

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 رضازاده ولوجردی^{۲،*}، مسعود امانلو^۳

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 به عنوان 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 ویژه (CASA)، توان زنده‌مانی با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو، ریخت‌شناسی با به‌کارگیری آزمون پاپانیکولاو، 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 کروماتین A₃ 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: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

Email: mr_valojerdi@modares.ac.ir

۱- مقدمه

انجماد منی انسان یکی از مؤثرترین روش‌های قابل قبول برای حفظ توانایی تولیدمثل مردان است [۱]. به همین 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 [۳-۶]. 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 آنتی اکسیدانی بسیار کمی وجود دارد، استرس اکسیداتیو در اسپرماتوزوا سبب ناباروری مردان می‌شود. بنابراین ضروری است که برای جبران کمبود سپر دفاعی، آنتی اکسیدان‌های خارجی به اسپرم افزوده شود [۱۱، ۱۲]. اگرچه اعمال آنتی اکسیدان‌ها 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 (H_2O_2 : Hydrogen Peroxide) و... اشاره نمود [۱۳].

سمینال پلاسما (Seminal Plasma) مترشح 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 [۱۴، ۱۵]. اما طی پردازش مایع منی، سمینال پلاسما برداشته می‌شود و به همین دلیل حساسیت اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد [۱۶]. 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 آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدان با دوز ۲۵ و ۵۰ میلی مولار 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 پژوهشگاه رویان، پس از ۳ الی ۴ روز خودداری از مقاربت و با رضایت کامل مبنی بر آزمایش‌های تجربی، جمع‌آوری شد. نمونه این افراد به دنبال 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: Kruger Criteria) (ریخت‌شناسی اسپرم) و معیار کروگر (WHO) (Sperm Motility) $\leq 50\%$ (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 به صورت تازه (Fresh) تجزیه و تحلیل شد و در معرض آنتی اکسیدان قرار نگرفت. ۲- نمونه‌ای از اسپرم‌ها به صورت تازه پس از شستشو با غلظت غیرمتوالی ماده

جدا کننده سلولی (Allgrad) تجزیه و تحلیل شد و در معرض آنتی‌اکسیدان قرار نگرفت (گروه آلگريد). ۳- نمونه‌ای از اسپرم‌ها که فقط با محیط انجماد (Human Sperm HSPM Preservation Medium) (بدون آنتی‌اکسیدان) مخلوط شد (گروه کنترل انجماد). ۴- نمونه‌ای از اسپرم‌ها که در معرض دوز ۲۵ میلی‌مولار تائورین به همراه محیط انجماد قرار گرفت.

۵- نمونه‌ای از اسپرم‌ها که در معرض دوز ۵۰ میلی‌مولار تائورین به همراه 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)	۰/۴	۵/۳۷
کلرید منیزیم ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	۰/۱	۰/۴۹
فسفات دی هیدروژن سدیم ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)	۰/۰۵	۰/۳۲
کلرید کلسیم ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	۰/۴	۲/۷۲
کربنات هیدروژن سدیم ($NaHCO_3$)	۲/۶ (در هر گرم)	۳۰/۹۵
محلول لاکتات سدیم (Sodium Lactate Syrup) (۷۰-۷۲ درصد)	۲/۶۶ (در هر میلی‌لیتر)	۱۲/۸۶
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)	۴/۰	-
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 پروکسی‌نیتريت (Proxinitrit Radical: ONOO⁻), بررسی میزان سوپرکسید اکسیژن (Superoxide Anion Radical: $O_2^{\cdot-}$), بررسی میزان قطعه‌قطعه 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 آلگريد گراדיانت (Density Gradient Allgrad) ۸۰ درصد (۲ میلی‌لیتر) و ۴۰ درصد (۲ میلی‌لیتر) قرار گرفت و به مدت 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 پپت جمع‌آوری نموده، با محیط کشت Ham's F10 دارای آلبومین انسانی، ۲ بار به مدت 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 20×10^6 رسانده شد.

۲-۳- روش انجماد- ذوب

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

پس از گذشت ۲ هفته، اسپرم‌ها طبق روش زیر ذوب شدند. به مدت 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 ۴ استفاده شد و در نهایت با دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، اسپرم‌ها با محیط Ham's F10 ترکیب شدند تا دوباره به حجم 20×10^6 برسند.

۲-۴- روش‌های تجزیه و تحلیل اسپرم

۲-۴-۱- 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 (CASA- Computer Assisted-Semen Analysis) استفاده شد.

۲-۴-۲- روش بررسی ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی اسپرم

درصد ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولاو (Papanicolaou) تعیین شد. پس از تهیه اسمیر، لام مورد نظر در الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه تثبیت و سپس در آب شستشو داده شد. در ادامه با

محلول رنگ همتوکسیلین هاریسن (Harris Hematoxylin) به مدت ۱۰ ثانیه رنگ‌آمیزی و پس از شستشو در آب، از اسید الکل به مدت ۵ ثانیه عبور داده شد. عبور از الکل اتانول ۹۶ درصد به مدت ۲۰ ثانیه، رنگ‌آمیزی با اورانژ ۶ (Orange-6: OG6) به مدت ۱۲ ثانیه، عبور از الکل اتانول ۹۶ درصد به مدت ۲۰ ثانیه، سپس رنگ‌آمیزی با ائوزین آزو (Azo-Eosin) به مدت ۲ ثانیه، عبور از الکل اتانول ۹۶ درصد به مدت ۲۰ ثانیه و عبور از الکل اتانول ۱۰۰ درصد به مدت ۲۰ ثانیه جزء مراحل بعدی رنگ‌آمیزی بود.

۲-۴-۳- تعیین درصد اسپرم‌های زنده

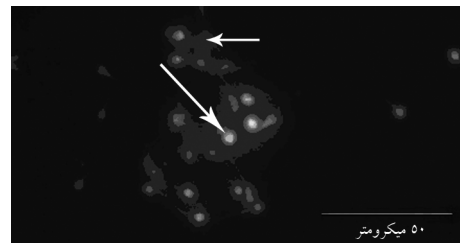
در این تحقیق از رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلو (Trypan Blue) استفاده شد. حجم مساوی (۱۰۰ میکرولیتر) از نمونه اسپرم و رنگ تریپان بلو را با هم در یک لوله آزمایش مخلوط و پس از گذشت ۵-۱۰ دقیقه، اسمیر تهیه شده از آن با بزرگنمایی ۴۰۰ ارزیابی شد. اگر اسپرم در زمان رنگ‌آمیزی زنده باشد، رنگ تریپان بلو را به خود نمی‌گیرد در نتیجه قسمت سر و تنه آن رنگ و حالت روشن‌تری دارد (سفید براق).

۲-۴-۴- بررسی کمبود نقص پروتامین

در این بررسی از روش رنگ‌آمیزی کرومایسین A_3 (Cromacyne 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 ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تثبیت شدند. پس از تهیه دو اسمیر و خشک شدن آن‌ها، توسط ۶۰-۱۰۰ میکرولیتر محلول کرومایسین A_3 (با غلظت ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر مک‌الوین (Mc-Elvin's Buffer) حاوی کلرید منیزیم ۱۰ میلی‌مولار) به مدت 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

واسرشت کننده (Denaturing Acid) (HCl ۰/۰۸ نرمال) تازه بود به مدت 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 به مدت 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 به ترتیب حاوی الکل ۷۰ درصد، ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد بود هرکدام به مدت ۲ دقیقه قرار داده و بعد از خشک شدن لام در مجاورت هوا در نهایت آن را به مدت ۵ دقیقه در رنگ راییت (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 به نظر آید، بدون هاله (Without Halo) و اگر سر اسپرم به صورت متراکم و رنگ آن کاملاً صورتی باشد، تجزیه شده (Degraded) در نظر گرفته شدند (شکل ۲).

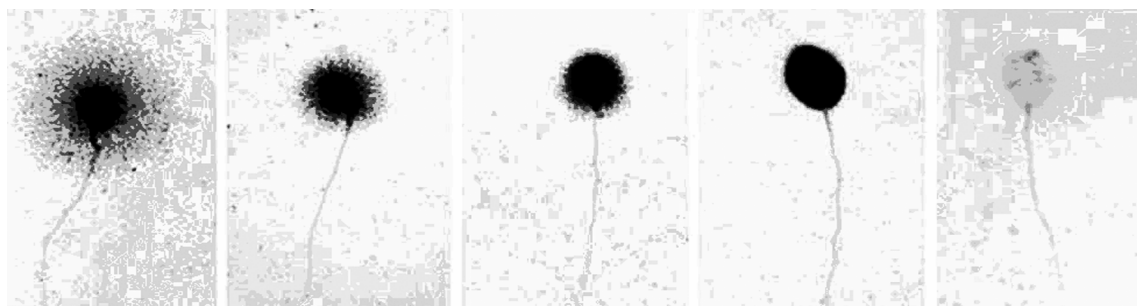
بزرگنمایی ۱۰۰× مشاهده و شمارش شد. درصد اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان به عنوان CMA_3^+ (اسپرم‌هایی هستند که کمبود نقص پروتئین دارند) بررسی و ثبت شد (شکل ۱).



شکل ۱ رنگ‌آمیزی CMA_3 : فلش کوتاه: CMA_3^- , فلش بزرگ: CMA_3^+

۲-۴-۵- بررسی قطعه قطعه شدن DNA

برای بررسی قطعه قطعه شدن DNA از روش SCD (Sperm Chromatin Dispersion 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 به مدت ۴ 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



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

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 به دست آمد. شاخص قطعه قطعه شدن DNA = درصد هاله کوچک + درصد بدون هاله + درصد تجزیه شده

۲-۴-۶- بررسی رادیکال آزاد O_2^-

از کلرونیتروبنزدیازول (7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: NBD-Cl) به عنوان 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 ۴۷۰ نانومتر و انتشار طول موج ۵۵۰ نانومتر قابل مشاهده است. به همین منظور ویال اسپرم منجمد شده در دمای اتاق قرار گرفت تا ذوب شود. سپس ۱ میلی لیتر NBD-Cl با ۲ میلی لیتر از استونیتریل (Acetonitril) (به عنوان حلال) ترکیب شد، که این محلول به صورت استوک بوده و در تاریکی به مدت طولانی قابل استفاده است. روزانه ۱۰۰ میکرومول از محلول را با ۲ میلی لیتر اسپرم مخلوط و بلافاصله با اسپکتروفلورومتر رادیکال آزاد O_2^- بررسی شد [۲۳].

۲-۴-۷- تعیین سطح ONOO

برای اندازه گیری سطح ONOO از ۲، ۷ دی کلروفلورسین دی استات (2,7-dichlorofluorescein-diacetate: DCFH-DA) و روش اسپکتروفلورومتری (Spectrofluorometry) استفاده شد. برای ارزیابی سطح ONOO نمونه های اسپرم هر فرد با فسفات بافر سالین (Phosphate Buffered Saline: PBS) (۲۰ میلی مول، pH=۷/۴) به 5×10^6 در هر میلی لیتر رسانده و سپس به دو قسمت تقسیم و در ۸۰- درجه سانتی گراد در لوله استریل ذخیره شد. اساساً محصولات ONOO توسط روش فلورومتری (Fluorimetric Assay) (2,7-dichlorofluorescein) تعیین می شود. (5,6- DCFDA)

(Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate) یک رنگ غیرفلورسنت و قابل نفوذ به غشا است که در بین سیتوپلاسم اسپرم توسط استرازاها به اسیدهای آزاد و DCFH هیدرولیز می شود. ONOO، DCFH را به یک رنگ فلورسنت قوی اکسید می نماید. در این بررسی DCFDA-free با مخلوط کردن ۰/۰۵ میلی لیتر از DCFDA ۱۰ میلی مولار در هر لیتر با ۲ میلی لیتر از NaOH ۰/۰۱ نرمال در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه تهیه شد. سپس مخلوط با ۱۸/۰ میلی لیتر از PBS ۲۵ میلی مولار در هر لیتر (pH=۷/۴) ختنی شد، البته این محلول در محیط تاریک و در یخ برای مدت طولانی قابل نگهداری است. نمونه های اسپرمی که تحت DCFDA قرار گرفت در بافر NO با ۱۰۰ میکرولیتر L-آرژنین در اتاق تاریک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد، سپس مخلوط با PBS در pH=۷/۴ شستشو داده شد و بعد از آن به مدت ۲ دقیقه در $214 \times g$ سانتریفوژ و سرانجام فلورسنسی محلول رویی (Supernatant Fluorescence) آن با اسپکتروفلورومتر و با تابیدن طول موج ۴۷۵ نانومتر و انتشار طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه گیری شد [۲۴].

۲-۴-۸- بررسی رادیکال آزاد H_2O_2

غلظت H_2O_2 در مایع منی با استفاده از DCFH-DA به روش اسپکتروفلورومتری اندازه گیری شد: محلول DCFH-DA به وسیله مخلوط کردن ۰/۵ میلی لیتر از DCFH-DA ۱ میلی مولار در متانول با ۲ میلی لیتر NaOH ۱۰ میلی مولار در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه آماده شد. سپس pH مخلوط فوق توسط ۱۰ میلی لیتر از $NaOHPO_4$ ۲۵ میلی مولار به ۷/۴ 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) 1×10^3 آماده شد و محلول استوک در هر آزمایش به غلظت لازم با رقیق کردن در سرم گاوی (Bovine Serum Albumin: BSA) آماده شد

تعداد 5×10^6 در هر میلی‌لیتر اسپرم در PBS شسته شد و سپس به محلول استوک DCFH-DA منتقل و به مدت 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 به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار گزارش شده است. برای مقایسه 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 (Akaike AIC Information Criteria) مدل همبستگی بدون ساختار (Unstructured) انتخاب شد (کمترین مقدار AIC را داشت).

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 ($P < 0.05$) داشته که این میزان نسبت به گروه آلوگريد 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 ($\pm$ خطای معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	آلوگريد (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
تحرک پیش‌رونده (کلاس A) (درصد)	۲۴/۴۵۰±۰/۴۴۱	۳۱/۰۸۸±۰/۳۹۷ ^a	۱۳/۷۵۰±۰/۴۳۳ ^{ab}	۱۷/۰۴۴±۰/۵۷۳ ^{abc}	۱۵/۵۹۹±۰/۷۵۰ ^{abc}
تحرک (کلاس B) (درصد)	۵۰/۵۵۸±۰/۵۶۶	۶۱/۹۱۸±۰/۲۴۵ ^a	۲۷/۶۷۵±۰/۵۸۳ ^{ab}	۲۹/۲۹۱±۰/۰۸۵ ^{ab}	۲۸/۱۱۰±۰/۱۳۳ ^{ab}
تحرک (کلاس B+A) (درصد)	۷۵/۱۳۳±۰/۸۰۵	۹۲/۹۰۸±۰/۳۴۷ ^a	۴۱/۴۲۰±۰/۶۶۱ ^{ab}	۴۵/۷۸۲±۰/۲۴۵ ^{abc}	۴۳/۷۴۹±۱/۵۸۱ ^{ab}
تحرک (کلاس C) (درصد)	۱۶/۷۴۰±۰/۶۸۰	۳/۰۷۰±۰/۲۱۳ ^a	۳/۹۱۵±۰/۳۱۶ ^{ab}	۴/۶۷۵±۰/۴۵۶ ^{ab}	۴/۰۸۲±۰/۵۶۲ ^a
تحرک (کلاس A+B+C) (درصد)	۹۱/۷۲۳±۰/۵۲۳	۹۵/۹۱۰±۰/۲۷۹ ^a	۴۵/۳۴۰±۰/۸۰۳ ^{ab}	۵۲/۰۰۵±۱/۳۳۲ ^{abc}	۴۸/۱۵۶±۱/۶۱۴ ^{abd}
عدم تحرک (کلاس D) (درصد)	۸/۲۷۸±۰/۵۲۳	۴/۰۱۵±۰/۲۷۷ ^a	۵۴/۶۶۰±۰/۸۰۳ ^{ab}	۴۷/۸۸۷±۱/۳۳۳ ^{abc}	۵۲/۰۶۸±۱/۷۵۳ ^{abd}

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

b: اختلاف معنی‌دار با گروه آلوگريد 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

۳-۱- مقایسه میانگین فاکتورهای ریخت شناسی اسپرم‌ها

با توجه به جدول ۲ از مقایسه میانگین فاکتورهای ریخت شناسی طبیعی، مشخص شد که اختلاف دو گروه تازه و آلوگريد با تمام گروه‌ها از نظر آماری معنی دار بوده است. بدین معنی که قبل از انجماد درصد ریخت شناسی طبیعی بیشتر بوده است و هیچ یک از دوزهای اضافه شده تائورین نسبت به گروه کنترل انجماد، تأثیری روی فاکتورهای مورد بررسی ریخت شناسی طبیعی اسپرم‌ها نداشته است. درصد اسپرم‌های با دم کوتاه و دم پیچ خورده در گروه انجماد با تائورین ۲۵ میلی مولار نسبت به گروه کنترل و دیگر گروه‌های دارای

آنتی اکسیدان کاهش یافته است و نتیجه این گونه بود که افزودن تائورین به میزان ۲۵ میلی مولار به محیط کشت انجماد، توانسته میانگین درصد اسپرم‌های غیرطبیعی را کاهش دهد. همچنین در بررسی فاکتور زواید سیتوپلاسمی، مشاهده شد که هنگام استفاده از آلوگريد، اسپرم‌های با زواید سیتوپلاسمی کاهش معنی داری 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 آلوگريد و انجمادی از نظر آماری معنی دار بود ولی در بین خود گروه‌های انجمادی معنی دار نبود.

جدول ۲ مقایسه میانگین فاکتورهای ریخت شناسی اسپرم‌ها ($\pm$ خطای معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	آلوگريد (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی مولار (انجماد)
اسپرم طبیعی (درصد)	۱۹/۴۰۰ $\pm$ ۰/۴۷۷	۲۳/۷۷۵ $\pm$ ۰/۴۷۰ ^a	۱۳/۶۷۵ $\pm$ ۰/۳۷۶ ^{ab}	۱۴/۲۹۵ $\pm$ ۰/۷۲۷ ^{ab}	۱۳/۲۹۲ $\pm$ ۰/۶۶۸ ^{ab}
اسپرم غیرطبیعی (درصد)	۸۰/۷۰۰ $\pm$ ۰/۴۹۹	۷۶/۱۷۵ $\pm$ ۰/۴۷۱ ^a	۸۶/۴۲۵ $\pm$ ۰/۳۶۰ ^{ab}	۸۵/۷۱۸ $\pm$ ۰/۷۴۴ ^{ab}	۸۶/۳۷۶ $\pm$ ۰/۸۶۹ ^{ab}
اسپرم آمورف (Amorph) (درصد)	۷۰/۵۲۵ $\pm$ ۰/۶۷۳	۷۱/۹۵۰ $\pm$ ۰/۵۶۲	۶۹/۴۰۰ $\pm$ ۰/۹۲ ^b	۷۲/۱۰۱ $\pm$ ۰/۵۹۷	۷۰/۵۵۳ $\pm$ ۰/۸۱۸
اسپرم با دم پیچ خورده (درصد)	۳/۴۲۵ $\pm$ ۰/۴۱۶	۱/۷۲۵ $\pm$ ۰/۲۰۳ ^a	۷/۲۷۵ $\pm$ ۰/۵۳۶ ^{ab}	۵/۸۶۰ $\pm$ ۰/۷۸۱ ^{abc}	۶/۷۴۱ $\pm$ ۰/۸۳۵ ^{ab}
اسپرم با دم کوتاه (درصد)	۱/۰۵۰ $\pm$ ۰/۲۰۶	۰/۷۵۰ $\pm$ ۰/۱۳۸	۵/۳۲۵ $\pm$ ۰/۶۵۹ ^{ab}	۲/۸۶۵ $\pm$ ۰/۴۷۱ ^{abc}	۵/۱۳۷ $\pm$ ۰/۷۵۳ ^{abd}
اسپرم با زایده سیتوپلاسمی (درصد)	۲/۸۲۵ $\pm$ ۰/۳۴۹	۰/۹۰۰ $\pm$ ۰/۱۴۷ ^a	۳/۰۵۰ $\pm$ ۰/۳۶۵ ^b	۲/۳۴۷ $\pm$ ۰/۶۶۲	۱/۸۹۱ $\pm$ ۰/۶۲۸

a: اختلاف معنی دار با گروه تازه در سطح معنی داری ۰/۰۵ و در همان سطر

b: اختلاف معنی دار با گروه آلوگريد در سطح معنی داری ۰/۰۵ و در همان سطر

c: اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطح معنی داری ۰/۰۵ و در همان سطر

d: اختلاف معنی دار با گروه تائورین ۲۵ میلی مولار در سطح معنی داری 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 آنتی اکسیدان تائورین توانسته‌اند میانگین قابلیت زنده ماندن را به طور معنی داری افزایش دهند. با توجه به جدول ۳ می‌توان بیان نمود که میانگین درصد کمبود پروتامین اسپرم‌ها پس از انجماد به طور معنی داری

افزایش یافته است، اما دوز ۲۵ میلی مولار تائورین توانسته است این کمبود را رفع نماید.

۳-۳- مقایسه میانگین درصد فاکتورهای قطعه

قطعه شدن DNA

طبق جدول ۴ به طور مجزا فاکتورهای مربوط به قطعه قطعه شدن DNA بررسی شد و در نهایت با محاسبه DFI، نتیجه گیری شد که میزان قطعه قطعه شدن DNA پس از انجماد

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 مقایسه اختلاف میانگین درصد قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها و کمبود پروتامین ($\pm$ انحراف معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	آلگريد (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
قابلیت زنده‌مانی (درصد)	۹۰/۷۷۵ $\pm$ ۰/۵۶۴	۹۵/۱۲۵ $\pm$ ۰/۳۱۷ ^a	۶۴/۰۵۰ $\pm$ ۰/۰۶۷ ^{ab}	۶۵/۳۱۳ $\pm$ ۲/۶۹۲ ^{abc}	۶۶/۱۵۵ $\pm$ ۲/۰۹۲ ^{abc}
کمبود پروتامین (درصد)	۳۳/۶۰۰ $\pm$ ۰/۷۵۱	۲۸/۶۷۵ $\pm$ ۰/۶۹۶ ^a	۵۳/۴۰۰ $\pm$ ۱/۸۲۳ ^{ab}	۴۹/۰۲۳ $\pm$ ۲/۲۰۰ ^{abc}	۵۱/۵۸۸ $\pm$ ۲/۵۶۱ ^{ab}

a: اختلاف معنی‌دار با گروه تازه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
b: اختلاف معنی‌دار با گروه آلگريد 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 ۴ مقایسه میانگین درصد فاکتورهای قطعه قطعه شدن DNA ($\pm$ خطای معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	آلگريد (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
هاله بزرگ (درصد)	۲۲/۰۷۵ $\pm$ ۰/۳۹۱	۲۵/۰۰۰ $\pm$ ۰/۲۱۸ ^a	۱۱/۴۲۵ $\pm$ ۰/۲۵۰ ^{ab}	۱۱/۸۳۰ $\pm$ ۰/۳۲۰ ^{ab}	۱۱/۷۳۶ $\pm$ ۰/۳۷۳ ^{ab}
هاله متوسط (درصد)	۴۲/۲۰۰ $\pm$ ۰/۴۷۰	۴۵/۰۷۵ $\pm$ ۰/۴۰۱	۲۲/۷۷۵ $\pm$ ۰/۶۶۳ ^b	۲۲/۲۳۵ $\pm$ ۰/۶۹۱ ^{abc}	۲۱/۹۶۷ $\pm$ ۰/۷۸۱ ^{abc}
هاله کوچک (درصد)	۲۰/۹ $\pm$ ۰/۳۲۶	۱۸/۸۵۰ $\pm$ ۰/۵۴۵	۴۳/۲۷۵ $\pm$ ۰/۸۷۵	۴۴/۰۰۳ $\pm$ ۰/۲۴۹	۵۱/۷۸۵ $\pm$ ۰/۸۷۱
بدون هاله (درصد)	۱۰/۱۵۰ $\pm$ ۰/۴۶۸	۸/۸۰۰ $\pm$ ۰/۴۳۴ ^a	۱۴/۷۲۵ $\pm$ ۰/۵۲۵ ^a	۱۴/۳۲۵ $\pm$ ۰/۵۸۲ ^a	۱۴/۷۵۲ $\pm$ ۰/۶۵۸ ^a
تجزیه شده (درصد)	۴/۴۲۵ $\pm$ ۰/۲۷۸	۲/۵۲۵ $\pm$ ۰/۱۸۴ ^a	۷/۸۰۰ $\pm$ ۰/۳۶۴ ^{ab}	۷/۸۳۶ $\pm$ ۰/۳۸۳ ^{abc}	۸/۱۲۸ $\pm$ ۰/۳۶۷ ^{abc}
DFI	۳۵/۴۷۵ $\pm$ ۰/۶۰۰	۳۰/۱۷۵ $\pm$ ۰/۴۳۷ ^a	۶۵/۸۰۰ $\pm$ ۰/۷۴۴ ^{ab}	۶۶/۱۶۴ $\pm$ ۰/۸۴۶ ^{ab}	۶۶/۴۳۳ $\pm$ ۰/۹۳۲ ^{ab}

a: اختلاف معنی‌دار با گروه تازه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و در همان سطر
b: اختلاف معنی‌دار با گروه آلگريد 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 H_2O_2 ، ONOO^- و O_2^- ($\pm$ خطای معیار) در بین گروه‌های آزمایشی

گروه‌ها	تازه (قبل انجماد)	کنترل (انجماد)	تائورین ۲۵ میلی‌مولار (انجماد)	تائورین ۵۰ میلی‌مولار (انجماد)
ONOO^- (میکرومول)	۴۹/۹۴۰ $\pm$ ۱/۴۷۶	۷۸/۰۵۱ $\pm$ ۱/۳۶۲ ^a	۷۸/۸۹۷ $\pm$ ۱/۶۲۴ ^a	۷۸/۸۴۵ $\pm$ ۲/۳۸۷ ^a
H_2O_2 (میکرومول)	۰/۸۸۴ $\pm$ ۰/۰۲۱	۱/۲۲۳ $\pm$ ۰/۰۲۷ ^a	۱/۱۹۳ $\pm$ ۰/۰۳۶ ^a	۱/۲۲۱ $\pm$ ۰/۰۸۰ ^a
O_2^- (میکرومول)	۲۹/۱۱۵ $\pm$ ۲/۱۰۱	۴۲/۹۸۴ $\pm$ ۲/۸۶۴	۴۰/۰۹۵ $\pm$ ۲/۸۹۹	۳۹/۴۲۴ $\pm$ ۳/۱۴

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

۳-۴- مقایسه میزان H_2O_2 و ONOO^- و O_2^-

میزان H_2O_2 ، ONOO^- و O_2^- به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و هیچ‌یک از گروه‌های دارای آنتی‌اکسیدان نتوانسته میزان ROS

جدول ۵ بیان‌کننده این مطلب است که پس از انجماد

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.

۴- 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 [۲۵]. 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 [۲۶، ۲۷]. نیکلسون (Nicholson) و همکارانش در سال ۲۰۰۰ بیان نمودند که سانتیفرژ 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 [۲۸] 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 [۲۹، ۳۰] که با مطالعه حاضر مطابقت کامل دارد. سمینال 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 [۳۱] حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در مراحل پردازش، میزان آسیب‌های ناشی از ROS را کاهش می‌دهد. در تحقیق حاضر، از روش جداسازی

شیب غلظتی آلوده و از Ham's F10 و HSA استفاده شد. ایتکن (Aitken) و همکارانش (۱۹۹۸) و فاره (Faure) و همکارانش (۲۰۰۴) 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 دی‌آلدهید (Malondialdehyde) را داراست و می‌تواند سبب کاهش میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شود [۲۶، ۳۲].

توئیگ (Twigg) و همکارانش (۱۹۹۸) 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 [۳۳].

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 بدین ترتیب 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 [۳۴]. 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

[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 [۴]. 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 پروتئین داشت. از سوی دیگر، آثار تائورین بر قطعه‌قطعه شدن DNA و همچنین نقص پروتئین هم بررسی شد و مشخص شد که تائورین نتوانست 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 مشارکت‌کننده 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 محافظت‌کننده در برابر پراکسیداتیوها همانند سیستم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز و ردوکتاز در فرایند انجماد-ذوب باشد و در نتیجه با افزودن این آنتی‌اکسیدان تأثیر مثبتی مشاهده نشده است [۴۰]. از آنجایی که این بتا آمینو اسید به‌طور طبیعی در اسپرم انواع گونه‌ها یافت می‌شود [۴۱]، 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، کلرآمینیکل استیل ترانسفراز (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 [۴۲، ۴۳] 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 [۴۴]. 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.

۶- منابع

[1] Hovatta O. Cryobiology of ovarian and

testicular tissue. Best Pract Res Clin Obstet

- Gynaecol 2003; 17(2): 331-42.
- [2] Verheyen G, De Croo I, Tournaye H, Pletinckx 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 cryopreservation 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, Ménéz 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] Ateşahin 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, Ateşahin A, Varışli 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.

- [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 Reprod* 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.

- [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 Reprod* 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 A. Detection 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 sulfinic 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 peroxidation 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, Boscós 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.