Archive of SID

Sarem Journal of Reproductive Medicine. Volume 5, Issue 1, Spring 2020: 10-17

Protective effect of zinc oxide nanoparticles on sperm parameters after freezing

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Elnaz Ashtari [1], MSc
Fatemeh Siadat [2], MD*
Niloofar Sodeifi [3], MD
Sajjad Atashparvar [4], MSc

[1] MSc of cell and developmental biology, Department of Biology, College of Basic Science, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Assistant Professor of cell and developmental biology, Department of Biology, College of Basic Science, Islamic Azad University, Garmsar Branch, Garmsar, Iran. Department of Biology, College of Basic Science, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3] Research Assistant Professor of Pathology, Department of Pathology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran.
[4] MSc of Medical Microbiology, Department of Medical Microbiology, Shahed University, and Tehran, Iran.

Corresponding Author
Address: Daneshjoo St., University Square, Islamic Azad University, Garmsar Branch, Garmsar, Iran.Tehran, Iran.
Phone: +98 9125239489 & +98 2334205009
Fsiadat2003@yahoo.com

Article History
Received: April 25, 2020
Accepted: May 27, 2020
e Published: January 13, 2021

ABSTRACT

Aims: Sperm freezing is most usable of method for the protection of reproductive performance in men who undergo gonadotoxic therapy such as chemotherapy or radiation treatment, or for the treatment of diseases such as infertility, autoimmune diseases and/or diabetes. Zinc oxide (ZnO) nanoparticle has potent anticancer and antioxidant effects. The purpose of this study was to evaluate the protective effects of various concentrations of this nanoparticle on sperm freezing.
Methods: sixteen semen samples of normal human referred to Royan Center, were evaluated in 8 Fresh and Freeze and control groups. Groups included: Three fresh experimental groups were only exposed to ZnO nanoparticle with concentrations of 40, 80 and 100 ppm and were analyzed half an hour later. Three freezing experimental groups were frozen after included concentrations of ZnO nanoparticle and thawed and analyzed half an hour later. Two control groups including control 1: were analyzed half an hour after exposure in culture and control 2: half an hour after freezing were thawed and analyzed. Count, morphology, motility, viability and PH of sperm were evaluated.
Findings: The results showed that 100 ppm concentration of ZnO nanoparticle had the best protective effect on sperm pH, survival, and motility in freezing process.

Conclusion: ZnO nanoparticle at a concentration of 100 ppm can maintain pH, motility and survival of sperm in the freezing process.

Keywords: ZnO nanoparticles; Sperm parameters; Human semen fluid; Sperm freezing.

Copyright© 2021, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License which permits Share (copy and distribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-Noncommercial terms.

www.SID.ir

Downloaded from saremjrm.com at 13:19 +0430 on Sunday August 1st 2021

Archive of SID

Downloaded from saremjrm.com at 13:19 +0430 on Sunday August 1st 2021

اثر محافظتی نانو ذره اکسید روی بر پارامترهای اسپرمی پس از انجماد

الناز اشتری[۱]، سیده فاطمه سیادت[۲]*، نیلوفر سدیفی[۳]، سجاد آتش پرور[۴]

[۱] کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

[۲] استادیار زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران.

[۳] دکتری تخصصی آسیب شناسی تشریحی، گروه ناباروری مردان، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

[۴] کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

چکیده

اهداف: انجماد اسپرم پرکاربردترین روش برای محافظت عملکرد تولید مثلی در مردانی است که درمان گونادوتوکسیک مانند شیمی درمانی یا پرتو درمانی را متحمل می شوند و یا تحت درمان برای بیماری هایی نظیر ناباروری، بیماری های خود ایمنی و یا دیابت هستند. نانو ذره ی اکسید روی (ZnO) دارای اثرات ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی قوی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات حفاظتی غلظت های مختلف این نانوذره در انجماد اسپرم می باشد.

روش ها: تعداد ۱۶ نمونه مایع منی افراد نرمال مراجعه کننده به مرکز رویان در ۸ گروه کنترل، فریز و تازه مورد ارزیابی قرار گرفتند. گروه ها شامل: سه گروه آزمایشی تازه فقط تحت تاثیر نانوذره ی اکسید روی با غلظت های ppm ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ و نیم ساعت بعد آنالیز شدند. سه گروه آزمایشی انجمادی بعد از اضافه کردن غلظت های مذکور نانو ذره اکسید روی، منجمد و نیم ساعت بعد از آن، ذوب و مورد آنالیز قرار گرفتند. دو گروه کنترل شامل کنترل ۱: نیم ساعت بعد از قرار گیری در محیط آنالیز شدند و کنترل ۲: نیم ساعت بعد از انجماد، ذوب و آنالیز گردیدند. تعداد، مورفولوژی، تحرک، زنده مانی و pH اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: ارزیابی ها نشان داد غلظت ppm ۱۰۰ از نانو ذره اکسید روی بهترین اثر حفاظتی را بر pH، زنده مانی و تحرک اسپرم در فرآیند انجماد داشت.

نتیجه‌گیری: نانو ذره اکسید روی در غلظت ppm ۱۰۰ می تواند باعث حفظ نسبی pH، تحرک و زنده مانی اسپرم در فرآیند انجماد گردد.

کلید واژه‌ها: نانوذره اکسید روی؛ پارامترهای اسپرمی؛ مایع منی انسان؛ انجماد اسپرم.

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۰۷

*نویسنده مسئول: سیده فاطمه سیادت

مقدمه

طبق تعریف سازمان جهانی بهداشت، ناباروری عدم توانایی زوجین در بارداری بعد از یک سال آمیزش بدون پیشگیری است. ناباروری یکی از شایع‌ترین مشکلات در جهان است که در حدود ۱۵ درصد زوج‌ها دیده می‌شود. بسته به جنسیت عوامل مختلفی می‌تواند در بروز ناباروری نقش داشته باشد [۱]. در ۵۰ درصد موارد ناباروری، علل مردانه و مشکلات اسپرم وجود دارد که به اختصار شامل؛ غیر طبیعی بودن مادرزادی یا اکتسابی سیستم اداری تناسلی، بدخیمی‌ها، عفونت های اوروژنیتال، افزایش حرارت اسکروتوم (مثلاً واریکوسل)، اختلال غدد درون‌ریز، ناهنجاری‌های ژنتیک و علل ایمونولوژیک هستند. البته در ۳۰ تا ۴۰ درصد مردان نابارور دلیل مشخصی وجود ندارد (ایدیوپاتیک) که گفته می شود شاید علل مختلفی مثل آلودگی محیط زیست، رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)، ناهنجاری‌های ژنتیک و اپی ژنتیک در این زمینه دخیل باشند [۲].

انجماد اسپرم با هدف حفظ باروری در افراد جوان مبتلا به سرطان و کاندید پرتودرمانی، شیمی درمانی و افراد داوطلب وازکتومی و یا هر فرد متقاضی خدمت انجام می گیرد. در این فرآیند، نگهداری اسپرم‌های گرفته شده از اپیدیدیم افراد آزواسپرم به مدت نامحدود برای استفاده بعدی در روش‌های کمک باروری (ART) انجام می‌شود [۳]. مکانیسم انجماد بر این پایه استوار است که هرگاه آب موجود در سلول در اثر کاهش دما به یخ تبدیل گردد و بدون آسیب به سلول به طور موثر حرکت مولکولی را متوقف کند، فرآیندهای بیوشیمیایی سلول به تعویق افتاده و یا متوقف می‌شود و در نتیجه بقای سلول افزایش می‌یابد [۴]. با توجه به این که روند انجماد سبب کاهش ظرفیت باروری اسپرم‌ها از طریق تولید گونه های فعال اکسیژن و آسیب به غشا سلولی، تحرک اسپرم‌ها، کروموزوم ها و DNA و تغییر در مورفولوژی و درستی ساختار و عملکرد طبیعی اسپرم می‌گردد، استفاده از محیط های فریز، برای جلوگیری تقریبی از این آسیب ها در روند انجماد ضروری به نظر می رسد. مواد مشترک بین محیط‌های فریز اسپرم، آلبومین و گلیسرول است [۵،۶].

www.SID.ir

Downloaded from saremjrm.com at 13:19 +0430 on Sunday August 1st 2021

نانو ذره اکسید روی به عنوان نانو ذره غیرآلی جزء پرکاربردترین ترکیبات تولیدی در زمینه‌های گوناگون به خصوص زیستی ـ پزشکی است. اکسید روی (ZnO) ترکیبی غیرمعدنی و پودر سفید رنگی که در آب حل نمی‌شود. ثابت شده است که این نانو ذره در محیط خارج سلولی با افزایش آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می‌تواند در برابر استرس اکسیداتیو اثر محافظتی داشته باشد [۷،۸]. اندازه ی کوچک و مساحت سطحی بالای نانوذرات سبب افزایش فعالیت شیمیایی آن ها شده و به آن ها اجازه می دهد که به عنوان یک کاتالیست با کارایی بالا عمل نمایند. برخی تحقیقات نشان دادند که عنصر روی برای عملکرد طبیعی محور گنادی هیپوتالاموس-هیپوفیزی نیاز است و نقش مهمی در پتانسیل تولید مثلی مردان دارد [۹،۱۰]. مهم ترین تغییرات آندروژنیکی بدن مربوط به حساسیت نسبت به کمبود این عنصر است و کاهش آن، اثر منفی بر غلظت تستوسترون سرم دارد [۱۱]. مطالعات بالینی در مردان بالغی که عنصر روی در مایع منی آن ها موجود نیست یا سطح پایینی را به خود اختصاص می دهد، اختلال در سنتز تستوسترون در سلول های لیدیگ را نشان داد زیرا این عنصر نقش اصلی در آنزیم آلفا-۵ ردوکتاز برای تبدیل به تستوسترون دارد و در طولانی مدت سلامت جنسی فرد را تحت تاثیر قرار می دهد [۱۲]. مقدار بیشتر روی در پروستات و میزان کمتر آن در غده سمینال وزیکول منشاء می گیرد. تحقیقات نشان می دهد آلبومین و روی از پروستات ترشح شده و سبب حفاظت اسپرم و سایر سلول ها می گردند. عنصر روی در مایع پلاسمای منی موجود بوده و عملکرد آن تا حدی ناشناخته است [۱۳]. این عنصر نقش مهمی بر فیزیولوژی اسپرم دارد. شواهدی در دست است که کمبود روی سبب شکست های اولیه DNA اسپرم در بیضه از جمله نقص در عملکرد گیرنده هورمون لوتئینی، کاهش سنتز استروئید، آسیب و مرگ سلول های لیدیگ در اثر تولید گونه های فعال اکسیژن می شود [۱۴-۱۶]. بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی اثر محافظتی نانو ذره اکسید روی بر پارامترهای اسپرمی پس از انجماد می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از نمونه مایع منی ۱۶ فرد نرمال مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان استفاده گردید. نمونه ها پس از ارزیابی اولیه با تعداد ۷۰ الی ۱۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر و تحرک ۷۵ الی۱۰۰ درصد انتخاب گردیدند. انواع تحرک شامل رده بندی های A، B، C و D که با نرم افزار CASA اندازه گیری شدند. سپس، پارامترهای دیگر از قبیل: زنده مانی (Vitality) به روش رنگ آمیزی ائوزین، pH با کاغذ pH سنج، شمارش اسپرم با لام نئوبار و فیکساتور تریپان بلو و مورفولوژی با رنگ آمیزی پاپانیکولا انجام شد.

هر نمونه مایع منی به ۸ قسمت به شرح زیر تقسیم شد:

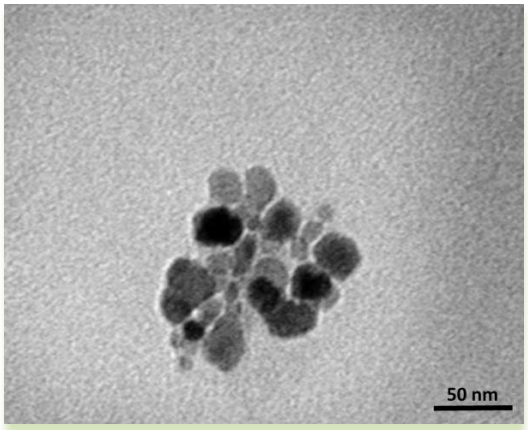
- کنترل ۱: مایع منی نیم ساعت پس از قرار گیری در محیط، آنالیز گردید.
- کنترل ۲: مایع منی نیم ساعت منجمد و سپس ذوب و آنالیز شد.
- گروه آزمایشی تازه ۳: مایع منی تحت تاثیر غلظت ppm ۴۰ از نانو ذره ی اکسید روی قرار گرفت.
- گروه آزمایشی تازه ۴: مایع منی تحت تاثیر غلظت ppm ۸۰ از نانو ذره ی اکسید روی قرار گرفت.
- گروه آزمایشی تازه ۵: مایع منی تحت تاثیر غلظت ppm ۱۰۰ از نانو ذره ی اکسید روی قرار گرفت.
- گروه آزمایشی انجمادی ۶: مایع منی تحت تاثیر غلظت ppm ۴۰ از نانو ذره ی اکسید روی قرار گرفت و سپس منجمد گردید.
- گروه آزمایشی انجمادی ۷: گروهی که مایع منی تحت تاثیر غلظت ppm ۸۰ از نانو ذره ی اکسید روی قرار گرفت و سپس منجمد شد.
- گروه آزمایشی انجمادی ۸: گروهی که مایع منی تحت تاثیر غلظت ppm ۱۰۰ از نانو ذره ی اکسید روی قرار گرفت و سپس منجمد گردید.

در تمامی گروه ها نیم ساعت بعد از انجماد یا اضافه کردن نانو ذره، آنالیز انجام شد.

نانوذره ی اکسید روی به صورت کلوئید در اندازه ی ۲۵ نانومتر (شرکت نانوزینو، ایران) مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). در این پژوهش از محیط فریز (Ferti pro، کشور بلژیک) که حاوی گلیسرول، HEPES و ماکرو مولکول هایی از جمله ساکروز و HSA است، استفاده گردید. برای استفاده از محیط فریز نسبت ۱ به ۰،۷ استفاده شد یعنی یک میلی لیتر مایع منی بایستی ۰،۷ میلی لیتر محیط فریز اضافه شود. به منظور انجام انجماد، محیط فریز اسپرم از یخچال خارج و مقدار مورد نیاز با سرنگ انسولین برداشته شد. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت تا هم دمای محیط شود، سپس قطره قطره به نمونه‌های داخل کرایوتیوپ‌ها اضافه، جهت همگن سازی تکان داده شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شدند، بعد از آن به مدت ۱۵ دقیقه روی بخار نیتروژن قرار گرفتند. سپس وارد نیتروژن مایع شده و به مدت نیم ساعت به حالت انجماد در آمدند.

www.SID.ir

Downloaded from saremjrm.com at 13:19 +0430 on Sunday August 1st 2021



شکل ۱: ساختار تجمع یافته از نانو ذرات اکسید روی در قطر۱۰± ۲۵ نانومتر که با میکروسکوپ الکترونی **TEM** مدل **PHILIPS**، **EM208 s** ، **kv۱۰۰** جهت تعیین قطر نانو ذره در شرکت پرتو رایان رستاک گرفته شد.

روش بررسی زنده مانی اسپرم ها

ابتدا با استفاده از سمپلر، مقدار ۵۰ لاندا از نمونه منی به همراه مقدار ۵۰ لاندا رنگ ائوزین برداشته به نسبت ۱ به ۱ در لوله آزمایش ریخته و به منظور همگن سازی برای ۱۰ ثانیه بر روی شیکر، شیک و همگن گردید. سپس، مقدار ۱۰ لاندا از نمونه همگن بر روی لام شیشه‌ای به همراه لامل قرار داده و با استفاده از میکروسکوپ نوری دو چشمی و بزرگنمایی ۴۰ مشاهده شد و شمارش اسپرم‌ها با کانتر ثبت گردید. اسپرم هایی که به رنگ صورتی دیده شدند سلول های مرده و اسپرم هایی که به رنگ سفید دیده شدند، زنده بودند. در هر نمونه، تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم های زنده و مرده ثبت گردیدند.

روش شمارش اسپرم ها با لام نئوبار

برای شمارش، اسپرم ها را باید فیکس کرد زیرا در صورتی که حرکت داشته باشند دائما از مربع ها خارج شده و یا وارد آن می شوند و باعث خطا در شمارش می گردند. برای این کار، ۵۰ گرم بیکربنات سدیم ($NaHCO_3$) و ۱۰ میلی لیتر فرمالین ۳۷ درصد در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شدند و جهت مشخص کردن سر اسپرم ها، مقدار ۰،۲۵ گرم از تریپان بلو به محلول فیکس کننده ی فوق اضافه گردیدند. رقت مورد نیاز (dilution factor) برای اندازه گیری دقیق تعداد اسپرم در نظر گرفته شد و با یک نسبت مشخص با نمونه ی اسپرم ترکیب و مقدار ۱۰ لاندا در هر طرف از لام نئوبار قرار داده شد [۱]. طبق فرمول زیر شمارش انجام گردید:

- C = تعداد اسپرم ها در هر میلی لیتر مایع منی
- N = تعداد کل اسپرم های شمارش شده در دو طرف لام نئوبار
- n = تعداد کل ردیف های شمارش شده ی اسپرم ها در دو طرف لام نئوبار
- ۱/۲۰ = حجم هر یک از خانه های ۴، ۵ و ۶ لام نئوبار برابر با ۲۰ نانولیتر

$$C = (N/n) \times (1/20) \times \text{dilution factor} \times 10^6$$

روش بررسی pH

در این تحقیق برای ارزیابی pH، قبل از اضافه کردن نانو ذره به مایع منی یک قطره از مایع بر کاغذ pH سنج گذاشته و با مشاهده ی قلیایی یا اسیدی بودن آن، pH ثبت گردید (بررسی پس از مایع شدگی). همچنین، در مرحله ی بعد از اضافه کردن نانو ذره به مایع منی و پس از فرآیند فریز به همین روش pH ثبت شد [۱].

روش رنگ آمیزی پاپانیکولا

ابتدا مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایع منی بر روی لام قرار داده شده و گستره تهیه گردید. سپس در انکوباتور گذاشته تا زمانی که مایع منی بر روی لام خشک شود. پس از آماده شدن لام ها مراحل رنگ آمیزی انجام گرفت [۱]. سپس لام‌ها در محیط یا انکوباتور گذاشته تا خشک شوند و با بزرگنمایی ۱۰۰۰× مورفولوژی را (استفاده از روغن ایمرسیون) بررسی شد.

روش بررسی تحرک

در این پژوهش برای بررسی تحرک اسپرم ابتدا از روش چشمی با میکروسکوپ و سپس از سیستم CASA استفاده شد. ابتدا مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه ی منی بر روی لام قرار داده شد. بعد از قرار دادن لامل روی آن، در زیر میکروسکوپ متصل به کامپیوتر قرار داده شد و با نرم‌افزار CASA و بزرگ نمایی ۲۰× تحرک اسپرم‌ها به طور دقیق تفکیک و ثبت گردید. همچنین، برای بررسی مجدد در روش چشمی، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه مایع منی بر لام گذاشته و با میکروسکوپ و بزرگنمایی ۴۰× مقاطع مختلف شد.

تجزیه و تحلیل آماری

اطلاعات به دست آمده از نمونه ها به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ و از روش مقایسه میانگین و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) ارزیابی گردید. با استفاده از آزمون T معنی دار بودن اختلاف بین گروه ها اندازه گیری شد. مقیاس $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

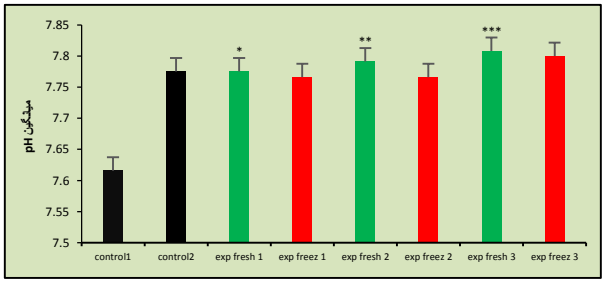
www.SID.ir

Archive of SID

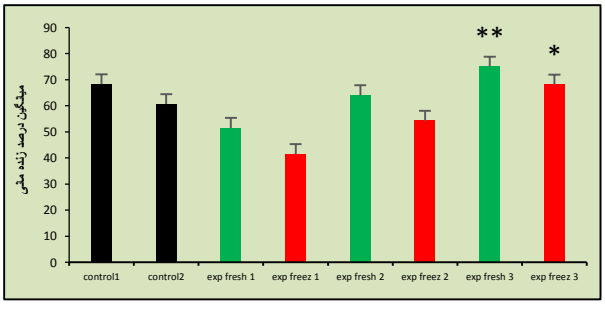
Downloaded from saremjrm.com at 13:19 +0430 on Sunday August 1st 2021

یافته ها

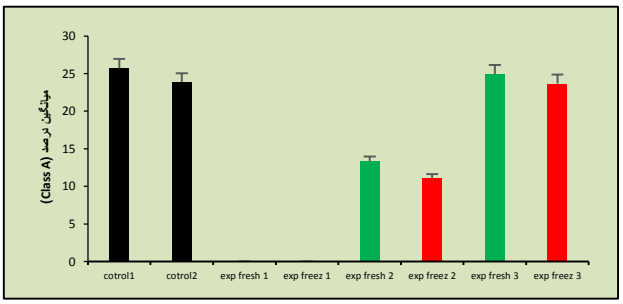
نتایج نشان داده شد که در گروه های مختلف، افزایش pH و همچنین اختلاف معنی دار بین گروه های دریافتی نانو ذره و گروه کنترل ۱ دیده شد. در گروه های آزمایشی انجمادی در مقایسه با گروه کنترل ۲، pH نمونه ها با اختلاف کم حفظ شد و در گروه آزمایشی انجمادی ۳ افزایش pH نسبت به گروه کنترل ۲ دیده شد اما معنی دار نبود (نمودار ۱). در ارتباط با پارامتر زنده مانی، نتایج حاکی از افزایش زنده مانی در گروه های دریافتی ppm ۱۰۰ از نانو ذره نسبت به هر دو گروه کنترل بود و از لحاظ آماری اختلاف معنی داری در این گروه ها مشاهده گردید (نمودار ۲). در مورد انواع تحرک، در حرکت از نوع پیشرونده رده A-B هیچ تغییراتی حاصل نشد و پارامتر ها نسبت به گروه کنترل دچار افت شدند، ولی در حرکت رده ی C، افت این نوع حرکت نسبت به گروه کنترل در غلظت دریافتی ppm ۱۰۰ کمتر دیده شد. در نتیجه، تعداد اسپرم های بدون تحرک در غلظت دریافتی ppm ۱۰۰ از نانو ذره اکسید روی نسبت به گروه کنترل کمتر و از نظر آماری معنی دار گزارش شد (نمودار های ۳ تا ۶).



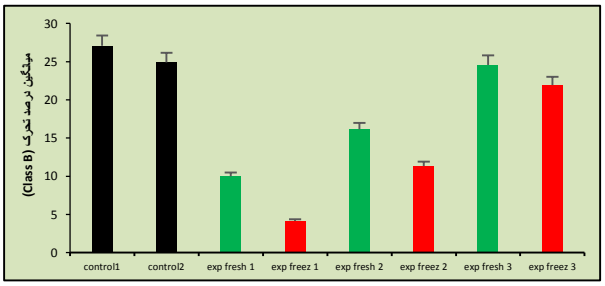
نمودار ۱: مقایسه ی **pH** در گروه های مختلف ۳۰ دقیقه بعد از فریز و ۳۰ دقیقه حضور در محیط. *دارای اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل به ازای P<۰/۰ ۵



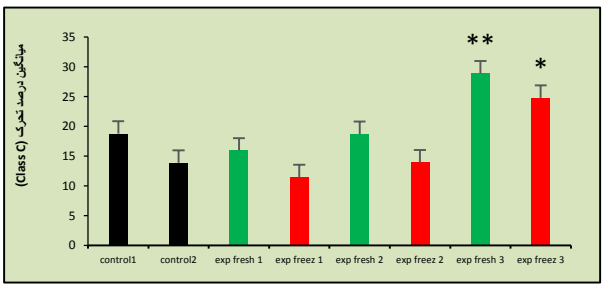
نمودار ۲:– مقایسه ی زنده مانی اسپرم پس از ۳۰ دقیقه فریز و ۳۰ دقیقه حضور در محیط. * اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل به ازای P<۰/۰۵



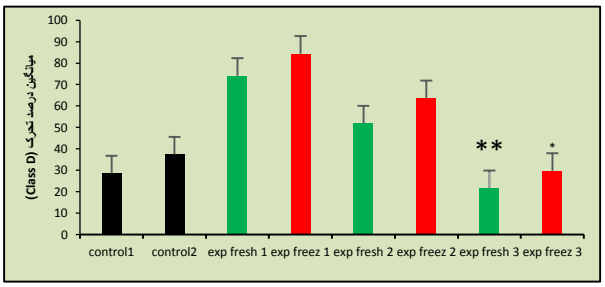
نمودار ۳: مقایسه ی میانگین تحرک پیشرونده رده ی A پس از ۳۰ دقیقه فریز و ۳۰ دقیقه حضور در محیط



نمودار ۴: مقایسه ی میانگین تحرک پیشرونده رده ی **B** پس از ۳۰ دقیقه فریز و ۳۰ دقیقه حضور در محیط



نمودار ۵: مقایسه ی میانگین تحرک غیر پیشرونده پس از ۳۰ دقیقه فریز و ۳۰ دقیقه حضور در محیط. * اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل به ازای P<۰/۰۵



نمودار ۶: مقایسه ی تحرک رده ی **D** پس از ۳۰ دقیقه فریز و ۳۰ دقیقه حضور در محیط. * اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل به ازای**P<۰/۰۵**

www.SID.ir

Downloaded from saremjrm.com at 13:19 +0430 on Sunday August 1st 2021

بحث

لازم به ذکر است که با توجه به انجام آزمایش در شرایط In vitro، اثر گذاری نانوذره ی اکسید روی نسبت به شرایط In vivo کمتر دیده شد، ولی نباید از اثرات آنتی اکسیدان ها چشم پوشی کرد. عنصر روی از جمله آنتی اکسیدان‌هایی است که در واکنش‌های استرس اکسیداتیو نقش مهمی دارد. درصد کمی از این عنصر در مایع منی وجود دارد. مکانیسم های متفاوتی برای مهار استرس اکسیداتیو و کاهش آسیب های ناشی از ROS وجود دارد که یکی از آن ها سیستم آنتی اکسیدان (Antioxidant) است. وجود آنتی اکسیدان ها وضعیت ثابتی از سطح ROS را در پلاسمای منی ایجاد می کند که به عنوان پاکسازی کننده ی رادیکال های آزاد، اسپرم را در برابر ROS محافظت می کنند [۱۷]. آنتی اکسیدان ها شامل دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی هستند. انواع آنزیمی شامل: سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز و انواع غیر آنزیمی شامل: ویتامین A-E و C، پیروات گلوتاتیون، تائورین، هیپوتائورین، و کوآنزیم Q هستند. میزان اکسیدان ها و آنتی اکسیدان ها در یک نسبت خاص حفظ می شود و هرگونه تغییر در جهت افزایش این نسبت به سمت اکسیدان ها سبب ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو می شود. همچنین، آنتی اکسیدان ها، کاهش آنزیم های سیتوپلاسمی ناشی از فرآیند اسپرماتوژنزیس را جبران می کنند [۱۸].

در این مطالعه اثر حفاظتی نانو ذره ی اکسید روی، در غلظت های ppm ۴۰ و ۸۰ نسبت به گروه کنترل در تحرک از نوع پیشرونده (نوع A و B) پس از انجماد کاهش یافت و در غلظت ppm ۱۰۰ از نانوذره نسبتا حفظ شد. ولی در حرکت از نوع غیر پیشرونده یا نوع C در گروهی که غلظت ppm ۱۰۰ از نانو ذره را دریافت کرده بود، شاهد افزایش تحرک به طور معنی دار نسبت به گروه کنترل انجمادی و گروه کنترل تازه و حفظ این تحرک نسبت به پارامتر بررسی شده در نمونه تازه آنالیز شده بود. در غلظت های ppm ۴۰ و ۸۰ این افزایش نسبت به گروه کنترل دیده نشد. همچنین، در گروه های آزمایشی تازه همین نسبت پابرجا بود، با این تفاوت که اعداد گروه آزمایشی انجمادی به دلیل انجماد و مشکلات فریز درصدی کاهش نسبت به گروه آزمایشی تازه داشتند. از طرفی در حرکت از نوع غیر متحرک (Immotile یا نوع D) کاهش این نوع حرکت در گروهی که ppm ۱۰۰ از نانوذره را دریافت کرده بودند به صورت چشمگیر نسبت به گروه کنترل دیده شد و در غلظت های ppm ۴۰ و ۸۰ افزایش این تحرک نسبت به گروه کنترل دیده شد. نتایج این مطالعه با تحقیقات Pena و همکاران در سال ۲۰۰۴ که نشان داد تحرک اسپرم با حضور آنتی اکسیدان ها هنگام انجماد حفظ می شود، مطابقت داشت [۱۹].

در ارتباط با پارامتر زنده مانی، اثرات مثبتی از مجاورت نانوذره ی اکسید روی با دوز ppm ۱۰۰ با مایع منی بر زنده مانی اسپرم مشاهده شد. در گروهی که غلظت ppm ۱۰۰ از نانو ذره را دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت و نسبت به پارامتر آنالیز شده ی نمونه ی تازه، فاکتور زنده مانی حفظ شد. همچنین، در گروه هایی با غلظت ppm۴۰ و ۸۰ افزایش زنده مانی نسبت به گروه کنترل دیده نشد. نتایج این پژوهش با مطالعه ی Omu و همکاران (۲۰۰۸) که ثابت کردند پارامتر های اسپرمی از جمله زنده مانی با درمان عنصر روی حفظ و افزایش می یابد، هم خوانی داشت [۲۰].

در پارامتر pH، گروه هایی که نانوذره ی اکسید روی دریافت کردند توانستند pH مایع منی را نسبت به گروه های کنترل حفظ کنند. همچنین، pH غلظت ppm ۸۰ از pH غلظت ppm ۴۰ بالاتر و به همین ترتیب pH غلظت ppm ۱۰۰ از غلظت ppm ۸۰ بالاتر بود و همگی گروه های دریافتی نانو ذره نسبت به گروه های کنترل افزایش یافتند. در گروه های آزمایشی تازه، غلظت ppm ۱۰۰ توانست pH نمونه تازه آنالیز شده را تا حدودی نسبت به گروه کنترل حفظ کند. در گروه های آزمایشی انجمادی، pH نمونه ها نسبت به گروه کنترل ۲ نسبتا حفظ شد. این مطالعه با نتایج به دست آمده از پژوهش Abaspour Aporvari و همکاران در سال ۲۰۱۷ که نشان دادند با افزایش غلظت اکسید روی، pH بهتر حفظ می شود، مطابقت داشتند [۲۱].

در این پژوهش اثر حفاظتی و واکنش موثری بر تعداد و مورفولوژی بعد از فریز-ذوب و هم چنین در گروه های آزمایشی تازه در هیچ یک از گروه های دریافتی نانو ذره اکسید روی مشاهده نشد. در پژوهش Abaspour Aporvari و همکاران (۲۰۱۷)، این نانوذره بر مورفولوژی و تعداد اسپرم موثر بود چرا که در شرایط In vivo مورد بررسی قرار گرفته بود. در شرایط In vitro، آنتی اکسیدان مذکور موثر واقع نشد این مطالعه با نتایج Abaspour Aporvari و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطابقت نداشت [۲۱]. از آن جا که محتویات سیتوپلاسمی در اسپرم کم است و در طول مراحل نهایی اسپرماتوژنز حذف می شود، پلاسمای منی دفاع بزرگی در برابر ROS توسط آنزیم مهار کننده ROS مانند سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز است. نتایج Amidi و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داد که افزودن کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به محیط فریز، باروری آزمایشگاهی اسپرم را بهبود می بخشد [۲۲].

برخی محققان از عنصر روی تحت عنوان عنصر مرموز با مکانیسم های ناشناخته یاد می کنند که یکی از مکانیسم های شناخته شده ی آن، بالا نگه داشتن سطح کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز است. اکسیدروی به عنوان یک آنتی اکسیدان در محیط خارج سلولی با بالا نگه داشتن سطح فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز می تواند در برابر استرس اکسیداتیو اثر محافظتی داشته باشد، هنگامی که استرس اکسیداتیو کاهش یابد، قطعه قطعه شدن DNA و دیگر پارامترها بهبود می یابند [۷،۸]. در پژوهش حاضر افزودن نانو ذره اکسید روی به عنوان آنتی اکسیدان به محیط انجمادی سبب حفظ نسبی پارامترهای مذکور شد و با پژوهش فوق سازگار بود.

در پژوهشی که در سال ۲۰۱۲ توسط Aditi و همکارانش انجام شد، نشان دادند که اثر عنصر روی بر نمونه های انجمادی بر پارامترهای مولکولی شامل قطعه قطعه شدن DNA، آسیب های ناشی از فریز بر عملکرد میتوکندری، ظرفیت پذیری لقاح و تحرک از نوع پیشرونده در نمونه های نرمال، استنواسپرمی و الیگواسپرمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پس از ۱۰ روز انجماد، افزایش پارامترهای مذکور در همه ی نمونه ها در گروه های

www.SID.ir

Downloaded from saremjrm.com at 13:19 +0430 on Sunday August 1st 2021

دریافت کننده ی روی نسبت به گروه کنترل و هم چنین حفظ تقریبی پارامترها در مقایسه با نمونه تازه آنالیز شده را نشان داد [۲۳].
در تحقیقی تأثیر نانو ذره اکسید روی بر خواص کمی و کیفی اسپرم گوسفند عربی در فصل غیر تولیدمثلی را بررسی کردند. نانو ذره به صورت خوراکی در دوزهای ppm ۸۰ و ۴۰ خورانده شد. پس از ۴ هفته بررسی ها انجام شد. در این مطالعه پارامترهای مایع منی از جمله مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، ظرفیت کل آنتی اکسیدانی اندازه گیری شد و نیز ریخت شناسی، تعداد، تحرک و زنده مانی اسپرم نیز بررسی گردید. نتایج این محققان نشان داد که دوز ppm ۸۰ از این نانو ذره بهترین نتیجه را بر پارامتر های مذکور نسبت به گروه کنترل که نانو ذره دریافت نکرده بود، به همراه داشت [۲۴].
با توجه به این که تحقیق فوق در شرایط in vivo انجام شده بود ولی از نظر بهبود پارامترهای تحرک و زنده مانی با پژوهش حاضر همسو بود.

نتیجه گیری

در این مطالعه، پس از بررسی پارامترهای اسپرمی شامل انواع تحرک، زنده مانی، شمارش، مورفولوژی و pH در گروه های آزمایشی و کنترل مشاهده شد که در گروه های دریافتی نانوذره تازه و انجمادی نسبت به گروه های کنترل این پارامترها بهتر حفظ شدند و به ویژه در غلظت ppm ۱۰۰ این اثر بهتر دیده شد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله ی استخراجی از پایان نامه ی دوره ی کارشناسی ارشد توسط دانشگاه علوم تحقیقات تهران حمایت شد. محققان همچنین از همکاری دلسوزانه همه پرسنل در بخش درمان ناباروری پژوهشگاه رویان قدردانی می کنند.

سهم نویسندگان در مقاله:

الناز اشتری (نویسنده ی اول)، نگارنده ی مقدمه/روش شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری ۵۰٪؛ سیده فاطمه سیادت (نویسنده ی دوم و مسئول)، طراحی ایده/پژوهشگر کمکی ۲۰٪؛ کاظم پریور (نویسنده ی سوم)، پژوهشگر کمکی ۱۰٪؛ نیلوفر سدیفی (نویسنده ی چهارم)، پژوهشگر کمکی ۱۰٪؛ سجاد آتش پرور (نویسنده ی پنجم)، پژوهشگر کمکی و ادیت کامل مقاله ۱۰٪.

تعارض منافع:

در این مطالعه تعارض منافع وجود نداشت.

منابع مالی:

توسط دانشگاه علوم تحقیقات تهران تامین شده است.

منابع

1. Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. 2010.
2. Lotti F, Maggi M. Sexual dysfunction and male infertility. Nature Reviews Urology. 2018;15(5):287-30.7
3. Suhag V, Sunita BS, Sarin A, Singh AK, Dashottar S. Fertility preservation in young patients with cancer. South Asian J Cancer. 2015;4(3):134-9.
4. Singh B, Mal G, Gautam SK, Mukesh M. Cryopreservation of oocytes and embryos. Advances in Animal Biotechnology: Springer; 2019. p. 97-108.
5. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. Fertility and sterility. 2004;82(4):913.8-
6. Prins GS, Weidel L. A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. Fertility and sterility. 1986;46(1):147-9.
7. Dawei A, Zhisheng W, Anguo Z. Protective effects of Nano-ZnO on the primary culture mice intestinal epithelial cells in in vitro against oxidative injury. World Journal of Agricultural Sciences. 2010;6(2):149-53.
8. Li Z, Yang R, Yu M, Bai F, Li C, Wang ZL. Cellular level biocompatibility and biosafety of ZnO nanowires. The Journal of Physical Chemistry C. 2008;112(51):20114-7.
9. Al-Ani NK, Al-Kawaz U, Saeed BT. Protective influence of zinc on reproductive parameters in male rat treated with cadmium. American Journal of Medicine and Medical Sciences. 2015;5(2):73-81.

www.SID.ir

Downloaded from saremjrm.com at 13:19 +0430 on Sunday August 1st 2021

10. Adedara IA, Abiola MA, Adegbosin AN, Odunewu AA, Farombi EO. Impact of binary waterborne mixtures of nickel and zinc on hypothalamic-pituitary-testicular axis in rats. Chemosphere. 2019;237:124501.
11. Elgazar V, Razanov V, Stoltenberg M, Hershfinkel M, Huleihel M, Nitzan YB ,et al. Zinc-regulating proteins, ZnT-1, and metallothionein I/II are present in different cell populations in the mouse testis. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2005;53(7):905-12.
12. Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. Zinc is an essential element for male fertility: a review of Zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. Journal of reproduction & infertility. 2018;19(2):69-81.
13. Saleem TH, Okasha M, Ibrahim HM, El-Hamd MA, Fayed HM, Hassan MH. Biochemical assessments of seminal plasma zinc, testis-expressed sequence 101 and free amino acids and their correlations with reproductive hormones in male infertility. Biological trace element research. 2020:1-14.
14. Abbasalipourkabir R, Moradi H, Zarei S, Asadi S, Salehzadeh A, Ghafourikhosroshahi A, et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles on adult male Wistar rats. Food and chemical toxicology. 2015;84:154-60.
15. Croxford TP, McCormick NH, Kelleher SL. Moderate zinc deficiency reduces testicular Zip6 and Zip10 abundance and impairs spermatogenesis in mice. The Journal of nutrition. 2011;141(3):359-65.
16. Yan M, Hardin K, Ho E. Differential response to zinc-induced apoptosis in benign prostate hyperplasia and prostate cancer cells. The Journal of nutritional biochemistry. 2010;21(8):687-94.
17. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. Nutrition reviews. 2012;70(5):257-65.
18. Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM, Alshahrani S, et al. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. Reproductive Biology and Endocrinology. 2014;12(1):33.
19. Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. Anim Reprod Sci. 2003;78(1-2):85-98.
20. Omu A, Fatinikun T, Mannazhath N, Abraham S. Significance of simultaneous determination of serum and seminal plasma α-tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography. Andrologia. 1999;31(6):347-54.
21. Abaspour Aporvari M, Mamoei M, Tabatabaei Vakili S, Zareei M, Dadashpour Davachi N. The effect of oral administration of zinc oxide nanoparticles on quantitative and qualitative properties of arabic ram sperm and some antioxidant parameters of seminal plasma in the non-breeding season. Archives of Razi Institute. 2018;73(2):121-9.
22. Amidi F, Pazhohan A, Nashtaei MS, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell and tissue banking. 2016;17(4):745-56.
23. Kotdawala AP, Kumar S, Salian SR, Thankachan P, Govindraj K, Kumar P, et al. Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function. Journal of assisted reproduction and genetics. 2012;29(12):1447-53.
24. Gharagozloo P, Gutiérrez-Adán A, Champroux A, Noblanc A, Kocer A, Calle A, et al. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. Human Reproduction. 2016;31(2):252-62.

www.SID.ir