بررسی اثر ملاتونین و کورکومین به‌صورت ترکیبی بر کیفیت پارامترهای اسپرم، القاء آپوپتوز و لیپید پراکسیداسیون غشاء در طی فرآیند انجماد اسپرم

مریم زمانی[۱]، دکتر فریبا ظفری[۲]، دکتر فرزاد رجایی[۳]، دکتر امیر فرزام[۲]، زینب خداکرمی[۱]، دکتر امیر حسینی[۲*]

۱. کارشناس ارشد علوم تشریح، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۲. استادیار گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پیشگیری از بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
۳. استاد گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پیشگیری از بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۶ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۶/۰۸

خلاصه

مقدمه: ناباروری اختلالی است که حدود ۱۵٪ زوجین را درگیر می‌کند و ۵۰٪ آن مربوط به جنس مذکر می‌باشد. انجماد اسپرم شامل ذخیره نمونه‌های سیمن در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد در نیتروژن مایع می‌باشد. در طی انجماد، به‌واسطه القاء آپوپتوز از طریق استرس اکسیداتیو، شاخص‌های عملکردی اسپرم آسیب و در نهایت منجر به کاهش باروری می‌گردد. مطالعات فراوانی مبنی بر استفاده از محیط‌های انجماد دارای آنتی‌اکسیدان‌های مکمل جهت محدود کردن آسیب‌های ناشی از انجماد صورت گرفته است. در این مطالعه از ملاتونین و کورکومین به‌صورت ترکیبی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در انجماد اسپرم استفاده شد.

روش‌کار: این مطالعه در سال ۱۴۰۱ بر روی مایع منی ۴۰ مرد دارای اسپرم نرمال در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. برای بررسی تحرک اسپرم از دستگاه CASA، مورفولوژی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین، زنده‌مانی از رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین، یکپارچگی DNA از کیت تانل و اندازه‌گیری MDA از روش واکنش با تیوباربیتوریک اسید و دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۵) و آزمون‌های آنووا، تی وابسته و آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: استفاده از ملاتونین و کورکومین چه به‌صورت جدا و چه به‌صورت ترکیبی در محیط انجماد، تأثیر معنی‌داری بر روی میزان تحرک و بقاء، قطعه قطعه شدن DNA و میزان MDA داشت ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: اضافه کردن کورکومین و ملاتونین به‌صورت ترکیبی به محیط انجماد، تأثیر مثبتی بر پارامترهای اسپرم پس از انجماد خواهد داشت.

کلمات کلیدی: آپوپتوز، فریز اسپرم، کورکومین، ملاتونین

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر امیر حسینی؛ مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. **تلفن:** ۰۲۸-۳۳۳۳۶۰۰۱؛ **پست الکترونیک:** Amirhosseininew1358@gmail.com

مقدمه

در حال حاضر حدود ۱۵٪ زوجین سراسر جهان درگیر ناباروری هستند. بر اساس تعریف سازمان جهانی بهداشت، ناباروری عدم رسیدن به باروری پس از یک سال تلاش متداوم بدون استفاده از وسایل جلوگیری از بارداری و بدون هرگونه مداخله پزشکی تعریف می‌شود. حدود ۵۰٪ علل ناباروری مربوط به مردان می‌باشد. از جمله علل ناباروری در مردان می‌توان الیگواسپرمی، آزواسپرمی، تراتوزواسپرمی و استنوزواسپرمی، واریکوسل، استعمال سیگار و دخانیات، مصرف الکل، چاقی و تماس با مواد سمّی و اشعه را نام برد (۷-۱). امروزه برای درمان ناباروری از روش‌های کمک باروری (ART)[1] استفاده می‌شود که در آن انجماد برای ذخیره طولانی‌مدت اسپرم کاربرد دارد. در روش انجماد اسپرم که اولین بار در سال ۱۹۶۰ معرفی گردید، ذخیره اسپرم در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نیتروژن مایع است که در این دما، سلول هیچ فعالیت بیوشیمیایی قابل تشخیصی نخواهد داشت (۱۰-۸). از کاربردهای دیگر انجماد می‌توان به ذخیره اسپرم قبل از رادیوتراپی و شیمی‌درمانی، وازکتومی، بیماران دیابتی، اختلالات خودایمنی، ذخیره اسپرم اهداءکنندگان برای داشتن زمان کافی جهت غربالگری از نظر ویروس HIV و هپاتیت B و در بیماران آزواسپرمی انسدادی و غیرانسدادی را نام برد. اسپرم به‌دلیل داشتن ۷۰-۵۰ عدد میتوکندری، قادر به تولید رادیکال‌های آزاد فعال اکسیژن (ROS)[2] می‌باشد. سطوح متوسط ROSها برای انجام واکنش‌هایی همچون ظرفیت‌یابی اسپرم، واکنش آکروزومی و پایداری میتوکندری لازم است. همچنین در شرایط طبیعی سمینال پلاسما و اسپرم دارای سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی برای کاهش تولید بیش از حد ROSها می‌باشند. این مکانیسم دفاعی شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مانند سوپراکساید دیسموتاز (SOD)[3] و غیرآنزیمی (ویتامین E) می‌باشد. انجماد اسپرم باعث می‌شود که تولید ROSها افزایش پیدا کند و یا فعالیت این آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش یابد و در نهایت تعادل بین تولید ROS و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم به‌هم می‌خورد که این موجب فعال شدن پروتئین ایکس مرتبط با لنفوم ۲ لنفوسیت‌های بی (BAX)[4] و به‌دنبال آن آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و فعال شدن کاسپازها و در نهایت شروع آپوپتوز و قطعه قطعه شدن DNA می‌گردد. اثر منفی دیگر ROSها، القاء استرس اکسیداتیو است که آن نیز منجر به پراکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و نوکلئوتیدها می‌شود (۱۱، ۱۲). یکی از مشکلات اساسی که پس از القاء استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود، پراکسیداسیون لیپیدی غشاء اسپرم است. مالون دی آلدئید (MDA)[5] و ۴-هیدروکسی نونئال در نتیجه این پدیده تولید می‌شوند که برای سلول به‌ویژه غشاء سلول مخرب می‌باشند. این محصولات با تغییر نفوذپذیری و سیالیت غشاء، باعث آسیب غیرقابل برگشت به حرکت اسپرم، نشت آنزیم‌های داخل سلولی، آسیب DNA و نقایصی در نفوذپذیری اسپرم به اووسیت می‌گردد (۱۵-۱۳). آنتی‌اکسیدان‌های فراوانی به‌عنوان مکمل برای از بین بردن اثرات مخرب ناشی از انجماد پیشنهاد شده است. ملاتونین (N استیل -۵-متوکسی تریپتامین) با نام علمی ایندولامین، یک هورمون عصبی است که از غده پینه‌آل ترشح می‌شود. این هورمون نقش مهمی در تنظیم برخی رویدادهای فیزیولوژیکی مانند ریتم سیرکادین (شبانه‌روزی)، فصل‌های سال و تنظیم دمای بدن را ایفا می‌کند. ملاتونین با داشتن توانایی ضدالتهابی، آنتی‌آپوپتیکی، ضدسرطانی و همچنین حذف و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد همچون آنیون‌های هیدروکسیل، پراکسیل و پروکسی نیترات مورد توجه قرار گرفته است. ملاتونین می‌تواند خود به‌طور غیرمستقیم اثرات تحریکی بر چندین آنزیم آنتی‌اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، ردوکتاز، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز داشته باشد (۱۹-۱۶). کورکومین یا همان زردچوبه با نام علمی curcuma longa دارای عملکردهای بیولوژیکی، دارویی و همچنین دارای فعالیت‌های ضدالتهابی،

[1] Assisted Reproductive Technology
[2] Reactive Oxygen Species
[3] Superoxide Dismutase
[4] Bcl-2-associated X protein
[5] Malondialdehyde

ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین با گروه‌های فنلی و یا متیلن مرکزی آن مرتبط است که باعث مهار و حذف رادیکال های آزاد مانند رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود. کورکومین همچنین باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های داخل سلولی مانند سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز و ... می‌شود (۲۳-۲۰). مطالعات انسانی و حیوانی فراوانی درباره اثرات آنتی‌اکسیدانی ملاتونین و کورکومین بر بهبود کیفیت پارامترهای اسپرم پس از انجماد و ذوب انجام شده است که وابسته به دوز می‌باشند. به‌طور مثال در مطالعه سانتوناستاسو و همکاران (۲۰۲۱)، از کورکومین در دوزهای مختلف استفاده شد که مؤثرترین دوز بر روی پارامترهای اسپرم، دوز ۲۰ میکرومولار بود. همچنین در مطالعه کاراکوس و همکاران (۲۰۲۱) که بر روی ۲۳ فردی که اسپرم‌های نرمالی داشتند، انجام شد، کورکومین باعث بهبود پارامترهای اسپرم پس از ذوب گردید (۲۷-۲۴). از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با اثر توأمان ملاتونین و کورکومین بر روی کیفیت اسپرم انسانی پس از انجماد و ذوب صورت نگرفته است، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ملاتونین و کورکومین به‌صورت ترکیبی بر پارامترهای عملکردی اسپرم شامل بقاء، حرکت، مورفولوژی، شکست DNA و پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء اسپرم انجام شد.

روش‌کار

در این مطالعه تحلیلی مداخله‌ای (تجربی) که در سال ۱۴۰۱ انجام شد، نمونه‌های مایع منی مورد استفاده (۴۰ نمونه) از نمونه‌های اضافی مردان داوطلب مراجعه کننده به آزمایشگاه پاتوهیستولوژی دکتر فرزام تهیه و به آزمایشگاه جنین‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده شد. به تمامی افراد شرکت کننده در مطالعه، برگه‌هایی جهت پر کردن اطلاعات مورد نیاز داده شد و به آنها توصیه شد که مقاربت به‌مدت ۵-۳ شبانه‌روز نداشته باشند.

معیارهای ورود به مطالعه شامل: افراد دارای اسپرم نرمال، سن بالای ۲۰ سال، سن افراد زیر ۶۰ سال، عامل ناباروری زنانه باشد، فاقد بیماری که سلامت فرد را در آینده به مخاطره بیندازد (ایدز، هپاتیت و ...) و معیارهای خروج از مطالعه شامل: استعمال سیگار و اعتیاد به مواد مخدر و مصرف الکل، سابقه بیماری‌های طولانی مدت مانند واریکوسل یا مصرف دارو از جمله آنتی‌اکسیدان بود. در نهایت پس از اخذ رضایت‌نامه از داوطلبین مورد تأیید، نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی درپوش‌دار جمع‌آوری و به‌مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دستگاه انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2-۵٪ انکوبه شده و از حالت ژل تبدیل به حالت مایع شد و به آزمایشگاه جنین‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل گردید. سپس هر نمونه به میزان لازم (۰/۵ سی‌سی) در لوله فالکون ریخته شد و در زیر هود در شرایط استریل محیط واشینگ (origio) و آلبومین ۲۰٪ به‌صورت ۱۰ به ۱ به جهت رقیق شدن اسپرم به نمونه به‌صورت ۱ به ۱ اضافه شد و لوله در دستگاه سانترفیوز با دور ۲۵۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. بعد از عمل سانترفیوژ، اسپرم‌ها به‌صورت پلیت در ته لوله رسوب کردند که لایه رسوب شده حاوی اسپرم‌های سالم بود که در این مرحله، مقداری از مایع رویی لوله دور ریخته شد و باقی‌مانده مایع داخل لوله همراه با پلیت رسوب شده دوباره با تکان دادن لوله مخلوط و مجدداً عمل واشینگ انجام شد و در نهایت این سوسپانسیون به‌دست آمده در زیر هود به چهار گروه تقسیم گردید. ۱- گروه کنترل: به این گروه هیچ آنتی‌اکسیدانی اضافه نشد. ۲-گروه ملاتونین: به این گروه، ملاتونین با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مول اضافه گردید (این غلظت با توجه به مطالعه کریم‌فر و همکاران (۲۰۱۵) تعیین گردید (۲۴). ۳- گروه کورکومین: به این گروه کورکومین با غلظت ۲۰ میکرومول اضافه گردید (این غلظت طبق مطالعه سانتوناستاسو و همکاران (۲۰۲۱) تعیین گردید (۲۵). ۴- گروه ترکیبی ملاتونین - کورکومین: به این گروه ملاتونین با غلظت ۰/۰۱ میلی‌مول و کورکومین ۲۰ میکرومول به‌صورت ترکیبی اضافه شد (برای رقیق کردن آنتی‌اکسیدان‌ها از اتانول ۹۶٪ استفاده شد) و هم حجم نمونه (به همان اندازه حجم نمونه اضافه شد) داخل کرایوتیوب، محیط انجماد (origio) به فاصله هر ۳۰ ثانیه یک قطره اضافه شد. سپس کرایوتیوپ‌ها به‌مدت ۳ دقیقه در محیط آزمایشگاه

تکان داده شدند و سپس به‌مدت ۳ دقیقه در درجه ۵- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس به‌مدت ۱ دقیقه با فورسپس از قبل سرد شده القاء و مجدداً مخلوط به‌مدت ۷ دقیقه در درجه ۵- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس کرایوویال حاوی مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در بخار ازت قرار گرفت و در نهایت کرایوویال همراه با کرایوکن در تانک نیتروژن غوطه‌ور شد. بعد از ۲ هفته کرایوتیوپ‌ها از تانک نیتروژن خارج و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و سپس ۵ دقیقه در ظرف آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و نمونه‌ها ذوب گردیدند. مجدداً نمونه‌ها با محیط شستشوی اسپرم (origio) واشینگ و ریواشینگ شدند و در دستگاه سانترفیوژ با دور ۱۵۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند، سپس پلیت تشکیل شده از اسپرم‌های سالم ته‌نشین شده در کف لوله فالکون آماده آنالیز شدند.

ارزیابی تحرک اسپرم: به میزان ۱۰ لاندا از هر گروه نمونه روی لام‌ها قرار داده شد و لامل روی آن گذاشته شد و لام‌ها برحسب گروه علامت‌گذاری شدند. تحرک اسپرم زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰× با استفاده از دستگاه CASA (آنالیز اسپرم توسط کامپیوتر) بر اساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت (WHO) به‌صورت پیشرونده، غیرپیشرونده و غیرمتحرک مورد بررسی قرار گرفت که در این مطالعه پیشرونده و غیرپیشرونده به‌صورت تحرک کلی در نظر گرفته شد.

ارزیابی مورفولوژی: با استفاده از تهیه اسمیر روی لام با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی مورفولوژی اسپرم، ابتدا لام اسمیر تهیه گردید. بعد از خشک شدن اسمیر تهیه شده با اتانول شستشو داده شد. پس از خشک شدن با رنگ هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردید و زیر میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱).

ارزیابی زنده‌مانی: با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین - نگروزین (هانکوک مدل سیتولوژی و هیستولوژی) مورد بررسی قرار گرفت. ۲۵ میکرولیتر از ائوزین Y ۱٪ با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ذوب شده مخلوط و پس از ۳۰ ثانیه، ۲۵ میکرولیتر از نگروزین ۱۰٪ به این مخلوط اضافه شد و پس از ۳۰ ثانیه از این مخلوط به‌دست آمده ۴ اسمیر بر روی لام‌های علامت‌گذاری شده تهیه گردید. پس از خشک شدن اسمیرها در دمای محیط، تعداد ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× شمارش گردید (شکل ۲).

ارزیابی شکست **DNA** به روش تانل: برای بررسی آسیب وارد شده به DNA از روش تانل با کیت تشخیص مرگ سلولی با فلورسین (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) استفاده شد که برای این کار، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه شسته شده با بافر PBS روی لام تمیز و عاری از چربی به‌صورت اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن با پارا فرمالدهید ۴٪ شستشو داده شده و به‌مدت ۴۵ دقیقه این ماده به‌صورت شناور بر روی اسپرم فیکس شده قرار داده شد. پس از آن هر لام ۳ بار به فاصله هر ۵ دقیقه با بافر PBS1X شستشو داده شد. سپس در یک محفظه مرطوب با پروتئیناز k به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و مجدداً با PBS شسته شد و با H_2O_2 ۳٪ در آب مقطر به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق درمان گردید و دوباره با PBS شستشو داده شد. پس از گذشت یک ساعت روی لام‌ها سدیم سیترات ۰/۱٪ و تریتون ۱۰۰X ریخته شد. سپس مجدداً با بافر PBS1X شستشو داده شد و خشک گردید. آنزیم حاوی دئوکسی نوکلئوتید ترانسفراز به نسبت ۱ به ۱۰ به محیط بافر حاوی نوکلئوتیدهای نشان‌دار در داخل یک میکروتیوپ اضافه شد. سپس این مخلوط آنزیم و بافر بر روی هر لام در محیط تاریک ریخته و به‌مدت نیم ساعت در انکوباتور گذاشته شد. پس از آن هر لام به فاصله هر ۵ دقیقه با بافر PBS1X شستشو داده شد و به تعداد ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ فلوئورسنت با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× شمارش گردید (شکل ۳).

سنجش پراکسیداسیون لیپیدی: میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) تولید شده توسط تست واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBARS) بر اساس روش شرح داده شده توسط روا و همکاران (۱۹۸۹) تعیین شد (۲۸). ۱ میلی‌لیتر از نمونه اسپرم درون لوله فالکون ریخته شده، سپس به‌ترتیب ۱ میلی‌لیتر بوتیلات

هیدروکسی تولوئن (BHT)، ۱ میلی‌لیتر اتیلن دیامین تترا استیک اسید (EDTA) و ۲ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) به نمونه اضافه شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی که فاقد هرگونه مواد درشت بود، برداشته و به درون یک میکروتیوب ریخته شد. سپس ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید (TBA) به آن افزوده شد. سپس در میکروتیوب‌ها کاملاً بسته شده و بعد از انکوباسیون نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه درون حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای محیط نگهداشته شدند تا سرد شوند. سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه حاصل، درون کوت ریخته شد. غلظت MDA موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (VIS مدل ۷۲۰۰ از کمپانی JENWAY انگلستان) در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد.

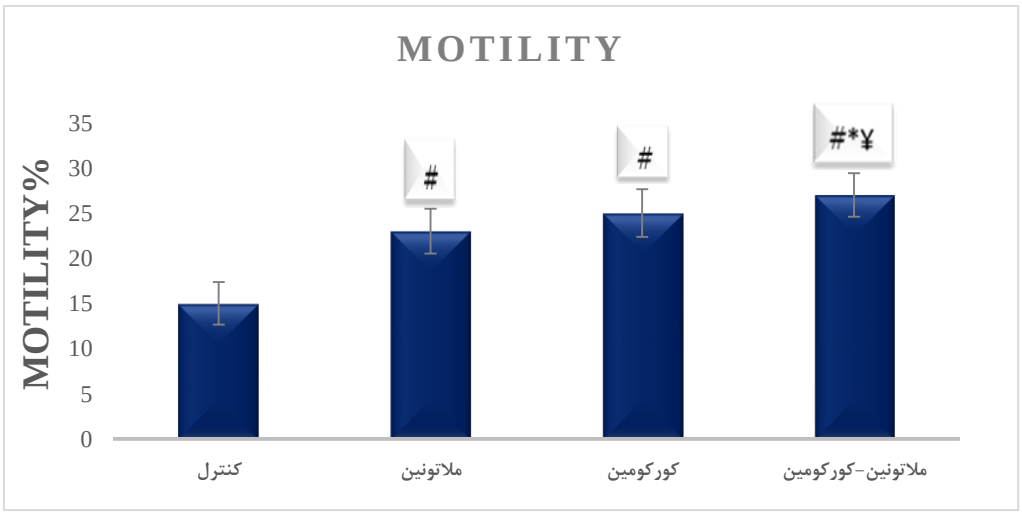
پس از جمع‌آوری اطلاعات و داده‌ها از طریق میکروسکوپ و سایر روش‌های ارزیابی ذکر شده در گروه‌های مورد مطالعه، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۵) و آزمون آنووا انجام شد. جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آماری تی وابسته و آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر افزودن ملاتونین و کورکومین به‌ترتیب با دوزهای ۰/۰۱ میلی‌مولار و ۲۰ میکرومولار به محیط انجماد چه به‌صورت منفرد و چه به‌صورت ترکیبی به میزان چشمگیری تحرک کل و زنده‌مانی را نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($p<0/05$) و همچنین باعث کاهش شکستگی DNA و MDA حاصل از لیپید پراکسیداسیون غشاء اسپرم گردید.

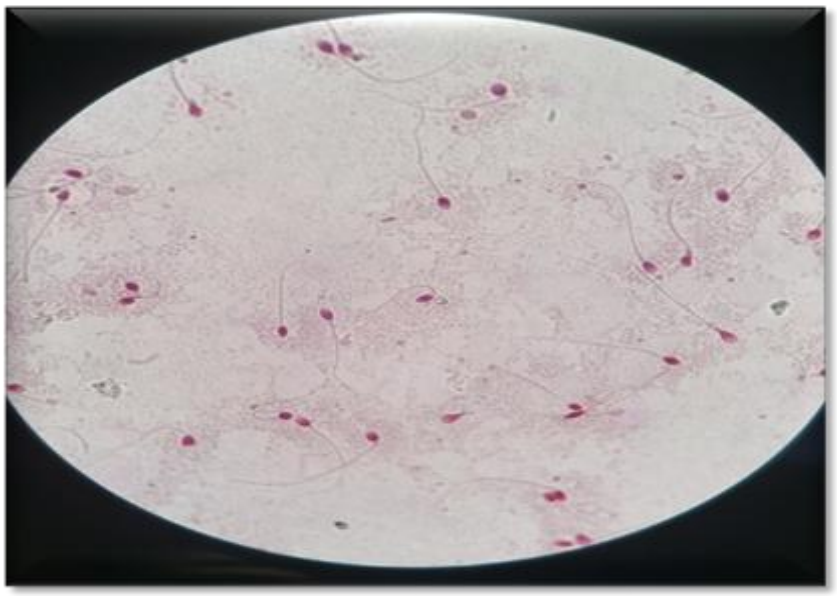
تأثیر ملاتونین و کورکومین بر روی تحرک کل:

داده‌های به‌دست آمده از مطالعه حاضر از طریق آزمون آنووا در مورد تحرک، تفاوت معنی‌داری را بین تمامی گروه‌ها با حجم نمونه هر گروه ۰/۵ سی سی در مقایسه با گروه کنترل و همچنین بین گروه ملاتونین - کورکومین در مقایسه با گروه ملاتونین و گروه کورکومین و گروه کنترل نشان داد ($p<0/05$)، ولی دو گروه ملاتونین و کورکومین در مقایسه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p=0/092$) و تأثیر این دو بر روی تحرک کل تقریباً یکسان بود (نمودار ۱).

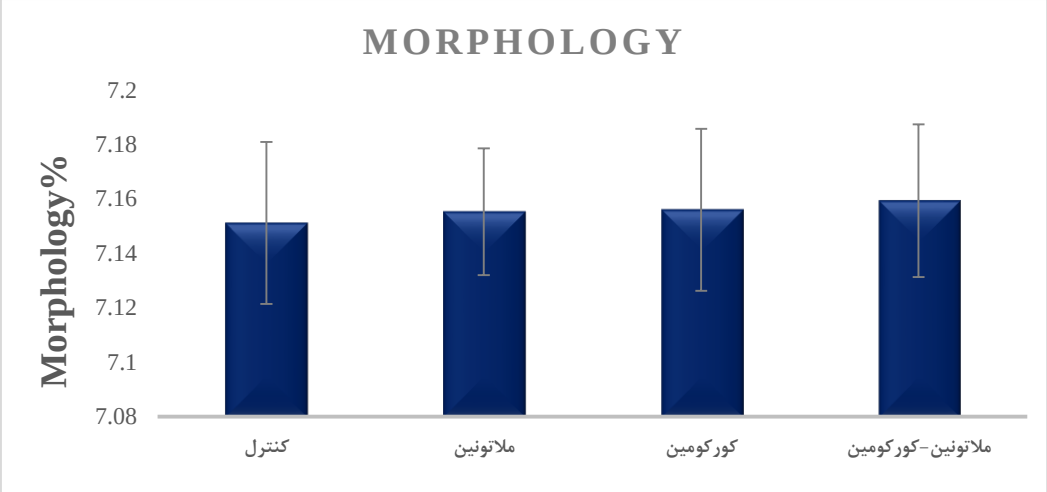


نمودار ۱- تأثیر ملاتونین و کورکومین بر حرکت اسپرم‌ها پس از انجام فرآیند فریز اسپرم.
اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل، ملاتونین، کورکومین به‌ترتیب با #، * و ¥ نشان داده شده است.
ستون‌ها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار و $p<0/05$ معنی‌دار می‌باشد.

تأثیر ملاتونین و کورکومین روی مورفولوژی اسپرم: طبق نتایج به‌دست آمده از آزمون آنووا در مورد مورفولوژی، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های ملاتونین و کورکومین و ترکیبی آنها با گروه کنترل وجود نداشت ($p>0/05$)، در واقع این آنتی‌اکسیدان‌ها، تغییری در مورفولوژی اسپرم ایجاد نکردند (نمودار ۲).



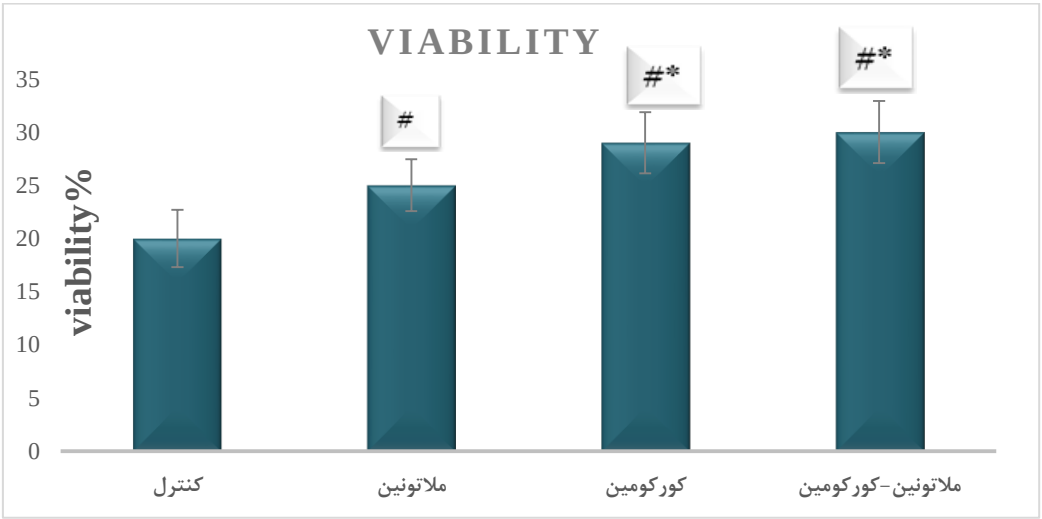
شکل ۱- تصویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰×
اسپرم طبیعی: دارای یک سر بیضوی و دم بلند؛ اسپرم‌های غیرطبیعی: دارای نقایصی نظیر دو دم، دم خمیده، سر بزرگ، سر گرد و بسیاری نقایص دیگر



نمودار ۲- تأثیر ملاتونین و کورکومین بر مورفولوژی اسپرم‌ها پس از انجام فرآیند فریز اسپرم.
اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل، ملاتونین، کورکومین به‌ترتیب با #، * و ¥ نشان داده شده است.
ستون‌ها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار و $p<0/05$ معنی‌دار می‌باشد.

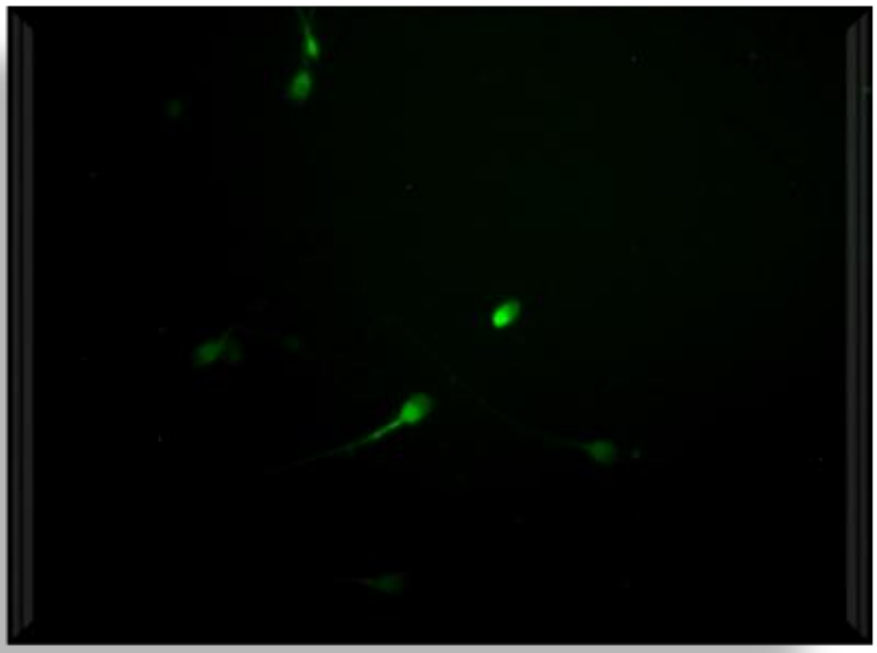
تأثیر ملاتونین و کورکومین روی زنده‌مانی اسپرم:
طبق داده‌های به‌دست آمده از آزمون آنووا در مورد زنده‌مانی، تفاوت معنی‌داری بین گروه ملاتونین- کورکومین و گروه کورکومین و گروه ملاتونین با حجم نمونه ۰/۵ سی سی در مقایسه با گروه کنترل و همچنین بین گروه ملاتونین-کورکومین و گروه کورکومین در مقایسه با گروه ملاتونین وجود داشت ($p<۰/۰۵$)، ولی دو گروه کورکومین و کورکومین- ملاتونین در مقایسه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p=۰/۶۹$) و تأثیر این دو روی زنده‌مانی تقریباً یکسان بود (نمودار ۳).

شکل ۲- تصویر گرفته شده با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰×
اسپرم‌های زنده: دارای سر سفید، اسپرم‌های مرده: دارای سر قرمز یا صورتی

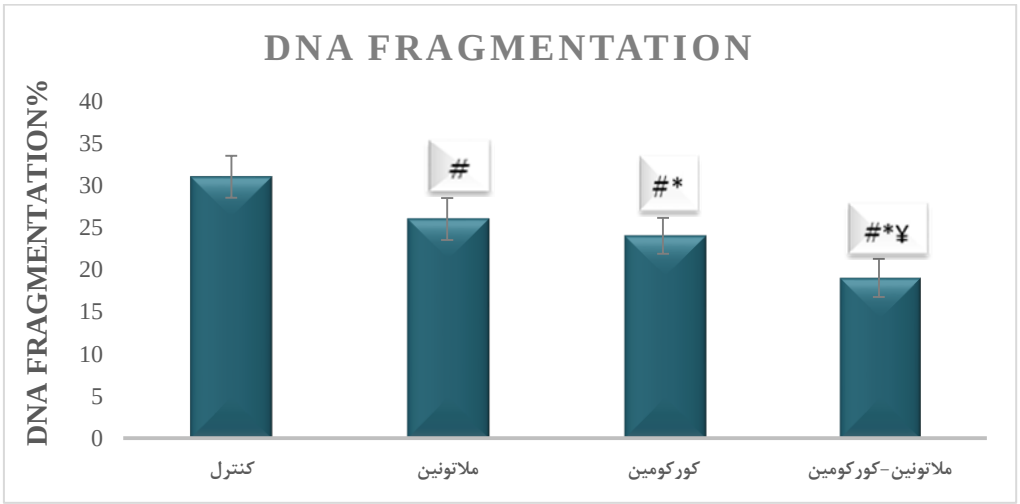


نمودار ۳- تأثیر ملاتونین و کورکومین بر زنده‌مانی اسپرم‌ها پس از انجام فرآیند فریز اسپرم.
اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل، ملاتونین، کورکومین به‌ترتیب با #، * و ¥ نشان داده شده است.
ستون‌ها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار می‌باشد.

تأثیر ملاتونین و کورکومین روی یکپارچگی DNA اسپرم: طبق داده‌های به‌دست آمده از آزمون آنووا در مورد شکست DNA، اختلاف معنی‌داری بین گروه ملاتونین-کورکومین و گروه کورکومین و گروه ملاتونین با حجم نمونه ۰/۵ سی‌سی در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین بیشترین کاهش در شکست DNA به‌ترتیب در گروه‌های ملاتونین - کورکومین، کورکومین و در نهایت در گروه ملاتونین مشاهده شد.

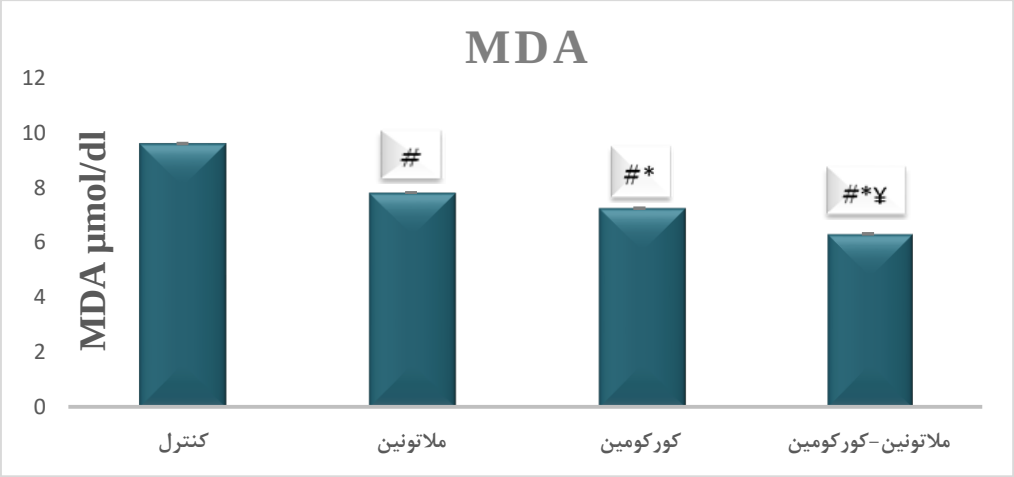


شکل ۳- تصویر گرفته شده با میکروسکوپ فلوئورسنت با بزرگ‌نمایی ۱۰۰×
اسپرم‌ها با سر سبز روشن: دارای شکست DNA



نمودار ۴- تأثیر ملاتونین و کورکومین بر شکست DNA هسته اسپرم‌ها پس از انجام فرآیند فریز اسپرم.
اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل، ملاتونین، کورکومین به‌ترتیب با #، * و ¥ نشان داده شده است.
ستون‌ها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار می‌باشد.

تأثیر ملاتونین و کورکومین بر روی میزان MDA حاصل از لیپید پراکسیداسیون غشای اسپرم: طبق داده‌های به‌دست آمده از آزمون آنووا در مورد تولید MDA، اختلاف معنی‌داری بین گروه ملاتونین- کورکومین و گروه کورکومین و گروه ملاتونین با حجم نمونه ۰/۵ سی‌سی در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین بیشترین کاهش در تولید MDA به‌ترتیب در گروه‌های ملاتونین- کورکومین، کورکومین و در نهایت در گروه ملاتونین وجود داشت (نمودار ۵).



نمودار ۵- تأثیر ملاتونین و کورکومین بر میزان مالون دی‌آلدئید غشاء اسپرم‌ها پس از انجام فرآیند فریز اسپرم. اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل، ملاتونین، کورکومین به‌ترتیب با #، * و ¥ نشان داده شده است. ستون‌ها نمایانگر میانگین ± انحراف معیار و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار می‌باشد.

بحث

مشکل اصلی بیولوژیکی انجماد اسپرم به‌دلیل تغییرات غیرقابل برگشت در مکانیسم‌های سلولی طبیعی است. سلول‌های اسپرمی که در معرض دمای پایین قرار می‌گیرند، آسیب‌های جبران‌ناپذیری را متحمل می‌شوند که باعث کاهش تحرک، زنده‌مانی و توان باروری آنها می‌شود (۲۴) مقادیر متعادل ROS نقش مهمی در ظرفیت‌یابی و واکنش آکروزومی و تثبیت میتوکندری و تحرک اسپرم دارد، ولی در حین انجماد، میزان ROS داخل سلولی افزایش یافته و تعادل بین ROS تولید شده و مهار آنتی‌اکسیدانی سمینال پلاسما و اسپرم علیه گونه‌های فعال اکسیژن به هم می‌خورد. این موضوع می‌تواند باعث تحریک استرس اکسیداتیو شود. یکی از پیامدهای اصلی افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرم، پراکسیداسیون لیپیدی است که از خطرناک‌ترین محصولات آن MDA و ۴- هیدروکسی نونئال (4-HNE) می‌باشد. این محصولات می‌توانند باعث اختلال شدید عملکرد پروتئین و آسیب DNA، جذب لکوسیت‌ها با فعالیت کموتاکتیک و مهار تکثیر سلولی شوند (۱۴، ۲۸). از طرف دیگر ساختار سلولی اسپرماتوزوآ، غشای پلاسمایی، تعداد زیاد میتوکندری، سیتوپلاسم کم و میزان کم آنتی‌اکسیدان در سیتوپلاسم اسپرم، احتمالاً اسپرم‌ها را در مقابل رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیر می‌کند (۲۹). مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی کورکومین و ملاتونین به‌صورت ترکیبی به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۰ میکرو مولار ۰/۰۱ میلی‌مولار بر روی اسپرم در طی فرآیند انجماد-ذوب و بررسی این موضوع که آیا افزودن این مواد به‌صورت ترکیبی می‌تواند از طریق اثر بر کنترل میزان ROS داخل سلولی بر عملکرد سلول اسپرم تأثیرگذار باشد و بقاء و یکپارچگی غشاء و میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تحرک را در طی فرآیند انجماد- ذوب بهبود دهد؟

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن این آنتی-اکسیدان‌ها به‌صورت جدا و ترکیبی به محیط انجماد می‌تواند موجب افزایش زنده‌مانی و کاهش قطعه‌قطعه شدن DNA و آپوپتوز، همچنین کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه کاهش تولید MDA در سلول‌های اسپرم شود. ولی بر اساس نتایج به‌دست آمده در مورد تغییرات مورفولوژی اسپرم، تفاوت معنی‌داری در گروه‌های مختلف در مقایسه با یکدیگر و در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نگردید. تاکنون مطالعات زیادی درباره اثر آنتی‌اکسیدانی مکمل‌های ملاتونین و کورکومین اضافه شده به محیط انجماد بر بهبود کیفیت پارامترهای اسپرم انجام شده است، ولی هیچ مطالعه‌ای به بررسی اثر ترکیبی آنها نپرداخته است. در این مطالعه اثر ملاتونین و کورکومین مورد بررسی قرار گرفت که در مقایسه با دیگر گروه‌ها، باعث تغییرات معنی‌داری بر کیفیت پارامترهای اسپرم شد. کریم‌فر و همکاران (۲۰۱۵) از دوزهای مختلف ملاتونین ۰/۰۵، ۰/۰۱، ۰/۰۰۵ و ۰/۰۰۱ استفاده کردند و نشان دادند بهترین غلظت برای بهبود تحرک، زنده‌مانی و کاهش MDA، دوز ۰/۰۱ میلی‌مولار است (۲۴). در این مطالعه دوز ۰/۰۱ مولار ملاتونین به‌عنوان مکمل محیط انجماد استفاده شد که در مورد بهبود تحرک، زنده‌مانی و کاهش MDA، مطالعه حاضر هم‌سو با این مطالعه بود که علت آن شاید به این دلیل باشد که دوز ملاتونین مورد استفاده در مطالعه حاضر طبق مطالعه کریم‌فر و همکاران بود، ولی در مطالعه کریم‌فر و همکاران از انجماد آهسته و در مطالعه حاضر از انجماد سریع استفاده شد و همچنین یکپارچگی DNA و همچنین مورفولوژی در مطالعه کریم‌فر مورد بررسی قرار نگرفته بود. در مطالعه مهایسن و همکاران (۲۰۲۰) که بر روی اسپرم خروس انجام شد، اضافه کردن مکمل ملاتونین در غلظت‌های 10^{-3}، 10^{-6} و 10^{-9} مولار به محیط انجماد، باعث بهبود تحرک پیشرونده، کاهش LPO و DNA fragmentation در اسپرم گردید (۱۶)، ولی تأثیر این آنتی‌اکسیدان‌ها در مطالعه حاضر بهتر از مطالعه مهایسن و همکاران بود که علت آن شاید به این‌دلیل باشد که مطالعه حاضر بر روی اسپرم انسان و با غلظت بیشتری نسبت به مطالعه مهایسن و همکاران که روی اسپرم حیوان بود، انجام گرفت (۱۶). همچنین در مطالعه حاضر میزان زنده‌مانی و مورفولوژی نیز مورد بررسی قرار گرفت که در مطالعه مهایسن و همکاران (۲۰۲۰) این پارامترها بررسی نشده بودند. در مطالعه سانتوناستاسو و همکاران (۲۰۲۱) که بر روی مایع سمن انسان انجام شد، استفاده از غلظت های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکرومولار از کورکومین به‌عنوان مکمل نشان داد که بهترین غلظت برای بهبود کیفیت پارامترهای اسپرم، غلظت ۲۰ میکرومولار است که در مطالعه حاضر از این غلظت استفاده شد. در مورد تحرک و قطعه قطعه شدن DNA، مطالعه حاضر با مطالعه سانتوناستاسو هم‌سو بود، ولی نتایج مطالعه سانتوناستاسو در مورد تحرک نشان داد که کورکومین تأثیر بهتری روی تحرک نسبت به مطالعه حاضر داشته است که علت آن شاید به این دلیل باشد که در مطالعه سانتوناستاسو مدت زمان انجماد ۱ هفته و در مطالعه حاضر مدت زمان انجماد ۲ هفته بود، ولی در مورد بررسی زنده‌مانی، مورفولوژی و همچنین میزان تولید MDA اشاره‌ای به آنها نشده بود، در حالی‌که در مطالعه حاضر به آن پرداخته شد. از طرف دیگر در مطالعه سانتوناستاسو ژن GPX4 اندازه‌گیری شد (۲۵). در مطالعه کاراکوس و همکاران (۲۰۲۱) که بر روی مایع منی ۲۳ مرد نرموزواسپرم انجام شد، اضافه کردن مکمل کورکومین به محیط انجماد، باعث بهبود پارامترهای اسپرم (تحرک، زنده مانی، بقاء) و یکپارچگی DNA و تراکم کروماتین شد که با مطالعه حاضر همسو بود، با این تفاوت که در مطالعه کاراکوس، کورکومین بر مورفولوژی اسپرم تأثیر گذاشته بود و باعث بهبود آن شده بود، ولی در مطالعه حاضر کورکومین چه به‌صورت منفرد و چه به‌صورت ترکیبی با ملاتونین، تأثیری بر روی مورفولوژی نداشت. با توجه به اینکه مورفولوژی اسپرم در زمان اسپرماتوژنز شکل می‌گیرد، بنابراین هیچ عاملی به‌طور طبیعی نمی‌تواند مورفولوژی اسپرم را تغییر دهد، مگر آنکه این آنتی-اکسیدان‌ها به‌صورت In vivo استفاده شوند. بنابراین ابهاماتی در مورد نتایج مربوط به مورفولوژی در این

مطالعه مورد نظر وجود دارد. همچنین در مطالعه ی کاراکوس و همکارانش میزان MDA مورد بررسی قرار نگرفت، ولی در مطالعه حاضر سطح MDA اندازه‌گیری شد (۲۶).

نتیجه‌گیری

افزودن کورکومین و ملاتونین چه به‌صورت منفرد و چه به‌صورت ترکیبی قبل از انجماد اسپرم به محیط انجماد در مردان دارای اسپرم نرمال می‌تواند باعث بهبود تحرک کل اسپرم، افزایش زنده‌مانی و کاهش مرگ، کاهش میزان شکست DNA و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء شود که این اثرات می‌تواند به‌علت فعالیت آنتی‌اکسیدانی ملاتونین و کورکومین باشد. همچنین بر اساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، افزودن این آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط انجماد، تأثیری روی مورفولوژی اسپرم نخواهد داشت و همچنین کورکومین تا حدودی اثر آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به ملاتونین دارد. بنابراین استفاده از کورکومین و ملاتونین به‌صورت ترکیبی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان ممکن است بتواند تا حدودی اثرات مخرب فرآیند انجماد ذوب را کاهش داده و به بهبود عملکرد اسپرم کمک کرده و شانس باروری را افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت‌های مالی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. بدین‌وسیله از همکاران گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی و همکاران آزمایشگاه پاتوهیستولوژی دکتر فرزام که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Vander Borght M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. Clinical biochemistry 2018; 62:2-10.
2. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, De Mouzon J, Sokol R, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. Human reproduction 2017; 32(9):1786-801.
3. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. Reproductive biology and endocrinology 2015; 13(1):1-9.
4. Lundberg FE, Johansson AL, Ludvigsson JF. Mortality in 43,598 men with infertility–a Swedish nationwide population-based cohort study. Clinical Epidemiology 2019: 645-57.
5. Gondwe MM, Mpungose A, Kamadyaapa DR, Shauli M, Ndebia E, Sewani-Rusike C, et al. The protective effect of aqueous extract of Typha capensis rhizomes on cadmium-induced infertility in rats. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology 2019; 30(3):20180173.
6. Shabani E, Khadem N, Shakeri MT. Comparison of pregnancy rate and effective factors following fresh and frozen embryo transfer in women undergoing Assisted Reproductive Techniques (ART). Iran J Obstet Gynecol Infertil 2017; 20(6):24-30.
7. Pilehvari Sh, Yavangi M, Salemi L, Charaghi Z. A comparative study of the effects of two different treatment periods with estradiol in endometrial preparation on the pregnancy outcome of frozen embryos. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2023; 26(3):25-32.
8. Pegg DE. Principles of cryopreservation. Methods Mol Biol 2015; 1257:3-19.
9. Sambu S. A Bayesian approach to optimizing cryopreservation protocols. PeerJ 2015; 3:e1039.
10. Chian RC, Quinn P, editors. Fertility cryopreservation. Cambridge University Press; 2010.
11. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chemico-biological interactions 2014; 224:164-75.
12. Leisegang K, Henkel R, Agarwal A. Redox regulation of fertility in aging male and the role of antioxidants: a savior or stressor. Current Pharmaceutical Design 2017; 23(30):4438-50.
13. Clyne M. Effects of ROS and vitamin E on sperm. Nature Reviews Urology 2012; 9(2):62-.
14. Wang S, Wang W, Xu Y, Tang M, Fang J, Sun H, et al. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. Proteomics 2014; 14(2-3):298-310.
15. Mottola F, Scudiero N, Iovine C, Santonastaso M, Rocco L. Protective activity of ellagic acid in counteract oxidative stress damage in zebrafish embryonic development. Ecotoxicology and Environmental Safety 2020; 197:110642.
16. Mehaisen GM, Partyka A, Ligocka Z, Niżański W. Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. Animal Reproduction Science 2020; 212:106238.
17. Fang Y, Zhao C, Xiang H, Zhao X, Zhong R. Melatonin inhibits formation of mitochondrial permeability transition pores and improves oxidative phosphorylation of frozen-thawed ram sperm. Frontiers in Endocrinology 2020; 10:896.

18. Lu XL, Liu JJ, Li JT, Yang QA, Zhang JM. Melatonin therapy adds extra benefit to varicecelectomy in terms of sperm parameters, hormonal profile and total antioxidant capacity: A placebo-controlled, double-blind trial. Andrologia 2018; 50(6):e13033.
19. Li CY, Hao HS, Zhao YH, Zhang PP, Wang HY, Pang YW, et al. Melatonin improves the fertilization capacity of sex-sorted bull sperm by inhibiting apoptosis and increasing fertilization capacitation via MT1. International journal of molecular sciences 2019; 20(16):3921.
20. Zhou Q, Wu X, Liu Y, Wang X, Ling X, Ge H, et al. Curcumin improves asthenozoospermia by inhibiting reactive oxygen species reproduction through nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation. Andrologia 2020; 52(2):e13491.
21. Zheng B, McClements DJ. Formulation of more efficacious curcumin delivery systems using colloid science: enhanced solubility, stability, and bioavailability. Molecules 2020; 25(12):2791.
22. Farzaei MH, Zobeiri M, Parvizi F, El-Senduny FF, Marmouzi I, Coy-Barrera E, et al. Curcumin in liver diseases: a systematic review of the cellular mechanisms of oxidative stress and clinical perspective. Nutrients 2018; 10(7):855.
23. Alizadeh F, Javadi M, Karami AA, Gholaminejad F, Kavianpour M, Haghighian HK. Curcumin nanomicelle improves semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers, and reproductive hormones in infertile men: A randomized clinical trial. Phytotherapy Research 2018; 32(3):514-21.
24. Karimfar MH, Niazvand F, Haghani K, Ghafourian S, Shirazi R, Bakhtiyari S. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. International journal of immunopathology and pharmacology 2015; 28(1):69-76.
25. Santonastaso M, Mottola F, Iovine C, Colacurci N, Rocco L. Protective effects of curcumin on the outcome of cryopreservation in human sperm. Reproductive Sciences 2021; 28:2895-905.
26. Karakus FN, Kuran SB, Solakoglu S. Effect of curcumin on sperm parameters after the cryopreservation. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2021; 267:161-6.
27. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as relatd to midpiece abnormalities and motility. Gamete research 1989; 24(2):127-34.
28. Fingerova H, Novotny J, Barborik J, Brezinova J, Svobodova M, Krskova M, et al. Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS Randox. Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc 2007; 151(1).
29. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein MA. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. The Journal of urology 2003; 170(4):1079-84.