فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۷، جلد ۱۵، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۰، صفحه۲۵ تا ۳۶
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

ارزیابی پارامترهای اسپرم انسانی پس از فرآیند انجماد با تیمارآنتی اکسیدان میواینوزیتول در بیماران آستنو تراتوزو اسپرمی

راحیل جنتی فر[۱و۲]،لیلا ناصرپور[۱و۲]، حمید پیروزمنش[۱و۲]
۱-بخش تحقیقات، گروه پژوهشی بیولوژی تولید مثل، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران
۲-بخش فوق تخصصی درمان ناباروری، مرکز جهاد دانشگاهی، قم، ایران. hp457@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۵ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۸/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: میواینوزیتول که یکی از اجزای تشکیل دهنده غشای سلول می‌باشد با خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانتی خود پتانسیل بالایی در خنثی‌سازی آسیب‌های ناشی از انجماد دارد. هدف ازاین مطالعه بررسی اثر آنتی اکسیدان میواینوزیتول همراه با محیط فریز اسپرم بر پارامترهای اسپرمی می‌باشد.

روش کار: نمونه های ۲۰ فرد مبتلا به آستنو تراتوز اسپرمی مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم در سه گروه: کنترل، انجمادی، انجمادی+میواینوزیتول mg/mL ۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. پارامترهای اسپرمی از قبیل: میزان تحرک، مورفولوژی و قابلیت حیات به ترتیب با استفاده از استانداردهای(WHO)، تکنیک رنگ آمیزی پاپانیکولا و ائوزین-نکروزین استفاده شد، برای بررسی تمامیت غشای پلاسمایی از تکنیکتHOST و همچنین برای ارزیابی میزان شکستDNA از تکنیک هالو اسپرم در هر سه گروه استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان داد که انکوباسیون میواینوزیتول با محیط فریز اسپرم(انجماد+میواینوزیتول) موجب افزایش میزان تحرک و قابلیت حیات اسپرم ها می شود(P<۰.۰۵). هم چنین، افزایش معنی داری در میزان حرکت پیشرونده اسپرم پس از انکوباسیون میواینوزیتول با نمونه اسپرم(انجماد+میواینوزیتول)حاصل گردید(P<۰.۰۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انکوباسیون میواینوزیتول با محیط فریز اسپرم موجب کاهش معنی دار میزان آسیب DNA می گردد(P<۰.۰۵). تمامیت غشای پلاسمایی و پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم نیز افزایش معنی داری در گروه انجماد+میواینوزیتول داشت(P<۰.۰۵). این درحالی است که مورفولوژی اسپرم ها تفاوت معنی-داری را نشان نداد(P>۰.۰۵).

نتیجه گیری: نتایج ما نشان می‌دهد که میواینوزیتول می‌تواند اثرات مخرب ناشی از فرآیند انجماد-ذوب را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آستنوتراتوزواسپرمی،آنتی اکسیدان ، میواینوزیتول، انجماد.

مقدمه

فرآیند انجماد اسپرم شامل انکوباسیون اسپرم ها با مواد محافظ انجماد، کاهش دما به زیر صفر درجه سانتی گراد، ذخیره، ذوب و سرانجام حذف ماده محافظ انجماد و بازگشت به حالت طبیعی فیزیولوژیکی است(۳۱). انجماد اسپرم انسان به طور گسترده ای دربرنامه های تلقیح مصنوعی و باروری آزمایشگاهی برای نگهداری اسپرم و افزایش شانس باروری به کار می رود(۱۶). بانک ذخیره فریز اسپرم برای چند هدف مورد استفاده قرار می گیرد: برای مردانی که باروری آن ها به واسطه وازکتومی، درمان با عوامل سیتوتوکسیک یا پرتودرمانی تحت تأثیر قرار گرفته است و یا افرادی که با اسپرم آن ها به واسطه شغلشان در معرض آسیب است(۲۴). در فرآیند فریز، دمای سلول-ها یا کل بافت تا به طور معمول تا ۱۹۶- درجه سانتی گراد کاهش می¬یابد(۱۳). ذخیره سازی طولانی مدت اسپرم از طریق مهار متابولیسم داخل سلولی انجام می شود، در واقع در دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد، به دلیل عدم انرژی

حرارتی کافی جهت واکنش شیمیایی در این دما اساساً هیچ فعالیت بیوشیمیایی رخ نمی دهد است(۳). به علاوه محیط آبی که برای فعالیت های متابولیک سلول ضروری است، وجود ندارد(۳). بنابرین به علت عدم انرژی حرارتی کافی برای واکنش های شیمیایی و فقدان آب کافی که برای فرآیند های متابولیک ضروری است، فعالیت های متابولیکی سلول متوقف می شود(۱۸). بااین حال، ممکن است بافت یا سلول های زنده طی فرایندهای فریز – ذوب دچار آسیب شوند(۲۳). اثرات منفی فریز در عملکرد اسپرم شامل: اختلال در تحرک، حیات، ساختار کروماتین، غشای پلاسمایی اسپرم، توانایی لقاح، رشد و نمو اولیه جنین، لانه گزینی و در نهایت کاهش میزان بارداری می-باشد(۲۱،۲۳). حدود ۶۰ سال است که فرآیند انجماد به عنوان یک روش نگهدارنده از اسپرم برای طولانی مدت مطرح شده است. علی‌رغم تاریخچه طولانی انجماد اسپرم، میزان بقای اسپرم هم‌چنان محدود است و نمی‌تواند انتظارات ایده‌آل را برآورده کند چرا که انجماد با ایجاد آسیب‌های شیمیایی و فیزیکی مانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن(ROS) در اسپرم سبب آسیب به غشای سلول، اختلال در تحرک اسپرم، ایجاد ناهنجاری‌های ریختی، آسیب به آکروزوم، قطعه قطعه شدن DNA و در نتیجه کاهش عملکرد اسپرم می‌شود(۱۶). امروزه تلاش‌های بسیاری در جهت بهبود و بهینه‌سازی تکنیک انجماد صورت گرفته است. یکی از این روش‌ها استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است(۲۲). میواینوزیتول با نام شیمیایی ۱،۲،۳،۴،۵،۶-Hexahydroxycyclohexane ابتدا به عنوان فسفر فراوان در دانه‌های گیاهی و سایر بافت‌های گیاهی به نام فیتیک اسید توصیف شد(۸). اغلب پژوهش-گران پیشین از میواینوزیتول برای بهبود پارامترهای مایع منی حیوانات تحت شرایط انجماد و یا تنها برای بهبود پارامترهای اسپرم تحت شرایط لقاح آزمایشگاهی استفاده کرده اند(۴). Affonso و همکاران در سال ۲۰۱۷ با مقایسه بین آنتی‌اکسیدان های میواینوزیتول، فرولیک اسید و ملاتونین در اسب مشاهده کردند که بعد از فرآیند انجماد-ذوب تحرک اسپرم در گروه تیمار با میواینوزیتول افزایش بیشتری نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌ها نشان داد(۲). هم-چنین Boni و همکارانش در سال ۲۰۱۷ با بررسی چندین آنتی‌اکسیدان از جمله میواینوزیتول با دوز Mm10 بر اسپرم گاو منجمد-ذوب شده به این مهم اشاره کرد که با افزایش زمان انکوبه کردن، میواینوزیتول سبب افزایش تحرک پیش‌رونده اسپرم می‌شود(۷). هدف ازاین مطالعه بررسی اثر آنتی اکسیدان میواینوزیتول بر محیط فریز اسپرم با ارزیابی پارامترهای اسپرمی، تمامیت غشای پلاسمایی، آسیب DNA و پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم می‌باشد. انتظار می‌رود که میواینوزیتول بتواند اثرات مخرب ناشی از استرس اکسیداتیو حاصل از فرآیند انجماد-ذوب را تا حد زیادی کاهش دهد.

مواد و روش ها

جامعه آماری شامل مردان نابارور مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم بود که پس از اعلام رضایت برای شرکت در مطالعه، انتخاب شدند. نمونه اضافی مایع منی ۲۰ فرد(N =۲۰) از بین بیماران مرد نابارور(آستنو تراتوزو اسپرمی) که توسط پزشک متخصص اورولوژیست تأیید شده مطابق استانداردهای سازمان بهداشت جهانی(۲۷)(WHO). پس از انجام اسپرموگرام جمع‌آوری شد. گروه‌ها شامل:گروه کنترل: این گروه فاقد آنتی‌اکسیدان بوده و عمل انجماد بر روی آن‌ها صورت نگرفت وتنها پس از ۳۰ دقیقه ماندن در انکوباتور، پارامترهای مورد نظر اندازه‌گیری شد.گروه انجماد: نمونه‌ها در این گروه، همراه با محیط انجماد به میزان ۱:۱ به مدت یک هفته در تانک نیتروژن مایع منجمد شدند. بعد از انجماد، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب شدند و پس از ذوب بررسی پارامترهای اسپرم انجام شد. گروه انجماد+میواینوزیتول: ابتدا نمونه‌ها

به مدت ۱ ساعت همراه با آنتی‌اکسیدان میواینوزیتول با دوز (کد)mg/mL ۲ انکوبه شد، سپس محیط انجماد با نسبت ۱:۱ اضافه و منجمد شدند و پس از ذوب پارامترها اندازه‌گیری شد.این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه قم مورد بررسی قرار گرفت و طی نامه شماره IR.QOM.REC.1398.006 مورد تصویب کمیته قرار گرفت.

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

بررسی پارمترهای اسپرمی(غلظت، تحرک و مورفولوژی) با استفاده از میکروسکوپ نوری(بزرگنمایی۴۰۰x) و طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت ۲۰۱۰صورت گرفت(۲۷). شمارش اسپرم‌ها بر حسب میلیون بر لیتر توسط لام نئوبار انجام شد. بررسی میزان تحرک اسپرم ها براساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت ۲۰۱۰ اندازه گیری گردید. در گروه بیماران آستنوتراتوزواسپرمی، درصد تحرک کل اسپرم کمتر از ۴۰ درصد بود و مورفولوژی نرمال اسپرم ها کمتر از ۴ درصد می باشد. برای بررسی مورفولوژی طبیعی اسپرم ها از روش رنگ آمیزی پاپانیکولا استفاده شد(۳۳). به منظور بررسی مورفولوژی اسپرم، ابتدا از هر نمونه گسترش تهیه شد. سپس رنگ آمیزی پاپانیکولا صورت گرفت. برای هر نمونه، یک لام فیکس شده از اسپرم تهیه شد. پس از رنگ آمیزی، ۲۰۰ اسپرم توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی۱۰۰ x بررسی گردید. برای تعیین قابلیت حیات اسپرم، براساس دستورالعمل WHO از رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد(۶).

ارزیابی میزان آسیب DNA اسپرم (روش هالواسپرم)

در این روش تقریباً بین ۱۵تا ۲۰ میلیون از نمونه اسپرمی شستشو داده شد و مراحل انجام کار طبق دستورالعمل کیت انجام شد. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگمانتاسیون DNA را با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی نمود. در اسپرم‌های با فراگمانتاسیون DNA، هسته اسپرم با هاله کوچک و بدون هاله و در اسپرم های بدون فراگمانتاسیون DNA، هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط تعیین می‌شود. در این مطالعه به منظور بررسی فراگمانتاسیون DNA، ۲۰۰ سلول شمارش گردید(۱۴).

ارزیابی تمامیت غشا سلول اسپرم (روش Host)

برای انجام این روش ابتدا آماده سازی محلول هایپواسموتیک انجام شد. برای این منظور، ۰/۷۳۵ گرم سیترات سدیم(Sigma, USA) و ۱/۳۵۱ گرم فروکتوز(Sigma, USA) در۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل گردید. محلول حاصل پس از تهیه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت انجام آنالیز، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم به ۱ میلی‌لیتر از محلول هایپواسموتیک اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس با قرار دادن یک قطره از سوسپانسیون سلولی حاصل بر روی لام و پوشاندن آن با لامل ارزیابی میکروسکوپی(بزرگنمایی۴۰۰x) انجام گرفت و تعداد ۱۰۰ اسپرم در هر لام شمارش شد و نتایج به‌صورت درصد اسپرم با غشای پلاسمایی سالم گزارش گردید(۲۹).

ارزیابی پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم

بررسی پتانسیل غشای میتوکندری(Mitochondrial Membrane Potential) با استفاده از رنگ‌آمیزی رودامین(Rho123) و بر اساس دستورالعمل ارائه شده انجام شد(۱۷). در این روش، ابتدا به هر کدام از لوله‌های حاوی سوسپانسیون اسپرم، ۵ میکرولیتر از رنگ رودامین ۱۲۳ با غلظت نهایی mg/ml ۱ اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگه‌داری شد. سپس محلول با دور g ۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد. روی رسوب حاصل یک میلی‌لیتر از محلول Phosphate (PBS) Buffered Saline اضافه، با دور g ۳۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و سپس محلول رویی دور ریخته شد. در مرحله آخر روی رسوب حاصل یک میلی‌لیتر از محلول PBS

اضافه شد. بعد از پیپتاژ چند میکرولیتر از سوسپانسیون روی لام قرار گرفت و بعد از تهیه گسترش، توسط میکروسکوپ فلورسانت مجهز به دوربین(BX51, Olympus, Japan)، با فیلتر مناسب با بزرگنمایی x ۱۰۰۰ تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش و اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندری طبیعی به‌صورت درصد بیان شد. در این روش قطعه میانی اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندری طبیعی به‌صورت رنگ سبز درخشان و قطعه میانی اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندری آسیب دیده به‌صورت غیر درخشان ظاهر شدند.

تحلیل آماری

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار، توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح P<۰.۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج:

ارزیابی پارامترهای اسپرمی

میانگین درصد تحرک کل اسپرم و اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). در گروه انجماد+میواینوزیتول میانگین درصد تحرک کل اسپرم و اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده افزایش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). اما در گروه انجماد+میواینوزیتول افزایش معنی‌داری در میانگین درصد تحرک کل اسپرم و اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد(P<۰.۰۵). میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکت غیر پیش‌رونده در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت(P<۰.۰۰۰۱). حرکت غیر پیش‌رونده در گروه انجماد+میواینوزیتول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). این پارامتر در گروه انجماد+میواینوزیتول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان نداد(P>۰.۰۵)(جدول۱). در گروه انجماد کاهش معنی‌داری در میانگین درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی نرمال نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<۰.۰۰۰۱). مورفولوژی نرمال اسپرم در گروه انجماد+میواینوزیتول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). میزان مورفولوژی نرمال در گروه انجماد+میواینوزیتول خود را به گروه کنترل نزدیک کرد اما این افزایش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود(P>۰.۰۵)(شکل۱، جدول ۱). میانگین درصد اسپرم‌های زنده(قابلیت حیات) در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافت(P<۰.۰۰۰۱). از طرفی قابلیت حیات اسپرم در گروه انجماد+میواینوزیتول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). در گروه انجماد+میواینوزیتول نیز، در میانگین درصد اسپرم‌های زنده، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مطابق شکل ۳-۱، C-B مشاهده شد(P<۰.۰۰۰۱)(جدول۱).

ارزیابی میزان آسیب DNA

در گروه انجماد افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل در میانگین درصد آسیب DNA مشاهده شد(P<۰.۰۰۰۱). میانگین درصد آسیب در گروه انجماد + میواینوزیتول کاهش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). در گروه انجماد + میواینوزیتول نیز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد(P<۰.۰۰۰۱)(نمودار۱، شکل ۲).

ارزیابی تمامیت غشا سلول اسپرم

تمامیت غشای هسته اسپرم(یکپارچگی غشای هسته) در گروه انجماد کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). در گروه انجماد + میواینوزیتول نیز این پارامتر افزایش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). هم چنین در گروه انجماد + میواینوزیتول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل در میزان یک پارچگی غشای هسته اسپرم مشاهده شد(P<۰.۰۰۰۱)(جدول ۲و شکل۳).

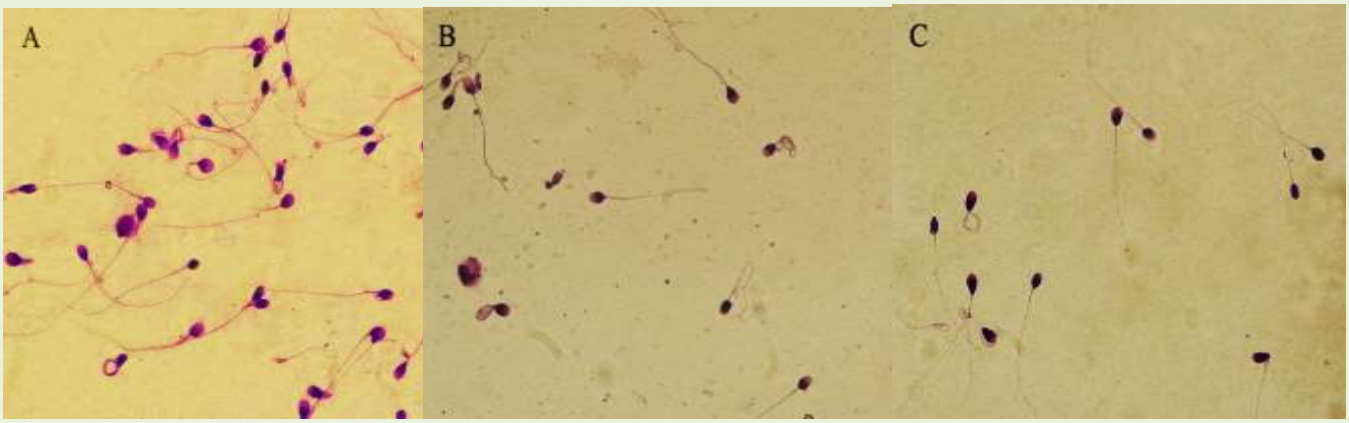
ارزیابی پتانسیل غشا میتوکندری

میانگین درصد پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم در گروه انجماد نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). این درحالی است که پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم در گروه انجماد + میواینوزیتول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد(P<۰.۰۰۰۱). هم چنین میانگین درصد پتانسیل غشای میتوکندری در گروه انجماد + میواینوزیتول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد(P<۰.۰۰۰۱)(جدول۲ و شکل ۴).

جدول ۱-مقایسه میانگین درصد انواع تحرک اسپرم ، مورفولوژی و قابلیت حیات در گروه‌های مختلف بیماران آستنوتراتوزواسپرمی

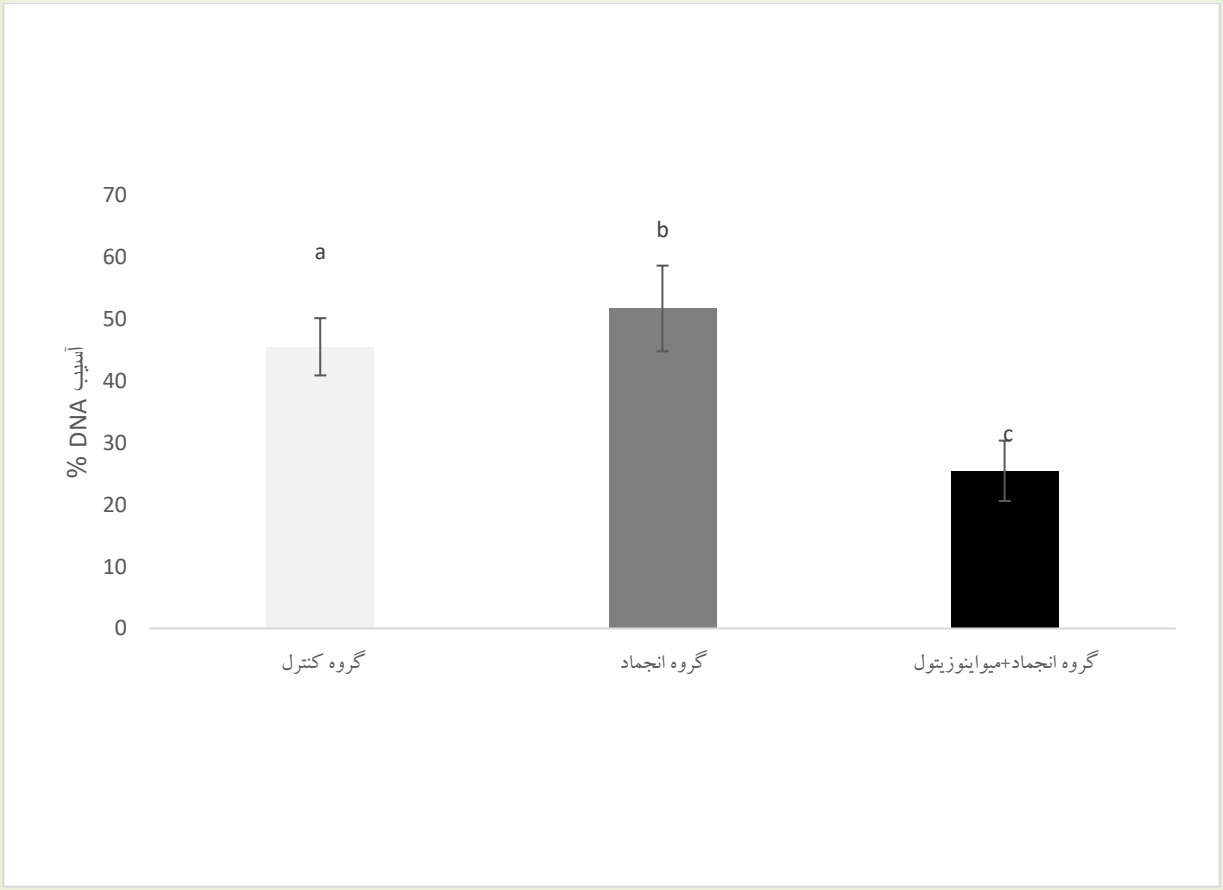
بعد از انجماد و درمان با میواینوزیتول (۲mg/ml). مقادیر به‌صورت Mean ± SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (p<۰/۰۵ و Repeated measure ANOVA).

گروه‌ها	تحرک کل	تحرک پیشرونده	تحرک غیر پیشرونده	مورفولوژی	قابلیت حیات
کنترل	۳۵.۲۵±۵.۴۹^{a}	۱۴.۵۰±۳.۵۹^{a}	۲۰.۷۵±۵.۴۴^{a}	۳.۷۵±۱.۴۴^{a}	۷۷.۷۵±۷.۴۴^{a}
انجماد	۱۸.۰۰±۴.۱۰^{b}	۶.۲۵±۲.۲۲^{b}	۱۱.۷۵±۳.۷۲^{b}	۱.۷۵±۱.۷۲^{b}	۵۰.۷۵±۵.۷۲^{b}
انجماد+میواینوزیتول	۲۷.۲۵±۴.۱۲^{c}	۱۰.۷۵±۳.۳۵^{c}	۱۶.۵۰±۲.۳۵^{c}	۳.۱۰±۱.۳۵^{c}	۶۶±۴.۳۵^{c}



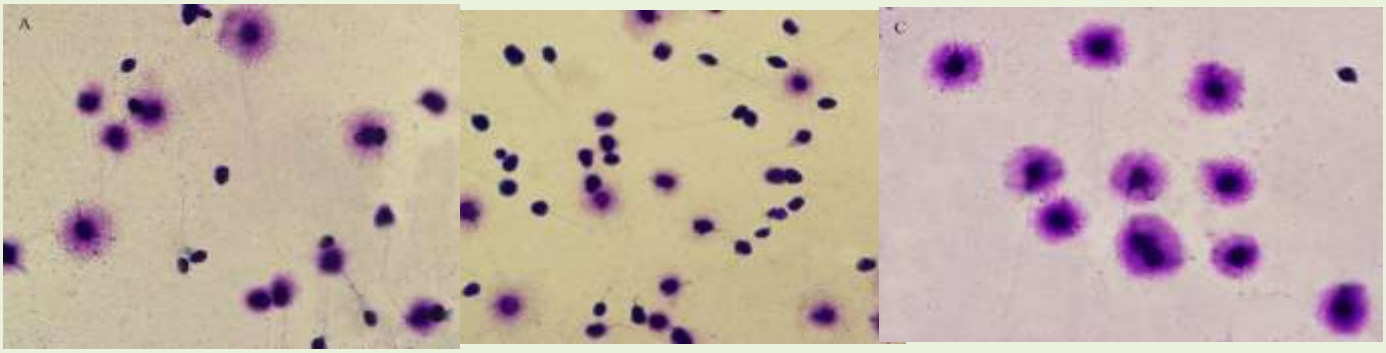
شکل ۱- بررسی مورفولوژیکی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا در گروه‌های مختلف

(بزرگنمایی **1000**×). **A**: گروه کنترل **B**: گروه انجماد **C**: گروه انجماد+آنتی‌اکسیدان



نمودار۱-مقایسه میانگین درصد آسیب DNA اسپرم در گروه‌های مختلف بیماران آستنوتراتوزواسپرمی)

میانگین‌ها با کد حرف‌های مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند



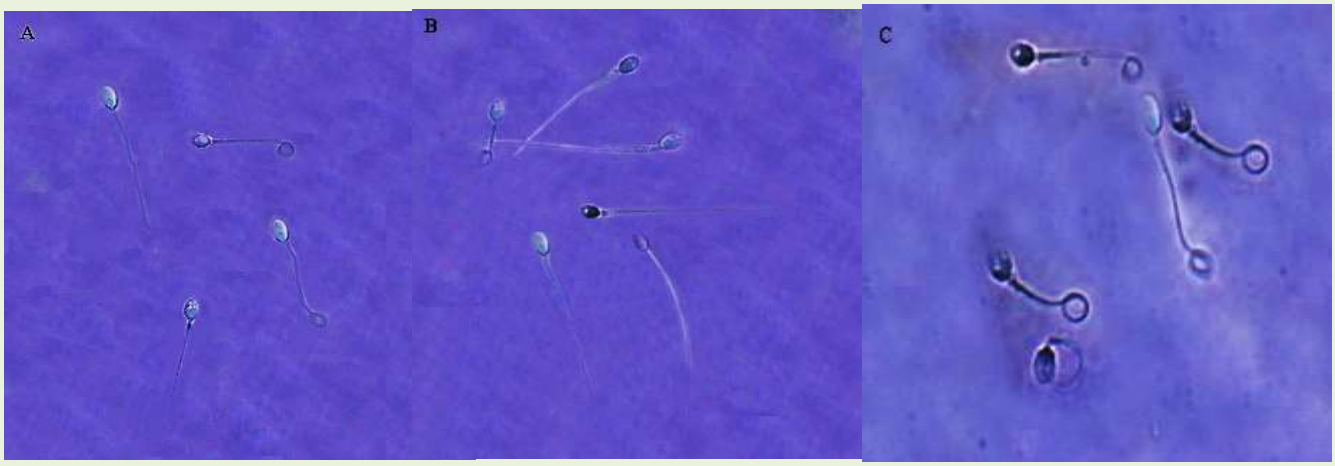
شکل ۲- نمایی از قطعه قطعه شدن DNA بر اساس تشکیل هاله در گروه‌های مختلف (بزرگنمایی ×۱۰۰۰).

A: گروه کنترل B: گروه انجماد C: گروه انجماد+آنتی‌اکسیدانت. هسته اسپرم با هاله بزرگ (بدون قطعه قطعه شدن DNA)، هسته اسپرم با هاله کوچک (دارای قطعه قطعه شدن DNA) و هسته اسپرم بدون هاله (دارای DNA با آسیب شدید).

جدول ۲:-مقایسه میانگین درصد پتانسیل غشای میتوکندری ، تمامیت غشای هسته در گروه‌های مختلف بیماران آستنوتراتوزواسپرمی)

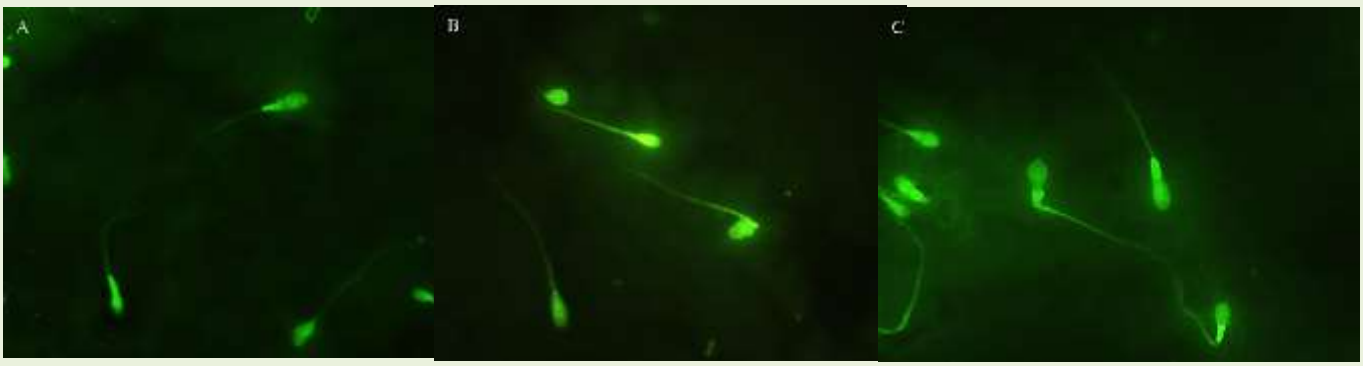
پس از انجماد و درمان با میواینوزیتول (۲mg/ml). مقادیر به‌صورت Mean ± SD می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های مختلف در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($p<0/05$ و Repeated measure ANOVA).

گروه‌ها	تمامیت غشای هسته	پتانسیل غشای میتوکندری
کنترل	19.70 ± 3.67^{a}	67.80 ± 8.45^{a}
انجمادی	15.30 ± 3.37^{b}	60.95 ± 7.03^{b}
انجمادی+میواینوزیتول	25.80 ± 4.14^{c}	75.95 ± 5.92^{c}



شکل۳- بررسی تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم‌های انسان با استفاده از روش تست HOST در گروه‌های مختلف (بزرگنمایی Ob×100).

A: گروه کنترل :B گروه انجماد C: گروه انجماد+آنتی‌اکسیدان. اسپرم با غشای پلاسمایی سالم دارای دم خمیده. اسپرم با غشای پلاسمایی



شکل ٤- سنجش پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم‌های انسان با استفاده از رنگ‌آمیزی رودامین در گروه‌های مختلف بزرگنمایی (1000×):

A . گروه کنترل B: گروه انجماد C: گروه انجماد+آنتی‌اکسیدان. اسپرم سالم واجد قطعه میانی سبز درخشان. اسپرم آسیب دیده، فاقد قطعه میانی سبز درخشان

بحث ونتیجه گیری

تلاش برای قابلیت باروری اسپرم از حدود یک قرن پیش آغاز شده و هم چنان ادامه دارد(۳۴). یافته‌های مطالعات نشان می دهد که در طول روند انجماد-ذوب، به دلیل بروز استرس اکسیداتیو که در نتیجه به هم خوردن تعادل بین میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی مایع منی ایجاد می شود، منجر به کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی مردان می شود(۱۹،۳۰). در مطالعه‌ی حاضر، گروه انجماد کاهش معنی‌داری در تحرک کل، تحرک پیش‌رونده و تحرک غیر پیش‌رونده نسبت به گروه کنترل نشان داد درصورتی‌که گروه درمان با میواینوزیتول افزایش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد. این مطالعه نشان داد که وجود میواینوزیتول در محیط In vitro باعث افزایش کیفیت شاخص‌های اسپرم، پس از انجماد-ذوب می‌گردد. در سال ۲۰۱۷ Saleh و همکاران به اثرات مثبت میواینوزیتول، در فرآیند انجماد اسپرم انسان اشاره کرده است(۳۲). میواینوزیتول یکی از پیش‌سازهای مهم برای مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول است(۱۲). از طرفی اینوزیتول موجود در فسفاتیدیل اینوزیتول به صورت متوالی به polyphosphoinositides, PtdInsP and PtdIns (4,5) P2 تبدیل می‌شود(۱۵). تحت محرک‌های خاص، PtdIns (4,5)P2 برای تولید پیام‌رسان‌های ثانویه: دی‌استیل گلیسرول(DAG) و Ins(1,4,5 P3 هیدرولیز می‌شود که به ترتیب در فسفوریلاسیون پروتئین و تعدیل کلسیم داخل سلولی نقش دارند(۹). بنابراین با ورود کلسیم به داخل غشای فلاژلوم تحرک اسپرم افزایش می یابد(۵). لذا افزودن این ماده به محیط انجماد اسپرم منجربه افزایش و بهبود پارامترهای تحرک می‌گردد. از طرفی اسپرم غنی از میتوکندری است که به‌عنوان یک منبع انرژی برای تحرک اسپرم عمل می‌کند. ROS سبب آسیب به غشای میتوکندری و القای استرس اکسیداتیو در آن می شود(۱۱). استرس اکسیداتیو باعث تخلیه‌ی ATP می‌شود که خود موجب کاهش انرژی در دسترس و هم چنین منجر به کاهش فسفوریلاسیون پروتئین آکسونمال و در نهایت کاهش تحرک اسپرم می‌گردد(۲۰). مطالعه پیش رو نشان داد که میواینوزیتول باعث افزایش پتانسیل غشای میتوکندری می‌شود لذا، در بهبود تحرک اسپرم پس از انجماد-ذوب نقش به‌سزایی را ایفا می‌کند. در تایید نتایج فوق، پژوهش‌هایی که توسط Condorelli و همکارانش بر روی مردان نابارور نورموزواسپرمی و اولیگواستنوتراتوزوسپرمی انجام گرفت، بیان شده است که انکوبه کردن مایع سیمن با میزان دوز ۲ mg/ml میواینوزیتول با افزایش تحرک اسپرم از طریق افزایش و بهبود میزان فعالیت میتوکندریایی همراه می‌باشد(۱۰،۱۱). در مطالعه حاضر در گروه اسپرم همراه با میواینوزیتول در مقایسه با گروه انجماد از لحاظ مورفولوژی طبیعی افزایش معنی داری مشاهده شد. این احتمالاً اثر آنتی‌اکسیدانتی میواینوزیتول را در محافظت از تخریب غشای سلول توسط استرس حاصل از سرما وگرما نشان می‌دهد و درصد مورفولوژی را بهبود می بخشد(۲۸). ارزیابی ما بر روی نمونه‌های اسپرم انسان با دوز ۲ mg/ml میواینوزیتول با اثر بهبودی مورفولوژی مناسب هم‌جهت با دیگر مطالعات بود. در پژوهش ما میواینوزیتول با محافظت از غشای اسپرم، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء ارگانل‌ها و در نهایت جلوگیری از آسیب به DNA، درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها را نسبت به گروه انجماد افزایش داد. در پژوهشی که Condorelli و همکارانش(۱۲) و مطالعه‌ای که Artini و همکارانش(۴) بر روی مردان نورموزواسپرمی و مردان نابارور اولیگو استنو تراتوزو سپرمی انجام دادند، افزایش معنی‌داری را در میزان قابلیت حیات اسپرم پس از انکوبه کردن آن با میواینوزیتول با دوز ۲ mg/ml گزارش کردند.با توجه به تحقیقات اندکی که

در این زمینه صورت گرفته مکانیسم عملکردی برای اثر بخشی میواینوزیتول بر ممانعت از شکست DNA وجود ندارد. با این وجود این احتمال وجود دارد که میواینوزیتول در سنتز DNA از طریق فعال‌سازی کانال‌های کلسیمی و هم چنین فعال‌سازی پروتئین کیناز C نقش دارد(۲۵). در این مطالعه، میانگین درصد آسیب DNA در گروه انجماد + میواینوزیتول کاهش معنی‌داری نسبت به گروه انجماد نشان داد و هم چنین در گروه انجماد + میواینوزیتول کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در مطالعه ما نتایج حاصل از تست HOST نشان می‌دهد که ازنظر این پارامتر بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود دارد و میواینوزیتول می‌تواند یک پارچگی عملکردی غشای دم اسپرم را از طریق تحریک فعالیت پمپ کلسیم با میانجی‌گری cAMP حفظ کند. تاکنون هیچ پژوهشی در رابطه با یک پارچگی غشای اسپرم با استفاده از میواینوزیتول گزارش نشده است. از آن‌جایی که طی انجماد آسیب قابل توجهی به غشای پلاسمایی تحمیل می‌شود میواینوزیتول ممکن است از طریق تحریک فعالیت پمپ کلسیم در غشای پلاسمایی این آسیب‌ها را از طریق میانجی‌گری cAMP جبران کند(۱،۲۶). در این مطالعه که به منظور بررسی اثر میواینوزیتول بر روی مایع منی افراد مبتلا به آستنواسپرمی انجام گرفت به‌دلیل اثرات سوء فرآیند انجماد-ذوب مشخص شد که میواینوزیتول علاوه بر بالا بردن پتانسیل غشای میتوکندری می‌تواند میزان قابلیت حیات را نیز بهبود بخشد. در مطالعه ای که Condorelli و همکارانش بر روی مردان نابارور اولیگو استنو تراتوزو سپرمی انجام دادند، این‌گونه بیان داشتند که انکوبه کردن مایع منی با دوز ۲mg/ml میواینوزیتول به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش بیان MMP در راستای بالا بردن پتانسیل غشای میتوکندری می‌شود(۱۱). نتیجه حاصل از این مطالعه بیان گر آن است که میواینوزیتول به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان بسیار قوی، دفاع مؤثری علیه رادیکال‌های آزاد داشته و سبب افزایش درصد تحرک کل، تحرک پیش‌رونده وتحرک غیر پیش‌رونده اسپرم، حیات سلول، بهبود مورفولوژی، بهبود یک پارچگی غشای اسپرم و هم چنین پتانسیل غشای میتوکندری اسپرم و کاهش DNA پس از فرآیند انجماد-ذوب در افراد آستنوتراتزواسپرمی می‌شود؛ بدین صورت که از اسپرم انسان در برابر آسیب ناشی از واکنش پراکسیداسیون لیپیدی غشا که در محیط های انجمادی اسپرم به وقوع می-پیوندد اثر حفاظتی داشته است؛ بنابراین می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که اضافه کردن، این آنتی‌اکسیدان موجب بهبود عملکرد اسپرم شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل از طرح جامع تحقیقاتی تصویب شده از سوی سازمان جهاد دانشگاهی واحد استان قم بود.بنابرین ازمسؤولین مربوطه تشکر به عمل می آید.

منابع

1. Abdolsamadi, M., Mohammadi, F., Nashtaei, MS., Teimouri, M., Sardar, R., Dayani, M. (2020). Does myoinositol supplement improve sperm parameters and DNA integrity in patients with oligoasthenoteratozoospermia after the freezing–thawing process? Cell Tissue Bank, 21(1); 99-106.

2.Affonso, FJ., Carvalho, HF., Lançoni, R., Lemes, KM., Leite, TG., Oliveira, LZ. (2017). Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. J. Equine Vet.erinary Sci, 59; 57-63.

3.Anger, JT., Gilbert, BR., Goldstein, M. (2003). Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. J. urol. 170(4); 1079-84.

4.Artini, PG., Casarosa, E., Carletti, E., Monteleone, P., Di Noia, A., Di Berardino, O. (2017). In vitro effect of myo-inositol on sperm motility in normal and oligoasthenospermia patients undergoing in vitro fertilization. Gynecol. Endocrinol, 33(2);109-12.

5.Barbagallo, F., La Vignera, S., Cannarella, R., Aversa, A., Calogero, AE., Condorelli, RA.

(2020). Evaluation of sperm mitochondrial function: a key organelle for sperm motility. J. Clin. Med, 9(2); 363.
6.Björndahl, L., Söderlund, I., Johansson, S., Mohammadieh, M., Pourian, MR., Kvist, U. (2004).Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. J. Androl, 25(5); 671-8.
7.Boni, R., Gallo, A., Cecchini, S. (2017). Kinetic activity, membrane mitochondrial potential, lipid peroxidation, intracellular pH and calcium of frozen/thawed bovine spermatozoa treated with metabolic enhancers. Andrology, 5(1); 133-45.
8.Chen, S-J., Gan, L., Guo, Y-C., Tian, L-X., Liu, Y-J. (2020). Changes in growth performance, aflatoxin B1 residues, immune response and antioxidant status of Litopenaeus vannamei fed with AFB1-contaminated diets and the regulating effect of dietary myo-inositol supplementation. Food Chem, 324;126888.
9.Chhetri, DR. (2019). Myo-Inositol and its derivatives: Their emerging role in the treatment of human diseases. Frontiers in Pharmacology, 10; 1172.
10. Condorelli, R., La Vignera, S., Di Bari, F., Unfer, V., Calogero, A. (2011). Effects of myoinositol on sperm mitochondrial function in-vitro. Eur Rev Med Pharmacol Sci., 15(2);129-34.
11. Condorelli, RA., Barbagallo, F., Calogero, AE., Cannarella, R., Crafa, A., La Vignera, S. (2020). D-chiro-inositol improves sperm mitochondrial membrane potential: in vitro evidence. J. Clin. Med., 9(5);1373.
12. Condorelli, RA., La Vignera, S., Bellanca, S., Vicari, E., Calogero, AE. (2012). Myoinositol: does it improve sperm mitochondrial function and sperm motility? Urology, 79(6); 1290-5.
13. Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. Adv Urol, 2012; 854837.
14. Fernández, JL., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil. Steril, 84(4); 833-42.
15. Gillaspy, GE. (2011). The cellular language of myo-inositol signaling. New Phytologist, 192(4); 823-39.
16. Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, HM., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Reprod. Biomed. Online, 37(3);327-39.
17. Hoornstra, D., Andersson, MA., Johansson, T., Pirhonen, T., Hatakka, M., Salkinoja-Salonen, MS. (2004). Mitochondrial toxicity detected in a health product with a boar spermatozoan bioassay. ATLA, 32(4);407-16.
18. Justice, T., Christensen, G. (2013). Sperm cryopreservation methods. Spermatogenesis: Springer, p. 209-15.
19. Kumar, A., Prasad, J., Srivastava, N., Ghosh, S. (2019). Strategies to minimize various stress-related freeze–thaw damages during conventional cryopreservation of mammalian spermatozoa. Biopreservation and Biobanking, 17(6); 603-12.
20. Kurkowska, W., Bogacz, A., Janiszewska, M., Gabryś, E., Tiszler, M., Bellanti, F. (2020). Oxidative Stress is Associated with Reduced Sperm Motility in Normal Semen. AJMH, 14(5);1557988320939731.
21. Li, Y-x., Zhou, L., Lv, M-q., Ge, P., Liu, Y-C., Zhou, D-x. (2019). Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. Eur.J.Obstet.Gynecol, 233;84-92.
22. Majzoub, A., Agarwal, A. (2020). Antioxidants in sperm cryopreservation. Male Infertility: Springer; p. 671-8.
23. Martins, AD., Agarwal, A., Henkel, R. (2019). Sperm cryopreservation. In vitro fertilization: Springer; p. 625-42.
24. Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology, 57(1);327-44.
25. Mohammadi, F., Varanloo, N., Nasrabadi, MH., Vatannejad, A., Amjadi, F., Masroor, MJ. (2019). Supplementation of sperm freezing medium with myoinositol improve human sperm parameters and protects it against DNA fragmentation and apoptosis. Cell Tissue Bank, 20; 86-177.
26. Montanino Oliva, M., Minutolo, E., Lippa, A., Iaconianni, P., Vaiarelli, A. (2016). Effect of myoinositol and antioxidants on sperm quality in men with metabolic syndrome. Int. J.Endocrinol, 2016.
27. Organization, WH. (2010). World health statistics 2010: World Health Organization; 2010.

28.Palmieri, M., Papale, P., Della Ragione, A., Quaranta, G., Russo, G., Russo, S. (2016). In vitro antioxidant treatment of semen samples in assisted reproductive technology: effects of myo-inositol on nemaspermic parameters. Int. J.Endocrinol, 2016.

29. Perez-Llano, B., Lorenzo, J., Yenes, P., Trejo, A., Garcia-Casado, P. (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. Theriogenology, 56(3);387-98.

30. Perros, C. (2017). Oxidative stress challenges during the sperm cryopreservation in dogs. Journal of Veterinary Andrology, 2(1);1-7.

31. Rahiminia, T., Hosseini, A., Anvari, M., Ghasemi-Esmailabad, S., Talebi, AR. (2017). Modern human sperm freezing: effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. Taiwan. J.Obstet Gynecol, 56(4);472-6.

32.Saleh, R., Assaf, H., Abd El Maged, W., Fawzy, M., Elsuity, M. (2017). Positive effects of in-vitro Myo-inositol supplementation of cryopreserved human sperm on the outcome of cryopreservation: a randomized controlled trial. Fertil. Steril, 108(3);e309.

33. Singh, S., Sharma, S., Jain, M., Chauhan, R. (2011). Importance of papanicolaou staining for sperm morphologic analysis: comparison with an automated sperm quality analyzer. Am. J. Clin. Pathol, 136(2); 247-51.

34. Vander Borght, M., Wyns, C. (2018). Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clin.Biochem, 62; 2-10.

Evaluation of Human Sperm Parameters after Cryopreservation Process with Myoinositol Antioxidant Treatment in Asthenoteratozoospermia Patients

R. Jannatifar [1, 2], L. Naserpoor [1, 2], **H. Piroozmanesh [1, 2]**

1.Department of Reproductive Biology, the Academic Center for Education, Culture and Research, Qom branch, Iran.

2.Fertility and infertility center, Academic Center for Education, Culture, and Research (ACECR), Qom branch, Iran.**hp457@yahoo.com**

Received:2021.27.9 **Accepted: 2021.13.11**

Abstract

Inroduction & Objective: Myoinositol, which is one of the components of cell membranes with its strong antioxidant properties, has a high potential to neutralize the damage caused by freezing. The aim of this study was to evaluate the effect of Myoinositol antioxidant on sperm sperm parameters after cryopreservation process

Material and Methods: Samples of 20 patients with asthenotratospermia referred to Qom University Jihad Infertility Treatment Center were evaluated in three groups: before cryopreservation (control), cryopreservation, cryopreservation + myoinositol. The Sperm parameters such as motility, morphology, and viability were assessed using WHO, Papanicolaou, and eosin-necrosin staining, respectively, to evaluate the integrity of the plasma membrane using the HOST technique, as well as to evaluate the degree of DNA fracture by the Halo sperm technique.

Results: The results showed that incubation of myoinositol with freezing medium of sperm (cryopreservation + myoinositol) increases sperm motility and viability (P <0.05). Also, a significant increase in sperm motility was achieved after incubation of myoinositol with sperm sample (cryopreservation + myoinositol) (P <0.05). The results of the present study showed that incubation of myoinositol with freezing medium of sperm significantly reduces the amount of DNA damage (P <0.05). Plasma membrane integrity and sperm mitochondrial membrane potential also increased significantly in cryopreservation + myoinositol group (P <0.05). However, sperm morphology did not show a significant difference (P <0.05).

Conclusion: Our results show that my inositol can reduce the destructive effects of the freeze-thaw process.

Keywords: Asthenoteratozoospermia, Antioxidant, Myoinositol, Cryopreservation.