Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2024 / Vol 26 / No 1

OPEN ACCESS

Original Paper

The Antioxidant Effect of Apigenin on Human Sperm Quality after Freezing-Thawing

Asieh Esmaeili Irani [1,2], **Bahare Nikoozar (M.Sc)** [3], **Maryam Arbabian (B.Sc)** [4]
Marziyeh Tavalaee (Ph.D)* [5], **Mohammad Hossein Nasr-Esfahani (Ph.D)** [6,2]

1 M.Sc Student of Microbial Biotechnology, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. 2 Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran. 3 M.Sc in Microbial Biotechnology, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. 4 B.Sc in Cellular and Molecular Biology, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. 5 Associate Professor, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. 6 Professor, Department of Animal Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Antioxidant apigenin (AP) is a natural, non-mutagenic, and less toxic flavonoid with pharmacological anti-cancer, anti-viral, anti-bacterial, anti-apoptotic, and anti-inflammatory activities. This antioxidant is easily received by the cell, binds to sperm DNA, and forms a DNA-AP complex, thereby protecting sperm DNA. The present study was conducted to determine the antioxidant effect of AP on human sperm quality after freezing-thawing.

Methods: In this descriptive-analytical study, 10 normozoospermic samples underwent freezing-thawing conditions, and sperm functional tests were investigated in different AP concentrations, including 0.4 mM, 0.2 mM, 0.1 mM, and 0.05 mM.

Results: The quality of total sperm parameters and functional tests decreased after freezing compared to before freezing. Among the AP concentrations, only in the 0.2 mM AP concentration, the improvement of the additional histone percentage, protamine deficiency, and sperm DNA health were observed compared to the control; this finding was not statistically significant.

Conclusion: The use of AP with a concentration of 0.2 mM during freezing-thawing culminates in improving sperm functional tests.

Keywords: Oxidative Stress, Antioxidants, Apigenin, Spermatozoa, Freeze-Thaw

***Corresponding Author:** Marziyeh Tavalaee (Ph.D), **E-mail:** m.tavalaee@royan-rc.ac.ir & tavalaee.royan@gmail.com

Received 15 April 2023
Final Revised 9 August 2023
Accepted 11 September 2023
Published Online 27 Feb 2024

Cite this article as: Esmaeili Irani A, Nikoozar B, Arbabian M, Tavalaee M, Hossein Nasr-Esfahani M. [The Antioxidant Effect of Apigenin on Human Sperm Quality after Freezing-Thawing]. J Gorgan Univ Med Sci. 2024; 26(1): 77-86. [Article in Persian]

© The author(s)
Owned: Golestan University of Medical Sciences **Publisher:** Deputy of Research and Technology

Journal of Gorgan University of Medical Sciences

e-ISSN: 2008-4080 p-ISSN: 1562-4765

2024 / Vol 26 / No 1

OPEN ACCESS

Extended Abstract

Introduction

Patients with cancer and males with severe oligozoospermia or azoospermia are more likely to experience infertility problems due to spermatogenesis dysfunction. Certain treatments (chemotherapy, radiotherapy, and surgery) result in complications, such as impaired spermatogenesis, decreased secretion of testosterone hormone, or sexual dysfunction, which can influence the patient's fertility and mental health. Sperm freezing is a way to cope with this concern and preserve an individual's fertility. The plasma membrane and the mitochondrial membrane are vulnerable to freezing and any disruption in the activity of the mitochondria may culminate in decreasing sperm motility and life. Optimizing sperm preparation techniques, the nature of sperm freezing medium, and freezing-thawing protocols should be able to minimize the induction of cell apoptosis in sperm freezing and result in achieving more success in assisted reproductive technologies using frozen sperm. The use of two antioxidants, namely catalase and ascorbate, on human sperm freezing medium by reducing DNA damage and imposing positive effects on mitochondrial membrane function has given rise to improved sperm motility and life after thawing. Adding vitamin E to human sperm freezing medium as a non-enzymatic antioxidant has been shown to improve sperm motility after freezing-thawing and has reduced DNA damage. So far, numerous studies have been conducted on the human sperm freezing-thawing method and several antioxidants or compounds have been used to maintain functional health of sperm; however, there are still conflicting results in this regard. An antioxidant that has a crucial function in lessening the impacts of oxidative stress and temperature stress is apigenin (AP). According to the authors' search, no study has been conducted on the effect of AP on human sperm function after freezing-thawing. Therefore, the present study was conducted to determine the antioxidant effect of AP on human sperm quality after freezing-thawing.

Methods

This descriptive-analytical study was conducted on 10 normozoospermia samples at Royan Research Institute, Iran during 2020. Each sample was collected in a sterile plastic container. It was then kept at room temperature for 20-30 minutes to liquefy and analyzed according to the World Health Organization (WHO) standard. After macroscopic examination of semen (appearance quality, liquefaction, viscosity, and volume), microscopic evaluation of semen, including sperm concentration, was performed using a Meckler counter slide, sperm motility was evaluated using computer-assisted sperm analysis (CASA) software, and sperm morphology was evaluated using Papanicolaou staining. The sperm freezing protocol was implemented based on the manufacturer's (Vitrolife, Sweden) instructions. For sperm sample thawing, we placed the freezing straw in water with a temperature of 35-37 ℃, and 30 seconds were considered for the complete thawing of the sample. Then, the contents of the straw were depleted into a 5 mL centrifuge tube, and, afterward, sperm parameters and sperm functional tests were performed. In order to achieve an optimal AP concentration, a dilution series was first prepared. According to the previous studies, the dilution series involved concentrations of 0.4 mM, 0.2 mM, 0.1 mM, and 0.05 mM. On each of the 10 sperm samples, six groups were considered as follows.

The first group: The sample before freezing, which was a sperm sample without AP before the freezing process; the second group (control): The sample for freezing, which was the semen sample without AP after freezing; the third, fourth, fifth, and sixth groups: Included AP concentrations of 0.4 mM, 0.2 mM, 0.1 mM, and 0.05 mM, respectively, which were placed in the freezing-thawing process.

After one day, the thawing process was performed. Sperm motility, life, and functional tests, including intracellular reactive oxygen species (ROS), sperm lipid peroxidation, additional sperm histone, protamine deficiency, and sperm DNA health, were evaluated before freezing and after thawing each sample. Papanicolaou staining was used to assess sperm morphology. Abnormalities were evaluated in three main parts of sperm, including head, trunk, and tail, and the results were reported as the abnormal sperm morphology percentage. Sperm lipid peroxidation level was evaluated by BODIPY staining (Invitrogen | Thermo Fisher Scientific-USA). Sperm ROS level was examined using flow cytometry and 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) staining. Chromomycin A3 (CMA3) staining was used for the assessment of sperm chromatin packaging and indirect observation of protamine deficiency. Sperm with insufficient protamine content turned into light yellow and sperm with sufficient protamine content turned into dark yellow. The results were reported as sperm protamine deficiency percentage. In order to evaluate sperm DNA health using acridine orange staining, a healthy sperm population was detectable in green color and sperms with DNA damage in red to yellow-orange colors. The results were reported as sperm DNA damage percentage.

Results

The mean percentage of sperm life in the control group (without AP) after freezing (36.14±4.52) compared to before freezing (68.43±3.55) and the mean percentage of sperm motility after freezing (14.26 ±6.33) compared to before freezing (67.29±6.42) indicated a statistically significant reduction ($P<0.05$). The mean percentage of sperm life in the groups treated with concentrations of 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, and 0.4 mM after freezing was 38.37±5.17, 34.62±5.03, 41.93±5.38, and 33.37±5.06, respectively, and the mean score of sperm motility after freezing was 10.45±2.91, 9.91±2.92, 11.13±2.18, and 5.79±2.89, respectively, compared to the control group not treated with AP after freezing, which showed no significant changes; however, the mean percentage of sperm motility in the groups treated with AP (0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 mM) showed a statistically significant effect compared to the group before freezing ($P<0.05$). The mean percentage of abnormal sperm morphology in the groups treated with AP (0.05, 0.1, 0.2, and 0.4 mM) did not show any statistically significant effect compared to the group before freezing. The mean percentage of sperm BIDOPY, the mean percentage of sperm DCF, the mean percentage of additional histone of the sperm nucleus, and the mean percentage of sperm DNA damage were not statistically significant in the groups treated with AP with different concentrations compared to the control group and the group before freezing. The mean percentage of sperm protamine deficiency in the groups treated with AP with different concentrations showed no statistically significant difference compared to the control group. Additionally, the mean percentage of sperm protamine deficiency in the groups treated with AP in different concentrations was not statistically significant compared to the group before freezing.

Conclusion

In the current research, the human sperm sample life before and after freezing was assessed in different groups, and sperm life after freezing decreased compared to the non-freezing sample. In this study, the AP concentration of 0.2 mM after freezing had a better life than the other groups after freezing; however, it was not statistically significant. Also, the amount of intracellular ROS and lipid peroxidation before and after freezing were examined in different groups. In different groups after freezing, no significant statistical difference was found among different AP concentrations. In the group of 0.2 mM AP, the improvement of sperm additional histone percentage, protamine deficiency, and sperm DNA health was observed, and no statistically significant difference was observed.

Ethical Statement

The present study was approved by the Research Ethics Committees of Royan Institute- Academic Center for Education, Culture and Research (IR.ACECR.ROYAN.REC.1399.025).

Funding

This article was extracted from proposal of Royan Institute- Academic Center for Education, Culture and Research (No. 99000021).

Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgment

The authors would like to thank all who cooperated in the advancement of this project and the investigated subjects.

Although the improvement of functional tests was observed after applying AP with a concentration of 0.2 mM during freezing-thawing, further research with other AP concentrations is required to specify the functional effect of using the antioxidant AP on sperm function.

Cite this article as: Esmaeili Irani A, Nikoozar B, Arbabian M, Tavalaee M, Hossein Nasr-Esfahani M. [The Antioxidant Effect of Apigenin on Human Sperm Quality after Freezing-Thawing]. J Gorgan Univ Med Sci. 2024; 26(1): 77-86. [Article in Persian]

مجله دانشگاه علوم پزشکی گرگان

بهار ۱۴۰۳ / دوره ۲۶ / شماره ۱ (پی در پی ۸۹)

دارای رتبه علمی -پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

e-ISSN: ۲۰۰۸-۴۰۸۰ p-ISSN: ۱۵۶۲-۴۷۶۵

با دسترسی آزاد

تحقیقی

اثر آنتی اکسیدانی اپیژنین بر کیفیت اسپرم انسانی پس از فریز - ذوب

آسیه اسماعیلی ایرانی [۱و۲]، بهاره نیکوزر [۳]، مریم اربابیان [۴]

دکتر مرضیه تولائی *[۵]، دکتر محمدحسین نصراصفهانی [۲و۶]

۱ دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران. ۲ مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران. ۳ کارشناس ارشد زیست فناوری میکروبی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران. ۴ کارشناس زیست شناسی سلولی مولکولی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران. ۵ دانشیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران. ۶ استاد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: *آنتی‌اکسیدان اپیژنین (Apigenin: AP) یک فلاونوئید طبیعی، غیرموتاژن و کمتر سمی است که دارای فعالیت‌های فارموکولوژیکی مانند ضد سرطان، ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد آپوپتوز و ضد التهاب است. این آنتی اکسیدان به راحتی توسط سلول دریافت می‌شود و به DNA اسپرم متصل شده و تشکیل کمپلکس DNA-AP می‌دهد؛ لذا به این صورت از DNA اسپرم محافظت می‌کند. این مطالعه به منظور تعیین اثر آنتی اکسیدانی اپیژنین بر کیفیت اسپرم انسانی پس از فریز – ذوب انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی - تحلیلی ۱۰ نمونه نورموزواسپرمی تحت شرایط فریز - ذوب قرار گرفتند و تست‌های عملکردی اسپرم در غلظت‌های متفاوت اپیژنین شامل ۰/٤ ، ۰/۲ ، ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *کیفیت کل پارامترهای اسپرمی و تست‌های عملکردی پس از فریز نسبت به قبل از فریز کاهش یافت. در بین غلظت‌های اپیژنین، فقط در غلظت ۰/۲میلی مولار اپیژنین، بهبود درصد هیستون اضافه، کمبود پروتامین و سلامت DNA اسپرم نسبت به کنترل مشاهده شد و این یافته از نظر آماری معنی‌دار نبود.*

نتیجه‌گیری: *استفاده از اپیژنین با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار طی فریز – ذوب باعث بهبود تست‌های عملکردی اسپرم می‌گردد.*

واژه‌های کلیدی: *استرس اکسیداتیو ، آنتی اکسیدان‌ها ، اپیژنین ، اسپرم ، فریز - ذوب*

* **نویسنده مسؤول:** دکتر مرضیه تولائی ، **پست الکترونیکی:** m.tavalaee@royan-rc.ac.ir و tavalaee.royan@gmail.com

نشانی: اصفهان، خوراسگان، خیابان سلمان، انتهای خیابان رویان، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، تلفن ۹۵۰۱۵۶۸۲-۰۳۱، نمابر ۹۵۰۱۵۶۸۷

وصول ۱۴۰۲/۱/۲۶ اصلاح نهایی ۱۴۰۲/۵/۱۸ پذیرش ۱۴۰۲/۶/۲۰ انتشار ۱۴۰۲/۱۲/۸

مقدمه

بیماران مبتلا به سرطان و مردان مبتلا به الیگوزواسپرمی شدید یا آزواسپرمی به دلیل اختلال عملکرد اسپرماتوژنز، به احتمال زیاد دارای مشکلات ناباروری هستند و چالش اصلی در روند درمان این بیماران، بازیابی سلامتی است. زیرا درمان‌های خاص (شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و جراحی) منجر به عوارض جانبی مانند اختلال در اسپرم‌زایی، کاهش ترشح هورمون تستوسترون یا اختلال عملکرد جنسی شده که می‌تواند بر سلامت باروری و روانی بیمار اثر گذار باشد. بنابراین، حفظ باروری قبل از شروع درمان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. انجماد اسپرم، راهی برای مقابله با این نگرانی و حفظ باروری فرد است.[۱] بحث انجماد هنگامی آغاز شد که Polge و همکاران کشف کردند که گلیسرول به عنوان یک کرایوپروتکتانت یا ماده محافظ انجمادی عمل می‌کند.[۲] همچنین در مطالعات زیادی گزارش شده که اسپرم ذخیره شده در نیتروژن مایع (دمای منفی ۱۹۶ درجه سانتی‌گراد)، حتی برای زمان طولانی‌تر قابل نگهداری است. اگرچه سلامت غشاء اسپرم طی فریز-ذوب تحت تاثیر است و کاهش تحرک و حیات را منجر می‌شود؛ با اینحال حرکت اسپرم در برخی نمونه‌ها تا حدی قابل برگشت است.[۳] اسپرم به دلیل نسبت بالاتر کلسترول به فسفولیپید و محتوی اسیدهای چرب اشباع بالاتر در غشای اسپرم، اندازه کوچک و کروماتین متراکم، قادر به تحمل یکسری از تغییرات دمایی است. به علاوه محتوی کم آب نسبت به سایر سلول‌ها در برابر آسیب‌های انجماد مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند.[۴] از جمله کاربردهای انجماد اسپرم می‌توان به مواردی از جمله جلوگیری از نمونه‌گیری مجدد در بیمارانی که احتمال

استفاده بیش از یک بار از تکنیک‌های کمک باروری را دارند اشاره نمود. همچنین انجماد اسپرم برای نگهداری اسپرم افراد اهداکننده در بانک اسپرم، حفظ باروری قبل از واژکتومی یا قبل از انواع خاصی از عمل‌های جراحی لگن یا بیضه می‌توان اشاره کرد.[۵] با وجود مزایای بسیار این تکنیک که توانسته در مراکز درمان ناباروری استفاده شود؛ اما معایبی نیز به همراه دارد. بنابراین محققان برای حفظ درصد بالایی از اسپرم‌های کارا در پی یافتن روش‌های برتر و یا بهینه‌سازی این تکنیک هستند.

انجماد می‌تواند سبب آسیب ساختار و یکپارچگی غشاء پلاسمایی شود که عامل مهمی برای تحرک و حیات اسپرم است.[۶] غشاء پلاسمایی و غشاء میتوکندری نسبت به انجماد حساسند و هرگونه اختلال در فعالیت میتوکندری‌ها ممکن است منجر به کاهش تحرک و حیات اسپرم گردد.[۷] بهینه‌سازی تکنیک‌های آماده‌سازی اسپرم، ماهیت محیط انجماد اسپرم و پروتکل‌های انجماد-ذوب بایستی به‌گونه‌ای باشد که القاء آپوپتوز سلولی را در انجماد اسپرم به حداقل رسانده و باعث دست‌یابی به موفقیت بیشتر در روش‌های کمک‌باروری با استفاده از اسپرم انجماد یافته؛ گردد.[۸] در مطالعه‌ای که روی مایع منی انسان انجام شد؛ افزودن کوآنزیم Q10 و ال-کارنیتین به محیط اسپرم به طور قابل توجهی منجر به کاهش سطح ROS گردید که می‌تواند میزان آسیب به اسپرم را طی انجماد تقلیل دهد.[۹]

استفاده از دو آنتی‌اکسیدان کاتالاز و آسکوربات بر روی محیط انجماد اسپرم انسانی با کاهش آسیب DNA و اثر مثبت بر عملکرد غشاء میتوکندری منجر به بهبود تحرک و حیات اسپرم پس از ذوب شده است.[۱۰] افزودن ویتامین E نیز به محیط انجماد اسپرم انسانی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی منجر به بهبود تحرک اسپرم پس از انجماد و ذوب گردیده و آسیب DNA را کاهش داده است.[۱۱] تاکنون مطالعات متعددی در زمینه روش فریز-ذوب اسپرم انسانی انجام شده و آنتی‌اکسیدانت‌ها یا ترکیبات متعددی برای حفظ سلامت عملکردی اسپرم استفاده شده؛ ولی هنوز در این زمینه نتایج متناقضی وجود دارد. یکی از آنتی‌اکسیدانت‌هایی که دارای عملکرد مهم در کاهش اثرات استرس اکسیداتیو و استرس دمایی است؛ اپیژنین (AP) است. این آنتی‌اکسیدان دارای فرمول ۴ و ۵ و ۷ تری‌هیدروکسی فلاون بوده که یک فلاونوئید طبیعی است. این آنتی‌اکسیدان غیرموتاژن و کمتر سمی است و فعالیت‌های فارموکولوژیکی مانند ضدسرطان، ضدویروسی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدآپوپتوز و ضدالتهاب دارد.[۱۲] زمانی که این آنتی‌اکسیدان توسط سلول دریافت و به DNA اسپرم متصل می‌شود؛ تشکیل کمپلکس DNA-AP را می‌دهد. لذا به این طریق از DNA اسپرم محافظت می‌کند.[۱۳] اثر محافظتی اپیژنین بر عملکرد طبیعی اسپرم، کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز سلولی در یک مدل رت نر نابارور بررسی و گزارش شد که مصرف خوراکی اپیژنین در این موش‌های نابارور با افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و نیز کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید و کاسپاز۳ به‌صورت معنی‌داری منجر به بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی بیضه و در نهایت کیفیت پارامترهای اسپرمی شده است.[۱۴] استفاده از اپیژنین در غلظت بهینه ۰/۲ میلی‌مولار در محیط انجماد اسپرم گراز، باعث بهبود تحرک و حیات اسپرم پس از انجماد شده است.[۱۵] در رابطه با اثر اپیژنین بر عملکرد اسپرم انسانی پس از انجماد-ذوب، طبق بررسی نویسندگان هنوز مطالعه‌ای انجام نشده است. لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر آنتی اکسیدانی اپیژنین بر کیفیت اسپرم انسانی پس از فریز – ذوب انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی – تحلیلی روی ۱۰ نمونه نورموزواسپرمی در پژوهشگاه رویان طی سال ۱۳۹۹ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش پژوهشگاه رویان – جهاد دانشگاهی (IR.ACECR.ROYAN.REC.1399.025) قرار گرفت. مراحل طرح به طور کامل برای شرکت‌کنندگان در مطالعه توضیح داده شد و در صورت موافقت زوجین برای شرکت در مطالعه، فرم رضایت‌نامه کتبی در اختیار آنها قرار داده شد. هر نمونه از طریق استمنا پس از ۳ الی ۴ روز پرهیز از نزدیکی توسط زوجین، در ظرف پلاستیکی استریل جمع‌آوری گردید. سپس برای مایع شدن به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و مطابق استاندارد سازمان بهداشت جهانی آنالیز شد. پس از بررسی ماکروسکوپی مایع منی (کیفیت ظاهری، مایع‌شدگی، گرانروی و حجم)، ارزیابی میکروسکوپی مایع منی از جمله غلظت اسپرم با استفاده از لام شمارشگر مکلر (Meckler)، تحرک اسپرم با استفاده از نرم‌افزارهای رایانه‌ای (CASA)، مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو صورت گرفت.

پروتکل روش انجماد اسپرم بر اساس شرکت سازنده (Vitrolife سوئد) انجام شد. در ابتدا نمونه مایع منی به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه به صورت قطره قطره به نسبت یک به یک به محیط فریز (fresh) اسپرم اضافه شد. سپس ۱۰ دقیقه دیگر نیز زمان داده شد تا کاملاً محیط فریز اسپرم با مایع منی مخلوط و در تماس قرار گیرد. پس از آن نمونه به داخل نی کشیده شده و سر دیگر آن توسط خمیر هماتوکریت مسدود شد. پس از اطمینان از بسته شدن دو سر نی، آنها به‌طور مجزا درون ظروف مخصوصی (ریل) به مدت ۳۰ دقیقه با فاصله ۳-۱ سانتی‌متری بر روی بخار ازت مایع (دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد) به منظور منجمد شدن تدریجی نی‌ها قرار گرفت. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، ریل‌های حاوی نی را درون ازت مایع با دمای

منفی ۱۹۶ درجه سانتی‌گراد غوطه ور کردیم. با وارد شدن ازت به داخل ریل، آنها به داخل کنیستر (اجزاء داخلی تانک ازت برای نگهداری نی انجماد) برای ذخیره‌سازی طولانی مدت، انتقال داده شدند.

برای ذوب نمونه اسپرم، نی فریز را درون آب با دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم و۳۰ ثانیه برای ذوب کامل نمونه، در نظر گرفته شد. سپس محتویات نی به درون لوله سانتریفیوژ ۵ میلی‌لیتری تخلیه گردید و در ادامه پارامترهای اسپرمی و تست‌های عملکردی اسپرم انجام شد.

برای دستیابی به یک غلظت بهینه از اپیژنین ابتدا سری رقتی از آن تهیه گردید. سری رقت بر اساس مقالات شامل غلظت‌های ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی‌مولار بودند.[۱۵] بر روی هر یک از ۱۰ نمونه اسپرمی شش گروه به شرح زیر در نظر گرفته شدند.

گروه اول: نمونه قبل از فریز که نمونه منی بدون اپیژنین قبل از فرایند فریز بود.

گروه دوم (کنترل): نمونه برای فریز که نمونه منی فاقد اپیژنین پس از فریز بود.

گروه سوم: غلظت ۰/۴ میلی‌مولار اپیژنین که در فرآیند فریز-ذوب قرار گرفت.

گروه چهارم: غلظت ۰/۲ میلی‌مولار اپیژنین که در فرآیند فریز-ذوب قرار گرفت.

گروه پنجم: غلظت ۰/۱ میلی‌مولار اپیژنین که در فرآیند فریز-ذوب قرار گرفت.

گروه ششم: غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار اپیژنین که در فرآیند فریز-ذوب قرار گرفت.

پس از یک روز فرآیند ذوب انجام شد. قبل از انجماد و پس از ذوب هر نمونه، میزان تحرک، حیات اسپرم و تست‌های عملکردی اسپرم شامل ROS داخل سلولی، پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم، هیستون اضافه اسپرم، کمبود پروتامین و سلامت DNA اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.[۱۵]

برای بررسی حیات اسپرم، نمونه مایع منی را به‌خوبی همگن کرده، ۵۰ میکرولیتر از مایع منی را با حجم مساوی از سوسپانسیون ائوزین - نگروزین مخلوط نموده و ۳۰ ثانیه زمان داده شد. یک گسترش روی یک لام شیشه‌ای ایجاد و در هوای محیط خشک شد. تعداد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده (مرده) یا رنگ نشده (زنده) را با کمک شمارشگر آزمایشگاهی محاسبه کرده و برای هر نمونه حداقل ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری زمینه روشن (100x) شمارش و نتایج به صورت درصد حیات گزارش گردید.[۱۶]

به منظور ارزیابی مورفولوژی اسپرم از رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو استفاده شد. این روش رنگ‌آمیزی طبق دستورالعمل WHO انجام شد.[۱۶] ناهنجاری‌ها در سه قسمت اصلی اسپرم شامل سر، تنه و دم مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج به صورت درصد اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی گزارش شدند.

سطح لیپید پراکسیداسیون اسپرم با رنگ‌آمیزی BODIPY (Invitrogen | Thermo Fisher Scientific - USA) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲×۱۰^{۶} اسپرم بر میلی‌لیتر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در Bodipy C11 محلول در دی متیل سولفوکساید با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار از Bodipy C11 (Merck, USA) انکوبه و سپس نمونه‌های اسپرم با PBS شسته شدند. درصد پراکسیداسیون لیپیدی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) ارزیابی شد. برای هر نمونه، دو لوله کنترل مثبت (تیمار شده با H2O2) و کنترل منفی (تیمار شده با -PBS) در نظر گرفته شد.[۱۷]

سطح ROS اسپرم با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری و رنگ ۲-۷ دی‌کلرودی‌هیدرو فلوروسنس دی‌استات (DCFH-DA) مورد بررسی قرار گرفت. برای رنگ‌آمیزی DCFH-DA، ۱×۱۰^{۶} اسپرم بر میلی‌لیتر در PBS به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ۵ میلی‌مولار DCFH-DA در دمای اتاق قرار گرفت. سپس درصد و شدت اسپرم ROS مثبت توسط دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) نمونه‌های رنگ‌آمیزی نشده به عنوان کنترل منفی با استفاده از PBS بدون DCFH-DA مورد استفاده قرار گرفتند.[۱۸]

برای بررسی بسته‌بندی کروماتین اسپرم و مشاهده غیرمستقیم کمبود پروتامین از رنگ‌آمیزی کروموماسین A3 (CMA3) استفاده گردید.[۱۹] از هر نمونه، دو اسمیر اسپرم شسته شده، تهیه گردید و سپس با محلول کارنوی فیکس شد. سپس اسمیرها با ۲۰۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی (CMA3 ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو با x-PBS (۳×) با استفاده از یک میکروسکوپ فلورسنت (Olympus، ژاپن) با فیلترهای مناسب (۴۶۰-۴۷۰ nm ، بزرگ‌نمایی 100x) حداقل ۲۰۰ اسپرم ارزیابی شدند. اسپرم با محتوی پروتامین ناکافی به رنگ زرد روشن و اسپرم با محتوی پروتامین کافی به رنگ زرد تیره درآمدند. نتایج به صورت درصد کمبود پروتامین اسپرم گزارش شد.[۱۶]

برای بررسی هیستون اضافی یا باقی مانده DNA اسپرم از هر نمونه اسمیری تهیه گردید. سپس اسلایدها به ترتیب با گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد و آنیلین بلو (آبی) ۵ درصد در اسید استیک ۴ درصد تثبیت و رنگ‌آمیزی شدند. سپس اسلایدها با استفاده از حمام اتانول متوالی (۷۰ درصد، ۹۶ درصد و ۱۰۰ درصد) خشک و در زایلول (۵ دقیقه) قرار داده شدند. در نهایت اسمیرها با محیط مونت انتلان سریع پوشانده شدند. به طور تصادفی، حداقل ۲۰۰ اسپرم توسط یک

فرد آموزش دیده با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شد. اسپرم مایل به آبی نشان‌دهنده عدم بلوغ هسته‌ای بود.[۲۰] نتایج به‌صورت درصد هیستون اضافی گزارش شد.

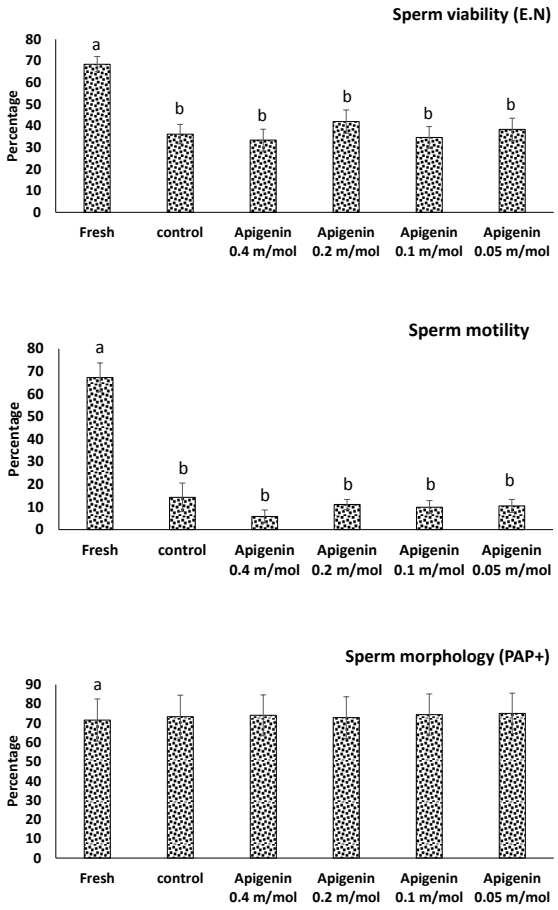
برای ارزیابی سلامت DNA اسپرم و انجام رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ، ابتدا یک اسمیر از نمونه اسپرمی تهیه شد. به منظور تهیه فیکساتیو کارنوی، متانول به اسید استیک به نسبت ۳ به یک با هم مخلوط شد. روی اسمیر، فیکساتیو کارنوی ریخته شد و در یک محیط مرطوب (Chamber) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از مدت زمان ۲ ساعت، لام را با ۲ میلی‌لیتر PBS شست و شو دادیم. ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ را روی اسمیر به مدت ۸ دقیقه قرار داده و سپس اسلایدها با PBS شستشو شدند. اسلایدها مونت و با بزرگ‌نمایی 100x حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد.[۱۶] برای ارزیابی سلامت DNA اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ، جمعیت اسپرمی سالم، به رنگ سبز و اسپرم‌ها با آسیب DNA به رنگ‌های قرمز تا زرد - نارنجی قابل شناسایی بودند.[۲۱] نتایج به‌صورت درصد آسیب DNA اسپرم گزارش شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-11.5 تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه متغیرهای مطالعه بین شش گروه ابتدا از لحاظ نرمال بودن داده‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. سپس از آزمون One way ANOVA و تست Tukey استفاده شد و داده‌های غیرنرمال از طریق آزمون Non parametric مورد بررسی قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها به صورت mean±SEM گزارش گردید. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین درصد حیات اسپرم در گروه کنترل (فاقد اپیژنین) پس از فریز (۴/۵۲±۳۶/۱۴) نسبت به قبل از فریز (۳/۵۵±۶۸/۴۳) و نیز میانگین درصد تحرک اسپرم بعد از فریز (۶/۳۳±۱۴/۲۶) در مقایسه با قبل از فریز (۶/۴۲±۶۷/۲۹) کاهش آماری معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵). میانگین درصد حیات اسپرم در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ میلی‌مولار پس از فریز به ترتیب ۵/۱۷±۳۸/۳۷، ۵/۰۳±۳۴/۶۲، ۵/۳۸±۴۱/۹۳ و ۵/۰۶±۳۳/۳۷ و نیز میانگین تحرک اسپرم پس از فریز به ترتیب ۲/۹۱±۱۰/۴۵، ۲/۹۲±۹/۹۱، ۲/۱۸±۱۱/۱۳ و ۲/۸۹±۵/۷۹ نسبت به گروه کنترل بدون تیمار با اپیژنین پس از فریز تغییرات آماری معنی‌داری نشان ندادند. در حالی که میانگین درصد تحرک اسپرم در گروه‌های تیمار شده با اپیژنین (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ میلی‌مولار) نسبت به گروه قبل از فریز اثر آماری معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵) (نمودار یک و شکل یک).

میانگین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در گروه کنترل پس از فریز (۱۱/۱۱±۷۳/۴۲) نسبت به درصد مورفولوژی غیرطبیعی قبل از فریز (۱۰/۹۳±۷۱/۶۴) اثر آماری معنی‌داری نشان ندادند. میانگین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ میلی مولار) پس از فریز به ترتیب ۱۰/۴۵±۷۵/۱۰، ۱۰/۶۹±۷۴/۴۶، ۱۰/۸۴±۷۲/۸۹ و ۱۰/۶۴±۷۴/۰۷ نسبت به گروه کنترل پس از فریز تغییرات آماری معنی‌داری نشان ندادند. همچنین میانگین درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در گروه‌های تیمار شده با اپیژنین (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ میلی‌مولار) نسبت به گروه قبل از فریز اثر آماری معنی‌داری نشان ندادند (شکل یک).



نمودار ۱ : میانگین و انحراف معیار درصد غلظت‌های مختلف اپیژنین بر میانگین درصد حیات و تحرک و مورفولوژی اسپرم قبل و بعد از فریز
حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی‌داری و حروف غیر مشترک نشان دهنده معنی‌داری (P<۰/۰۵) گروه‌ها است.

میانگین درصد Bodipy اسپرم در گروه کنترل پس از فریز (۳/۰۴±۱۶/۰۰) نسبت به درصد Bodipy اسپرم قبل از فریز (۲/۶۵±۱۴/۵) افزایش نشان داد که از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین درصد Bodipy اسپرم در گروه‌های تیمار شده با اپیژنین با غلظت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل و نیز گروه قبل از فریز از

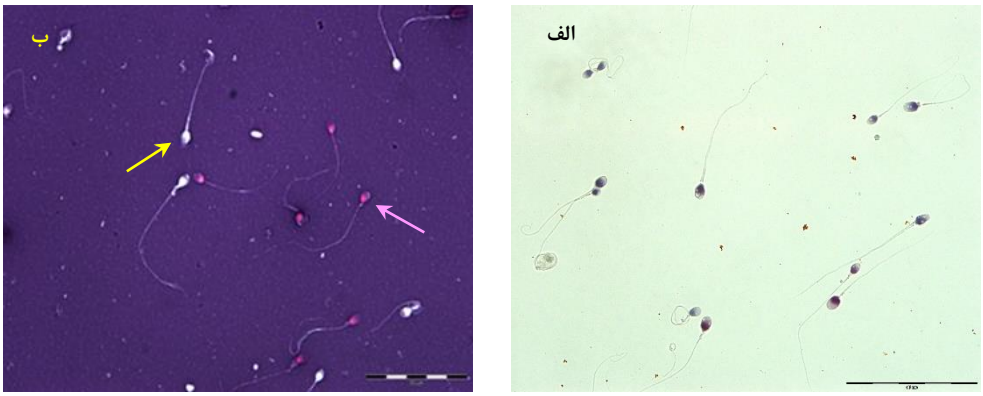
جدول ۱: میانگین و انحراف معیار غلظت‌های مختلف اپیژنین بر میانگین درصد Bodipy و DCF اسپرم قبل و بعد از فریز

مشخصه اسپرمی	قبل از فریز	گروه‌ها بعد از فریز				
		کنترل	اپیژنین ۰/۰۵ میلی مولار	اپیژنین ۰/۱ میلی مولار	اپیژنین ۰/۲ میلی مولار	اپیژنین ۰/۴ میلی مولار
درصد Bodipy اسپرم	۱۴/۵±۲/۶۵	۱۶±۳/۰۴	۱۶/۵±۲/۷۱	۱۶/۲۵±۲/۰۲	۱۲/۱۲±۱/۹۴	۱۸/۱۲±۳/۴۵
درصد DCF اسپرم	۱۴/۱۲±۱/۷۲	۱۳/۸۵±۲/۲۵	۱۶/۷۵±۳/۲۸	۱۷/۲۵±۲/۹۳	۱۲/۵±۱/۲۹	۱۶±۳/۲۷

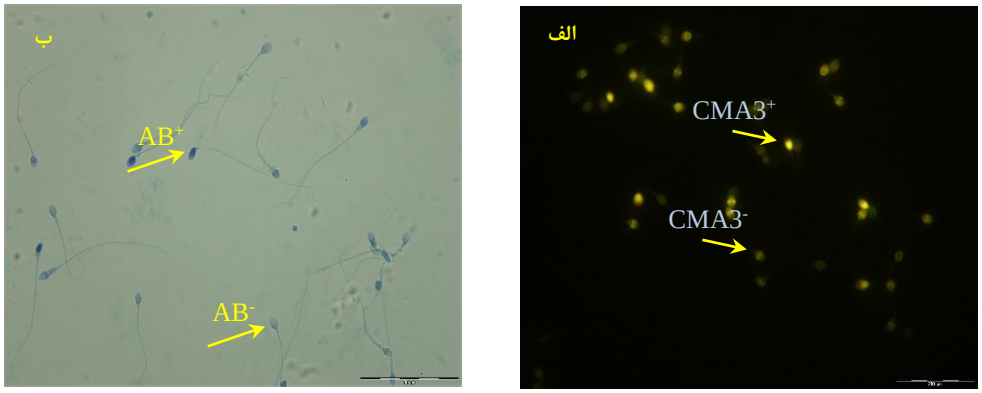
اختلاف آماری معنی‌داری در هر ردیف بین گروه‌ها وجود ندارد.

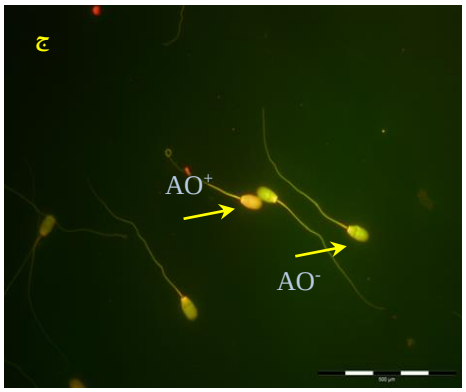
جدول ۲: میانگین و انحراف معیار غلظت‌های مختلف اپیژنین بر میانگین درصد کمبود پروتامین اسپرم، درصد هیستون اضافی اسپرم و آسیب DNA اسپرم قبل و بعد از فریز

مشخصه اسپرمی	قبل از فریز	گروه‌ها بعد از فریز				
		کنترل	اپیژنین ۰/۰۵ میلی مولار	اپیژنین ۰/۱ میلی مولار	اپیژنین ۰/۲ میلی مولار	اپیژنین ۰/۴ میلی مولار
درصد کمبود پروتامین (CMA3+)	۲۷/۸۳±۴/۵۲	۳۳/۵۸±۶/۶۸	۲۱/۷۵±۳/۹۱	۲۳/۶۶±۵/۲۷	۱۹/۴۱±۳/۵	۲۴/۵±۴/۲۵
درصد هیستون اضافی (AB+)	۳۲/۱۴±۲/۳۹	۳۸/۰۷±۲/۱۵	۴۰/۶۴±۳/۳۳	۳۴/۰۷±۴/۱۹	۳۱/۷۸±۳/۵۱	۴۱/۵±۵/۳۶
درصد آسیب DNA اسپرم (AO+)	۴۷/۸۵±۵/۹۴	۷۱/۳۵±۶/۷۱	۶۸/۲۱±۶/۸۶	۵۸/۶۴±۶/۴۲	۵۱/۷۱±۷/۷۵	۶۲/۲۱±۶/۹۴



شکل ۱ : ارزیابی پارامترهای میکروسکوپی اسپرم.
الف) ارزیابی مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولائو. ب) ارزیابی حیات اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین –نگروزین. فلش صورتی: اسپرم‌های مرده دارای سر به رنگ صورتی روشن تا قرمز؛ فلش زرد: اسپرم‌های زنده دارای سر به رنگ سفید.





شکل ۲ : ارزیابی تست‌های عملکردی اسپرم. الف: بررسی کمبود پروتامین با استفاده از رنگ آمیزی CMA3، اسپرم‌های با رنگ زرد براق +CMA (کمبود پروتامین) و اسپرم‌های با رنگ زرد کمرنگ -CMA3 (اسپرم سالم) هستند. ب: بررسی هیستون اضافی در اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی آنیلین بلو، اسپرم‌های دارای هیستون اضافی در هسته به رنگ آبی تیره(+AB) و اسپرم های دارای محتوی هیستون طبیعی در هسته به رنگ آبی روشن (-AB) هستند. ج: ارزیابی آسیب DNA با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورانژ، اسپرم‌های به رنگ سبز نشانگر اسپرم با سلامت DNA (-AO) و اسپرم‌های به رنگ نارنجی-قرمز نشانگر آسیب DNA (+AO) است.

نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول یک).

میانگین درصد DCF اسپرم در گروه کنترل پس از فریز (۱۳/۸۵±۲/۲۵) نسبت به درصد DCF اسپرم قبل از فریز (۱۴/۱۲±۱/۷۲) از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین درصد DCF اسپرم در گروه‌های تیمار شده با اپیژنین با غلظت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل و نیز گروه قبل از فریز از نظر آماری معنی‌دار نبود. (جدول یک).

میانگین درصد کمبود پروتامین اسپرم در گروه کنترل پس از فریز (۳۳/۵۸±۶/۶۸) نسبت به درصد کمبود پروتامین قبل از فریز (۲۷/۸۳±۴/۵۲) افزایش داشت که از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین درصد کمبود پروتامین اسپرم در گروه‌های تیمار شده با اپیژنین با غلظت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد. همچنین میانگین درصد کمبود پروتامین اسپرم در گروه‌های تیمار شده با اپیژنین در غلظت‌های مختلف نسبت به گروه قبل از فریز از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲) (شکل ۲).

میانگین درصد هیستون اضافی اسپرم در گروه کنترل پس از فریز (۳۸/۰۷±۲/۱۵) نسبت به درصد هیستون اضافی هسته قبل از فریز (۳۲/۱۴±۲/۳۹) افزایش داشت که از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین درصد هیستون اضافی هسته اسپرم در گروه‌های تیمار شده با اپیژنین با غلظت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل و گروه قبل از فریز اختلاف آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

میانگین درصد آسیب DNA اسپرم در گروه کنترل پس از فریز (۷۱/۳۵±۶/۷۱) نسبت به درصد آسیب DNA قبل از فریز (۴۷/۸۵±۵/۹۴) افزایش داشت که از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین درصد آسیب DNA اسپرم در گروه‌های تیمار شده با اپیژنین با غلظت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل و گروه قبل از فریز از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲).

بحث

در مطالعه حاضر حیات نمونه اسپرم انسانی قبل و بعد از فریز در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و همانند سایر مطالعات[۳و۶و۷و۱۰] حیات اسپرم پس از فریز نسبت به نمونه فریز نشده کاهش پیدا کرد. در مطالعه Pei و همکاران استفاده از آنتی‌اکسیدان اپیژنین در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار در نمونه اسپرم گراز منجر به بهبود حیات اسپرم پس از فریز نسبت به گروه کنترل (فاقد اپیژنین) پس از فریز شده است.[۱۵] در مطالعه حاضر نیز غلظت ۰/۲میلی‌مولار اپیژنین پس از فریز، نسبت به بقیه گروه‌های پس از فریز حیات بهتری داشت؛ ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در بسیاری از مطالعات، نمونه اسپرم پس از ذوب با افزایش آسیب DNA همراه است و پروسه انجماد و ذوب تغییرات غیرقابل برگشتی را در سلامت ژنوم اسپرم ایجاد می‌کند. از جمله عواملی که در آسیب DNA اسپرم طی پروسه فریز و ذوب نقش دارند؛ می‌توان به شوک سرمایی و ایجاد استرس اکسیداتیو اشاره نمود.[۲۲] با افزایش تولید ROS، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت‌ها کاهش یافته و DNA را مستعد آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو می‌کند. از طرفی، احتمالاً روند انجماد باعث القاء فرآیند آپوپتوز، فعال‌شدن کاسپازها و اندونوکلئازهای اختصاصی تخریب کننده DNA می‌شود.[۲۳] به‌منظور حل کردن مشکل فریز نمونه اسپرم، از سال‌ها پیش از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شده است. با اینحال برای رفع مشکل استرس اکسیداتیو طی فرایند انجماد نمونه اسپرم، نیاز به بررسی‌های بیشتری است.[۲۴] در اپیدیدیم مقدار قابل توجهی ال-کارنیتین و استیل-ال-کارنیتین وجود دارد که می‌تواند نشان‌دهنده اثر حیاتی ال-کارنیتین بر متابولیسم اسپرم و اسپرماتوژنز باشد. از ال-کارنیتین در شرایط آزمایشگاهی برای تقویت تحرک اسپرم استفاده می‌شود. زیرا انتقال اسیدچرب در میتوکندری که برای تولید ATP ضروری است؛ ممکن است تحت تأثیر ال کارنیتین قرار گیرد. همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که ملاتونین یک آنتی‌اکسیدان وابسته به زمان و دوز است که با تغییر کمپلکس‌های زنجیره تنفسی میتوکندری I و IV، بهبود پتانسیل زنجیره انتقال میتوکندری و حذف ROS، می‌تواند موجب بهبود تحرک اسپرم شود. با این حال، تحرک پیشرونده اسپرم پس از افزودن مکمل ال-کارنیتین به محیط فریز در نمونه‌های آستنوزواسپرمی مانند گروه کنترل بوده است.[۲۵] Zuo و همکاران در سال ۲۰۱۷ ، ۷/۵ میلی‌مولار استیل-ال-کارنیتین را به عنوان دوز بهینه برای بهبود تحرک اسپرم پس از ذوب در نمونه‌های آستنوزواسپرمی نشان دادند. این نتیجه را می‌توان به اشباع ال-کارنیتین ترانسفراز I در غشای خارجی میتوکندری نسبت داد.[۲۶] Rossi و همکاران پیشنهاد کردند که آنزیم‌های سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز از طریق جلوگیری تولید ROS و پراکسیداسیون لیپیدی منجر به بازیابی کیفیت پارامترهای اسپرم پس از فرآیند انجماد و ذوب می‌شود.[۲۷] یکی دیگر از آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی که از DNA اسپرم در برابر اثرات مضر انجماد محافظت می‌کند؛ ویتامین E است. این آنتی‌اکسیدان در غشای سلولی قرار دارد و رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و به رادیکال‌های آلفا توکوفروکسیل تبدیل می‌کند. Kalthur و همکاران گزارش کردند که محیط فریز با اضافه شدن ویتامین E منجر به بهبود سلامت DNA اسپرم شده است.[۲۸]

در مطالعه حاضر مقدار ROS داخل سلولی و پراکسیداسیون لیپیدی قبل و بعد از فریز، در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در گروه‌های مختلف پس از فریز، در بین غلظت‌های مختلف اپیژنین اختلاف آماری معنی‌داری یافت نشد. در مقابل، در مطالعه‌ای که اثر میواینوزیتول بر روی پارامترهای اسپرم انسان قبل و بعد از فریز ارزیابی شد؛ این ماده باعث کاهش تولید ROS پس از

فریز گردید.[۲۹] در مطالعه حاضر، در گروه ۰/۲میلی‌مولار اپیژنین، بهبود درصد هیستون اضافی اسپرم، کمبود پروتامین و سلامت DNA اسپرم مشاهده شد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعه‌ای اثر کاروتنوئید کانتاگزانتین که به صورت طبیعی توسط جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها بیوسنتز می‌شوندد و علاوه بر آن در محیط آزمایشگاه نیز توسط میکروارگانیسم‌ها به ویژه *اشریشیا کلی* بیوسنتز می‌شود را بر روی اسپرم انسانی بررسی کردند. کانتاگزانتین دارای نقش آنتی‌اکسیدانی بود و عملکرد آن در پاکسازی ROS و جلوگیری از فسفوریلاسیون لیپید گزارش شد.[۳۰] همچنین تمام پارامترهای اسپرم پس از ذوب به‌طور قابل توجهی در مقایسه با قبل از انجماد کاهش یافت. کانتاگزانتین ۲۵ میکرومولار توانست به‌طور قابل توجهی تحرک اسپرم و تحرک پیشرونده، حیات، مورفولوژی طبیعی، بسته‌بندی کروماتین، یکپارچگی آکروزوم و آسیب DNA را بهبود بخشد. همچنین، کیفیت مورفولوژی پس از فریز در گروه کنترل (فاقد کانتاگزانتین) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در حالی‌که مورفولوژی اسپرم قبل و بعد از فریز اختلاف آماری معنی‌داری نداشت.[۳۰]

با توجه به محدودیت در تهیه و دسترسی به آنتی‌اکسیدان اپیژنین، تعداد ۱۰ نمونه نورموزواسپرمی تحت شرایط فریز – ذوب قرار گرفتند که از محدودیت‌های این مطالعه محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گرچه بهبود تست‌های عملکردی پس از استفاده از اپیژنین با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار طی فریز – ذوب مشاهده گردید؛ اما مطالعات بیشتر با غلظت‌های دیگری از اپیژنین بایستی انجام شود تا اثر عملکردی استفاده از آنتی‌اکسیدان اپیژنین بر عملکرد اسپرم مشخص گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۹۹۰۰۰۰۲۱) پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی بود. بدین‌وسیله از همه اساتیدی که به نحوی در پیشبرد این پروژه همکاری داشتند؛ سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از شرکت‌کنندگان در مطالعه تشکر می‌نماییم. بین نویسندگان تضاد منافع وجود ندارد.

References

1. Liu S, Li F. Cryopreservation of single-sperm: where are we today? Reprod Biol Endocrinol. 2020 May;18(1):41. doi: 10.1186/s12958-020-00607-x.

2. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 1949 Oct;164(4172):666. doi: 10.1038/164666a0.

3. Sherman JK. Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. Fertil Steril. 1963 Jan-Feb;14:49-64. doi: 10.1016/s0015-0282(16)34746-x.

4. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. Reprod Fertil Dev. 2003;15(7-8):377-81. doi: 10.1071/RD03007.

5. Ping P, Zhu WB, Zhang XZ, Yao KS, Xu P, Huang YR, et al. Sperm banking for male reproductive preservation: a 6-year retrospective multi-centre study in China. Asian J Androl. 2010 May;12(3):356-62. doi: 10.1038/aja.2010.12.

6. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Reprod Biomed Online. 2018 Sep;37(3):327-39. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.05.012.

7. Bai H, Zhang Y, Tian S, Hu R, Liang Y, Gao J, Wang Y, Wu B. Elamipretide as a potential candidate for relieving cryodamage to human spermatozoa during cryopreservation. Cryobiology. 2020 Aug;95:138-42. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.03.011.

8. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. Reprod Biomed Online. 2010 Oct;21(4):456-62. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.05.011.

9. Chavoshi Nezhad N, Vahabzadeh Z, Allahveisie A, Rahmani K, Raoofi A, Rezaie MJ, et al. The Effect of L-Carnitine and Coenzyme Q10 on the Sperm Motility, DNA Fragmentation, Chromatin Structure and Oxygen Free Radicals During, before and after Freezing in Oligospermia Men. Urol J. 2021 Feb;18(3):330-36. doi: 10.22037/uj.v16i7.6400.

10. Li Z, Lin Q, Liu R, Xiao W, Liu W. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. J Androl. 2010 Sep-Oct;31(5):437-44. doi: 10.2164/jandrol.109.007849.

11. Kalthur G, Raj S, Thiyagarajan A, Kumar S, Kumar P, Adiga SK. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. Fertil Steril. 2011 Mar;95(3):1149-51. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.10.005.

12. Yan X, Qi M, Li P, Zhan Y, Shao H. Apigenin in cancer therapy: anti-cancer effects and mechanisms of action. Cell Biosci. 2017 Oct;7:50. doi: 10.1186/s13578-017-0179-x.

13. Sharma H, Kanwal R, Bhaskaran N, Gupta S. Plant flavone apigenin binds to nucleic acid bases and reduces oxidative DNA damage in prostate epithelial cells. PLoS One. 2014 Mar;9(3):e91588. doi: 10.1371/journal.pone.0091588.

14. Akilah A, Balaha M, Abd-El Rahman MN, Hedya S. Apigenin and Baicalin, Each Alone or in Low Dose Combination, Attenuated Chloroquine Induced Male Infertility in Adult Rats. Thai Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018 Aug;42(3):118-28.

15. Pei Y, Yang L, Wu L, He H, Geng G, Xu D, et al. Combined effect of apigenin and ferulic acid on frozen-thawed boar sperm quality. Anim Sci J. 2018 Jul;89(7):956-65. doi: 10.1111/asj.13009.

16. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. 2021.

17. Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, McLaughlin EA. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. Mol Hum Reprod. 2007 Apr;13(4):203-11. doi: 10.1093/molehr/gal119.

18. Kiani-Esfahani A, Tavalaee M, Deemeh MR, Hamiditabar M, Nasr-Esfahani MH. DHR123: an alternative probe for assessment of ROS in human spermatozoa. Syst Biol Reprod Med. 2012 Jun;58(3):168-74. doi: 10.3109/19396368.2012.681420.

19. Hamilton TRDS, Assumpção MEOD. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. Zygote. 2020 Feb;28(1):1-8. doi: 10.1017/S0967199419000595.

20. Jesse JP, Dhawan V, Dada R. Chromatin Condensation:

Aniline Blue Stain. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp: 142-50.

21. Evenson D. DNA Damage: Sperm Chromatin Structure Assay: Sperm Chromatin Structure Assay Test on its Fortieth Anniversary. In: Agarwal A, Henkel R, Majzoub A, editors. Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction. Cambridge: Cambridge University Press. 2021; pp: 192-201. doi: 10.1017/9781108878715.023.

22. Martinez-Soto JC, de DiosHourcade J, Gutiérrez-Adán A, Landeras JL, Gadea J. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. Asian J Androl. 2010 May;12(3):431-41. doi: 10.1038/aja.2009.92.

23. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum Reprod. 2009 Sep;24(9):2061-70. doi: 10.1093/humrep/dep214.

24. Silvestre MA, Yániz JL, Peña FJ, Santolaria P, Castelló-Ruiz M. Role of Antioxidants in Cooled Liquid Storage of Mammal Spermatozoa. Antioxidants (Basel). 2021 Jul;10(7):1096. doi: 10.3390/antiox10071096.

25. Bahmyari R, Zare M, Sharma R, Agarwal A, Halvaei I. The efficacy of antioxidants in sperm parameters and production of reactive oxygen species levels during the freeze-thaw process: A systematic review and meta-analysis. Andrologia. 2020 Apr;52(3):e13514. doi: 10.1111/and.13514.

26. Zou YJ, Yang J, Chang S, Xu WM, Yin TL, Long W. Acetyl-L-carnitine: An effective antioxidant against cryo-damage on human spermatozoa with asthenospermia. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2017 Dec;37(6):915-21. doi: 10.1007/s11596-017-1827-4.

27. Rossi T, Mazzilli F, Delfino M, Dondero F. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. Cell Tissue Bank. 2001;2(1):9-13. doi: 10.1023/A:1011592621487.

28. Kalthur G, Raj S, Thiyagarajan A, Kumar S, Kumar P, Adiga SK. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. Fertil Steril. 2011 Mar;95(3):1149-51. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.10.005.

29. Mohammadi F, Varanloo N, Heydari Nasrabadi M, Vatannejad A, Amjadi FS, Javedani Masroor M, et al. Supplementation of sperm freezing medium with myoinositol improve human sperm parameters and protects it against DNA fragmentation and apoptosis. Cell Tissue Bank. 2019 Mar;20(1):77-86. doi: 10.1007/s10561-018-9731-0.

30. Najafi L, Halvaei I, Movahedin M. Canthaxanthin protects human sperm parameters during cryopreservation. Andrologia. 2019 Nov;51(10):e13389. doi: 10.1111/and.13389.