مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ٤: از ٥٣-٦٦
زمستان ۱۳۸۹

اثرات آنتی‌اکسیدان تائورین بر روی پارامترهای استاندارد، میزان قطعه قطعه شدن DNA، کمبود پروتامین و استرس اکسیداتیو اسپرم منجمد شده انسانی

اعظم صمیمی[۱]، مجتبی رضازاده‌ولوجردی[۲،۳*]، مسعود امانلو[٤]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه جنین‌شناسی، پژوهشگاه رویان، جهاد دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴- استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۲/۲۸ پذیرش مقاله: ۸۹/۰۸/۱۸

چکیده

هدف: مطالعه ارزیابی آثار افزودن آنتی‌اکسیدان تائورین با دوزهای مختلف بر استرس اکسیداتیو و پارامترهای اسپرم منجمد شده انسانی

مواد و روش‌ها: مایع منی ۲۰ نفر که دارای اسپرم طبیعی بودند، به ۵ قسمت مساوی تقسیم شد و قسمتی به‌عنوان تازه قبل از شستشو، قسمتی پس از شستشو، قسمتی دیگر برای انجماد بدون آنتی‌اکسیدان (گروه کنترل انجماد) و بخشی با آنتی‌اکسیدان تائورین با دوز ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار با روش انجماد سریع منجمد شد. تحرک با استفاده از سیستم کامپیوتری و برنامه‌های ویژهٔ (CASA)، توان زنده‌مانی با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو، ریخت‌شناسی با به‌کارگیری آزمون پاپانیکولائو، اندازه‌گیری میزان انواع اکسیژن فعال، انواع نیتروژن فعال با به‌کار بردن ۲، ۷ دی کلروفلورسین دی استات به روش اسپکتروفلورومتری، قطعه قطعه شدن DNA توسط SCD و تشخیص کمبود پروتامین با استفاده از رنگ‌آمیزی کرومایسین A_3 بررسی شد. در انتها با استفاده از آزمون آماری آنووا نتایج ارزیابی شد.

نتایج: فرآیند انجماد کاهش کیفیت پارامترهای کلاسیک اسپرم و افزایش انواع اکسیژن فعال را به دنبال داشته و افزودن آنتی‌اکسیدان تائورین تنها با دوز ۲۵ میلی‌مولار می‌تواند سبب بهبود تحرک و نقص پروتامین پس از انجماد شود. در هر صورت هیچ‌یک از دوزهای تائورین تأثیر چندانی بر انواع اکسیژن فعال، فاکتورهای ریخت‌شناسی، توان بقای اسپرم و قطعه قطعه شدن DNA آن پس از انجماد ندارند.

نتیجه‌گیری: افزودن آنتی‌اکسیدان تائورین مانع تولید انواع اکسیژن فعال طی فرایند انجماد نشده و تنها دوز ۲۵ میلی‌مولار آن قدری نقص پروتامین و تحرک اسپرم را بهبود می‌بخشد.

کلیدواژگان: انجماد اسپرم، آنتی‌اکسیدان تائورین، انواع اکسیژن فعال، قطعه قطعه شدن DNA اسپرم، کمبود نقص پروتامین اسپرم

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، کدپستی: ١٤١١٧١٣١١٦
Email: mr_valojerdi@modares ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

انجماد منی انسان یکی از مؤثرترین روش‌های قابل قبول برای حفظ توانایی تولیدمثل مردان است [۱]. به‌همین دلیل باید یک بانک انجمادی مناسب انتخاب شود که باروری و تحرک قابل قبول اسپرم‌ها را در طول مدت انجماد حفظ نماید [۲]. با وجود کوشش‌های فراوان در زمینه شناخت زیست‌شناسی انجماد و استفاده از روش‌های گوناگون، همچنان انجماد با ایجاد فشارهای شیمیایی و فیزیکی روی غشای اسپرم، سبب تولید بیش از اندازه انواع اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species: ROS) شده و در نتیجه ایجاد استرس اکسیداتیو (Oxidative Stress) می‌نماید [۳-٦]. براساس مطالعات گذشته، افزایش ROS منجر به کاهش تحرک اسپرم می‌شود. علت کاهش حرکت اسپرم در نتیجه آبشاری است که در حین پراکسیداسیون چربی غشای اسپرم رخ می‌دهد و در نهایت منجر به فسفریلاسیون پروتئین‌های اکسونم (Axonem) شده و باعث کاهش حرکت می‌شود [۷]. افزایش میزان تولید ROS در نتیجه استرس اکسیداتیو، سبب کاهش ظرفیت باروری اسپرماتوزوا (Spermatozoa) در نتیجه آسیب به غشای سلول، تحرک و ایجاد ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی همچون دم پیچ‌خورده و آسیب به اکروزوم (Acrosome)، قطعه قطعه شدن DNA و کاهش عملکرد اسپرم می‌شود [۸-۱۰]. مطالعات نشان می‌دهند، هنگامی که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بسیار کمی وجود دارد، استرس اکسیداتیو در اسپروماتوزوا سبب ناباروری مردان می‌شود. بنابراین ضروری است که برای جبران کمبود سپر دفاعی، آنتی‌اکسیدان‌های خارجی به اسپرم افزوده شود [۱۱، ۱۲]. اگرچه اعمال آنتی‌اکسیدان‌ها متفاوت است، ولی می‌توان به‌طور خلاصه به کاهش غلظت اکسیژن، حذف یون‌های کاتالیک فلزی و برداشت انواع رادیکال‌های آزاد مثل سوپراکسید (O_2^-)، هیدروکسیل (OH) و پروکسید هیدروژن (Hydrogen Peroxide:H_2O_2) و... اشاره نمود [۱۳].

سمینال پلاسما (Seminal Plasma) مترشحه از اپیدیدیم منبع اصلی ترکیبات تائورین (Taurine) و هیپوتائورین (Hypotaurine) است، که برای ظرفیت‌پذیری، حفظ عملکرد غشا، دیگر ساختارهای اسپرم و کسب قدرت باروری اسپرم ضروری است [۱٤، ۱۵]. اما طی پردازش مایع منی، سمینال پلاسما برداشته می‌شود و به‌همین دلیل حساسیت اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد [۱٦]. در مطالعات گذشته بیان شده است که اضافه کردن تائورین به محیط انجماد اسپرم بز، سبب افزایش سطح فعالیت گلوتاتیون پروکسیداز (Glutathione Peroxidase: GSH-PX)، ویتامین E و A می‌شود [۱۷، ۱۸]. از طرف دیگر آثار ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Antiapoptotic) و آنتی‌اکسیدانی تائورین ثابت شده است [۱۹، ۲۰]. از آن‌جایی که شواهدی مبنی بر تأثیرات مثبت تائورین در دست است، در مطالعه حاضر نیز سعی شده است تحقیقی در زمینه آثار این آنتی‌اکسیدان با دوز ۲۵ و ۵۰ میلی‌مولار روی اسپرم منجمد شده انسانی برای حذف یا کاهش میزان انواع اکسیژن فعال انجام شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جمع‌آوری نمونه مایع منی

مایع منی ۲۰ نفر مرد مراجعه کننده به پژوهشکده رویان، پس از ۳ الی ٤ روز خودداری از مقاربت و با رضایت کامل مبنی بر آزمایش‌های تجربی، جمع‌آوری شد. نمونه این افراد به‌دنبال ارزیابی حجم، رنگ، میزان چسبندگی (Viscosity)، زمان مایع شدن (Liquefaction Time)، pH، شمارش اسپرم، تحرک، ریخت‌شناسی و توان زنده‌مانی اسپرم براساس معیارهای استاندارد سازمان بهداشت جهانی (World Health Organization: WHO) و معیار کروگر (Kruger Criteria) (ریخت‌شناسی اسپرم ≤ ۱۵ درصد، تحرک اسپرم (Sperm Motility)≤ ۵۰ درصد) طبیعی شناخته شده و برای مطالعه حاضر در نظر گرفته شد.

سپس نمونه هر فرد به ۵ قسمت مساوی تقسیم شد: ۱- نمونه‌ای از اسپرم‌ها به‌صورت تازه (Fresh) تجزیه و تحلیل شد و در معرض آنتی‌اکسیدان قرار نگرفت. ۲- نمونه‌ای از اسپرم‌ها به‌صورت تازه پس از شستشو با غلظت غیرمتوالی ماده

Archive of SID
www.SID.ir

جدا کننده سلولی (Allgrad) تجزیه و تحلیل شد و در معرض آنتی‌اکسیدان قرار نگرفت (گروه آلگرید). ۳- نمونه‌ای از اسپرم‌ها که فقط با محیط انجماد HSPM (Human Sperm Preservation Medium) (بدون آنتی‌اکسیدان) مخلوط شد (گروه کنترل انجماد). ٤- نمونه‌ای از اسپرم‌ها که در معرض دوز ۲۵ میلی‌مولار تائورین به‌همراه محیط انجماد قرار گرفت. ۵- نمونه‌ای از اسپرم‌ها که در معرض دوز ۵۰ میلی‌مولار تائورین به‌همراه محیط انجماد قرار گرفت. لازم به ذکر است که محیط انجمادی، یک محیط کشت تایرود هپس بافر (Hepes-Buffered Tyrodes Medium) با آلبومین و گلیسرول است که طبق جدول ۱ آماده و پس از فیلتر با فیلتر (۰/۲۲ میکرومتر) استفاده شد.

جدول ۱ مواد در محیط انجمادی HSPM [۲۱]

مواد	گرم در لیتر	میلی‌مولار
کلرید سدیم (NaCl)	۵/۸	۱۰۰
کلرید پتاسیم (KCl)	۰/٤	۵/۳۷
کلرید منیزیم ($Mgcl_2.6H_2O$)	۰/۱	۰/٤۹
فسفات دی هیدروژن سدیم ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	۰/۰۵	۰/۳۲
کلرید کلسیم ($CaCl_2.2H_2O$)	۰/٤	۲/۷۲
کربنات هیدروژن سدیم ($NaHCO_3$)	۲/٦ (در هر گرم)	۳۰/۹۵
محلول لاکتات سدیم (Sodium Lactate Syrup) (۷۰-۷۲ درصد)	۲/٦٦ (در هر میلی‌لیتر)	۱۲/۸٦
گلوکز	۱/۰	۵/۵
سولفات کانامایسین (Kanamycin Sulphate)	۰/۰۵	–
گلیسین (Glycine)	۱۰/۰	۱۳۳/۲۱
ساکاروز	۱۷/۱۸	۵۰/۰۰
سرم آلبومین انسانی (Human Serum Albumin: HSA)	٤/۰	–
محلول ۱ مولار هپس (HEPES)	۲۰ (در هر میلی‌لیتر)	۲۰/۰۰
گلیسرول (Glycerol)	۱۵۰ (در هر میلی‌لیتر)	۱۷/۰۰

در هر گروه آزمایشی پس از بررسی پارامترهای کلاسیک ذکر شده، آزمایش‌های دیگری نظیر بررسی میزان H_2O_2، بررسی میزان پروکسی‌نیتریت (Proxinitrit Radical: ONOO)، بررسی میزان سوپرکسید اکسیژن (Superoxide Anion Radical: O_2^-)، بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA (DNA Fragmentation) و بررسی نقص کمبود پروتامین (Protamin Deficiency) نیز صورت گرفت.

۲-۲- روش آماده‌سازی اسپرم

مقداری از نمونه برای ارزیابی در گروه اول برداشته و مابقی آن برای گروه‌های دیگر آزمایشی شستشو داده شد: ۲ میلی‌لیتر از نمونه اسپرم روی ستون آلگرید گرادیانت (Density Gradient Allgrad) ۸۰ درصد (۲ میلی‌لیتر) و ٤۰ درصد (۲ میلی‌لیتر) قرار گرفت و به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، رسوب در ته لوله باقی مانده با استفاده از پیپت جمع‌آوری نموده، با محیط کشت Ham's F10 دارای آلبومین انسانی، ۲ بار به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و شستشو داده شد. در انتها رسوبی که ته لوله جمع شده با Ham's F10 (در کل مطالعه محیط Ham's F10 دارای ۲۵۰ میکرولیتر HSA (۲۰ درصد) به ازای هر ۱۰ سی‌سی محیط است) رقیق شده و به تعداد حدود ۲۰×۱۰^٦ رسانده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۳- روش انجماد- ذوب

اسپرم با محیط کشت انجمادی HSPM به نسبت ۱ به ۱ مخلوط و به داخل کرایوویال (Cryovial) منتقل شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه تیمار با محیط انجمادی، کرایوویال‌ها به مدت ۱۵ دقیقه روی بخار نیتروژن (۷ سانتی‌متر بالاتر از سطح نیتروژن مایع) قرار گرفت و در نهایت داخل تانک نیتروژن نگهداری شدند. البته قابل ذکر است که آنتی‌اکسیدان تائورین قبل از انجماد، به محیط کشت انجمادی اضافه شده بود.

پس از گذشت ۲ هفته، اسپرم‌ها طبق روش زیر ذوب شدند. به‌مدت ۱ تا ۲ دقیقه در زیر آب جاری قرار داده شد تا به دمای معمولی رسیدند. برای برداشت محیط انجمادی از اسپرم‌ها دوبار شستشو صورت گرفت. برای شستشو از Ham's F10 به نسبت ۱ به ٤ استفاده شد و در نهایت با دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، اسپرم‌ها با محیط Ham's F10 ترکیب شدند تا دوباره به حجم ۲۰×۱۰^{٦} برسند.

۲-٤- روش‌های تجزیه و تحلیل اسپرم

۲-٤-۱- تحرک اسپرم

۵ میکرولیتر از نمونه اسپرم ابتدا روی میکروسل (Microcell) گذاشته و سپس در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. برای هر نمونه با تغییر مکان میکروسل، ۷-۱۰ میدان میکروسکوپی بررسی و برای تعیین نتیجه درصد کل غلظت و درصد تحرک اسپرم‌ها، از نرم‌افزار (Computer- (CASA) Assisted-Semen Analysis) استفاده شد.

۲-٤-۲- روش بررسی ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی اسپرم

درصد ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو (Papanicolaou) تعیین شد. پس از تهیه اسمیر، لام مورد نظر در الکل اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه تثبیت و سپس در آب شستشو داده شد. در ادامه با محلول رنگ هماتوکسیلین هاریسن (Harris Hematoxylin) به‌مدت ۱۰ ثانیه رنگ‌آمیزی و پس از شستشو در آب، از اسید الکل به‌مدت ۵ ثانیه عبور داده شد. عبور از الکل اتانول ۹٦ درصد به‌مدت ۲۰ ثانیه، رنگ‌آمیزی با اورانژ ٦ (Orange-6: OG6) به‌مدت ۱۲ ثانیه، عبور از الکل اتانول ۹٦ درصد به‌مدت ۲۰ ثانیه، سپس رنگ‌آمیزی با ائوزین آزو (Azo-Eosin) به‌مدت ۲ ثانیه، عبور از الکل اتانول ۹٦ درصد به‌مدت ۲۰ ثانیه و عبور از الکل اتانول ۱۰۰ درصد به‌مدت ۲۰ ثانیه جزء مراحل بعدی رنگ‌آمیزی بود.

۲-٤-۳- تعیین درصد اسپرم‌های زنده

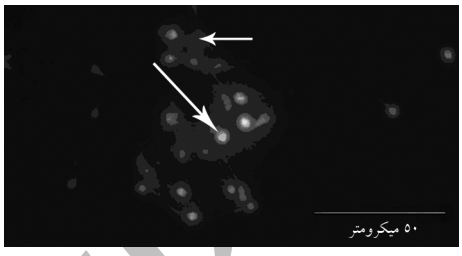
در این تحقیق از رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلو (Trypan Blue) استفاده شد. حجم مساوی (۱۰۰ میکرولیتر) از نمونه اسپرم و رنگ تریپان بلو را با هم در یک لوله آزمایش مخلوط و پس از گذشت ۵-۱۰ دقیقه، اسمیر تهیه شده از آن با بزرگنمایی ٤۰۰ ارزیابی شد. اگر اسپرم در زمان رنگ‌آمیزی زنده باشد، رنگ تریپان‌بلو را به‌خود نمی‌گیرد در نتیجه قسمت سر و تنه آن رنگ و حالت روشن‌تری دارد (سفید براق).

۲-٤-٤- بررسی کمبود نقص پروتامین

در این بررسی از روش رنگ‌آمیزی کرومایسین A_3 (Cromaycine A_3: CMA_3) استفاده شد. محلول تثبیت کننده کارنوی (Carnoy's Fixative) (متانول+اسید استیک به نسبت ۳ به ۱) را به اندازه ۳۰۰ میکرولیتر (با حجم مساوی) به اسپرم‌ها اضافه نموده و در حرارت ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه تثبیت شدند. پس از تهیه دو اسمیر و خشک شدن آن‌ها، توسط ٦۰-۱۰۰ میکرولیتر محلول کرومایسین A_3 (با غلظت ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر مک‌الوین (Mc-Elvin's Buffer) حاوی کلرید منیزیم ۱۰ میلی‌مولار) به‌مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی انجام شد. برای بهتر بودن کیفیت رنگ‌آمیزی، لام‌ها در محیط تاریک و مرطوب نگهداری شد. ۱۰۰ اسپرم در هر لام در زیر میکروسکوپ فلورسنت با

Archive of SID
www.SID.ir

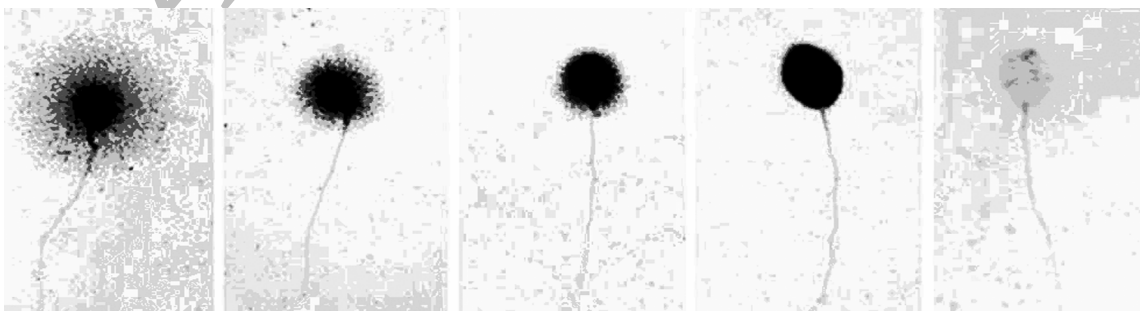
بزرگنمایی ۱۰۰× مشاهده و شمارش شد. درصد اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان به‌عنوان CMA_3^+ (اسپرم‌هایی هستند که کمبود نقص پروتامین دارند) بررسی و ثبت شد (شکل ۱).



شکل ۱ رنگ‌آمیزی CMA_3؛ فلش کوتاه: CMA_3^-، فلش بزرگ: CMA_3^+

۲-٤-۵- بررسی قطعه قطعه شدن DNA

برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA از روش SCD (Sperm Chromatin Dispertion Test) استفاده شد. برای انجام آزمایش، نمونه مایع منی سانتریفوژ و پس از تشکیل رسوب مقداری از اسپرم‌ها برداشته شد. سپس در یک لوله آزمایش ریخته و با محیط Ham's F10 رقیق شد و تعداد اسپرم را به ۵-۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر رسانده و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. سپس ۳۰ میکرولیتر از مایع منی رقیق شده را با ۷۰ میکرولیتر از آگارز (Low Melting Agarose) مخلوط کرده و روی لامی که قبلاً با آگارز نرمال پوشانده شده بود قرار داده شد و پس از گذاشتن لامل روی آن به‌مدت ٤ دقیقه در یخچال قرار داده شدند. سپس لامل را به آرامی از روی لام کشیده و برداشته و لام به‌طور افقی در ظرفی که حاوی اسید واسرشت کننده (Denaturating Acid) (HCl ۰/۰۸ نرمال) تازه بود به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفت تا زنجیرهای منفرد DNA در اثر شکسته شدن آن ایجاد شود. بعد از ۷ دقیقه لام از داخل اسید به داخل ظرف حاوی محلول لیز کننده برای برداشتن پروتئین‌ها به‌مدت ۲۵ دقیقه قرار گرفت. در پی آن لام را ۵ دقیقه در آب دیونیزه شستشو داده و بعد از آن لام را در سه ظرف که به‌ترتیب حاوی الکل ۷۰ درصد، ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود هرکدام به‌مدت ۲ دقیقه قرار داده و بعد از خشک شدن لام در مجاورت هوا در نهایت آن را به‌مدت ۵ دقیقه در رنگ رایت (Wright) قرار داده و پس از شستشو با آب، در معرض هوا قرار گرفت تا خشک شود. سپس در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شدند. اسپرم‌هایی که در اطراف آن‌ها هاله مشاهده می‌شد، اسپرم‌های سالم و آن‌هایی که فاقد هاله بودند ناسالم در نظر گرفته شدند [۲۲]. اسپرم‌هایی که دارای هاله هستند، به چند گروه زیر تقسیم شدند: اگر هاله اطراف سر اسپرم برابر قطر سر باشد هاله بزرگ (Large Halo) در نظر گرفته شد، اما اگر هاله اطراف سر اسپرم ۲ تا ۳ لایه باشد در واقع ۱/۳ هسته اسپرم باشد، هاله متوسط (Medium Halo) گفته شد. از طرف دیگر اگر یک لایه هاله در اطراف سر باشد، هاله کوچک (Small Halo)، اگر هیچ لایه‌ای در اطراف سر نباشد و سر کاملاً تیره به‌نظر آید، بدون هاله (Without Halo) و اگر سر اسپرم به‌صورت متراکم و رنگ آن کاملاً صورتی باشد، تجزیه شده (Degraded) در نظر گرفته شدند (شکل ۲).



شکل ۲ آزمون SCD با رنگ‌آمیزی رایت در زیر میکروسکوپ نوری؛ از چپ به راست هاله بزرگ، هاله متوسط، هاله کوچک، بدون هاله، متلاشی شده

Archive of SID

www.SID.ir

در انتها تعداد ۱۰۰ عدد اسپرم شمارش و شاخص قطعه قطعه شدن DNA (DNA Fragmentation Index: DFI) با استفاده از فرمول زیر برای هر نمونه به‌دست آمد.

شاخص قطعه قطعه شدن DNA= درصد هاله کوچک + درصد بدون هاله + درصد تجزیه شده

۲-٤-٦- بررسی رادیکال آزاد O_2^-

از کلرونیتروبنزودیازول (7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3- diazole: NBD-Cl) به‌عنوان یک پروب(Probe) فلوروسنت ویژه برای سنجیدن میزان غلظت یون سوپراکسید استفاده شد که پس از واکنش NBD-Cl با سوپراکسید، میزان غلظت یون سوپراکسید با اسپکتروفلورومتر و با تابیدن طول موج ٤٧٠ نانومتر و انتشار طول موج ٥٥٠ نانومتر قابل مشاهده است. به‌همین منظور ویال اسپرم منجمد شده در دمای اتاق قرار گرفت تا ذوب شود. سپس ۱ میلی‌لیتر NBD-Cl با ۲ میلی‌لیتر از استونیتریل (Acetonitril) (به‌عنوان حلال) ترکیب شد، که این محلول به‌صورت استوک بوده و در تاریکی به‌مدت طولانی قابل استفاده است. روزانه ۱۰۰ میکرومول از محلول را با ۲ میلی‌لیتر اسپرم مخلوط و بلافاصله با اسپکتروفلورمتر رادیکال آزاد O_2^- بررسی شد [۲۳].

۲-٤-۷- تعیین سطح ONOO

برای اندازه‌گیری سطح ONOO از ۲، ۷ دی کلروفلورسین دی استات (2,7-dichlorofluorescein-diacetate: DCFH-DA) و روش اسپکتروفلورومتری (Spectrofluorometery) استفاده شد. برای ارزیابی سطح ONOO نمونه‌های اسپرم هر فرد با فسفات بافر سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS) (۲۰ میلی‌مول، pH=۷/٤) به ۵×۱۰^۶ در هر میلی‌لیتر رسانده و سپس به دو قسمت تقسیم و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد در لوله استریل ذخیره شد. اساساً محصولات ONOO توسط روش فلورومتریک (Fluorimetric Assay) (2,7-dichlorofluorescein) تعیین می‌شود. (5,6- Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate) یک رنگ غیرفلورسنت و قابل نفوذ به غشا است که در بین سیتوپلاسم اسپرم توسط استرازها به اسیدهای آزاد و DCFH هیدرولیز می‌شود. ONOO، DCFH را به یک رنگ فلورسنت قوی اکسید می‌نماید. در این بررسی DCFDA-free با مخلوط کردن ۰/۰۵ میلی‌لیتر از DCFDA ۱۰ میلی‌مولار در هر لیتر با ۲ میلی‌لیتر از NaOH ۰/۰۱ نرمال در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه تهیه شد. سپس مخلوط با ۱۸/۰ میلی‌لیتر از PBS ۲۵ میلی‌مولار در هر لیتر (pH=۷/٤) خنثی شد، البته این محلول در محیط تاریک و در یخ برای مدت طولانی قابل نگهداری است. نمونه‌های اسپرمی که تحت DCFDA قرار گرفت در بافر NO با ۱۰۰ میکرولیتر L-آرژنین در اتاق تاریک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد، سپس مخلوط با PBS در pH=۷/٤ شستشو داده شد و بعد از آن به‌مدت ۲ دقیقه در g× ۲۱٤ سانتریفوژ و سرانجام فلورسنسی محلول رویی (Supernatant Fluorescence) آن با اسپکتروفلورومتر و با تابیدن طول موج ٤٧٥ نانومتر و انتشار طول موج ٥۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [٢٤].

۲-٤-۸- بررسی رادیکال آزاد H_2O_2

غلظت H_2O_2 در مایع منی با استفاده از DCFH-DA به روش اسپکتروفلورومتری اندازه‌گیری شد: محلول DCFH از DCFH-DA به‌وسیله مخلوط کردن ۰/۵ میلی‌لیتر از DCFH-DA ۱ میلی‌مولار در متانول با ۲ میلی‌لیتر NaOH ۱۰ میلی‌مولار در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه آماده شد. سپس pH مخلوط فوق توسط ۱۰ میلی‌لیتر از $NaOHPO_4$ ۲۵ میلی‌مولار به ۷/٤ رسانده شد و مخلوط تا قبل از استفاده، در یخ و جای تاریک نگهداری شد. DCFH-DA قبل از شروع هر آزمایش در استون یا دی متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) ۱×۱۰^۳ آماده شد و محلول استوک در هر آزمایش به غلظت لازم با رقیق کردن در سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) آماده شد

Archive of SID
www.SID.ir

تعداد ۵×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر اسپرم در PBS شسته شد و سپس به محلول استوک DCFH-DA منتقل و به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها از محلول استوک خارج شده و دوباره برای حذف فلورسنس سطحی در PBS شسته شد [۲۴].

۲-۵- مطالعه آماری

برای توصیف و تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش‌های آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای معیار گزارش شده است. برای مقایسهٔ گروه‌ها با یکدیگر، به دلیل این‌که برای آزمودنی‌های یکسانی، وضعیت‌های مختلف تکرار شده است، بنابراین فرض استقلال مشاهدات برقرار نیست و برای این منظور از تحلیل خطی آمیخته (Mixed Model Linear) استفاده شد تا ساختار همبستگی داده‌ها مدل شده، سپس اثر عوامل مورد بررسی ارزیابی شود. در این مدل برای پارامترها از روش REML (Restricted Maximal Likelihood) استفاده شد. برای تعیین مدل همبستگی، با استفاده از شاخص AIC (Akaike Information Criteria)، مدل همبستگی بدون ساختار (Unstructured) انتخاب شد (کمترین مقدار AIC را داشت).

پس از معنی‌داری آنووا (ANOVA) در این بخش از آزمون تعقیبی توکی (Tukey) برای مقایسهٔ دو به دوی گروه‌ها با یکدیگر استفاده شد.

مقادیر کمتر از P-value ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای تجزیه وتحلیل داده‌ها نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ به‌کار رفت.

۳- نتایج

جدول ۱، نشان‌دهنده میانگین درصد تحرک کلاس متفاوت و سطح معنی‌داری مابین گروه‌های آزمایشی است. با بررسی روی این اختلاف‌ها، مشخص شد که درصد تحرک کلاس اسپرم‌های گروه تازه با کلیه گروه‌ها، اختلاف معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) داشته که این میزان نسبت به گروه آلگرید کمتر ولی نسبت به گروه‌های دیگر انجماد، بیشتر بوده است. این بدین معنی است که پس از پردازش درصد تحرک افزایش یافته ولی به‌طور کلی انجماد سبب کاهش آن می‌شود. اگرچه میزان درصد تحرک پس از انجماد کاهش یافته ولی پس از استفاده از آنتی‌اکسیدان تائورین در محیط انجمادی، میزان درصد تحرک نسبت به گروه کنترل انجماد، بهبود یافته است. این بهبودی به‌طور معنی‌داری به‌ویژه در گروه تائورین ۲۵ میلی‌مولار قابل مشاهده بود.

جدول ۱ مقایسه میانگین درصد میزان تحرک کلاس‌های متفاوت اسپرم‌ها (± خطای معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	آلگرید (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
تحرک پیشرونده (کلاس A) (درصد)	۲٤/٤٥۰±۰/٤٤۱	۳۱/۰۸۸±۰/۳۹۷^{a}	۱۳/۷۵۰±۰/٤۳٦^{ab}	۱۷/۰٤٤±۰/۵۷۳^{abc}	۱۵/۵۹۹±۰/۷۵۰^{abc}
تحرک (کلاس B) (درصد)	۵۰/۵۵۸±۰/۵٦٦	٦۱/۹۱۸±۰/۲٤۵^{a}	۲۷/٦۷۵±۰/۵۸۳^{ab}	۲۹/۲۹۱±۰/۰۸۵^{ab}	۲۸/۱۱۰±۰/۱۳۲^{ab}
تحرک (کلاس B+A) (درصد)	۷۵/۱۳۳±۰/۸۰۵	۹۲/۹۰۸±۰/۳٤۷^{a}	٤۱/٤۲۰±۰/٦٦۱^{ab}	٤۵/۷۸۲±۰/۲٤۵^{abc}	٤۳/۷٤۹±۱/۵۸۱^{ab}
تحرک (کلاس C) (درصد)	۱٦/۷٤۰±۰/٦۸۰	۳/۰۷۰±۰/۲۱۳^{a}	۳/۹۱۵±۰/۳۱٦^{ab}	٤/٦۷۵±۰/٤۵٦^{ab}	٤/۰۸۲±۰/۵٦۲^{a}
تحرک (کلاس A+B+C) (درصد)	۹۱/۷۲۳±۰/۵۲۳	۹۵/۹۱۰±۰/۲۷۹^{a}	٤۵/۳٤۰±۰/۸۰۳^{ab}	۵۲/۰۰۵±۱/۳۳۲^{abc}	٤۸/۱۵٦±۱/٦۱٤^{abd}
عدم تحرک (کلاس D) (درصد)	۸/۲۷۸±۰/۵۲۳	٤/۰۱۵±۰/۲۷۷^{a}	۵٤/٦٦۰±۰/۸۰۲^{ab}	٤۷/۸۸۷±۱/۳۳٦^{abc}	۵۲/۰٦۸±۱/۷۵۳^{abd}

a: اختلاف معنی‌دار با گروه تازه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر

b: اختلاف معنی‌دار با گروه آلگرید در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر

c: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر

d: اختلاف معنی‌دار با گروه تائورین ۲۵ میلی‌مولار در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۱- مقایسه میانگین فاکتورهای ریخت‌شناسی اسپرم‌ها

با توجه به جدول ۲ از مقایسهٔ میانگین فاکتورهای ریخت‌شناسی طبیعی، مشخص شد که اختلاف دو گروه تازه و آلگرید با تمام گروه‌ها از نظر آماری معنی‌دار بوده است. بدین معنی که قبل از انجماد درصد ریخت‌شناسی طبیعی بیشتر بوده است و هیچ‌یک از دوزهای اضافه شده تائورین نسبت به گروه کنترل انجماد، تأثیری روی فاکتورهای مورد بررسی ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم‌ها نداشته است. درصد اسپرم‌های با دم کوتاه و دم پیچ‌خورده در گروه انجماد با تائورین ۲۵ میلی‌مولار نسبت به گروه کنترل و دیگر گروه‌های دارای آنتی‌اکسیدان کاهش یافته است و نتیجه این‌گونه بود که افزودن تائورین به میزان ۲۵ میلی‌مولار به محیط کشت انجماد، توانسته میانگین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را کاهش دهد. همچنین در بررسی فاکتور زواید سیتوپلاسمی، مشاهده شد که هنگام استفاده از آلگرید، اسپرم‌های با زواید سیتوپلاسمی کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد ولی هنگامی که اسپرم‌ها در محیط انجماد و سپس در معرض فرایند انجماد- ذوب قرار گرفتند، درصد اسپرم‌هایی که زواید سیتوپلاسمی (در ناحیه دم) دارند، افزایش می‌یابد و این اختلاف در بین گروه‌های آلگرید و انجمادی از نظر آماری معنی‌دار بود ولی در بین خود گروه‌های انجمادی معنی‌دار نبود.

جدول ۲ مقایسه میانگین فاکتورهای ریخت‌شناسی اسپرم‌ها (± خطای معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	آلگرید (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
اسپرم طبیعی (درصد)	۱۹/۴۰۰±۰/۴۷۷	۲۳/۷۷۵±۰/۴۷۰^{a}	۱۳/۶۷۵±۰/۳۷۶^{ab}	۱۴/۲۹۵±۰/۷۲۷^{ab}	۱۳/۲۹۲±۰/۶۶۸^{ab}
اسپرم غیرطبیعی (درصد)	۸۰/۷۰۰±۰/۴۹۹	۷۶/۱۷۵±۰/۴۷۱^{a}	۸۶/۴۲۵±۰/۳۶۰^{ab}	۸۵/۷۱۸±۰/۷۴۴^{ab}	۸۶/۳۷۶±۰/۸۶۹^{ab}
اسپرم آمورف (Amorph) (درصد)	۷۰/۵۲۵±۰/۶۷۳	۷۱/۹۵۰±۰/۵۶۲	۶۹/۴۰۰±۱/۰۹۲^{b}	۷۲/۱۰۱±۱/۵۹۷	۷۰/۵۵۳۱±۰/۸۱۸
اسپرم با دم پیچ‌خورده (درصد)	۳/۴۲۵±۰/۴۱۶	۱/۷۲۵±۰/۲۰۳^{a}	۷/۲۷۵±۰/۵۳۶^{ab}	۵/۸۶۰±۰/۷۸۱^{abc}	۶/۷۴۱±۰/۸۳۵^{ab}
اسپرم با دم کوتاه (درصد)	۱/۰۵۰±۰/۲۰۶	۰/۷۵۰±۰/۱۳۸	۵/۳۲۵±۰/۶۵۹^{ab}	۲/۸۶۵±۰/۴۷۱^{abc}	۵/۱۳۷±۰/۷۵۳^{abd}
اسپرم با زایده سیتوپلاسمی (درصد)	۲/۸۲۵±۰/۳۴۹	۰/۹۰۰±۰/۱۴۷^{a}	۳/۰۵۰±۰/۳۶۵^{b}	۲/۳۴۷±۰/۶۶۲	۱/۸۹۱±۰/۶۲۸

a: اختلاف معنی‌دار با گروه تازه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
b: اختلاف معنی‌دار با گروه آلگرید در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
c: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
d: اختلاف معنی‌دار با گروه تائورین ۲۵ میلی‌مولار در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر

۳-۲- مقایسه میانگین قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها و کمبود پروتامین

با مشاهده جدول ۳ و بررسی میانگین درصد قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها مشخص می‌شود که انجماد این فاکتور را کاهش داده است ولی گروه‌های دارای آنتی‌اکسیدان تائورین توانسته‌اند میانگین قابلیت زنده ماندن را به‌طور معنی‌داری افزایش دهند.

با توجه به جدول ۳ می‌توان بیان نمود که میانگین درصد کمبود پروتامین اسپرم‌ها پس از انجماد به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است، اما دوز ۲۵ میلی‌مولار تائورین توانسته است این کمبود را رفع نماید.

۳-۳- مقایسه میانگین درصد فاکتورهای قطعه قطعه شدن DNA

طبق جدول ٤ به‌طور مجزا فاکتورهای مربوط به قطعه قطعه شدن DNA بررسی شد و در نهایت با محاسبهٔ DFI، نتیجه‌گیری شد که میزان قطعه قطعه شدن DNA پس از انجماد

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش یافته و از نظر آماری معنی‌دار بود. همچنین می‌توان بیان داشت که هیچ‌یک از دوزهای آنتی‌اکسیدان نتوانسته سبب کاهش معنی‌داری در میزان قطعه قطعه شدن DNA نسبت به گروه کنترل انجماد شود.

جدول ۳ مقایسهٔ اختلاف میانگین درصد قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها و کمبود پروتامین (± انحراف معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	آلگرید (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
قابلیت زنده‌مانی (درصد)	۹۰/۷۷۵±۰/۵۶٤	۹۵/۱۲۵±۰/۳۱۷[a]	٦٤/۰۵۰±۰/۰٦۷[ab]	٦۵/۳۱۳±۲/٦۹۲[abc]	٦٦/۱۵۵±۲/۰۹۲[abc]
کمبود پروتامین (درصد)	۳۳/٦۰۰±۰/۷۵۱	۲۸/٦۷۵±۰/٦۹٦[a]	۵۳/٤۰۰±۱/۸۲۳[ab]	٤۹/۰۲۳±۲/۲۰۰[abc]	۵۱/۵۸۸±۲/۵٦۱[ab]

a: اختلاف معنی‌دار با گروه تازه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
b: اختلاف معنی‌دار با گروه آلگرید در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
c: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر

جدول ٤ مقایسه میانگین درصد فاکتورهای قطعه قطعه شدن DNA (± خطای معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	آلگرید (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
هاله بزرگ (درصد)	۲۲/۰۷۵±۰/۳۹۱	۲۵/۰۰±۰/۲۱۸[a]	۱۱/٤۲۵±۰/۲۵۰[ab]	۱۱/۸۳۳۰±۰/۳۲۰[ab]	۱۱/۷۳٦±۰/۳۷۳[ab]
هاله متوسط (درصد)	٤۲/۲۰۰±۰/٤۷۰	٤۵/۰۷۵±۰/٤۰۱	۲۲/۷۷۵±۰/٦٦۳[b]	۲۲/۲۳۵±۰/٦۹۱[abe]	۲۱/۹٦۷±۰/۷۸۱[abe]
هاله کوچک (درصد)	۲۰/۹±۰/۳۲٦	۱۸/۸۵۰±۰/۵٤۵	٤۳/۲۷۵±۰/۸۷۵	٤٤/۰۰۳±۰/۲٤۹	۵۱/۷۸۵±۰/۸۷۱
بدون هاله (درصد)	۱۰/۱۵۰±۰/٤٦۸	۸/۸۰۰±۰/٤۳٤[a]	۱٤/۷۲۵±۰/۵۲۵[a]	۱٤/۳۲۵±۰/۵۸۲[a]	۱٤/۷۵۲±۰/٦۵۸[a]
تجزیه شده (درصد)	٤/٤۲۵±۰/۲۷۸	۲/۵۲۵±۰/۱۸٤[a]	۷/۸۰۰±۰/۳٦٤[ab]	۷/۸۳٦±۰/۳۸۳[abe]	۸/۱۲۸±۰/۳٦۷[abe]
DFI	۳۵/٤۷۵±۰/٦۰۰	۳۰/۱۷۵±۰/٤۳۷[a]	٦۵/۸۰۰±۰/۷٤٤[ab]	٦٦/۱٦٤±۰/۸٤٦[ab]	٦٦/٤۳۳±۰/۹۳۲[ab]

a: اختلاف معنی‌دار با گروه تازه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
b: اختلاف معنی‌دار با گروه آلگرید در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
c: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر

جدول ۵ میانگین میزان ONOO، H_2O_2 و O_2^- (± خطای معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
ONOO (میکرومول)	٤۹/۹٤۰±۱/٤۷٦	۷۸/۰۵۱±۱/۳٦۲[a]	۷۸/۸۹۷±۱/٦۲٤[a]	۷۸/۸٤۵±۲/۳۸۷[a]
H_2O_2 (میکرومول)	۰/۸۸٤±۰/۰۲۱	۱/۲۲۳±۰/۰۲۷[a]	۱/۱۹۳±۰/۰۳٦[a]	۱/۲۲۱±۰/۰۸۰[a]
O_2^- (میکرومول)	۲۹/۱۱۵±۲/۱۰۱	٤۲/۹۸٤±۲/۸٦٤	٤۰/۰۹۵±۲/۸۹۹	۳۹/٤۲٤±۳/۱٤

a: اختلاف معنی‌دار با گروه تازه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر

۳-٤- مقایسه میزان H_2O_2 و ONOO و O_2^-

جدول ۵ بیان کننده این مطلب است که پس از انجماد میزان H_2O_2، ONOO و O_2^- به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و هیچ‌یک از گروه‌های دارای آنتی‌اکسیدان نتوانسته میزان ROS

Archive of SID

www.SID.ir

را کاهش دهد. در نتیجه می‌توان بیان داشت که هیچ‌یک از دوزهای تائورین نتوانسته است سبب کاهش معنی‌دار میزان ROS نسبت به گروه کنترل انجماد شود.

٤- بحث

تجزیه و تحلیل کیفیت اسپرم، اساسی‌ترین و رایج‌ترین آزمایش مورد استفاده در زمینه پیش‌بینی باروری است که بر پایهٔ برآورد شاخص‌های مهمی چون تحرک، ریخت‌شناسی و توان زنده‌مانی استوار است. اگرچه ارزیابی ساختار کروماتین اسپرم یک مقیاس مستقل از کیفیت اسپرم است، ولی نشان داده شده است که ناهنجاری‌های کروماتینی می‌تواند نشانگر ناباروری فرد حتی بدون توجه به فاکتورهای دیگر باشد [٢٥]. واضح است که استفاده از یک روش پردازش اسپرم، سبب جداسازی اسپرم‌های متحرک و سالم از اسپرم‌های بی‌حرکت و غیرطبیعی می‌شود و بدین ترتیب پردازش مایع منی، سبب بهبود کیفیت اسپرم‌ها می‌شود [٢٦، ٢٧]. نیکلسون (Nicholson) و همکارانش در سال ٢٠٠٠ بیان نمودند که سانتریفوژ با شیب غلظتی محلول‌های جداسازنده سلولی برای ذخیره‌سازی اسپرم‌ها مفید است، زیرا علاوه بر جداسازی اسپرم‌های پرتحرک و سالم که سبب بهبود کیفیت مایع منی می‌شوند با برداشت سلول‌های غیرمتحرک، لکوسیت‌ها، سلول‌های خونی و سمینال پلاسما می‌توان جمعیت یک دستی از اسپرم‌های متحرک سالم را به‌دست آورد [٢٨] که به دلیل حذف باکتری‌ها، لکوسیت‌ها و اسپرم‌های غیرطبیعی و مرده، سبب کاهش ROS شده و بنابراین سبب حفظ توان زنده‌مانی، افزایش درصد تحرک و ریخت‌شناسی طبیعی می‌شود [٢٩، ٣٠] که با مطالعه حاضر مطابقت کامل دارد. سمنیال پلاسما، منبع مهمی از آنتی‌اکسیدان‌هاست ولی در طی مرحله پردازش از اسپرم‌ها جدا شده و دور ریخته می‌شود. بنابراین حساسیت اسپرم‌ها به انواع اکسیدان‌ها افزایش می‌یابد [٣١] حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در مراحل پردازش، میزان آسیب‌های ناشی از ROS را کاهش می‌دهد. در تحقیق حاضر، از روش جداسازی شیب غلظتی آلگرید و از Ham's F10 و HSA استفاده شد.

ایتکن (Aitken) و همکارانش (١٩٩٨) و فاره (Faure) و همکارانش (٢٠٠٤) اعلام نمودند که Ham's F10 یک آنتی‌اکسیدان مهم است که با توانایی برداشت ROS از اسپروماتوزوا در برابر آسیب‌های ناشی از ROS حمایت می‌کند. همچنین بیان نمودند که Ham's F10 توانایی کاهش سطوح مالون دی آلدهید (Malondialdehyde) را داراست و می‌تواند سبب کاهش میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شود [٢٦، ٣٢].

توئیگ (Twigg) و همکارانش (١٩٩٨) اعلام نمودند که آنتی‌اکسیدان‌هایی همچون آلبومین که به همراه Ham's F10 استفاده می‌شود، می‌تواند سبب محافظت غشای اسپرم و بنابراین حفظ تحرک شود، ولی نمی‌تواند از DNA در برابر اکسیدان‌ها حمایت کند [٣٣].

در سال‌های اخیر با استفاده از بانک‌های انجمادی امید به باروری بیماران دو چندان شده است. بنابراین می‌توان گفت که حفظ پارامترهای اساسی و کلیدی اسپرم‌ها (حرکت، توان زنده‌مانی و ...) در برابر آسیب‌های گوناگون طی روند انجماد- ذوب و افزایش توان باروری اسپرم‌ها پس از ذوب همواره به‌عنوان یک هدف مطرح بوده است. بنابراین در این تحقیق با بررسی غلظت میزان ROS تولید شده (O_2^-، H_2O_2، ONOO) قبل و پس از انجماد، نشان داده شده است که فرآیندهای انجماد- ذوب سبب افزایش تولید ROS می‌شود و بدین‌ترتیب می‌تواند علتی برای افزایش میزان آسیب‌های وارده به اسپرم باشد که تحقیق حاضر تأییدی بر مطالعات دیگران است. آنیون سوپراکسید O_2^-، اولین محصول تولید شده به‌وسیله اسپرم است ولی این رادیکال‌های با طول عمر کوتاه به‌سرعت به H_2O_2 تغییر شکل می‌یابد و از سوی دیگر NO می‌تواند با O_2^- ترکیب شود و یک اکسید کننده قوی به‌نام $ONOO^-$ به‌وجود آورد [٣٤]. غشای اسپرم نسبت به H_2O_2، فوق‌العاده نفوذپذیر بوده و به‌نظر می‌رسد که مهم‌ترین عامل آسیب‌رسان به اسپرم H_2O_2 است که افزایش آن باعث پراکسیداسیون لیپیدی غشا می‌شود

Archive of SID
www.SID.ir

[۳۵] و از آن‌جایی که اسپرم انسان دارای مقادیر فراوانی اسیدهای چرب غیراشباع است، فوق‌العاده نسبت به پراکسیداسیون لیپیدی حساس است [۳۶]. از سوی دیگر ONOO نیز یک اکسیدکننده قوی است که سبب اکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها و DNA شده و با ایجاد تغییرات اکسیداتیوی اسیدهای آمینه سبب غیرفعال شدن و تخریب پروتئین‌ها و DNA می‌شود [٤]. در این مطالعه برای جبران کمبود سپر دفاعی، آنتی‌اکسیدان تائورین با دوز ۲۵ میلی‌مولار و ۵۰ میلی‌مولار به محلول انجمادی اسپرم افزوده شد.

تائورین به‌عنوان یک پروتئین اتصال یابنده و انتقال‌دهنده فلزات است و به یون‌های فلزی (Cu^{2+}،Fe^{3+}) مایعات داخل بدن متصل می‌شود و در واقع از عوامل به دام اندازنده یون‌های فلزی است که نقش کاتالیزور در تولید رادیکال‌های اکسیژن و توانایی مهار واکنش‌های اکسیداسیونی ROS (جلوگیری از تشکیل و یا به دام اندازی آن‌ها) را دارد [۳۷].

در تحقیق حاضر افزودن تائورین نتوانست سبب بهبود ریخت‌شناسی طبیعی اسپرم شود و اما دوز ۲۵ میلی‌مولار تائورین اثر مثبتی بر افزایش توان زنده‌مانی اسپرم‌ها یا کاهش نقص پروتامین داشت. از سوی دیگر؛ آثار تائورین بر قطعه قطعه شدن DNA و همچنین نقص پروتامین هم بررسی شد و مشخص شد که تائورین نتوانسته اثر مثبتی بر پارامترهای ذکر شده داشته باشد. در تحقیق حاضر افزودن تائورین نتوانست به‌طور معنی‌داری سبب کاهش غلظت میزان ROS تولید شده شود. این مطالعه همانند گزارش مارتینز- بسا (Martins-Bessa) و همکارانش بود که آثار تائورین را بر پارامترهای اسپرم سگ سنجیده بودند. دلایل عدم وجود تأثیرات مثبت واضح نیست [۳۸]. ولی ممکن است به علت ترکیبات مشارکت کننده در محیط انجماد باشد که توانسته تأثیرات مثبت را خنثی نماید. در انجماد اسپرم گاو، مشارکت تائورین به همراه محیط دارای گلیسرول، سبب بهبود حرکت شد ولی حضور تائورین در محیط‌های دیگر تأثیر مثبتی نداشت [۳۹] که این ممکن است به دلیل میزان غلظت مورد استفاده بر روی مایع منی، یا به علت مکانیسم‌های دیگر محافظت کننده در برابر پراکسیداتیوها همانند سیستم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و ردوکتاز در فرایند انجماد– ذوب باشد و در نتیجه با افزودن این آنتی‌اکسیدان تأثیر مثبتی مشاهده نشده است [٤٠]. از آن‌جایی که این بتا آمینو اسید به‌طور طبیعی در اسپرم انواع گونه‌ها یافت می‌شود [٤١]، ممکن است که افزودن این آنتی‌اکسیدان تأثیر محدودی بر اسپرم داشته باشد. باکاک (Bucak) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ و همچنین در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که افزایش تائورین به محیط انجماد اسپرم بز، سبب افزایش حرکت و همچنین سطوح فعالیت GSH-PX، کلرآمفنیکل استیل ترنسفراز (Chloramphenicol Acetyltransferase: CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase: SOD)، ویتامین A و E، در مقایسه با گروه کنترل شده است که این مطلب موافق مطالعه حاضر بود. آن‌ها همچنین بیان نمودند که تائورین توانسته است سطوح ROS را کاهش دهد [٤٢، ٤٣] که با مطالعه حاضر منافات داشت. اما نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر، با مطالعات میشل (Micheal) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد. میشل بیان نمود که مکمل تائورین آثار مثبتی بر تحرک اسپرم سگ داشته است ولی بر کاهش اکسیژن فعال موجود در اسپرم تأثیری نداشته است [٤٤]. البته تأیید این یافته‌ها به تحقیقات بیشتری با دوزهای دیگر نیاز دارد.

۵-تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه اعضا و کارشناسان محترم پژوهشکده رویان و گروه بیوشیمی دانشکده علوم داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Hovatta O. Cryobiology of ovarian and testicular tissue. Best Pract Res Clin Obstet

Archive of SID

www.SID.ir

Gynaecol 2003; 17(2): 331-42.

[2] Verheyen G, De Croo I, Tournaye H, Pletincx I, Devroey P, van Steirteghem AC. Comparison of four mechanical methods to retrieve spermatozoa from testicular tissue. Hum Reprod 1995; 10(11): 2956-9.

[3] Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. J Urol 2003; 170(4 Pt 1): 1079-84.

[4] Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. Fertil Steril 2001; 76(5): 892-900.

[5] Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. Mol Reprod Dev 2001; 59(4): 451-8.

[6] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J Androl 2003; 24(4): 621-8.

[7] Parks JE, Graham JK. Effects of cryo-preservation procedures on sperm membranes. Theriogenology 1992; 38(2): 209-22.

[8] Weinberg JB, Doty E, Bonaventura J, Haney AF. Nitric oxide inhibition of human sperm motility. Fertil Steril 1995; 64(2): 408-13.

[9] Overstreet JW, Price MJ, Blazak WF, Lewis EL, Katz DF. Simultaneous assessment of human sperm motility and morphology by videomicrography. J Urol 1981; 126(3): 357-60.

[10] Seligman J, Kosower NS, Weissenberg R, Shalgi R. Thiol-disulfide status of human sperm proteins. J Reprod Fertil 1994; 101(2): 435-43.

[11] Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, Guérin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003; 18(5): 1023-8.

[12] Taylor CT. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. Environ Toxicol Pharmacol 2001; 10(4): 189-98.

[13] Guérin P, Guillaud J, Ménézo Y. Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. Hum Reprod 1995; 10(4): 866-72.

[14] Pasantes-Morales H, Fellman J. Taurine and hypotaurine and membrane lipid peroxidation. In: Quintanilha MAT, Weber H, (Editors). CRC handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine. vol. II, Boca Raton, Fla: CRC Press, 1989; p: 105-17.

[15] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992; 119(3): 493-501.

[16] Atessahin A, Bucak MN, Tuncer PB, Kizil M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. Small Rumin Res 2008; 77(1): 38-44.

[17] Bucak MN, Ateşşahin A, Varişli O, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology 2007; 67(5): 1060-7.

Archive of SID
www.SID.ir

[18] Mangiagalli A, Samuele A, Armentero MT, Bazzini E, Nappi G, Blandini F. Effects of homocysteine on apoptosis-related proteins and anti-oxidant systems in isolated human lymphocytes. Eur J Biochem 2004; 271(9): 1671-6.

[19] Meizel S, Lui CW, Working PK, Mrsny RJ. Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. Dev Growth Differ 1980; 22(3): 483-94.

[20] Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. J Androl 2001; 22(6): 1012-8.

[21] Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J Androl 2003; 24(1): 59-66.

[22] Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. Clin Chim Acta 2006; 368(1-2): 53-76.

[23] Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, Wolf G. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. FEBS Lett 1997; 416(2): 175-8.

[24] Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. Anal Biochem 1965; 11: 1-5.

[25] Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update 2003; 9(4): 331-45.

[26] Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl 1988; 9(6): 367-76.

[27] Suzuki K, Nagai T. In vitro fertility and motility characteristics of frozen-thawed boar epididymal spermatozoa separated by Percoll. Theriogenology 2003; 60(8): 1481-94.

[28] Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane-coated silica particles at different g forces. Hum Repord 2000; 15(3): 662-6.

[29] Kovalski NN, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. Fertil Steril 1992; 58(4): 809-16.

[30] Yenilmez E, Yildirmis S, Yulug E, Aydin S, Tekelioglu Y, Erdem E, Topbas M, Arvas H. Ham's F-10 medium and Ham's F-10 medium plus vitamin E have protective effect against oxidative stress in human semen. Urology 2006; 67(2): 384-7.

[31] Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol 2003; 1: 108.

[32] Faure P, Oziol L, Le Bihan ML, Chomard P. Cell culture media are potent antioxidants that interfere during LDL oxidation experiments. Biochimie 2004; 86(6): 373-8.

Archive of SID

www.SID.ir

[33] Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. Hum Repord 1998; 13(6): 1429-36.

[34] de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. Free Radic Biol Med 1993; 14(2): 157-66.

[35] Ball BA, Vo ADetection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. J Androl 2002; 23(2): 259-69.

[36] Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol Reprod Dev 1995; 42(3): 334-46.

[37] Kochakian CD. Free amino acids of sex organs of the mouse: regulation by androgen. Am J Physiol 1975; 228(4): 1213-5.

[38] Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A. Effects of taurine and hypotaurine supplementation and ionophore concentrations on post-thaw acrosome reaction of dog spermatozoa. Theriogenology 2009; 71(2): 248-53.

[39] Fan JJ, Zhou JL, Li JH, Cui S. Accessory sex glands of male mice have the ability to synthesize taurine via the cysteine sulfinate decarboxylase pathway. Cell Biol Int 2009; 33(6): 684-9.

[40] Lobo MV, Alonso FJ, del Río RM. Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat. J Histochem Cytochem 2000; 48(3): 313-20.

[41] Casslén BG. Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration. J Reprod Med 1987; 32(3): 181-4.

[42] Bucak MN, Ateşşahin A, Varişli O, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology 2007; 67(5): 1060-7.

[43] Bucak MN, Sariozkan S, Tuncer PB, Ulutas PA, Akcadag HI. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid per-oxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. Small Rumin Res 2009; 81(2-3): 90-5.

[44] Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscos CM. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Anim Reprod Sci 2009; 112(1-2): 119-35.

Archive of SID

www.SID.ir