

## Increasing viability, numbers, and motility of sperm in men with normal spermatogenesis exposed to saffron extract after freezing- thawing process

Y. Khazaei<sup>1</sup>, S. Moghbelinejad<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Genetic, School of Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran

Corresponding Address: Sahar Moghbelinejad, Department of Biochemistry and Genetic, School of Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran

Tel: +98-28-3336001, Email: smoghbinejad@qums.ac.ir

Received: 25 May 2016; Accepted: 24 Jan 2017

### \*Abstract

**Background:** Sperm freezing method is used frequently in assisted reproductive techniques, on the other hand in different studies negative effect of freezing have been shown on different sperm parameters.

**Objective:** The aim of this study was to determine the effect of saffron extract as an antioxidant, on the different sperm parameters in men with normal spermatogenesis after freezing-thawing process.

**Methods:** In this case-control study, collecting of samples was done in 2015 year from the Infertility Treatment Center, ACECR Branch of Qazvin, Qazvin, Iran. These men had normal spermatogenesis and their spouse had infertility problem. Semen samples was divided in two groups, control without saffron extract, and case with 50 mg/ml saffron extract. Then, samples freezed with snap freezing method. After two weeks, they were thawed and different sperm parameters were assessed. Data were analyzed by two-tail T test.

**Findings:** Our results showed, mean percent of viability ( $72\pm0.99$ ), motility ( $87\pm0.43$ ), and the number of sperm cells ( $62.5\pm3.8$ ) in treaded group was elevated significantly ( $P<0.01$ ) compared to the control group ( $46.6\pm1.1$ ), ( $62.3\pm0.33$ ), and ( $45\pm4.3$ ) respectively. However, about the morphology we don't observed significant difference ( $P>0.05$ ).

**Conclusion:** Our results showed that possibly antioxidant agents of saffron extract could scavenge free radicals and thus, optimize different sperm parameters (viability, motility, and number) after freezing and thawing.

**Keywords:** Saffron extract, Freezing, Thawing, Sperm parameters

**Citation:** Khazaei Y, Moghbelinejad S. Increasing viability, numbers, and motility of sperm in men with normal spermatogenesis exposed to saffron extract after freezing-thawing process. J Qazvin Univ Med Sci. 2017; 21 (1): 12-20.

## افزایش میزان حیات، تعداد و تحرک اسپرم مردان با اسپرماتوژنزیس طبیعی تحت تأثیر عصاره زعفران پس از پدیده انجماد- ذوب

یوسف خزایی<sup>۱</sup>، دکتر سحر مقبلی نژاد<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران  
<sup>۲</sup> گروه بیوشیمی - ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی - ژنتیک، تلفن ۰۲۸-۳۳۳۳۶۰۰۱-۳۳۳۳۶۰۰۱  
تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۵

### \*چکیده

**زمینه:** امروزه در استفاده از روش‌های کمک باروری شاهد به کار بردن روش انجماد اسپرم به میزان زیادی هستیم. از طرفی در مطالعه‌های مختلف، تأثیر منفی انجماد بر شاخص‌های مختلف اسپرم نشان داده شده است.

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر زعفران به عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان بر شاخص‌های مختلف اسپرم مردان با اسپرماتوژنزیس طبیعی پس از پدیده انجماد- ذوب انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه مورد-شاهدی در سال ۱۳۹۴ بر روی ۴۲ نمونه مایع سمن از مردان که جهت اقدامات تشخیصی و درمانی به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی قزوین مراجعه کرده بودند، انجام شد. این افراد دارای اسپرماتوژنزیس نرمال بودند و مشکل ناباروری مربوط به همسران این افراد بود. نمونه‌های مایع سمن هر نفر به ۲ گروه شاهد (بدون عصاره زعفران) و مورد (با عصاره زعفران با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) تقسیم و سپس با روش انجماد سریع منجمد شدند. اثر عصاره زعفران پس از گذشت دو هفته از انجماد و ذوب نمودن نمونه‌ها، بر روی شاخص‌های مختلف اسپرم بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تی تست زوجی تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** نتایج ما نشان داد که میانگین درصد زنده ماندن (۷۲±۰/۹۹)، تحرک (۸۷±۰/۴۵) و تعداد اسپرم‌ها (۶۲/۵±۳/۸) در نمونه‌های دارای زعفران نسبت به نمونه‌های شاهد به ترتیب ۱/۱±۴۶/۶، ۳۳/۳±۶۲/۳ و ۴۵±۴/۳ افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۱)، اما میانگین درصد شکل طبیعی، علی‌رغم بهبود شاخص مورد نظر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های مطالعه ما نشان داد که احتمالاً مواد آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره زعفران می‌تواند رادیکال‌های آزاد ایجاد شده را حذف بدین ترتیب در بهبود برخی شاخص‌های اسپرم (میزان زنده ماندن، تعداد و حرکت) که طی پدیده انجماد و ذوب دچار تغییر شده‌اند مؤثر واقع شود.

**کلیدواژه‌ها:** عصاره زعفران، انجماد، ذوب، شاخص‌های اسپرم

### \*مقدمه

ناباروری مردان اسپرماتوژنزیس ناقص است که به صورت‌های مختلف در بررسی سمن این افراد خود را نشان می‌دهد. این موارد شامل آروسپرمی (عدم وجود اسپرم)، لیگواسپرمی (تعداد کم اسپرم)، استنواسپرمی (کاهش حرکت اسپرم)، تراتواسپرمی (شکل نامناسب اسپرم) می‌باشد.<sup>(۳-۵)</sup> امروزه برای درمان ناباروری به‌طور وسیع از روش‌های کمک باروری استفاده می‌شود و انجماد اسپرم انسان یکی از مواردی است که به‌خصوص

ناباروری در ۱۵ تا ۲۰ درصد زوج‌هایی که قصد بچه‌دار شدن دارند، مشاهده می‌گردد.<sup>(۱)</sup> ۵۰ درصد موارد ناباروری مربوط به ناباروری مردان می‌باشد. اسپرماتوژنزیس ناقص بیش‌ترین موردی است که در ناباروری مردان مشاهده شده و گفته می‌شود ۱۵ تا ۳۰ درصد ناباروری مردان مربوط به عوامل ژنتیکی می‌باشد که شامل ریزحذف بازوی بلند کروموزوم Y، ناهنجاری‌های کروموزومی و جهش‌های تک ژنی است.<sup>(۲)</sup> یکی از موارد مهم در

میان گلیکوزیدهای کاروتنوئیدی محلول در آب، کروسین اهمیت بیش تری دارد.<sup>(۱۵)</sup> پیکروکروسینوس افرانال عامل طعم، عطر و خاصیت آنتی اکسیدانی زعفران است. عصاره زعفران، کروسینوس افرانال مانع عمل بی رنگ کنندگی رادیکال ها می شود و مقدار آن در عصاره الکلی زعفران نسبت به عصاره آبی آن بیش تر است.<sup>(۱۶)</sup> با توجه به این که در سطح بالینی انجام اسپرم یکی از روش های دخیل در کمک باروری است، ولی از طرفی عاملی در ایجاد رادیکال آزاد و آسیب به اسپرم نیز می باشد. با توجه به این که نقش زعفران به عنوان یک ماده طبیعی و در دسترس آنتی اکسیدان به خوبی نشان داده شده است، هدف از انجام این مطالعه، تعیین نقش زعفران به عنوان یک ماده آنتی اکسیدان بر شاخص های مختلف اسپرم افراد با اسپرم طبیعی پس از پدیده انجماد و ذوب می باشد.

### \* مواد و روش ها:

مطالعه حاضر، مطالعه ای مورد- شاهدهی است که در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد IR.QUMS.REC.1394.215 مورد تأیید قرار گرفت. جمعیت مورد مطالعه، ۴۲ نفر با شاخص های اسپرم نرمال که جهت اقدامات تشخیصی و درمانی به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی قزوین در سال ۱۳۹۴ مراجعه کرده بودند. معیار ورود در این مطالعه، مردان مراجعه کننده به مرکز ناباروری با اسپرماتوزنیز نرمال که مشکل ناباروری مربوط به همسرانشان بود و معیار خروج از مطالعه، دوری از مقاربت به مدت ۳ تا ۷ شبانه روز، عدم سابقه مصرف سیگار، مواد مخدر، الکل، نداشتن پرتودرمانی، شیمی درمانی، مصرف آنتی بیوتیک و عکس برداری در یک ماه آخر بود. از این افراد نمونه مایع سمن گرفته شد. پس از تهیه نمونه به روش استمنا، نمونه در داخل ظرف پلاستیکی درپوش دار ریخته شده و داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا پس از ۳۰ تا ۴۰ دقیقه نمونه از حالت سل - ژل به مایع تبدیل شود. نمونه های مایع سمن هر نفر به ۲ گروه شاهد (بدون عصاره زعفران)

در مورد افراد سرطانی قبل از انجام شیمی درمانی به منظور نگره داری اسپرم این افراد استفاده می گردد. در برخی از مراکز ناباروری بانک نگره داری اسپرم به منظور اهداء اسپرم به افرادی که مشکلات اسپرماتوزنیز دارند وجود دارد. غشای اسپرم در بسیاری از عملکردهای آن مثل متابولیسم، تحرک، غلظت و واکنش های آکروزومی نقش دارد. از این رو انجام منجر به آسیب هایی مانند تنش اکسیداتیو، تنش اسموتیک، تشکیل کریستال های یخ داخل سلولی و تخریب عملکرد غشای پلاسمایی و تخریب اندامک های داخل سلولی می شود.<sup>(۶)</sup>

یکی از دلایل مهم تنش اکسیداتیو، حاصل عدم توازن میان تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و دفاع آنتی اکسیدان بدن می باشد که در شرایط پاتولوژیک موجب ایجاد مرگ سلول های جنسی، اختلال در عملکرد سلول های سرتولی و لیدیگ و اختلال در اسپرماتوزنیز می شود.<sup>(۶-۸)</sup> در مطالعه های صورت گرفته وجود سطوح بالایی از رادیکال آزاد در مایع سمن ۸۰ درصد از بیماران نابارور گزارش شده است.<sup>(۹)</sup> رادیکال های آزاد اکسیژن عوامل اکسیدکننده بسیار فعالی هستند که آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال های هیدروکسیلاز، مهم ترین آن ها در زیست شناسی تولید مثل به حساب می آیند.<sup>(۱۱،۱۰)</sup> از بین سلول های تولیدکننده رادیکال آزاد اکسیژن لکوسیت های مایع سمن واسپرم غیر طبیعی منابع اصلی در انزال انسان هستند.<sup>(۱۲)</sup> عوامل محافظتی در برابر رادیکال آزاد، مانند آنتی اکسیدان ها می توانند معرف های درمانی مفیدی برای ناباروری مردان باشند.<sup>(۱۳)</sup>

مکانیسم های متفاوتی برای مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب های ناشی از رادیکال آزاد اکسیژن وجود دارد که یکی از آن ها سیستم آنتی اکسیدان است. آنتی اکسیدان ها به عنوان پاکسازی کننده رادیکال های آزاد، اسپرم را در برابر گونه های فعال اکسیژن محافظت می کنند.<sup>(۱۴)</sup> رنگ دانه های موجود در کلاله زعفران از گروه کاروتنوئیدهای دارای عامل کربوکسیل است. از

میکروسکوپ حرکت اسپرم‌ها براساس معیار WHO مورد بررسی قرار گرفت.<sup>(۱۸)</sup> براساس این معیار حرکت اسپرم‌ها به ۴ دسته تقسیم شد: A- حرکت سریع و جلورونده B- حرکت آرام و درجا C- بدون حرکت جلورونده D- بدون حرکت. به منظور بررسی تحرک اسپرم‌ها میانگین دو حرکت A+B مورد بررسی قرار گرفت.

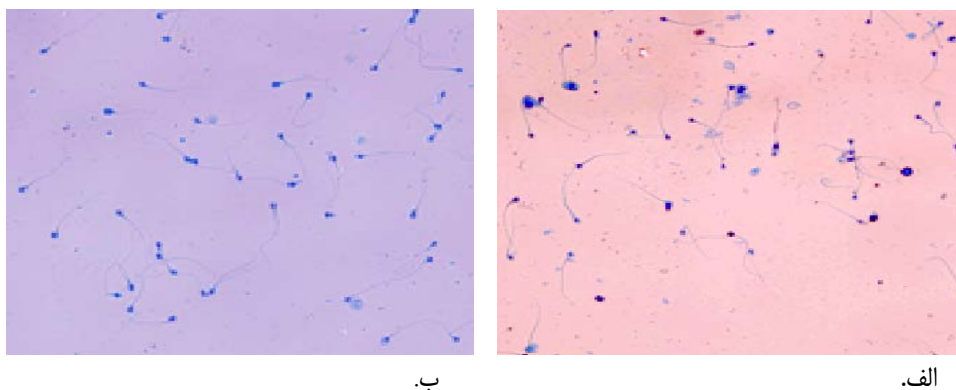
به‌منظور بررسی شکل اسپرم از رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو استفاده گردید. در این رنگ‌آمیزی، سر در ناحیه آکروزوم به رنگ آبی روشن و ناحیه پشت آکروزوم به رنگ آبی تیره و قطعه گردن اسپرم ممکن است کمی قرمز و دم آن به رنگ آبی و بقایای سیتوپلاسمی اطراف گردن صورتی شد.<sup>(۱۸)</sup> سپس با استفاده از میکروسکوپ CX31 و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ حداقل ۲۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل شماره ۱).

برای بررسی حیات و زنده بودن اسپرم از رنگ‌آمیزی ائوزین - نکروزین استفاده شد که در آن اساس بر میزان نفوذپذیری رنگ ائوزین - نکروزین به درون غشای سلولی که آسیب‌دیده است و عدم نفوذ رنگ به درون غشای سلولی سالم می‌باشد. اگر سر اسپرم به رنگ قرمز و یا صورتی تیره دربیاید، آن اسپرم مرده محسوب می‌شود و اگر سر آن صورتی روشن و یا سفید شود، زنده تلقی می‌گردد. اگر ناحیه گردن رنگ صورتی به خود بگیرد ولی باقی‌مانده سر رنگ نگیرد نشان‌دهنده مرگ سلولی نیست، سلول مذکور زنده است و این حالت نشان‌دهنده نشت غشا در قسمت گردن آن است.<sup>(۱۸)</sup> پس از رنگ‌آمیزی از هر نمونه، ۱۰۰ عدد اسپرم با استفاده از میکروسکوپ CX31 و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل شماره ۲).

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS۱۶ و آزمون آماری تی تست زوجی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

و مورد (با عصاره زعفران با غلظت ۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) تقسیم شد. برای تهیه عصاره، ابتدا زعفران به‌صورت پودر تهیه و سپس به کمک حلال اتانول ۱۰ گرم پودر در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درجه با روش ماسراسیون عصاره‌گیری شد.<sup>(۱۶)</sup> سپس نمونه‌ها در تانک نیتروژن با استفاده از روش انجماد سریع فریز شدند. بدین منظور نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۱ با محیط ضد یخ (Global, USA) مخلوط شده و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت یک ساعت دیگر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در نهایت به نیتروژن مایع انتقال داده شدند. دو هفته بعد نمونه‌ها از تانک نیتروژن خارج شده و برای ذوب شدن حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب ۳۷ درجه قرار داده شدند. پس از ذوب شدن محیط ضد انجمادی و دیگر قسمت‌های مایع سمن از اسپرم‌ها جدا شدند. پس از حذف مایع رویی به پلت (رسوب) باقی‌مانده ۲ میلی‌لیتر محیط Hams-F10 اضافه و آن را مخلوط کرده و جهت بررسی حرکت، شکل، غلظت و زنده ماندن بررسی شدند.

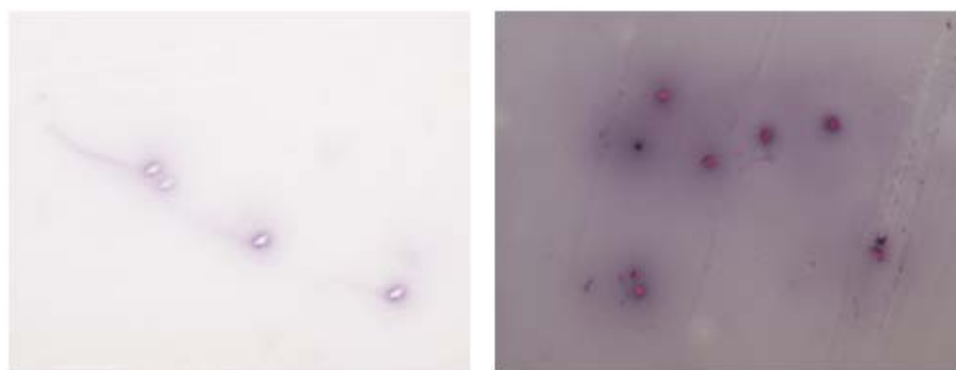
برای شمارش تعداد اسپرم‌ها از لام نتوبار استفاده گردید. در این لام دو قسمت برای شمارش وجود دارد و در هر قسمت یک مربع بزرگ ۳×۳ میلی‌متر روی لام حک شده است و این مربع بزرگ به ۹ مربع کوچک‌تر ۱×۱ میلی‌متر تقسیم شده است. لام نتوبار با لامل مخصوصی پوشانده شد که وقتی روی لام گذاشته می‌شود عمقی برابر ۰/۱ میلی‌متر ایجاد کند. مایع منی به نسبت ۱:۲ رقیق و همه مربع‌ها (۱ تا ۹) در شمارش منظور گردید. در هنگام شمارش فقط اسپرم‌هایی شمارش شدند که دارای سر و دم بودند (اسپرم کامل). مرز هر کدام از مربع‌های ۹گانه دارای سه خط می‌باشد. در صورتی که سر اسپرم داخل مربع یا روی دو خط داخلی حاشیه آن باشد آن اسپرم در شمارش منظور شد، اما اگر سر اسپرم بیش‌تر روی دو خط خارجی بود در شمارش محسوب نگردید.<sup>(۱۷)</sup> جهت تعیین درصد اسپرم‌های متحرک، یک قطره کوچک از نمونه روی لام قرار گرفت و با بزرگ‌نمایی ۴۰ در زیر درجه‌های مختلف



ب.

الف.

شکل ۱- شکل اسپرم در نمونه‌های مایع سمن بدون زعفران (الف) و در مجاورت زعفران (ب) پس از دو هفته انجماد (رنگ آمیزی پاپانیکولاو، بزرگ‌نمایی ۱۰۰)



ب.

الف.

شکل ۲- مقایسه زنده ماندن اسپرم در نمونه‌های مایع سمن بدون زعفران (الف) و در معرض زعفران (ب) پس از دو هفته انجماد (رنگ آمیزی ائوزین-نکروزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

### \* یافته‌ها:

دارای زعفران ( $55 \pm 3/1$ ) نسبت به نمونه‌های بدون زعفران ( $50/1 \pm 3/4$ ) با این که افزایش یافته بود ولی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ) که این نتیجه بیان‌گر عدم تأثیر زعفران بر روی این شاخص از اسپرم‌ها پس از پدیده ذوب و انجماد است. همچنین درصد حرکت اسپرم‌ها در نمونه‌های دارای زعفران ( $87 \pm 0/45$ ) نسبت به نمونه‌های شاهد ( $62/3 \pm 0/33$ ) افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/001$ ) که بیان‌گر تأثیر زعفران بر روی این شاخص از اسپرم‌ها پس از پدیده ذوب و انجماد است (جدول و نمودار شماره ۱).

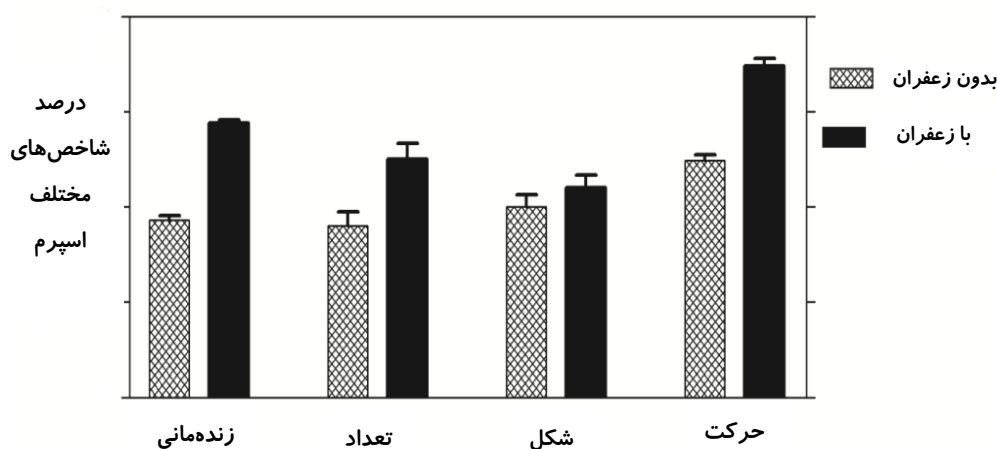
درصد زنده ماندن اسپرم‌ها در نمونه‌های دارای زعفران ( $72 \pm 0/99$ ) نسبت به نمونه‌های بدون زعفران ( $46/6 \pm 1/1$ ) افزایش معنی‌داری را نشان داد که بیان‌گر اثر مثبت زعفران بر روی میزان زنده ماندن بیشتر اسپرم‌ها پس از پدیده انجماد می‌باشد ( $P < 0/001$ ). همچنین میانگین شمارش اسپرم‌ها در نمونه‌های دارای زعفران ( $62/5 \pm 3/8$ ) نسبت به نمونه‌های بدون زعفران ( $45 \pm 4/3$ ) افزایش معنی‌داری نشان داد که بیان‌گر اثر مثبت زعفران بر روی تعداد اسپرم‌ها پس از پدیده ذوب و انجماد می‌باشد ( $P < 0/001$ ).

درحالی که درصد اسپرم‌ها با شکل طبیعی در نمونه‌های

جدول ۱- مقایسه میانگین شاخص‌های اسپرم در دو گروه مورد و شاهد (هر گروه ۴۲ نفر)

سطح معنی‌داری	مورد (حاوی عصاره زعفران ۵۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر)	شاهد (بدون عصاره زعفران)	گروه شاخص اسپرم
<۰/۰۱	۷۲±۰/۹۹	۴۶/۶±۱/۱	درصد زنده ماندن
<۰/۰۱	۶۲/۵±۳/۸	۴۵±۴/۳	میانگین تعداد (۱۰)
>۰/۰۵	۵۵±۳/۱	۵۰/۱±۳/۴	درصد شکل طبیعی
<۰/۰۱	۸۷±۰/۴۵	۶۲/۳±۰/۳۳	درصد تحرک (A+B)

نمودار ۱- مقایسه شاخص‌های مختلف اسپرم در نمونه‌های مایع سمن بدون زعفران (الف) و در معرض زعفران (ب) پس از دو هفته انجماد (رنگ‌آمیزی ائوزین - نکروزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰)



### \*بحث و نتیجه‌گیری:

اثر مواد آنتی‌اکسیدان بر شاخص‌های مختلف اسپرم پس از پدیده انجماد و ذوب در سال ۲۰۱۴ رضائیان و همکاران نشان دادند که استفاده از دوز ۵ میکروگرم در لیتر سلنیوم اثر مطلوبی در تحرک، شکل و غلظت اسپرم (تعداد در میلی‌لیتر) پس از انجماد و ذوب داشت، مخصوصاً این تأثیر بر روی اسپرم‌های شسته شده بیش‌تر از نمونه‌های شسته نشده بود.<sup>(۲۲)</sup> در مورد اثر گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی نیز در یک مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره انار بر شاخص‌های مختلف اسپرم مورد بررسی گرفت. نتایج این گروه نشان داد که این ماده آنتی‌اکسیدان بیش‌ترین تأثیر را بر روی میزان حرکت و حیات اسپرم دارد.<sup>(۲۳)</sup> در سال ۲۰۱۲ فلورین و همکاران نشان دادند که اضافه کردن مکمل ویتامین‌های E و C به محیط فریز باعث افزایش میزان تحرک اسپرم‌ها پس

در این مطالعه اثر مثبت زعفران بر شاخص‌های مختلف اسپرم مانند درصد زنده‌مانی، غلظت و حرکت اسپرم‌ها پس از انجماد نشان داده شد. به‌طور کلی انجماد صرف‌نظر از این‌که از چه روشی استفاده کرده باشیم اثر منفی بر شاخص‌های مختلف اسپرم دارد.<sup>(۲۰،۱۹)</sup> در این زمینه ونگ در سال ۲۰۰۳ یکی از دلایل آسیب‌های سلولی در نتیجه انجماد را تخریب غشای میتوکندری عنوان کرد. با توجه به این‌که یکی از مسیرهای مرگ سلولی از طریق میتوکندری می‌باشد و سیتوکروم C در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد، تنش‌های اکسیداتیو حاصل از انجماد باعث تخریب غشای میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C شده و در نهایت سلول را به سمت مرگ پیش می‌برد. در زمینه اثر انجماد بر کاهش حیات اسپرم‌ها این یک دلیل منطقی می‌تواند باشد.<sup>(۲۱)</sup> در مورد

اسپرم گردید ولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به نظر می‌رسد آسیب‌های تنش اکسیداتیو در پدیده انجماد شدیدتر از تنش اکسیداتیو ایجاد شده در شرایط واریکوسل می‌باشد و مقدار انتخابی زعفران در این تحقیق به منظور بهبود شکل پس از پدیده انجماد کافی نبوده و باید از مقدار بیش‌تری استفاده کرد. مطالعه حاضر نشان داد که عصاره زعفران تأثیر مثبتی بر روی میزان زنده ماندن اسپرم‌ها و همچنین تعداد اسپرم‌ها پس از پدیده ذوب و انجماد حاصل از ذخیره‌سازی اسپرم‌های نرمال که به‌عنوان یک راهکار درمانی در ناباروری آقایان استفاده می‌شود، دارد.

#### \*مراجع:

1. O'Flynn, O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* 2010; 93(1): 1-12. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.045.
2. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22(2): 226-39.
3. Dowsing AT, Yong EL, Clark M, McLachlan RI, de Kretser DM, Trounson AO. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. *Lancet* 1999; 354 (9179): 640-3.
4. Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, Lin L, Sebire NJ, Montjean D, Bignon-Topalovic J, et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am J Hum Genet* 2010; 87(4): 505-12. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.09.009.
5. Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev* 2008; 29(5): 560-80. doi: 10.1210/er.2007-0042.

از ذوب می‌شود. آن‌ها توجیه نمودند که ویتامین E باعث شکست پیوندهای کووالانسی شده و ویتامین C در مهار رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده نقش دارد.<sup>(۲۴)</sup>

در راستای مطالعه‌های قبلی، در این مطالعه نیز افزایش معنی‌داری در درصد زنده ماندن، تعداد و حرکت اسپرم‌ها تحت تأثیر عصاره زعفران به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان مشاهده گردید. در مطالعه ساپانیدوا و همکاران (۲۰۱۵) نیز اثر آنتی‌اکسیدانی کروسین بر میزان زنده ماندن و تحرک اسپرم‌ها نشان داده شد.<sup>(۲۵)</sup> در دو تحقیق ضریبی و همکاران (۲۰۱۰) و عمیدی و همکاران (۲۰۱۵) که به‌ترتیب به بررسی اثر پدیده انجماد و ذوب بر روی شاخص‌های مختلف اسپرم و اثر عصاره زعفران بر شاخص‌های اسپرم موش مبتلا به واریکوسل پرداختند، بیان‌گر افزایش زنده ماندن و تحرک اسپرم‌ها بود.<sup>(۲۶ و ۲۷)</sup> در زمینه مکانیسم تأثیر عصاره زعفران بر روی میزان حرکت اسپرم‌ها، تارانتیلیس نشان داد که رنگ‌دانه‌های موجود در کلاله زعفران از گروه بتاکاروتنوئیدهای دارای عامل کربوکسیل می‌باشند که یکی از رنگ‌دانه‌های محلول در چربی آن بتاکاروتن است. این مولکول قادر است با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن واسطه‌ای از ادامه اکسیداسیون مولکول‌های دیگر جلوگیری نماید و انرژی لازم برای حرکت فراهم گردد.<sup>(۲۸)</sup>

در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین شکل اسپرم‌ها در دو گروه مورد و شاهد مشاهده نشد. شکل اسپرم نشان‌دهنده چگونگی وضعیت لوله‌های منی‌ساز می‌باشد. تغییرات دژنراتیو لوله‌های اپی‌تلیوم تأثیر منفی بر شاخص‌های اسپرم دارد.<sup>(۲۹)</sup>

در مطالعه سبحانی و همکاران (۲۰۱۵) که به بررسی اثر مواد آنتی‌اکسیدان بر شاخص‌های مختلف اسپرم پرداخته بودند، تفاوت معنی‌داری بین شکل دو گروه مورد و شاهد بیان کردند که با مطالعه حاضر مغایرت داشت.<sup>(۳۰)</sup> در این مطالعه، برخلاف مطالعه عمیدی و همکاران که در آن تأثیر مثبت زعفران بر شکل اسپرم نشان داده شد،<sup>(۲۷)</sup> با این‌که زعفران باعث بهبود شاخص‌های شکل

6. Redmon JB, Carey P, Pryor JL. Varicocele-the most common cause of male factor infertility? *Hum Reprod Update* 2002; 8(1): 53-8.
7. Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999; 140(4): 1709-17.
8. Mehraban D, Ansari M, Keyhan H, Sedighi Gilani M, Naderi G, Esfehiani F. Comparison of nitric oxide concentration in seminal fluid between infertile patients with and without varicocele and normal fertile men. *Urol J* 2009; 2(2): 106-10.
9. Assimopoulou AZ, Sinakos Z, Papageorgiou V. Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res* 2005; 19(11): 997-1000.
10. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl* 2003; 5(3): 231-42.
11. Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Turkoz Y, Soyulu A, Ilbey YO, et al. Comparison of antioxidant enzyme activity in the internal spermatic vein and brachial veins of patients with infertile varicocele. *Int Urol Nephrol* 2008; 40(3): 679-83. doi: 10.1007/s11255-008-9339-6.
12. Kumar R, Venkatesh S, Kumar M, Tanwar M, Shasmsi MB, Kumar R, et al. Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46(2): 172-7.
13. Martin-Du Pan RC, Sakkas D. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? *Hum Reprod* 1998; 13(11): 2984-5.
14. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29(4): 817-27.
15. Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A* 1994; 664(1): 55-61.
16. Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. *Crocus sativus* L. (Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Evid Based Complement Alternat Med* 2009; 6(3): 343-50. doi: 10.1093/ecam/nem125.
17. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI risk science institute expert working group on sperm evaluation. *Reprod Toxicol* 1996; 10(3): 237-44.
18. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: WHO Press; 2010.
19. Üstüren B, Zekariya NUR, Alcay S, Toker MB, Sagirkaya H, Kemal Soyulu M. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. *Turk J Vet Anim Sci* 2015; 39: 110-4.
20. Oberoi B, Kumar S, Talwar P. Study of human sperm motility post cryopreservation. *Med J Armed Forces India* 2014; 70(4): 349-



53. doi: 10.1016/j.mjafi.2014.09.006.
21. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 80(3): 531-5.
22. Nasri S, Amidi F, Rezaeian Z. Effect of Selenium on the motility, morphology and viability of sperm cells after freezing and thawing procedure. *J Qazvin Univ Med Sci* 2014; 18(1): 11-7. [In Persian]
23. Amini Rad O, Khalili A, Soltani HR, Faramarzi G, et al. Influence of pomegranate juice on sperm parameters and fertility in mice. *J Hormozgan Univ Med Sci* 2009; 13: 183-7. [In Persian]
24. Florin V, Ghioro L, Roman I, et al. Antioxidant medium for mangalitaobor semen cryopreservation. *Bulletin UASVM-CN* 2010; 67(1-2): 445-51.
25. Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, Kourtzelis I, Fletouris D, Theodoridis A, et al. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology* 2015; 84(8): 1273-82. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.005.
26. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 2010; 93(1): 159-66. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.09.038.
27. Amidi F, Ebrahimi S, Abbasi M, Yazdani M, Ghasemi S. Effects of saffron extract on sperm parameters in rats with experimentally induced varicocele. *J Qazvin Univ Med Sci* 2014; 18(5): 4-11. [In Persian]
28. Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A* 1994; 664(1): 55-61.
29. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Kumar HH, Abhilash K, Bairy KL. Effects of methyl parathion (o, o-dimethyl o-4-nitrophenyl phosphorothioate) on rat sperm morphology and sperm count, but not fertility, are associated with decreased ascorbic acid level in the testis. *Mutat Res* 2005; 588(1): 28-34.
30. Sobhani A, Eftekhaari TE, Shahrzad ME, Natami M, Fallahi S. Antioxidant effects of Brown Algae *Sargassum* on sperm parameters: CONSORT-compliant article. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(52): e1938. doi: 10.1097/MD.0000000000001938.