دوره ۲۵، شماره ۸۱، بهار ۱۴۰۱، صفحات: ۸۵-۶۷

مقاله پژوهشی

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانت رزوراترول بر پارامترهای بیوشیمیایی اسپرم و بیان ژن‌های کاسپاز۳ و HSP70 افراد نابارور آستنواسپرمی تحت شرایط انجماد

نرگس عاشوری[۱]، شهربانو عریان[۱،۲،*] ، اکرم عیدی[۱]، کامبیز روشنایی[۳]

[۱] گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

[۳] گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۱۱/۰۶

چکیده

مقدمه: یکی از مهم‌ترین اقدامات به‌منظور افزایش کیفیت اسپرم و در نتیجه موفقیت فناوری کمک زادآوری (ART)، محافظت از اسپرم در برابر واکنش‌های اکسیداتیو در حین انجماد می‌باشد. زوراترول یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی است که با از بین بردن رادیکال‌های آزاد، از بدن در برابر بیماری‌های مزمن محافظت می‌نماید. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثر رزوراترول بر پارامترهای عملکردی اسپرم انسان و ارزیابی آپوپتوز و بیان ژن‌های HSP70 و Caspase3 پس از انجماد می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از ۴۰ مرد مراجعه کننده به مرکز ناباروری ACECR قم که همگی معیارهای ورود به مطالعه را دارا بودند به عنوان جامعه هدف استفاده شد. جامعه هدف به دو گروه مردان با معیار WHO طبیعی و گروه دوم افراد مبتلا به استنوتراسپرمی تقسیم شدند. پس از نمونه‌گیری اسپرم، اسپرم‌ها با غلظت‌های مختلف رزوراترول منجمد شدند.

نمونه‌های منی از نظر پارامترهای اسپرم شامل غلظت، مورفولوژی، تحرک، زنده‌ماندن، گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS)، آپوپتوز و بیان ژن‌های HSP70 و کاسپاز ۳ مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: رزوراترول ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌مولار به‌طور قابل‌توجهی تحرک اسپرم را افزایش داد ($P\leq 0/001$)، اما در مقایسه با گروه شاهد با رزوراترول ۰/۲۵ و ۰/۱ میلی‌مولار کاهش یافت ($P\leq 0/001$). به‌جز رزوراترول ۰/۲۵ میلی‌مولار، همه دوزهای رزوراترول به‌ویژه ۰/۰۵ میلی‌مولار باعث افزایش اسپرم شد ($P<0/05$). تمام دوزهای رزوراترول به‌ویژه ۰/۰۲ میلی‌مولار و ۰/۰۵ میلی‌مولار باعث کاهش آپوپتوز و بیان ژن‌های HSP70 و Caspase3 گردید.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، مکمل رزوراترول قبل از انجماد به‌طور چشمگیری کیفیت اسپرم را افزایش داد و باعث کاهش عوارض جانبی شوک انجماد گردید.

کلمات کلیدی: اسپرم، رزوراترول، استنوتراتاسپرمیا، HSP70

* **نویسنده مسئول:** شهربانو عریان ، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۹۱۶۹۴۲۰۲۶، ایمیل: Sh_oryan@khu.ac.ir

مقدمه

انجماد اسپرم، قدرت باروری مردان را صرف‌نظر از اتیولوژی ناباروری[1]، برای سال‌ها حفظ می‌کند. این روش برای موارد مختلفی از جمله ذخیره اسپرم قبل از رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و وازکتومی استفاده می‌گردد (۱). در طی انجماد، منی در معرض شوک سرما و فشار اسمزی قرار می‌گیرد و در نتیجه، میزان اکسیداسیون غشا به دلیل واکنش‌های اکسیداتیو افزایش می‌یابد، که در نهایت باعث کاهش تحرک و زنده ماندن اسپرم می‌شود. تحقیقات مختلف نشان داد که پس از انجماد اسپرم، غشاء، عملکرد صحیح خود را از دست داده و میزان لقاح پس از انجماد اسپرم به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲). پروتئین HSPA2 از جمله پروتئین‌های شوک حرارتی می‌باشند که در هنگام استرس میزان آن در سلول افزایش یافته و منجر به بازیابی پروتئین‌های تخریب‌شده ناشی از استرس و سنتز پروتئین‌های جدید برای جایگزینی با پروتئین‌های غیرقابل تعمیر می‌شود (۳،۴). بیان زیاد چاپرون‌ها در ترمیم پروتئین‌های تخریب‌شده همچنین سنتز پلی‌پپتیدهای جدید و جایگزینی با پروتئین‌های غیرقابل ترمیم نقش دارد. پروتئین HSPA2 در صورت استرس بیان می‌شود و در سلول، بافت یا ارگان تحت یک پاسخ استرسی است. همچنین سطوح بالای پروتئین‌های HSP70با مهار آپوپتوز و مقاومت سلول‌ها به عوامل گوناگون شیمی درمانی ارتباط دارد.

مطالعات مختلف نشان داده است که مردان نابارور نسبت هیستون / پروتامین بیشتری نسبت به مردان بارور دارند (۵). نقص در نسبت هیستون / پروتامین منجر به نقص در تجمع کروماتین اسپرم می‌شود که DNA اسپرم را مستعد آسیب شوک خارجی و در نتیجه کاهش میزان لقاح در این نوع بیماران می‌کند (۶،۷).

همچنین پروتئین خاص به نام کاسپاز نقش اساسی در تنظیم میزان آپوپتوز دارند. فعال‌سازی کاسپاز، خارج‌سازی فسفاتیدیل سرین، تغییر پتانسیل غشای میتوکندری و قطعه‌قطعه‌شدن DNA از نشانه‌های آپوپتوز در اسپرماتوزوای انسانی است (۸). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که NO در غلظت کم خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و آنیون سوپراکسید را خنثی می‌کند. ولی در غلظت‌های بالا با تشکیل پراکسیدنیتریت سبب آزادسازی سیتوکروم C از غشای میتوکندری شده و با فعال‌کردن کاسپازها باعث ایجاد آپوپتوز می‌شود (۸).

این پروتئینازها ابتدا به‌عنوان پروآنزیم در اپیتلیوم لوله‌های منی ترشح می‌شوند و سپس منجر به فعالیت‌های آبشار دیگری می‌شوند که سیگنال‌های پرواپوپتوتیک را القا می‌کنند (۹). گیرنده‌های مرگ سلول در اسپرم، مانند گیرنده‌های FAS و TNFα، از جمله عواملی هستند که توسط آنزیم شبه‌کاسپاز فعال می‌شوند و منجر به مرگ سلولی می‌شوند (۱۰،۱۱). در تحقیقات اخیر، آنتی‌اکسیدان‌های مختلفی از جمله لوتئین و زآگزانتین، ویتامین C، ویتامین E و بتاکاروتن برای محافظت از غشای پلاسمایی اسپرم در برابر واکنش‌های اکسیداتیو و سایر آسیب‌های ناشی از انجماد آزمایش شده است (۱۲،۱۳). آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن برای حفظ تحرک اسپرم، شرایط سلولی را تغییر می‌دهند (۱۴،۱۵). رزوراترول یک ترکیب تیول با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی است. این ماده یک پلی‌فنلی طبیعی است که با از بین بردن رادیکال‌های آزاد، از بدن در برابر بیماری‌های مزمن محافظت می‌نماید. رزوراترول و فالونوئیدها توسط گیاهان و از یک مسیر مشترک سنتز می‌شوند. همچنین رزوراترول یک فیتوآلکسین است (۱۶،۱۷). رزوراترول در دوزهای پایین خود بقای سلول را

[1] Aetiological Pregnancy

فراهم می‌کند، مانند محافظت قلبی و عصبی؛ و در عین حال دوزهای بالای آن باعث افزایش مرگ سلولی در درمان سرطان می‌شود (۱۶). یکی از فعالیت‌های بیولوژیکی رزوراترول پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن است و به‌دلیل اینکه تعامل بیشتری با رادیکال‌های آزاد در تغییر لیپیدی دارد، قادر است خود را به غشاهای پراکسیدازی سفت و سخت برساند و سیالیت غشا را افزایش دهد. بنابراین، رزوراترول در غشاهای سلول در برابر پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب DNA ایجادشده توسط ROS اثری محافظتی نشان می‌دهد (۱۷). باتوجه‌به توضیحات ارائه شده، هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌اکسیدانت رزوراترول بر پارامترهای بیوشیمیایی اسپرم و بیان ژن‌های کاسپاز۳ و HSP70 افراد نابارور آستنواسپرمی تحت شرایط انجماد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در سال ۱۳۹۹ در مرکز ناباروری مرکز آموزش و تحقیقات (ACECR)، قم / ایران انجام گردید. جامعه مورد مطالعه شامل ۲۰ مرد نابارور استنوتراتاسپرمی دارای سن ۲۵ تا ۳۵ سال که فاقد بیماری زمینه‌ای می‌باشند به‌عنوان گروه بیمار و ۲۰ مرد سالم به‌عنوان گروه شاهد بود که پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی و داشتن معیارهای ورود به مطالعه، وارد مطالعه شدند. غلظت اسپرم، سرعت تحرک و تجزیه و تحلیل مورفولوژی با توجه به توصیه‌های WHO ارزیابی شد (۱۸).

در این مطالعه از کیت تانل شرکت پرومگا آلمان به منظور انجام تست تانل، کیت MDA ELISA شرکت zelbio آلمان برای انجام تست تشخیص مالون دی آلدهید و کیت ROS Assay شرکت آبکم آمریکا برای ارزیابی ROS استفاده گردید.

از همه بیماران قبل از شرکت در مطالعه، رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. معیار ورود به مطالعه وجود آزواسپرمی، الیگوسپرمی شدید یا لکوسیتوسپرمیا، استفاده از دارو / آنتی-اکسیدان‌ها، قرارگرفتن در معرض شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی یا واریکوسل بودند. مردان بارور درصورت‌داشتن سابقه وازوازوستومی یا واریکوسلکتومی از مطالعه خارج شدند.

در این مطالعه پس از اخذ نمونه‌های منی، نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباسیون CO_2 دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا قبل از ارزیابی پارامترهای اسپرم، مایع‌سازی منی انجام شود. سپس نمونه‌های منی از نظر پارامترهای مختلف از جمله غلظت اسپرم، مورفولوژی و تحرک مورد ارزیابی قرار گرفتند. تحرک اسپرم در ۳ درجه ارزیابی شد: درجه A: درجا، دورانی و سرعت کم، درجه B: خطی کم‌سرعت، درجه C: خطی، پیشرو و سریع.

بررسی زنده‌ماندن اسپرم با استفاده از اسمیرهای بافت-شناسی آغشته به ائوزین-نیگروسین (محلول ۴٪ ائوزین و محلول ۸٪ نیگروسین در سیترات سدیم) و طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO) انجام شد (۱۹).

پس از ارزیابی پارامترهای مختلف در مایع منی تازه، حجم باقی‌مانده از هر نمونه به شش میزان مساوی از هم جدا شد: بدون رزوراترول و با رزوراترول در غلظت‌های ۰/۰۱ ، ۰/۰۲ ، ۰/۰۵ ، ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌مولار (۲۰). نمونه مایع منی به‌صورت جداگانه به‌مدت ۱۰ دقیقه با غلظت‌های مختلف رزوراترول نگهداری و سپس محیط فریز اسپرم به نمونه‌ها اضافه گردید. سپس با استفاده از روش استاندارد انجماد سریع، نمونه‌ها منجمد و به تانک ازت حداقل به مدت یک هفته وارد و نگهداری شدند.

روش انجماد

هر یک از نمونه‌های منی به چهار مقدار تقسیم شد: نمونه بدون رزوراترول (شاهد) و نمونه با ۰/۰۱، ۰/۰۲ ، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲۵ میلی‌مولار رزوراترول که به مدت ۱

ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس مایع منی با یک محیط محافظت‌کننده خنک‌کننده (Life global-Belgium) در نسبت ۱: ۱ رقیق‌شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انکوبه گردید. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای -۲۰ درجه سانتی‌گراد منجمد-شده و به‌مدت ۱ ساعت در نیتروژن فاز بخار معلق گردید. سپس به‌مدت ۷ روز در نیتروژن مایع در -۱۹۶ درجه سانتی-گراد ذخیره شدند (۲۱). نمونه‌های منجمد از مخزن نیتروژن مایع برای ذوب استخراج شد و پس از ۲۰ ثانیه، تعادل در هوای آزمایشگاه برای ذوب کامل در ۳۷ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردید. سپس با اضافه‌نمودن ۱۰٪ آلبومین و سانتریفیوژ به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰g ضدیخ پاک شد. سپس نمونه‌ها از نظر پارامترهای اسپرم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

اندازه‌گیری ROS و MDA

گونه‌های واکنش‌دهنده اسید تیوباربیتوریک (TBARS) به‌عنوان اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در اسپرم، محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید (LPO)، توسط کیت MDA ELISA و طبق پروتکل استاندارد موجود در کیت تعیین شد. سطح MDA در طول موج ۵۳۲ نانومتر به‌عنوان نانومول / میلی‌لیتر گزارش گردید (۲۲). سطح ROS در نمونه‌های اسپرم با استفاده از (۵ و ۶) کلرو متیل-۲ ′ ، ۷'-دی‌کلروفلورسین‌دی‌استات و استیل‌استر (CM-H2DCFDA) توسط کیت ROS Assay و طبق پروتوکل استاندارد موجود در کیت ارزیابی شد. این روش براساس اکسیداسیون وابسته به ′ 2 ROS، 7 dia دی‌استات‌دی‌کلروفلوئورسین به دی‌کلروفلورسین‌فلورسنت (DCF) است. DCF یک ترکیب بسیار فلورسنت است که با طیف‌سنجی فلورسانس در ۵۳۵ نانومتر قابل تشخیص است. اسپرماتوزوآ (۱۰۶ × ۵ میلی‌لیتر) با ۱۰ میکرومولار CM-H2DCFDA به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی تحت درمان قرار گرفتند.

استخراج RNA و انجام real-time PCR

استخراج Total RNA با روش استاندارد تریازول انجام شد. ابتدا نمونه‌ها با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر محلول SDS یک درصد لیزشده سپس از محلول تریازول و کلروفرم جهت جداسازی RNA از پروتئین و دیگر عوامل سلولی استفاده گردید. غلظت RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop اندازه گیری شد. ازآنجاکه نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ بالاتر از ۱/۸ بود، از این نمونه‌ها برای سنتز cDNA استفاده گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Takara Bio، Otsu، Japan) و طبق پروتکل استاندارد موجود در کیت انجام شد. طراحی آغازگر برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای مناطق ژنومی مورد هدف توسط perlprimer انجام شد (نسخه ۰،۱،۱). پس از انتخاب یک جفت آغازگر مناسب، برای اطمینان از طراحی صحیح آن، آغازگر انتخاب‌شده توسط (Gene Runner Hastings Software، Hudson، NY؛ نسخه ۶،۵،۴۷) و سایت‌های UCSC و Blast NCBI مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

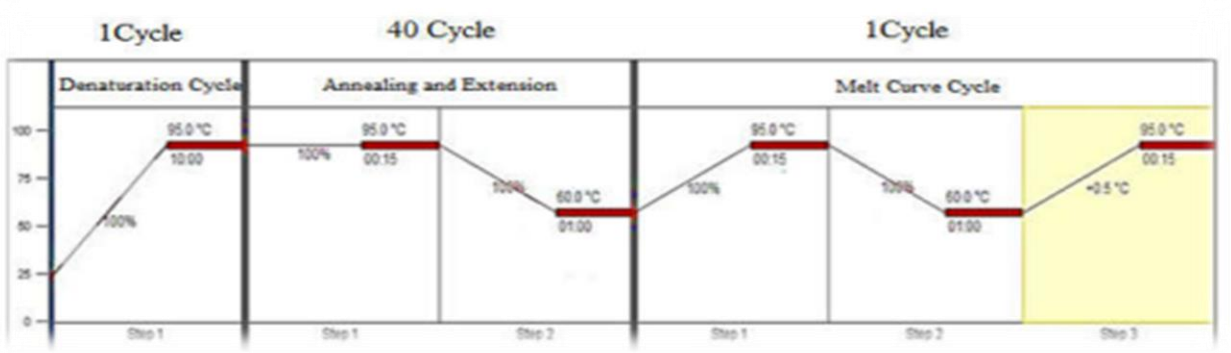
جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن کاسپاز ۳ GAPDH/

نام ژن	توالی (۵-۳)	طول قطعه تکثیری (جفت باز)	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	درصد CG
Caspase3	F: AAGCGAATCAATGGACTCTGG R: CTGTACCAGACCGAGATGTC	۱۳۴	59/4 60/5	47/62 55/0
GAPDH	F: CCATGAGAAGTATGACAAC	۱۶۱	53	42/11

نام ژن	توالی (۵-۳)	طول قطعه تکثیری (جفت باز)	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	درصد CG
	R :GAGTCCTTCCACGATACC		۵۶/۱	۵۵/۵۶
HSP70-	F: CATCGACTTCTACACGTCCA R: CAAAGTCCTTGAGTCCCAAC	۱۷۰	50 51	20 20

واکنش‌ها در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر از SYBRes Green Real-time PCR Master Mixes Thermo (USA ،MA ،Waltham ،Fisher Scientific) انجام شد. برنامه دمای PCR مطابق جدول ۲ انجام شد.

جدول ۲: بررسی تغییرات بیان ژن



برای مطالعه تغییرات بیان ژن در این مطالعه از مقایسه روش (ΔΔ CT) استفاده و این نسبت در مقایسه با بیان ژن GAPGH به‌عنوان کنترل داخلی محاسبه شد. روش مقایسه نسبی، تفاوت نسبی بین نمونه آزمایش و نمونه شاهد با استفاده از فرمول زیر مقایسه گردید.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{control})} = \frac{2^{-(\Delta Ct)_{sample}}}{2^{-(\Delta Ct)_{control}}}$$

تعیین آپوپتوز

برای هر نمونه اسپرم، با استفاده از روش TUNEL که از یک لیبل فلورسنت یا شیمیایی استفاده می‌کند به نوکلئوتیدهایی متصل می‌شود که توسط TdT به انتهای ۳′-هیدروکسیل شکاف DNA اضافه شده‌اند در پایان با استفاده از کیت تشخیص مرگ سلول InSitu (روشه، مانهایم، آلمان) ارزیابی شد. اسمیرهای اسپرم بر روی اسلایدهای میکروسکوپ و در یک محلول ۴٪ پارافورمالدئید (Merck) در محلول PBS به‌مدت ۱ ساعت در RT ثابت شد. سپس اسلایدها در PBS شسته و با محلول ۰/۱٪ تریتون-ایکس در محلول سیترات سدیم ۰/۱٪ (سیگما) به‌مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نفوذ یافتند. بار دیگر اسلایدها در PBS شسته و سپس به‌مدت یک ساعت در محفظه‌ای تاریک و مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵۰ میکرولیتر مخلوط TUNEL انکوبه شدند. پس از آن، اسلایدها در PBS شسته شدند و با محیط نصب حاوی DAPI رنگ‌آمیزی شدند (Burlingame، CA، USA). در هر اسلاید، حداقل ۲۰۰ اسپرم از نظر مورفولوژیکی به‌صورت رندوم در میکروسکوپ فلورسانس Leitz DMRBE ارزیابی شد (لایکا، زلار، آلمان). تعداد اسپرماتوزوئیدهایی که فلورسانس سبز ساطع می‌کنند (TUNEL مثبت) به‌عنوان درصدی از تعداد کل اسپرم‌های شمارش‌شده ثبت شد.

تحلیل آماری

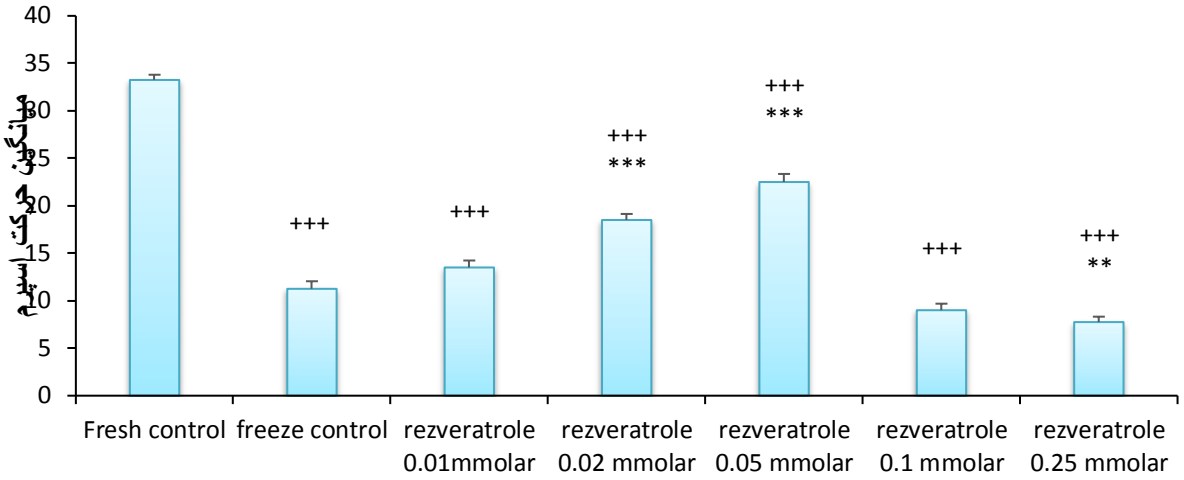
نرمال‌بودن متغیرهای مداوم با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov تأیید شد و داده‌ها به‌عنوان میانگین ± SEM گزارش شدند. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از ANOVA یک‌طرفه و آزمون Tukey برای post-hoc انجام شد. تمام داده‌ها با نرم‌افزار آماری spss version 20 تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج

تحرک اسپرم

براساس نمودار ۱، رزوراترول به‌طور قابل‌توجهی میزان تحرک اسپرم را در غلظت‌های ۰/۰۱ ، ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی-مولار در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد (P<۰/۰۵). با-این‌حال، رزوراترول ۰/۱ میلی‌مولار به‌طور ناچیزی این پارامتر را افزایش داد و تحرک اسپرم به‌طور قابل‌توجهی توسط رزوراترول ۰/۲۵ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد در سطح معناداری P<۰/۰۵ کاهش یافت.

نمودار ۱ : بررسی حرکت اسپرم



نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

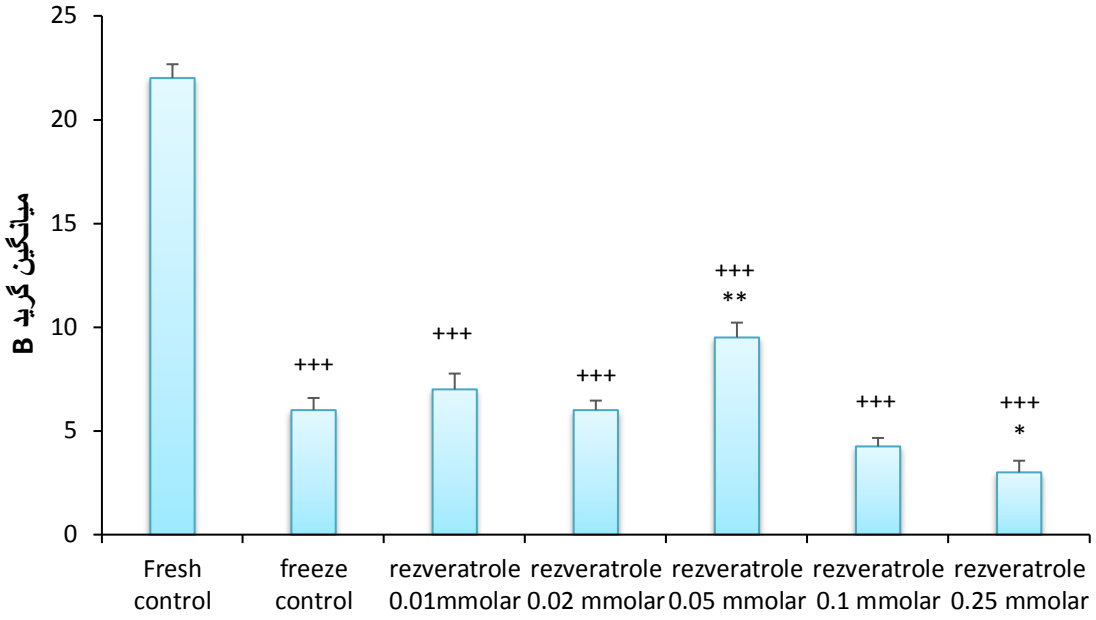
+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

* $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

همچنین، میانگین درجه B در مقایسه با گروه شاهد با رزوراترول ۰،۰۵ میلی‌مولار به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت (P<۰/۰۵) (نمودار ۲). درحالی‌که، رزوراترول ۰/۲۵میلی-مولار نسبت به شاهد به‌طور قابل‌توجهی درجه B را در سطح معناداری P<۰/۰۵ کاهش داد (نمودار ۲). همان‌طور که نمودار ۳ نشان می‌دهد، رزوراترول از دوز ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ میلی‌مولار به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش میانگین درجه C در مقایسه با گروه کنترل شد (P<۰/۰۵). بااین‌حال، تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های دیگر رزوراترول و گروه کنترل وجود نداشت ($P\leq 0/001$).

نمودار ۲ : بررسی حرکت اسپرم از نوع گرید B

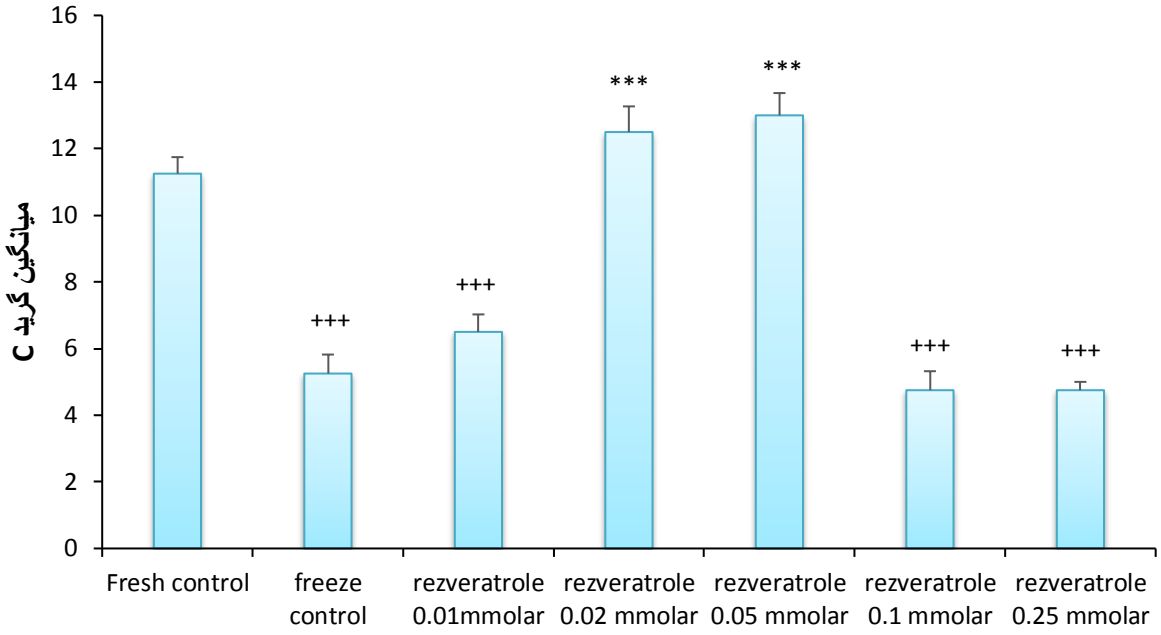


نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

نمودار ۳ : بررسی حرکت اسپرم از نوع گریدC



نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

++ $p < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

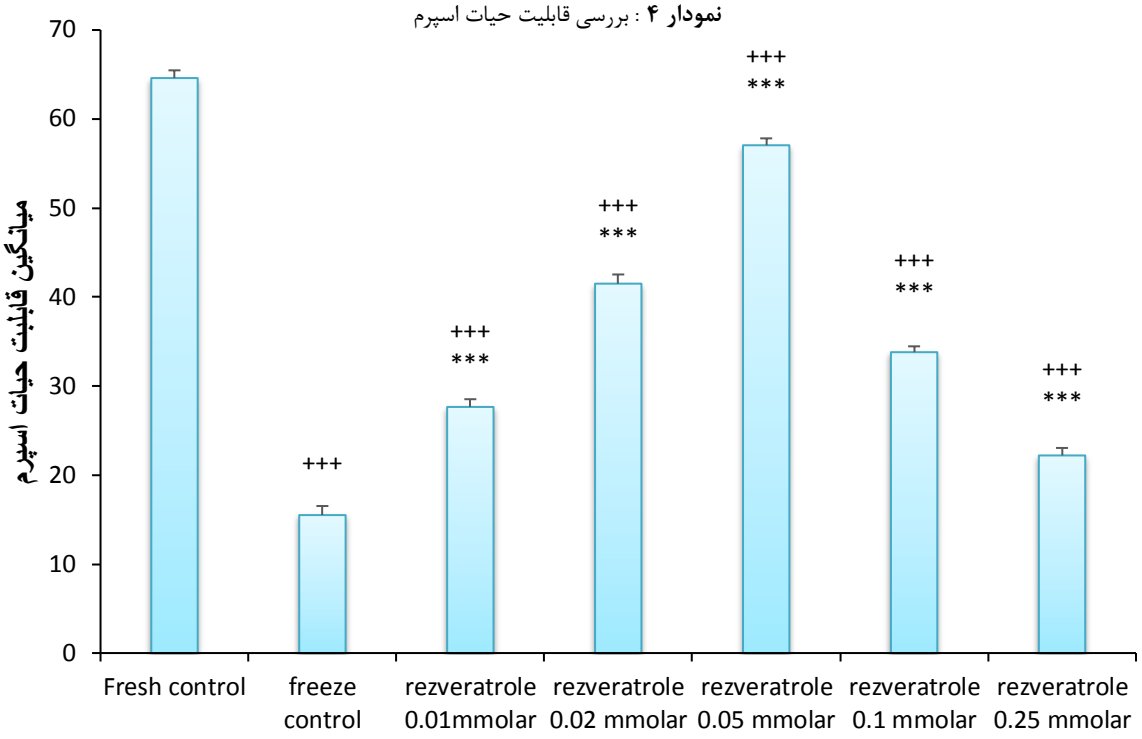
+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

زنده‌مانی، شکل‌گیری و غلظت اسپرم

همان‌طور که نمودار ۴ نشان می‌دهد، تقریباً همه دوزهای رزوراترول به‌ویژه ۰/۰۵ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری باعث افزایش اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد (P<۰/۰۵)، به‌جز دوز ۰/۲۵ میلی‌مولار.

نمودار ۴ : بررسی قابلیت حیات اسپرم



نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

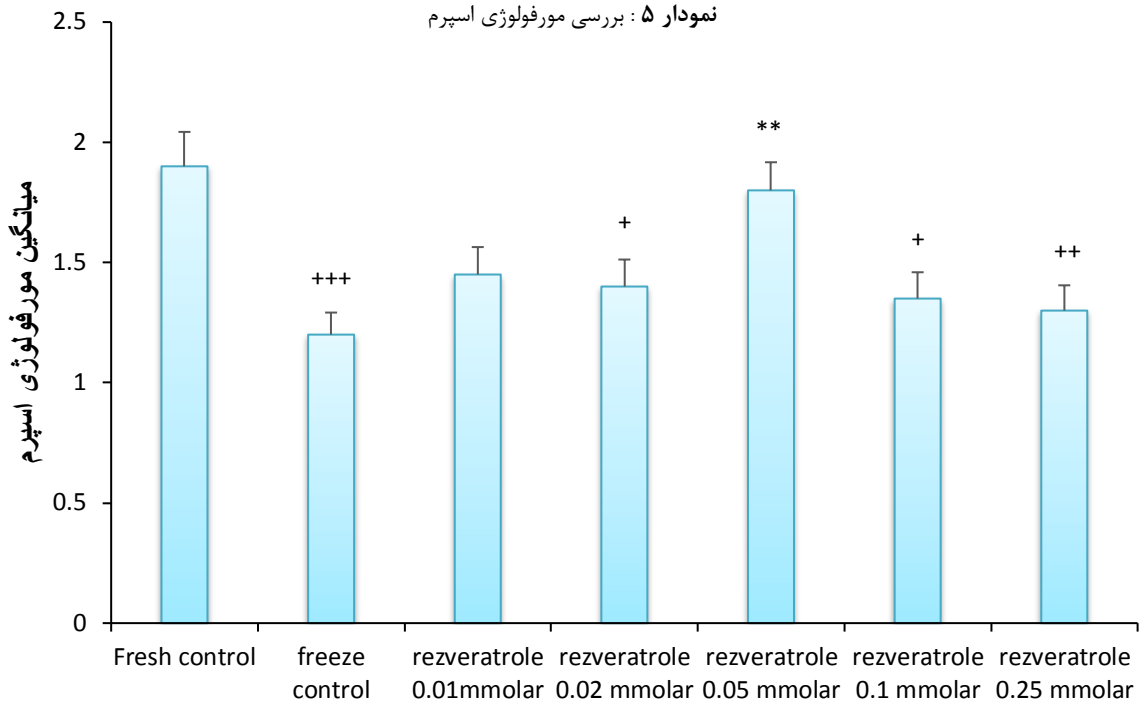
+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

یافته‌های ما نشان داد که میانگین مورفولوژی طبیعی اسپرم ها با تمام غلظت‌های رزوراترول افزایش می‌یابد. بااین‌حال، این در گروه رزوراترول ۰/۰۵ میلی‌مولار نسبت به گروه شاهد فقط به‌طور قابل‌توجهی بالاتر بود (P<۰/۰۵) (نمودار۵).

علاوه‌براین، مطابق نمودار ۴ و۶، غلظت اسپرم در بیشتر دوزهای رزوراترول در مقایسه با گروه کنترل به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت (P<۰/۰۵). همچنین رزوراترول ۰/۰۵ میلی‌مولار بالاترین اثر را داشت؛ درحالی‌که رزوراترول ۰/۲۵ میلی‌مولار غلظت اسپرم را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد.

نمودار ۵ : بررسی مورفولوژی اسپرم



نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

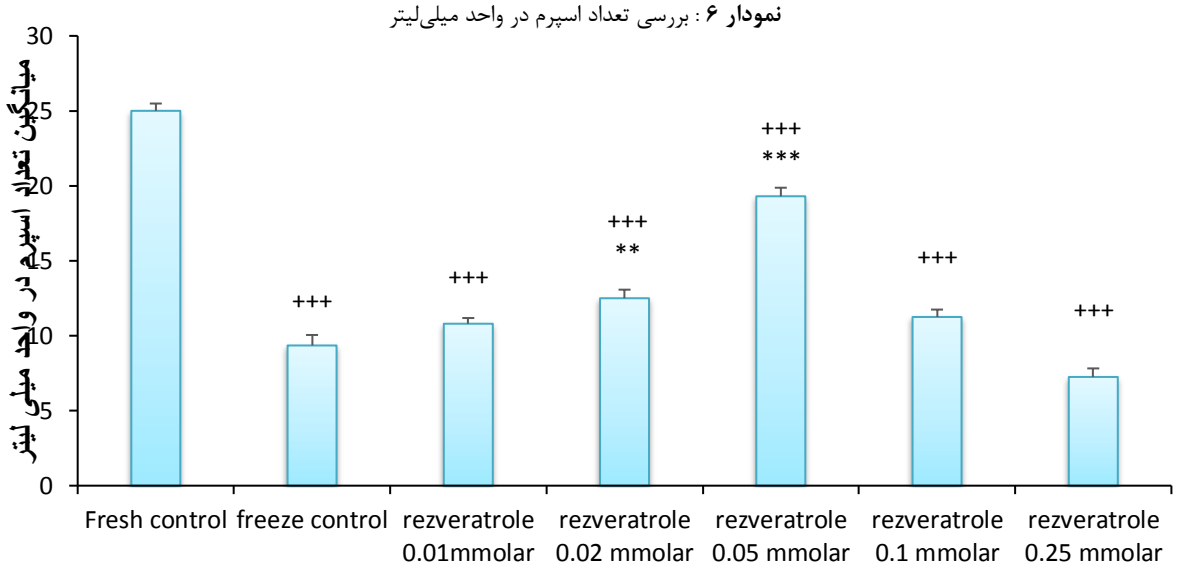
+ $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

++ $p < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

* $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

نمودار ۶ : بررسی تعداد اسپرم در واحد میلی‌لیتر



نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

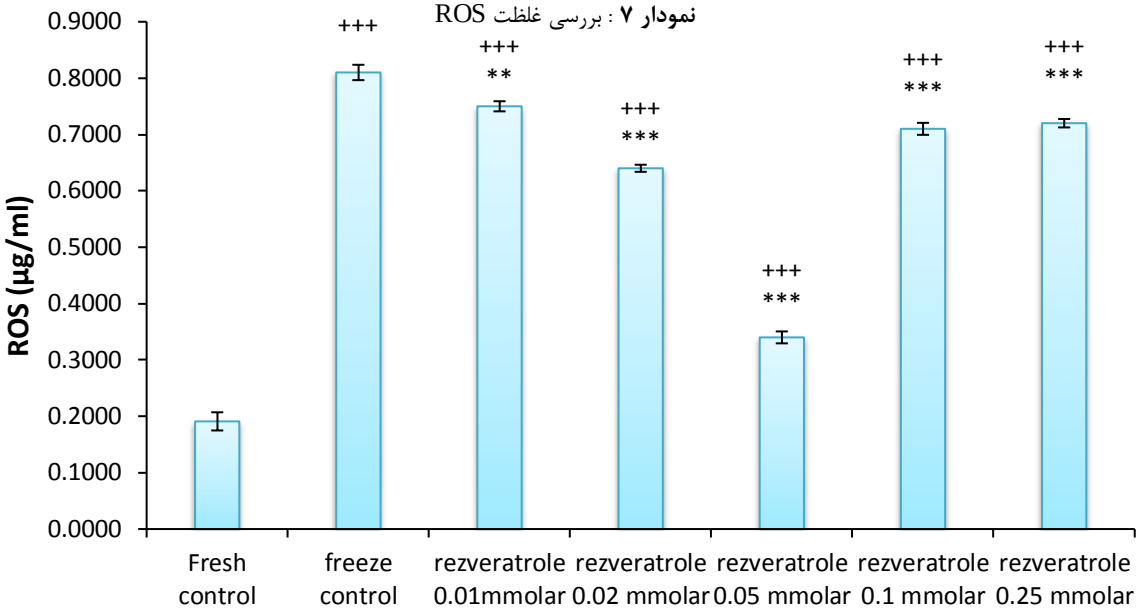
* $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر و MDA

مطابق نمودار ۷، یافته‌های ما نشان می‌دهد که در تمام غلظت‌های رزوراترول به‌ویژه ۰/۰۵ میلی‌مولار به‌طور معنی-داری تولید ROS را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می-دهد (P<۰/۰۵). براساس نمودار ۸، رزوراترول ۰/۰۲ و به-ویژه رزوراترول ۰/۰۵ میلی‌مولار به‌طور قابل‌توجهی MDA را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌دهد (P<۰/۰۵).

نمودار ۷ : بررسی غلظت ROS



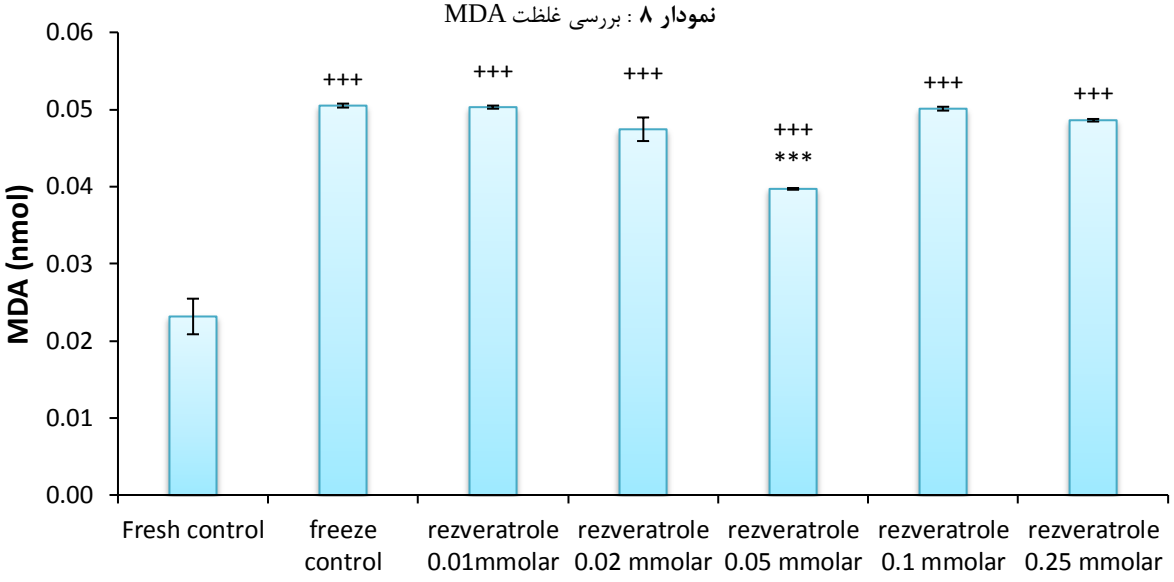
نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

** $p < 0/01$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

نمودار ۸ : بررسی غلظت MDA



نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

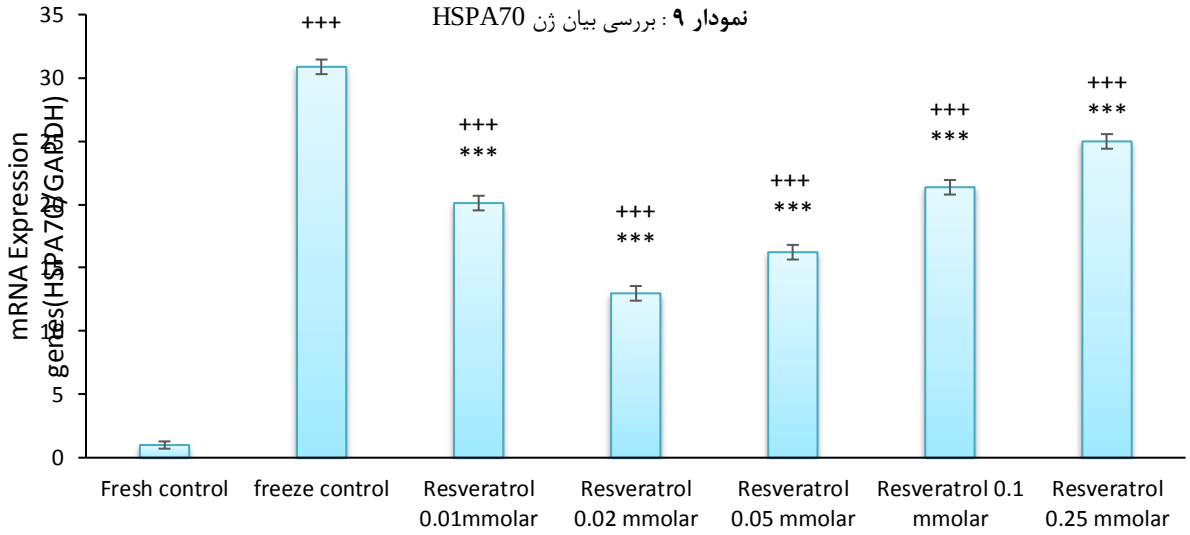
*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

آپوپتوز و بیان ژن‌های HSPA70 و Caspase3

یافته‌ها نشان داد که بیشترین بیان ژن HSPA70 در گروه کنترل مشاهده شده است و تمام دوزهای رزوراترول به‌ویژه ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌مولار بیان را در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد (P<۰/۰۵) (نمودار ۹).

جالب توجه است که همین نتایج در مورد بیان ژن caspase3 در سطح معناداری P<۰/۰۵ مشاهده شده است (نمودار ۱۰).

نمودار ۹ : بررسی بیان ژن HSPA70

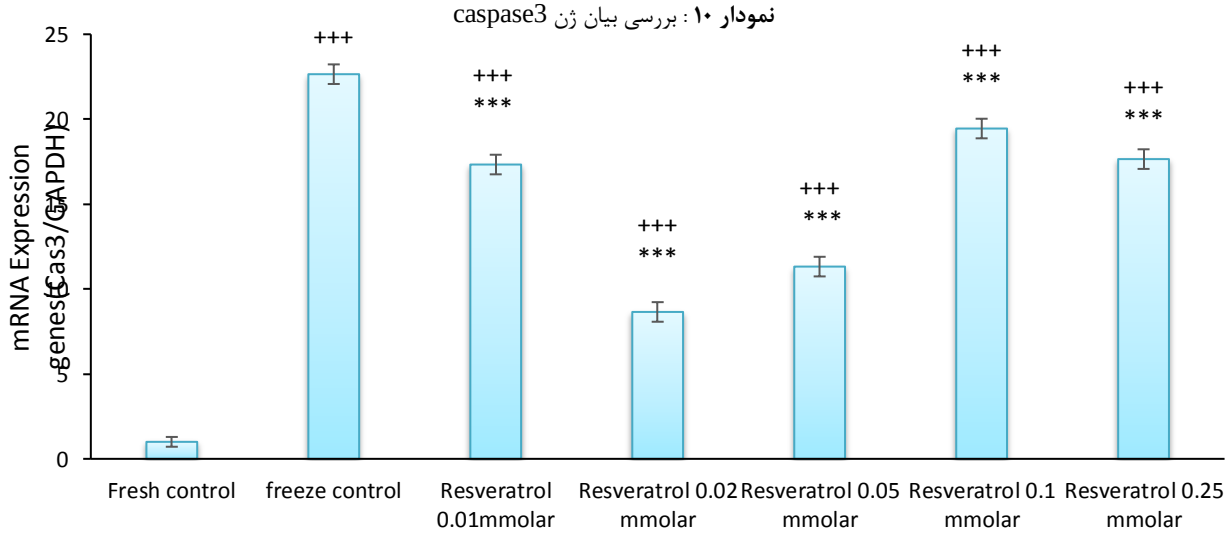


نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

نمودار ۱۰ : بررسی بیان ژن caspase3



نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

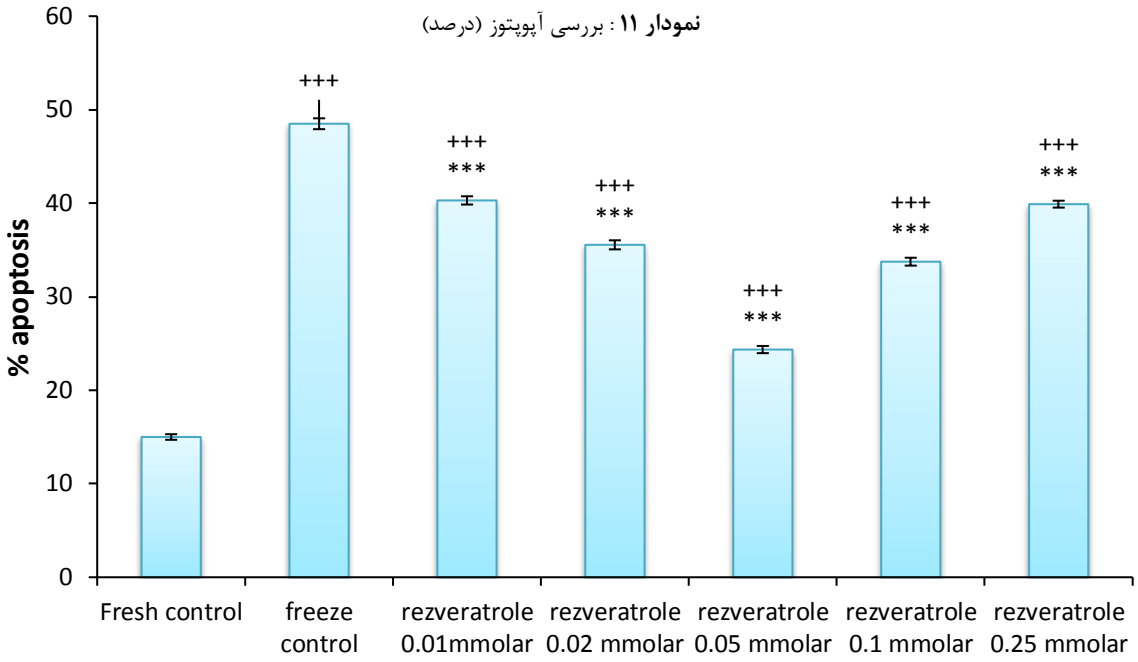
+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

* $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

همچنین بررسی نمودار ۱۱ نشان داد که تمام غلظت-های رزوراترول باعث کاهش آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل می‌شود (P<۰/۰۵). همان‌طورکه در نمودار ۱۱ نشان داده شده است، آپوپتوز در ۰/۵میلی‌مولار کاهش یافته و کمترین میزان آپوپتوز در این دوز رخ داده است.

نمودار ۱۱: بررسی آپوپتوز (درصد)



نتایج به‌صورت Mean ± SEM گزارش شده است.

+++ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل تازه

*** $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل فریز

بحث

اساسی‌ترین و رایج‌ترین آزمایش مورد استفاده در زمینه پیش‌بینی باروری، بررسی کیفیت پارامترهای اسپرم می‌باشد (۲۳). نظربه‌اینکه افزایش کیفیت اسپرماتوزوآ، رابطه مستقیمی با موفقیت در باروری دارد و اسپرم‌هایی با تحرک بالا و مورفولوژی نرمال منجر به افزایش میزان باروری می-گردند، پس می‌توان با جداسازی اسپرم‌های پرتحرک و سالم، گامی مهم در افزایش میزان موفقیت IVF برداشت. بنابراین در این مطالعه سعی شد تا با استفاده از روش up Swim به اسپرم‌هایی با کیفیت بالا دست یابیم. مسأله مهم دیگر که کیفیت اسپرماتوزوآ را تحت‌الشعاع قرار می‌دهد، افزایش سطح ROS در مایع منی می‌باشد؛ افزایش تولید ROS و ایجاد استرس اکسیداسیون، سبب لیپید پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشای پلاسمایی اسپرم و همچنین آسیب به ویژگی‌های حرکتی اسپرم‌ها و ساختار کروماتین می‌شوند و در نهایت توانایی باروری اسپرم را کاهش می‌دهند (۲۴).

انجماد اسپرم از طریق شوک سرد منجر به کاهش تحرک اسپرم و اختلال در یکپارچگی غشا membrane، اختلال در واکنش آکروزوم و عملکرد میتوکندری می‌شود (۲۵).

طی فرآیند انجماد - ذوب، کاهش سطح آنتی‌اکسیدان و افزایش غلظت ROS رخ می‌دهد که سبب نقص‌های فراوانی در غشا و در نهایت مورفولوژی اسپرم می‌گردد. افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی سبب افزایش معنادار

اسپرم‌های غیرطبیعی و در نتیجه کاهش معنی‌دار تحرک و توانایی بقای اسپرم‌ها می‌شود (۲۶).

در تحقیق حاضر تعداد اسپرم‌ها پس از انجماد نیز بررسی و نشان داده شد که تغییرات شدید دمایی طی انجماد یک پدیده طبیعی نیست که سلول بتواند خود را با آن تطبیق دهد و به دنبال این تغییرات کاهش تعداد اسپرم ایجاد می‌شود. اسپرم یک سلول هوازی است و طی عمل سوخت‌وساز خود، رادیکال آزاد تولید می‌نماید و این عملکرد را در طول مدت انجماد به‌صورت مداوم حفظ می‌کند؛ بنابراین به‌دلیل کاهش سطح آنتی‌اکسیدان موجود در مایع منی، توازن طبیعی بین تولید ROS و سطح آنتی‌اکسیدان در اسپرم به‌هم می‌خورد و به‌این‌ترتیب به‌دلیل عدم تعادل ایجادشده، تغییرات مخربی در کیفیت ساختار اسپرم و عملکرد آن ایجاد خواهد شد. در طی تکنیک‌های پردازش اسپرم، بخشی از حجم سمینال پلاسما (که حاوی انواع آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد) برداشته می‌شود؛ همچنین به‌دلیل سانتریفیوژهای مکرر، تولید ROS نیز افزایش می‌یابد (۲۷). در مطالعه Patel و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش گردید که بسیاری از عوامل فیزیولوژیکی، ژنتیکی و محیطی در باروری مردان تاثیرگذار است، استرس اکسیداتیو، سطوح پایین ویتامین C و E. طبق مطالعات Patel و همکارانش آسیب غشای لیپیدی با عوارضی در مورفولوژی و تحرک اسپرم در ارتباط است که بیانگر سطوح بالای ROS در غشای اسپرم است. این نتایج با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد (۲۷).

علیرغم پیشرفت‌های اخیر در زمینه شناخت بیولوژی انجماد و استفاده از روش‌های گوناگون در انجماد اسپرم، هنوز هم درصد موفقیت لقاح و باروری با اسپرم منجمد – ذوب‌شده پایین است. در تحقیق حاضر نیز همانند سایر تحقیقات نشان داده شد که فرآیند انجماد - ذوب به‌دلیل وجود عوامل مختلف آسیب‌زننده به سلول از قبیل شوک سرمایی و استرس‌اکسیداتیو، سبب کاهش کیفیت اسپرم و در نتیجه کاهش پتانسیل باروری می‌شود. غشای اسپرم نسبت به پراکسیدهیدروژن H2O2 فوق‌العاده نفوذپذیر می‌باشد و به‌نظر می‌رسد که مهم‌ترین عامل آسیب‌رسان به اسپرم همین H2O2 است که افزایش آن باعث لیپید پراکسیداسیون غشا می‌شود (۲۸).

همچنین در مطالعه Soleas و همکاران در سال ۱۹۹۷ عنوان گردید که افزودن رزوراترول قبل از فرآیند انجماد قادر به جلوگیری از آسیب اکسیداتیو به اسپرم در مردان نابارور و همچنین مردان بارور است. علاوه‌براین مشخص شده است که این ترکیب قادر به کاهش ROS است و نیز کاهش میزان H2O2، مهار تشکیل رادیکال‌های چربی، حفظ یکپارچگی غشا و تعادل یونی می‌شود که با نتایج حاصل از پژوهش ما همخوانی داشت (۲۹).

بنابراین می‌توان گفت افزایش تولید ROS و در نتیجه اکسیداتیو و تولید آلدهیدهای‌سیتوتوکسیک، سبب تغییرات بیوشیمیایی غشا می‌شود و با تخریب غشا و آسیب به آکروزوم و فرآیند تولید ATP، موجب کاهش تحرک و توان بقای اسپرم‌ها می‌گردد (۲۹،۳۰).

درنتیجه باتوجه‌به مطالعات صورت‌گرفته در این خصوص، به‌نظر می‌رسد که مکانیسم دفاعی اسپرم برای محافظت از ساختار سلولی‌اش در مقابل استرس‌های اکسیداسیون طی فرآیند انجماد و ذوب ظرفیت و کارایی لازم را ندارد؛ بنابراین ضروری است که برای جبران کمبود سپر دفاعی، آنتی‌اکسیدان‌های خارجی به اسپرم اضافه گردد. در ساله‌ای اخیر تلاش محققان بر این بوده است که با افزودن آنتی‌اکسیدان به محیط شستشوی اسپرم، میزان ROS حاصل از سانتریفیوژهای مکرر و استرس‌های اکسیداتیو حاصل از آن را طی آماده‌سازی اسپرم کاهش دهند (۳۱).

زیرا به خاطر فرآیند انجماد - ذوب تعداد اسپرم به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. چون در فرآیند up swim با

اسپرم متحرک روبه‌رو هستیم، بنابراین این کاهش را می‌توان به تعداد اسپرم‌های متحرک نسبت داد و کاهش آن را طی فرآیند انجماد - ذوب به خاطر نقص فعالیت میتوکندری دانست (۳۲).

مطالعه Branco و همکاران نیز نشان داد که افزودن آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی Resveratrol و اسید-آسکوربیک به محلول انجمادی سیمن انسان در حفظ ساختار DNA اسپرم در هر دو گروه مردان بارور و نابارور به‌خصوص در گروه نابارور، پس از انجماد بسیار مؤثر بوده است و با حضور این دو مکمل تغییری در شکل و غلظت اسپرم پس از انجماد مشاهده نشد (۳۳).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدان‌های محلول در آب مانند ویتامین C و آنتی‌اکسیدان‌های محلول در چربی مانند ویتامین E باعث کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شوند (۳۴). هیچ گزارشی در مورد تأثیر این آنتی‌اکسیدان بر کیفیت پارامترهای اسپرم انسان وجود ندارد.

افزودن ویتامین E به محلول انجمادی اسپرم انسانی نیز در مطالعه Taylor و همکاران در سال ۲۰۰۹ مورد ارزیابی قرار گرفت؛ تأثیر مواد فوق بر تحرک اسپرم مشهود بود، هرچندکه در افزایش درصد بقا و حفظ ساختار DNA تأثیری نداشت (۳۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن رزوراترول، به‌ویژه دوزهای ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌مولار، به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش تحرک و به‌ویژه تحرک پیش‌رونده اسپرم می‌شود. Garcez و همکاران نیز در مطالعه خود در سال ۲۰۱۰ تأثیر افزودن آنتی‌اکسیدان شیمیایی Resveratrol را به محلول انجمادی اسپرم انسان مورد بررسی قرار دادند. آنها مشاهده نمودند که غلظت و مورفولوژی اسپرم پس از فرآیند انجماد بدون اثر بر تحرک اسپرم حفظ شده است (۳۶).

همان‌طور که در نمودار ۷ نشان داده شد، سطح ROS در تمام دوزهای رزوراترول به‌جز ۰/۲۵ میلی‌مولار کاهش می‌یابد. اما مهم‌ترین کاهش در دوز ۰/۰۲ میلی‌مولار و به‌ویژه ۰/۰۵ میلی‌مولار اتفاق افتاد که ممکن است فرضیه رزوراترول وابسته به دوز را تأیید کند و ۰/۰۵ میلی‌مولار را به‌عنوان دوز بهینه برای نمونه‌های انسانی درنظر بگیرد. این یافته‌ها با نتایج مطالعات پرز و همکاران (۲۰۱۵) و Mata و همکاران (۲۰۱۲) سازگار است که به ترتیب از دوز ۱ میلی‌مولار و ۱,۵ میلی‌مولار برای نمونه اسپرم گاو و گوزن قرمز استفاده کردند (۱۸، ۲۶).

اخیراً در مطالعات داخل سلولی مدل‌های حیوانی نشان داده شده است که رزوراترول قدرت تولید اسپرم را در موش‌های صحرایی با تحریک محور هیپوتاالموسی – هیپوفیزی - گنادی و بدون القای عوارض جانبی افزایش می‌دهد (۳۷).

در خرگوش نیز رزوراترول به‌وسیله افزایش سطح تستوسترون خون می‌تواند اثر مثبت بر روی تعداد اسپرم‌های بیضه و تحرک اسپرم‌های اپیدیدیم داشته باشد (۳۸).

به‌طورمشابه، در مطالعه حاضر، کاهش تحرک A و B با دوز ۰/۱ میلی‌مولار آغاز شد و بیشترین کاهش قابل‌توجه در بالاترین دوز رزوراترول ۰/۲۵ میلی‌مولار مشاهده شد (نمودار ۱). این ممکن است منشاء وابسته به دوز رزوراترول و عوارض جانبی آن را در دوزهای بالاتر از ۰/۰۵ میلی‌مولار نشان دهد. همچنین، یافته‌های مطالعه ما نشان داد که تقریباً تمام دوزهای رزوراترول باعث افزایش زنده‌ماندن می‌شوند (نمودار۴). مجدداً، این افزایش در دوزهای ۰/۰۲ و ۰/۰۵ بارزتر بود که تأثیر سطح آنتی‌اکسیدان را بر اثربخشی آن تأیید می‌کند، بنابراین دوزهای ۰/۰۲ و ۰/۵ میلی‌مولار را می‌توان به‌عنوان دوزهای مطلوب درنظر گرفت. بیشترین تأثیر در مورفولوژی و غلظت اسپرم در رزوراترول ۰/۰۵ و ۰/۰۲ میلی‌مولار بود. جالب‌توجه است که روند کاهشی این شاخص‌ها نیز با افزایش دوزهای رزوراترول به‌طور قابل‌توجهی

معکوس شد (نمودار۵، ۶ و ۷). نتایج مطالعه مایکل و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که مصرف رزوراترول ۱/۵ پس از محافظت در برابر انجماد، باعث زنده‌ماندن در اسپرم سگ می‌شود (۲۵).

رزوراترول، سلول‌ها را از استرس پیش‌اکسیداتیو و آسیب بافتی محافظت می‌کند. علاوه‌براین Chan و همکاران نشان دادند که ترکیبی از ترانس رزوراترول و ویتامین‌های C یا Eدر حفاظت از سلول‌ها مؤثرتر از هر سه آنتی‌اکسیدان به‌تنهایی می‌باشد (۳۹).

مطالعات متعدد حاکی از آن است که HSP70 علاوه‌بر لقاح، در رشدونمو جنین نیز نقش دارد (۴۰). نتایج مطالعه Juan و همکاران (۱۹۹۸) نشان داده است که وجود آنتی‌بادی HSP70 باعث کاهش سرعت رشد بلاستوسیت در موش می‌شود (۴۱). چندین مطالعه همچنین حاکی از آن است که HSP70 مهارکننده آپوپتوز در رشد اولیه جنینی است و مهار HSP70 باعث کاهش رشد بلاستوسیت می‌شود و ممکن است با افزایش مرگ‌سلولی و ناباروری مردان همراه باشد (۴۲).

یافته‌های مطالعه ما نشان داد که بیان ژن HSP70 با تمام دوزهای رسوراترول کاهش می‌یابد. دراین‌حالت، دوزهای ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌مولار نیز بیشترین تأثیر را داشتند. وجود این پروتئین به بلوغ و باروری اسپرم مربوط می‌شود. کاهش یا عدم بیان این پروتئین در مراحل میوز با نقایص میوز مانند آنوپلوئیدی، اولیگوزواسپرمیا و آزواسپرمی همراه خواهد بود (۴۳). هرگونه نقص در بیان این پروتئین در مرحله نهایی اسپرموژنز منجر به آسیب DNA می‌شود و به‌دلیل عدم حذف سیتوپلاسمی، مورفولوژی غیرطبیعی و جایگزینی نامناسب این پروتئین، اتصال تخمک نیز از بین می‌رود (۴۰). این پروتئین همچنین به‌عنوان یک پروتئین متصل به کلسیم و یک جمع‌کننده مناسب از پروتئین‌های غشای اسپرم در فرآیند خازن عمل می‌کند (۴۴).

ازطرف‌دیگر، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف رزوراترول، به‌ویژه در دوزهای ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌مولار، باعث کاهش قابل‌توجه آپوپتوز می‌شود (نمودار۱۱). از نظر روند کاهشی و فزاینده، نتایج قبلی تکرار شده و اثر دوزهای خاص این آنتی‌اکسیدان را تأیید می‌کند.

در مورد اثر آنتی‌اکسیدان رسوراترول بر بیان ژن‌کاسپاز، نتایج کاملاً مشابه یافته‌های مربوط به ژن HSP70 و وضعیت آپوپتوز بود (۴۵). چندین مکانیسم برای توجیه اثرات بیان ژن کاسپاز -۳ ارائه شده است که بخشی از آن مربوط به فعالیت آنزیم، مهار تکثیر سلولی، تغییر در سطح گلوتاتیون و از بین بردن رادیکال‌های آزاد است (۴۶).

نتیجه‌گیری

مکمل رزوراترول به‌عنوان یک عامل زنده‌ماندن قبل از انجماد نقش فعالی در کاهش عوارض این روش دارد و بنابراین می‌تواند منجر به افزایش موفقیت ART شود. این آنتی‌اکسیدان کیفیت پارامترهای اسپرم را به طرز چشم‌گیری افزایش داده و سطح اکسیژن فعال را کاهش می‌دهد که در نتیجه باعث کاهش آپوپتوز و بیان ژن‌های HSP70 و Caspase3 می‌شود. نتایج نشان داد دوزهای ۰/۰۲ و ۰/۰۵ میلی‌مولار، به‌عنوان دوزهای مطلوب، می‌تواند در ART بسیار مفید و موثر باشند. بااین‌حال، باتوجه‌به کمبود مطالعات نمونه انسانی و عدم انحنای نمونه‌ها، مطالعات بیشتر با تمرکز بر دوز دقیق رزوراترول و توجه به مکانیسم‌های عملکردی مربوطه ممکن است لازم باشد.

ملاحظات اخلاقی

قبل از شروع مطالعه کد اخلاق از معاونت پژوهشی دانشگاه اخذ گردید. اطلاعات در هر مرحله بدون نام بیمار تحلیل و بررسی گردید و نتایج حاصل از بررسی پرونده‌ها

کاملا محرمانه نزد محقق محفوظ ماند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم با تائیدیه به شماره IR.IAU.QOM.REC.1398.002 مورد تائید قرار گرفت.

حمایت مالی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام گردید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمامی اساتید دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات و همچنین مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم که ما را در انجام این پژوهش یاری نموده‌اند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Sherman JK. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. Fertility and Sterility. 1973 May;24(5):397. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)39678-9.
2. Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2000 Jul 1;91(1):65-70. https://doi.org/10.1016/s0301-2115(99)00255-9.
3. Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. Cell stress & chaperones. 1998 Dec;3(4):228. https://doi.org/10.1379/1466-1268(1998)003.
4. Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. Journal of Vascular Surgery. 1999 Apr 1;29(4):748-51. https://doi.org/10.1016/s0741-5214(99)70329-0.
5. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cellular and molecular life sciences. 2005 Mar 1;62(6):670. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6.
6. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell. 1998 Feb 6;92(3):351-66.https://doi.org/10.1016/s0092- 8674(00)80928-9.
7. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jäättelä M, Schwarz T. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. The Journal of clinical investigation. 1995 Mar 1;95(3):926-33. https://doi.org/10.1172/jci117800.
8. Sun Y, Chen XY, Liu J, Cheng XX, Wang XW, Kong QY, Li H. Differential caspase-3 expression in noncancerous, premalignant and cancer tissues of stomach and its clinical implication. Cancer Detection and Prevention. 2006 Jan 1;30(2):168-73. https://doi.org/10.1016/j.cdp.2006.02.004.
9. Kim PK, Armstrong M, Liu Y, Yan P, Bucher B, Zuckerbraun BS, Gambotto A, Billiar TR, Yim JH. IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo. Oncogene. 2004 Feb;23(5):1125-35. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207023
10. Guo J, Bourre L, Soden DM, O'Sullivan GC, O'Driscoll C. Can nonviral technologies knockdown the barriers to siRNA delivery and achieve the next generation of cancer therapeutics?. Biotechnology advances. 2011 Jul 1;29(4):402-17. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.003.
11. Khori V, Shalamzari SA, Isanejad A, Alizadeh AM, Alizadeh S, Khodayari S, Khodayari H, Shahbazi S, Zahedi A, Sohanaki H, Khaniki M. Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. European journal of pharmacology. 2015 Oct 15;765:179-87. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.031.
12. Bucak MN, Ateşşahin A, Varışlı Ö, 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 Mar 15;67(5):1060-7. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.004.

13. Hatef B, Taromchi A, Nejatbakhsh R, Farrokhi A, Shokri S. Supplementation of freezing media with stromal cell-derived factor1α preserves human sperm from cryodamage. Cryobiology. 2017 Dec 1;79:37-42. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.09.004.
14. Keogh LM, Byrne PG, Silla AJ. The effect of antioxidants on sperm motility activation in the Booroolong frog. Animal reproduction science. 2017 Aug 1;183:126-31. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.008.
15. Yan W, Kanno C, Oshima E, Kuzuma Y, Kim SW, Bai H, Takahashi M, Yanagawa Y, Nagano M, Wakamatsu JI, Kawahara M. Enhancement of sperm motility and viability by turmeric by-product dietary supplementation in roosters. Animal reproduction science. 2017 Oct 1;185:195-204. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.021.
16. Mani A, Staikou C, Karmaniolou I, Orfanos N, Mylonas A, Nomikos T, Pafiti A, Papalois A, Arkadopoulos N, Smyrniotis V, Theodoraki K. N-acetylcysteine and desferoxamine reduce pulmonary oxidative stress caused by hemorrhagic shock in a porcine model. Journal of Investigative Surgery. 2017 Jan 2;30(1):33-40. https://doi.org/10.1080/08941939.2016.1215580.
17. Santus P, Corsico A, Solidoro P, Braido F, Di Marco F, Scichilone N. Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. 2014 Dec 1;11(6):705-17. https://doi.org/10.3109/15412555.2014.898040.
18. Mata- Campuzano M, Álvarez- Rodríguez M, Alvarez M, Anel L, de Paz P, Garde JJ, Martínez- Pastor F. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37 C up to four hours. Reproduction in domestic animals. 2012 Dec;47(6):907-14. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01990.x.
19. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Human reproduction update. 2010 Jan 1;16(3):231- 45. https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048.
20. Kvist U, Björndahl L, editors. Manual on basic semen analysis: 2002. Oxford University Press; 2002. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.058.
21. Garcez ME, dos Santos Branco C, Lara LV, Pasqualotto FF, Salvador M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. Fertility and sterility. 2010 Nov 1;94(6):2118-21. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.058.
22. Buege JA, Aust SD. [30] Microsomal lipid peroxidation. InMethods in enzymology 1978 Jan 1 (Vol. 52, pp. 302-310). Academic Press.
23. Sá R, Cunha M, Rocha E, Barros A, Sousa M. Sperm DNA fragmentation is related to sperm morphological staining patterns. Reproductive biomedicine online. 2015 Oct 1;31(4):506-15. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.019.
24. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, MahmoudAMA, WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. 2000: Cambridge University Press.
25. Nicholson C, 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.
26. Fraser L, Strzeżek J. Effects of freezing–thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. Reproduction in domestic animals. 2005 Dec;40(6):530-6. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00626.x.
27. Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Chełmonska-Soyta AC, Kurpisz M. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. Int J Androl 1997; 20(5): 255- 64.
28. O'Connell M, McClure N, Lewis S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod 2002; 17(3): 704-9.
29. Ball BA, Vo A, Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilicfluorescent dye C1l-BODIPY581/591. J Androl 2002; 23(2): 259-69.
30. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J Androl 2000; 21(6): 895-902.
31. Lass A, Akagbosu F, and Brinsden P, Sperm banking and assisted reproduction treatment for couples following cancer treatment of the male partner. Hum Reprod Update 2001; 7(4): 370-7.
32. 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.
33. Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. Cryobiology 2010; 60(2): 235-7.
34. Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. Effect of

antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. Reprod Biomed Online 2009; 18(2): 184-9.
35. Garcez ME, dos Santos Branco C, Lara LV, Pasqualotto FF, Salvador M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. Fertil Steril 2010; 94(6): 2118-21.
36. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. Journal of andrology. 2005 Nov 12;26(6):654-60. https://doi.org/10.2164/jandrol.05016.
37. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin K. Levels of reactive oxygen species before and after sperm preparation: comparison of swim-up and L4 filtration. Arch Androl 1994; 32: 169.
38. Chan MM, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A, Fong D. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. Biochem Pharmacol 2000; 60(10): 1539-48
39. Shin S, Jeon JH, Park D, Jang MJ, Choi JH, Choi BH, et al. trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. Arch Pharm Res 2008; 31(1): 83-7.
40. Juan ME, González-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodríguez-Gil JE, Planas JM. transResveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. J Nutr 2005; 135(4): 757-60.
41. Lima S, Cedenho A, Cenedeze M, Bertolla R, Oehninger S, Srougi M. Male infertility and heat shock protein 70–2 (HSP70–2) expression. Fertility and Sterility. 2004 Sep 1;82:S181. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.07.475.
42. Ji ZL, Duan YG, Mou LS, Allam JP, Haidl G, Cai ZM. Association of heat shock proteins, heat shock factors and male infertility. Asian Pacific Journal of Reproduction. 2012 Mar 1;1(1):76-84. https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60053-6.
43. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cellular and molecular life sciences. 2005 Mar 1;62(6):670. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6.
44. Zhang XG, Hong JY, Yan GJ, Wang YF, Li QW, Hu JH. Association of heat shock protein 70 with motility of frozen-thawed sperm in bulls. Czech Journal of Animal Science. 2015 Jan 1;60(6):256-62. https://doi.org/10.17221/8239-CJAS.
45. Amidi F, Pazhohan A, Nashtaei MS, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell and tissue banking. 2016 Dec 1;17(4):745-56. https://doi.org/10.1007/s10561- 016-9566-5.

Volume 25, Issue 81, Spring 2022, Pages: 67-85

Original Article

Evaluation of the effect of antioxidant resveratrol on sperm biochemical matches and expression of caspase 3 and HSP70 genes in infertile stenotratospermia under freezing conditions

Narges Ashoori, Shahrebanoo Oriani, Akram Eidi, Kambiz Roshanaei

[1] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
[3] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4] Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Received: 29 November 2021 **Accepted:** 26 January 2022

Abstract

Introduction: One of the most important measures to increase sperm quality and consequently the success of assisted reproductive technology (ART) is to protect sperm against oxidative reactions during freezing. Zoratrol is an antioxidant compound that protects the body against chronic diseases by scavenging free radicals. The aim of this study was to evaluate the effect of resveratrol on human sperm functional parameters and to evaluate apoptosis and expression of HSP70 and Caspase3 genes after cryopreservation.

Materials and Methods: In this study, 40 men referred to the ACECR Infertility Center in Qom, all of whom met the inclusion criteria, were used as the target population. The target population was divided into two groups of men with normal WHO criteria and a second group of patients with asthenotracheal sperm. After sperm sampling, the sperm was frozen with different concentrations of resveratrol. Semen samples were examined for sperm parameters including concentration, morphology, motility, viability, reactive oxygen species (ROS), apoptosis and expression of HSP70 and caspase 3 genes.

Results: Resveratrol significantly increased sperm motility by 0.02 and 0.05 mM ($P \leq 0.001$), but decreased compared to the control group with resveratrol by 0.25 and 0.1 mM ($P \leq 0.001$). With the exception of resveratrol 0.25 mM, all doses of resveratrol, especially 0.05 mM, increased sperm count ($P<0.05$). All doses of resveratrol, especially 0.02 mM and 0.05 mM, reduced apoptosis and expression of HSP70 and caspase3 genes.

Conclusion: In general, resveratrol supplementation before cryopreservation significantly increased sperm quality and reduced the side effects of cryopreservation shock.

Keywords: Sperm, Resveratrol, Stenotratospermia, HSP70

Corresponding Author: Shahrebanoo Oriani, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. Tel: 09916942026; Email: Sh_oryan@khu.ac.ir