب: تمام نمونه‌های گروه انجمادی در این مطالعه، به روش پروتکل مورد استفاده در کلینیک ناباروری پژوهشگاه رویان منجمد شدند. انجماد سریع اسپرم با استفاده از محیط Sperm freeze (شرکت Fertipro، کشور بلژیک) به‌عنوان ضد یخ و مطابق با بروشور راهنمای محصول صورت پذیرفت. میزان یک میلی‌لیتر از هر نمونه اسپرم با میزان ۰/۷ میلی‌لیتر از محیط Sperm freeze مخلوط شد. پس از سپری شدن دوره تعادل در دمای اتاق (۱۰ دقیقه)، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی بخار نیتروژن قرار گرفتند و سپس به درون تانک نیتروژن منتقل شدند. پس از سه روز نمونه‌ها از تانک نیتروژن خارج و به مدت پنج دقیقه در زیر شیر آب ذوب شدند. پس از ذوب و به منظور حذف محیط ضد یخ، میزان چهار میلی‌لیتر محیط HTF سرم‌دار افزوده و به مدت پنج دقیقه با سرعت ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، محلول رویی جدا شد و به رسوب انتهایی، میزان یک میلی‌لیتر HTF سرم‌دار افزوده گردید و به مدت دو ساعت درون انکوباتور CO2دار انکوبه شدند [۲۳]. در نهایت رسوب انتهایی، برای استخراج RNA به آزمایشگاه برده شد. زمان بازیابی بهینه برای سلول اسپرم پس از فرآیند انجماد و ذوب: برای تعیین بهترین زمان مناسب جهت انکوبه کردن سلول اسپرم پس از فرآیند ذوب، از دیگر آنتی‌ژن اختصاصی اسپرم انسانی به نام *SPAG1* استفاده شد. برای اطمینان بیشتر از نتیجه، از ژنی استفاده شد که در مسیرهای مولکولی، عملکرد شاخصی داشته باشد و *SPAG1* از این‌رو برای این ارزیابی انتخاب شد که به‌دلیل نقشی که در عملکرد ژنومی و از جمله مسیر پیام‌رسانی سلولی دارد (Uniprot)، حائز اهمیت می‌باشد و تغییرات بیان در این ژن می‌تواند نشانگر خوبی برای تشخیص زمان مناسب بهینه جهت انکوبه کردن اسپرم‌ها باشد. ارزیابی آنتی‌ژن اختصاصی اسپرم انسانی ۱ *(SPAG1)*، فقط در این مرحله صورت پذیرفت و برای تعیین زمان بازیابی بهینه اسپرم در مرحله ذوب استفاده شد. تعداد ۴ نمونه منی با حجم سه میلی‌لیتر از آزمایشگاه بخش درمان پژوهشگاه رویان تهیه شدند و به سه قسمت یک میلی‌لیتری تقسیم گردیدند و به‌صورت جداگانه به روش سانتریفیوژ گرادیان غلظت شستشو داده شدند. یک قسمت به‌عنوان نمونه کنترل (گروه تازه)، فرآیند استخراج RNA را طی کرد و دو قسمت بعدی به‌صورت جداگانه منجمد شدند. پس از گذشت سه روز، فرآیند ذوب به منظور تعیین بهترین زمان انکوبه کردن برای بازیابی فرآیند بیان ژن در سلول اسپرم دو نمونه ذوب‌شده انجام شد که به‌صورت جداگانه به مدت یک ساعت [۲۳] و دو ساعت در انکوباتور CO2دار قرار گرفتند. ارزیابی بیان ژن *SPAG1* در گروه‌های تازه و انجمادی، به‌وسیله دستگاه Real time PCR (شرکت Applied Biosystems، کشور آمریکا) صورت پذیرفت. استخراج RNA: به منظور جداسازی RNA کل اسپرم بالغ، از محلول TRIzol (شرکت Invitrogen، کشور آمریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کمیت RNA جداشده با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ (NanoDrop 1000، Thermo Fisher) مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی بیان ژن با استفاده از Real time PCR: با استفاده از روش Real time PCR، بررسی بیان رونوشت سه ژن *SPAG5*, *SPAG9* و *SPAG1* (فقط در مرحله تعیین زمان بازیابی بهینه برای ذوب اسپرم) در اسپرم بالغ انسانی مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده (جدول ۱)، ارزیابی بیان ژن‌ها به‌وسیله تکنیک Real time PCR انجام شد. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های موردنظر از نرم‌افزارهای Perl Primer Version 1.1.21 و Gene Runner Version 6.00 طراحی شدند. ژن *β-ACTIN* به‌عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ساخت cDNA از روی رشته RNA به‌عنوان الگو، از تکنیک نسخه‌برداری معکوس و کیت Takara (شرکت Takara، کشور ژاپن) استفاده شد. جهت انجام Real-time PCR، یک مخلوط واکنش برای پرایمرهای ژن خانه‌دار (*β-ACTIN*) و به تعداد ژن‌های دیگر نیز مخلوط واکنش (کیت SYBR، کشور ژاپن) تهیه شد. درون استریپ‌های مخصوص Real time PCR به ازای هر واکنش PCR مقدار ۸ میکرولیتر از مخلوط واکنش ریخته و سپس ۲ میکرولیتر از cDNA به‌صورت جداگانه داخل این چاهک‌ها اضافه شد. پس از آماده ساختن حجم موردنظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه در ۴۰ چرخه صورت پذیرفت. برای افزایش دقت، هر نمونه با دو تکرار بیولوژیک انجام شد. علاوه بر واکنش‌های فوق، به ازای هر ژن یک واکنش بدون الگو نیز انجام گرفت. مقادیر ct حاصل از آزمایش با استفاده از رابطه Δct و فرمول $2^{-\Delta ct}$ به کمیت‌های نسبی تبدیل شدند. در این مطالعه به منظور ارزیابی و مقایسه بیان ژن *SPAG* به شماره‌های ۱ و ۵ و ۹ میان اسپرم‌های منجمد و اسپرم‌های تازه از روش کمیت‌سنجی نسبی (Relative

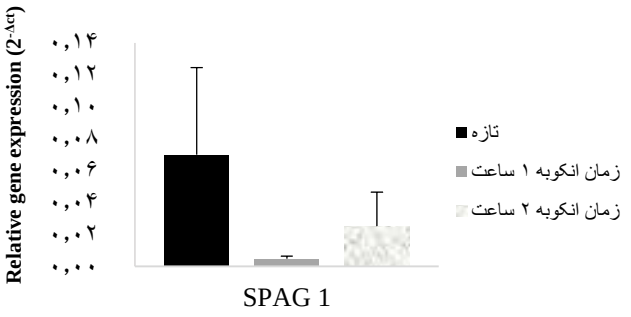
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-22]

(Quantitation) استفاده شده است که در مطالعات بیانی، مناسب‌ترین روش برای ارزیابی و مقایسه به شمار می‌رود.

آنالیز آماری: به منظور آنالیز و مقایسه داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۰ و سطح معنی‌داری آماری ($P\leq$۰/۰۵) استفاده شد. برای تأیید توزیع نرمال اعداد از آزمون کولموگروف - اسمیرنف استفاده شد. به منظور مقایسه بین گروه‌ها، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) برای زمان بازیابی بهینه و نیز آزمون t مستقل برای ارزیابی بیان ژن‌ها به‌کار برده شد.

نتایج

نتیجه کمّی حاصل از بیان ژن *SPAG1* برای زمان بازیابی بهینه سلول اسپرم پس از فرآیند انجماد و ذوب: برای تعیین زمان مناسب جهت انکوبه کردن اسپرم پس از ذوب، به ترتیب زمان‌های یک ساعت و دو ساعت مورد ارزیابی قرار گرفتند. در ارزیابی‌های انجام‌شده، از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری میان نتایج یک ساعت و دو ساعت انکوباسیون مشاهده نشد. اما با توجه به داده‌ها، میزان بیان ژن در *SPAG1* در مدت‌زمان دو ساعت انکوباسیون نسبت به ۱ ساعت بیشتر و بهتر بود؛ در نتیجه این زمان برای ریکاوری نمونه‌ها پس از ذوب در نظر گرفته شد (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱- مقایسه داده‌های بیان ژن در *SPAG1* در سه گروه تازه و ذوب‌شده در مدت‌زمان انکوباسیون ۱ ساعته و ذوب‌شده در مدت‌زمان انکوباسیون ۲ ساعته. میزان بیان در گروه‌های انجمادی (۱ ساعت انکوباسیون و ۲ ساعت انکوباسیون) کاهش یافته است. اگرچه از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری میان دو گروه انجمادی ۱ و ۲ ساعت انکوباسیون مشاهده نشد؛ اما میزان بیان ژن در گروه انجمادی ۲ ساعت انکوبه‌شده کمی بیشتر از گروه دیگر بود (n=۴).

همچنین تأثیر فرآیند انجماد و ذوب بر روی ویژگی‌های حرکتی اسپرم در سه گروه تازه و مدت‌زمان بازیابی ۱ و ۲ ساعت با استفاده از سیستم رایانه‌ای CASA مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول شماره ۲). نتایج کمّی حاصل از بیان ژن‌های *SPAG 5* ,*9* در سلول اسپرم پس از فرآیند انجماد و ذوب: طبق ارزیابی‌ها، میزان کاهش بیان ژن *SPAG5* در گروه تازه (قبل از انجماد) با میانگین (۰/۰±۰۲/۰۱) نسبت به گروه انجمادی با میانگین (۰/۰±۰۰۵/۰۰۱) از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۹، نمودار ۲). در حالی‌که میزان کاهش بیان ژن *SPAG9* در گروه تازه نسبت به گروه انجمادی از لحاظ آماری معنی‌دار گزارش نشد (P=۰/۳، نمودار شماره ۲).

جدول شماره ۱- اطلاعات مربوط به پرایمر

نام پرایمر		توالی پرایمر(´3-´5)	طول محصول (bp)
SPAG1	F:	GAGCCAGCAGGAAGTGAAA	122
	R:	AGTTCCAGAGCCCTGTTAC	
SPAG5	F:	CAGCACCATAGCAGATAACC	139
	R:	CTCTTGTTCAGTCTTCTCCTTTAG	
SPAG9	F:	TTCAAGCACTCCCACCAAAG	148
	R:	CTCAACTTCCCGACCCATTC	
ß ACTIN	F:	CAAGATCATTGCTCCTCCTG	90
	R:	ATCCACATCTGCTGGAAGG	

F: Forward, R: Reverse

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-22]

جدول شماره ۲- اطلاعات مربوط به اثر فرآیند انجماد - ذوب بر روی ویژگی‌های حرکتی اسپرم در دو گروه تازه و انجمادی

	تازه	زمان بازیابی ۱ ساعت	زمان بازیابی ۲ ساعت
Total Motility (%)	۸۹/۲±۲^{a}	۴۳/۶±۵/۶^{b}	۴۸/۴±۴/۴^{b}
Progressive Motility (%)	۶۰/۲±۳/۹^{a}	۳۵±۳/۶^{b}	۳۸/۳±۳/۱^{b}
VCL (µm/s)	۴۷/۷±۱/۹^{a}	۴۱/۷±۶/۸^{a}	۴۱/۹±۴/۲^{a}
VSL (µm/s)	۲۰ ±۱/۲^{a}	۲۰/۷±۲/۹^{a}	۱۹/۷±۲^{a}
VAP (µm/s)	۳۰/۱±۱/۴^{a}	۲۵/۶±۳/۷^{a}	۲۵±۲/۲^{a}
LIN (%)	۴۰/۲±۱/۶^{a}	۳۸±۵/۱^{a}	۴۳/۴±۳/۶^{a}
STR (%)	۶۱/۸±۱/۶^{a}	۶۳/۳±۴/۶^{a}	۶۶/۴±۲/۵^{a}
WOB (µm/s)	۶۲/۷±۱^{a}	۴۸/۶±۴/۳^{b}	۵۷/۳±۳/۸^{a}

داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف استاندارد (mean ± SEM) ارائه شده است و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (post hoc Tukey test) مورد بررسی قرار گرفت ($n = 12$; $P<۰/۰۵$). حروف متفاوت (a, b, c) در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در بین گروه‌هاست.

LIN, linearity; STR, amplitude of straightness; VAP, average path velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight linear velocity; WOB, wobble.

نمودار شماره ۲- مقایسه داده‌های بیان ژن در SPAGهای ۵ و ۹ در دو گروه تازه و انجمادی. میزان بیان در هر دو گروه کاهش یافته و از لحاظ آماری این کاهش در SPAG5 معنی‌دار گزارش شده است (n=۱۲، $P\leq۰/۰۵$). علامت * نشان‌دهنده معنی‌داری است.

بحث

آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم (SPAGs)، پروتئین‌های بااهمیتی از لحاظ ساختاری، پیام‌رسانی، روند تکامل اسپرم، باروری و تحرک در سلول‌های اسپرم انسانی به شمار می‌روند. این پروتئین‌ها علاوه بر بیان در سلول اسپرم، در بافت‌های مختلف بدن نیز وجود دارند و احتمالاً در صورت نقصان، موجب ناباروری از طریق ایجاد اختلال در عملکرد سلول اسپرم و بیماری‌های مختلف از جمله سرطان در بافت‌های مربوطه می‌شوند [۲]. انجماد اسپرم به روش سریع، یکی از فرآیندهای حفظ باروری مورد استفاده در کلینیک‌های ناباروری برای نگهداری طولانی‌مدت اسپرم انسانی می‌باشد که به‌دلیل آسیب کمتر سلول نسبت به روش‌های مشابه دیگر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. از دلایل انجماد اسپرم می‌توان به حفظ باروری در افراد مبتلا به سرطانی که به‌واسطه شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی در معرض خطر از دست دادن باروری قرار گرفته‌اند، اشاره کرد [۱۵]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که انجماد اسپرم به سبب چالش‌ها و اثرات نامناسبی که به همراه دارد، می‌تواند روی بیان ژن‌ها نیز تأثیرگذار باشد [۱۶]؛ بنابراین چنین فرضیه‌ای مطرح شد که انجماد می‌تواند روی بیان آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم انسانی ۵ و ۹ در طی فرآیند انجماد و ذوب تأثیرات بسزایی داشته باشد و سؤال اساسی در مطالعه حاضر بر این پایه استوار بود که به‌دلیل اهمیت این پروتئین‌ها، آیا بیان ژنی این آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم می‌تواند در اثر فرآیند انجماد تحت‌تأثیر قرار بگیرد یا خیر؟ بنابراین اثر فرآیند انجماد روی بیان *SPAG*های انسانی ۵ و ۹ مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد که به دنبال انجماد و اثرات مخرب احتمالی آن، میزان بیان رونوشت در ژن *SPAG5* کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. در سال ۱۹۹۵، Mazzilli و همکاران گزارش کردند که طی فرآیند انجماد، Reactive ROS) oxygen species) تولید می‌شود و این استرس اکسیداتیو، تحرک و زنده‌مانی اسپرم را کاهش می‌دهد و بر فعالیت‌های حیاتی این سلول نیز تأثیر بسزایی دارد [۲۴]. ROS با ایجاد یکسری شکاف‌ها، واکنش‌های متقاطع، اصلاحات در بازهای نیتروژن‌دار و حتی شکست در رشته DNA، روی یکپارچگی DNA تأثیر می‌گذارد

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-22]

[۲۵]. در گزارشات به تأثیر انجماد و استرس اکسیداتیو ناشی از آن، بر افزایش MicroRNAها و تنظیم فعالیت‌های سلولی نیز اشاره و این‌گونه بیان شده است که MicroRNAها می‌توانند از طریق مسیرهای مختلف پیام‌رسانی، نقش تنظیمی در بیان ژن‌ها داشته باشند [۲۶]. در مطالعه‌ای نیز به تأثیر شوک حاصل از سرمای ۴ درجه بر افزایش انواعی از MicroRNAها اشاره شده است [۲۷]. در مطالعه‌ای که Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام دادند، این‌گونه گزارش شد که miR-539 به‌طور مستقیم بر ژن *SPAG5* تأثیر می‌گذارد و بیان آن را کاهش می‌دهد [۲۸]؛ بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که احتمالاً شوک حاصل از انجماد با ایجاد استرس اکسیداتیو موجب افزایش miR-539 می‌شود و این اسید نوکلئیک با اثر روی ژن *SPAG5* باعث کاهش بیان آن می‌گردد. با توجه به نقش غیرقابل انکار آنتی‌ژن‌های اختصاصی اسپرم انسانی ۵ و ۹ در بیماری‌ها و سرطان [۲۹،۱۴،۲]؛ می‌توان به این نکته اشاره کرد که SPAGها یک شاخص مهم پیش‌درمانی، به‌خصوص در افراد مبتلا به سرطان می‌باشند [۳۰].

نتیجه‌گیری

اسپرم‌های سالم منجمد، نمونه‌هایی هستند که معمولاً در کلینیک‌های ناباروری برای فرآیند تلقیح مورد استفاده قرار می‌گیرند. بنابراین، سلامت اسپرم بعد از فرآیند انجماد، از اهمیت مولکولی برخوردار است. علاوه بر این، آسیب DNA در اسپرم‌ها می‌تواند با افزایش نارسایی در IVF و ICSI در ارتباط باشد و همچنین تغییر در بیان برخی از ژن‌های حیاتی می‌تواند منجر به ایجاد بیماری‌ها و سرطان‌های مختلف گردد. به‌دلیل نقش بسیار مهم SPAGها در تکامل و رشد جنین و حتی بیماری‌های مختلف، تغییر در بیان این ژن‌های حیاتی ممکن است در آینده تأثیراتی را به همراه داشته باشد که نیازمند تحقیقات بیشتر در این حیطه می‌باشد. با مطالعات بیشتر بر روی MicroRNAها و بررسی ارتباط آن‌ها با سرما و انجماد و همچنین بررسی میزان ROS، در آینده نتایج قابل اعتمادتری به دست خواهد آمد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، برگرفته از پروژه کارشناسی ارشد نویسنده اوّل می‌باشد. بدین‌وسیله از تمامی افرادی که به نوعی در اجرای این پژوهش نقش داشته و یاری‌گر بوده‌اند، به‌خصوص جناب آقای وحید اسماعیلی برزآبادی و سرکار خانم الهام عابد حیدری تشکر و قدردانی می‌شود. این پژوهش با حمایت و تأیید گروه جنین‌شناسی پژوهشگاه رویان انجام گرفته است.

References:

[1] Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. ***Mol Hum Reprod*** 2001; 7(2): 113-8.

[2] Silina K, Zayakin P, Kalnina Z, Ivanova L, Meistere I, Endzelinš E, et al. Sperm-associated antigens as targets for cancer immunotherapy: expression pattern and humoral immune response in cancer patients. ***J Immunother*** 2011; 34(1): 28-44.

[3] Zhou X, Jia L, Sun Y, Xu L, Wang X, Tang Q. Sperm‐associated antigen 5 is a potential biomarker for poor prognosis in breast cancer. ***Oncol Lett*** 2019; 17(1): 1146-52.

[4] Zhen Z, Dong F, Shen H, Wang QG, Yang L, Hu J. MiR-524 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in thyroid cancer via targeting SPAG9. ***Eur Rev Med Pharmacol Sci*** 2018; 22(12): 3812-8.

[5] Ren B, Zou G, He J, Huang Y, Ma G, Xu G, et al. Sperm-associated antigen 9 is upregulated in hepatocellular carcinoma tissue and enhances QGY cell proliferation and invasion in vitro. ***Oncol Lett*** 2018; 15(1): 415-22.

[6] Li D, Yang M, Liao A, Zeng B, Liu D, Yao Y, et al. Linc00483 as ce RNA regulates proliferation and apoptosis through activating MAPK s in gastric cancer. ***J Cell Mol Med*** 2018; 22(8):3875-86.

[7] Rižner TL. Discovery of biomarkers for endometrial cancer: current status and prospects. ***Expert Rev Mol Diagn*** 2016; 16(12): 1315-36.

[8] Ren B, Luo S, Xu F, Zou G, Xu G, He J, et al. The expression of DAMP proteins HSP70 and cancer-testis antigen SPAG9 in peripheral blood of patients with HCC and lung cancer. ***Cell Stress Chaperones*** 2017; 22(2): 237-44.

[9] Yang X, Zhou W, Liu S. SPAG9 controls the cell motility, invasion and angiogenesis of human osteosarcoma cells. ***Experimental Therapeutic Med*** 2016; 11(2): 637-44.

[10] Ren B, Wei X, Zou G, He J, Xu G, Xu F, et al. Cancer testis antigen SPAG9 is a promising marker for the diagnosis and

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-22]

treatment of lung cancer. ***Oncol Rep*** 2016; 35(5): 2599-605.
[11] Yan Q, Lou G, Qian Y, Qin B, Xu X, Wang Y, et al. SPAG9 is involved in hepatocarcinoma cell migration and invasion via modulation of ELK1 expression. ***Onco Targets Ther*** 2016; 9: 1067.
[12] Jagadish N, Gupta N, Agarwal S, Parashar D, Sharma A, Fatima R, et al. Sperm-associated antigen 9 (SPAG9) promotes the survival and tumor growth of triple-negative breast cancer cells. ***Tumour Biol*** 2016; 37(10): 13101-10.
[13] Ha JH, Yan M, Gomathinayagam R, Jayaraman M, Husain S, Liu J, et al. Aberrant expression of JNK-associated leucine-zipper protein, JLP, promotes accelerated growth of ovarian cancer. ***Oncotarget*** 2016; 7(45): 72845-59.
[14] Pan J, Yu H, Guo Z, Liu Q, Ding M, Xu K, et al. Emerging role of sperm-associated antigen 9 in tumorigenesis. ***Biomed Pharmacother*** 2018; 103: 1212-6.
[15] Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. ***Adv Urol*** 2012; 2012: 854837.
[16] Valcarce DG, Carton-Garcia F, Herraez MP, Robles V. Effect of cryopreservation on human sperm messenger RNAs crucial for fertilization and early embryo development. ***Cryobiology*** 2013; 67(1): 84-90.
[17] Valcarce DG, Carton-Garcia F, Riesco MF, Herraez MP, Robles V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. ***Andrology*** 2013; 1(5): 723-30.
[18] Salehi M, Mahdavi AH, Sharafi M, Shahverdi A. Cryopreservation of rooster semen: Evidence for the epigenetic modifications of thawed sperm. ***Theriogenology*** 2020; 142: 15-25.
[19] Bogle O, Kumar K, Attardo- Parrinello C, Lewis S, Estanyol J, Ballesca J, et al. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. ***Andrology*** 2017; 5(1): 10-22.
[20] Cui Z, Sharma R, Agarwal A. Proteomic analysis of mature and immature ejaculated spermatozoa from fertile men. ***Asian J Androl*** 2017; 18(5): 735.
[21] Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
[22] Beydola T, Sharma RK, Lee W, Agarwal A. Sperm preparation and selection techniques. ***Male Infertility Practice*** 2013; p. 244-51.
[23] Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nabi A, Ashourzadeh S. Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. ***Reproductive Biomedicine Online*** 2014; 28(3): 352-8.
[24] Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, et al. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. ***Acta Eur Fertil*** 1995; 26(4): 145-8.
[25] Valcarce D, Cartón- García F, Riesco M, Herráez M, Robles V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. ***Andrology*** 2013; 1(5): 723-30.
[26] Bu H, Wedel S, Cavinato M, Jansen-Durr P. MicroRNA Regulation of Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence. ***Oxid Med Cell Longev*** 2017; 2017: 2398696.
[27] Guo W, Lian S, Zhen L, Zang S, Chen Y, Lang L, et al. The Favored Mechanism for Coping with Acute Cold Stress: Upregulation of miR-210 in Rats. ***Cell Physiol Biochem*** 2018; 46(5): 2090-102.
[28] Zhang H, Li S, Yang X, Qiao B, Zhang Z, Xu Y. miR-539 inhibits prostate cancer progression by directly targeting SPAG5. ***J Exp Clin Cancer Res*** 2016; 35(1): 60.
[29] Liu G, Liu S, Cao G, Luo W, Li P, Wang S, et al. SPAG5 contributes to the progression of gastric cancer by upregulation of Survivin depend on activating the wnt/β-catenin pathway. ***Experimental Cell Res*** 2019; 379(1): 83-91.
[30] Abdel-Fatah TM, Agarwal D, Liu D-X, Russell R, Rueda OM, Liu K, et al. SPAG5 as a prognostic biomarker and chemotherapy sensitivity predictor in breast cancer: a retrospective, integrated genomic, transcriptomic, and protein analysis. ***Lancet Oncol*** 2016; 17(7): 1004-18.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-05-22]