

نقش ضد اکسیدان‌تی زیلتول بر فراسنجه‌های سلولی اسپرم انسانی طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی

داریوش غلامی^{۱*} و رشید علیجانی اردشیر^۲

^۱ ایران، آمل، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، دانشکده زیست‌فناوری، گروه زیست‌فناوری میکروبی

^۲ ایران، آمل، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، دانشکده زیست‌فناوری، گروه زیست‌فناوری دریا

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۴

چکیده

انجماد اسپرم روشی مناسب برای بقای تولیدمثل در مردان مبتلا به سرطان و همچنین افراد مبتلا به نقص‌های اسپرمی از جمله ناهنجاری‌های آزو اسپرمی و الیگو اسپرمی است. آسیب‌های ناشی از انجماد اسپرم منجر به کاهش نرخ زنده‌مانی سلول‌های اسپرم و به دنبال آن کاهش باروری می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر پلی‌الکل قندی زیلتول به‌عنوان ضد اکسیدان‌تی طی فرآیند انجماد اسپرم و در نتیجه، کاهش سطح رادیکال‌های آزاد تولیدشده است. در این مطالعه ۶۰ نمونه اسپرم نرمال انسانی از ۶۰ فرد مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقات ناباروری پژوهشگاه رویان جمع‌آوری شد و به سه گروه شامل گروه کنترل تازه، گروه کنترل انجمادی (نمونه‌هایی که با محیط انجمادی اسپرم به‌تنهایی منجمد شدند) و گروه تیمار انجمادی (با محیط انجمادی مکمل شده با غلظت ۵۵ میلی‌مولار ضد اکسیدان‌تی زیلتول منجمد شدند) تقسیم‌بندی شدند. جنبایی اسپرم، زنده‌مانی و تورم غشای اسپرمی بر اساس معیارهای WHO ارزیابی و همچنین سطح رادیکال‌های آزاد در نمونه‌های مذکور بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن زیلتول به محیط انجمادی باعث بهبودی فراسنجه‌های اسپرمی و همچنین بالا رفتن نرخ زنده‌مانی سلول‌ها شد. سطح رادیکال‌های آزاد در حضور زیلتول به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت. از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که افزودن زیلتول به‌عنوان یک ترکیب ضد اکسیدان‌تی به محیط انجمادی طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی اسپرم، یک راهکار مناسب در جهت کاهش سطح رادیکال‌های آزاد این محیط انجمادی است.

واژه‌های کلیدی: ضد اکسیدان‌تی، انجماد-یخ‌گشایی، اسپرم، زیلتول

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱-۴۴۴۴۲۱۳۵، پست الکترونیکی: d.gholami@ausmt.ac.ir

مقدمه

تشکیل بلوره‌های یخ درون سلولی، شوک سرمایی و آسیب اسمزی منجر به افزایش سطوح گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) (Reactive oxygen species) می‌شود (13; 20; 37; 38). افزایش سطوح ROS منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود و همچنین باعث کاهش ظرفیت ضد اکسیدان‌تی کل می‌شود. این امر منجر به اختلال در پتانسیل میتوکندری و غشای پلاسمای سلول‌های اسپرم نیز می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پی آزادسازی الکترون‌های اسیدهای

انجماد اسپرم روشی ارزشمند برای حفظ باروری در کلینیک‌های فناوری کمک باروری است (۳۴). این روش مؤثرترین راه برای حفظ باروری در مردان مبتلا به اولیگواسپرمی، سرطان، بیماری خود ایمنی و غیره است (۲۱; ۴۴). علی‌رغم موفقیت‌های به‌دست آمده با این روش، آسیب ساختاری و کارکردی به اسپرم که منجر به کاهش قابلیت زنده‌مانی، جنبایی و در نهایت کاهش توانایی لقاح اسپرم می‌شود، اتفاق می‌افتد (7; 14; 16; 17). طی این فرآیند

مواد محافظ انجمادی نفوذناپذیر مانند سوکروز و ترهالوز نمی‌توانند از غشای سلولی عبور کنند. در نتیجه، فقط در خارج از سلول کارکرد خود را نشان می‌دهند. این ماده بر غشای سیتوپلاسمی سلول تأثیرگذار بوده و می‌تواند مانند یک محلول عمل کرده و نقطه انجمادی سلول اسپرم را کاهش دهد (۱۲). تحقیقات نشان می‌دهد که افزودن مواد محافظ انجمادی کربوهیدراتی مانند انواع قندها، بقای سلول‌ها را پس از انجماد در اسپرم انسان، ماهی و سگ افزایش می‌دهد (۱۳).

در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی برای بهبود فرآیند انجماد اسپرم با مکمل‌سازی محیط انجمادی با ضد اکسیدانت‌ها انجام شده است و نتایج آن‌ها پتانسیل محافظتی ضد اکسیدانت‌ها را در فرآیند انجماد نشان می‌دهد (۷). زیلیتول نوعی الکل قندی پنج‌کربنه طبیعی است که در بیشتر مواد گیاهی از جمله بسیاری از میوه‌ها و سبزی‌ها یافت می‌شود. این ترکیب به‌طور گسترده محصولات غذایی «بدون قند» و به‌عنوان ترکیبی که جایگزین شکر شده است، استفاده می‌شود (۴۷).

این مطالعه باهدف بررسی اثرات به‌عنوان یک ضد اکسیدانت طی فرآیند انجماد- یخ‌گشایی اسپرم انسانی بر جنبایی و زنده‌مانی اسپرم، سطح ROS و MDA موجود در منی انجام شد.

مواد و روشها

بیشتر مواد شیمیایی از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شده است و در غیر این صورت نام شرکت سازنده درج شده است.

نمونه‌گیری، آماده‌سازی و رقیق‌سازی اولیه اسپرم: در این مطالعه نمونه منی ۶۰ فرد نر موزوسپرم (افرادی که اسپرم نرمال دارند) برای بررسی اثر زیلیتول بر فراسنجه‌های سلولی و فرآیند آپوپتوز مطابق معیارهای WHO (نمونه‌های اسپرم با شرایط حداقل حرکت ۴۰ درصد، حداقل غلظت

نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها منجر به آسیب‌های برگشت-ناپذیر به سلول می‌شوند (4; 18; 29; 36; 41). در شرایط استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد مانند آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن منجر به افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشا (PUFAs) (Polyunsaturated fatty acids) می‌شود که موجب از دست دادن یکپارچگی ساختاری و کارکردی غشاها می‌شود. این شدت آسیب پراکسیداتیو PUFAs را می‌توان با تخمین محصولات آلدئیدی پایدار انتهایی پراکسیداسیون لیپید از قبیل مالون دی‌آلدئید (MDA) (Malondialdehyde) سنجید.

امروزه تلاش‌های زیادی برای توسعه فناوری انجماد اسپرم در حال انجام است. مهم‌ترین مسئله در یخ‌زدن منی متوقف کردن فعالیت‌های متابولیکی اسپرم در زمان یخ‌زدن است؛ به‌گونه‌ای که جنبایی اسپرم تا زمان یخ‌گشایی و فرآیند لقاح به تعویق نیفتد. سرما و فرآیند انجماد و ایجاد بلوره‌های یخ درون سلولی می‌تواند برای اسپرم زیان‌بار باشد. مقدار آثار سوء این فرآیند در گونه‌های مختلف متفاوت است (۳۵). امروزه، معمول‌ترین روش حفاظت سلول‌ها و بافت‌ها از انجماد، استفاده از گلیسرول و دی‌متیل سولفوکساید به‌عنوان محافظ انجمادی (Cryoprotectant) است. از آنجایی‌که این ترکیبات در برخی از مسیرهای پیام‌رسان سلولی اختلال ایجاد می‌کنند، استفاده از این محافظ‌های انجمادی، به‌ویژه در زمینه پزشکی تولیدمثل و همچنین ذخیره سلول‌های اجدادی (Progenitor)، بسیار مسئله‌ساز است (۴۲). مطالعات شرم‌ن نشان داد که استفاده از گلیسرول ممکن است، باعث تغییراتی از جمله نوسانات غشایی، تغییر در غشای درونی آکروزومی و به‌هم ریختگی میتوکندریایی شود. گلیسرول به‌طور گسترده در انجماد اسپرم انسان استفاده می‌شود، اما می‌تواند به درون سلول نفوذ کند و بر ساختار غشایی، نفوذپذیری و پایداری لیپید-های دو لایه موجود در سطح غشا و همچنین پروتئین‌های سطحی آن اثر بگذارد (۴۰).

نمونه‌ها در نیتروژن مایع سپری شد، پایوت‌ها از نیتروژن مایع خارج شده و بعد از چند دقیقه که در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند، محتوای پایوت به نسبت ۱ به ۴ در محلول Tyrode (۵) مخلوط شد. سپس نمونه‌ها در ۸۰۰g و به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب در ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول Tyrode به آرامی مخلوط شد و برای ارزیابی‌های مختلف کیفیت اسپرم مورد استفاده قرار گرفت (۱۳).

ارزیابی فراسنجه‌های مربوط به جنبایی با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer)

برای بررسی جنبایی اسپرم پس از فرآیند انجماد-یخ-گشایی از نرم‌افزار کامپیوتری CASA نسخه ۵٫۱ (شرکت میکروپتیک، اسپانیا) استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۶ میکرولیتر از منی یخ‌گشایی شده به زیر میکروسکوپ معکوس فاز کنتراست منتقل و جنبایی اسپرم با استفاده از رایانه مجهز به نرم‌افزار SCA (Sperm class analyzer) ارزیابی شد. فراسنجه‌هایی که توسط این سیستم برآورد شدند، شامل جنبایی کل ((Total motility (%))، جنبایی پیش‌رونده ((Progressive motility (%)) LIN، ((Linearity (%)) STR ((Sperm track straightness))، ((VCL Curvilinear velocity))، ((STR=VSL/VAP×100))، ((ALH (Amplitude of Lateral head displacement))، ((micron/sec))، ((Average path velocity))، ((micron))، ((VSL Straight line velocity))، ((micron/sec)) و ((micron/sec)) BCF (Beat cross frequency (Hz)) بودند.

بررسی زنده‌مانی اسپرم

بررسی زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین صورت گرفت. در این روش ابتدا ۱۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰ میکرولیتر از مخلوط رنگ ائوزین-نگروزین روی لام مخلوط شده و یک دقیقه زمان داده شد تا واکنش

۲۰ میلیون و حداکثر مورفولوژی ۴ درصد اسپرم غیرنرمال جمع‌آوری شد (۴۳). این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ گروه کنترل تازه، کنترل بعد از انجماد و تیمار انجمادی (محیط انجمادی مکمل با زیلیتول) انجام شد. همچنین مطالعه حاضر به وسیله کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران (Ir.ausmt.rec.1402.02) تأیید شد.

نمونه‌های منی از افراد مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری پژوهشگاه رویان مطابق ۳-۷ روز دوره عدم نزدیکی با روش استمناء (Masturbation) یا نزدیکی (Coitus) در ظرف‌های استریل پلاستیکی اخذ شد. نمونه‌های اخذ شده ۲۰ تا ۴۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه جهت مایع شدن نگهداری شده و سپس به لحاظ حجم، رنگ، ویسکوزیته، غلظت و pH مورد ارزیابی قرار گرفتند. فرآیند رقیق‌سازی منی با افزودن محیط انجمادی اسپرم و با نسبت ۱ به ۱ انجام شد و سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا متعادل‌سازی انجام شود.

محیط انجمادی: محیط انجمادی بر پایه زرده تخم‌مرغ به صورت زیر تهیه شد:

۱/۵ گرم از گلوکز را با ۱/۳ گرم سترات سدیم و ۱/۳ گرم گلیسین با همدیگر مخلوط و زیلیتول در غلظت‌های ۲۵، ۵۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار (به صورت جداگانه) افزوده شد و ۱۵ میلی‌لیتر گلیسرول و ۲۰ میلی‌لیتر زرده تخم‌مرغ به آن اضافه و با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس محلول مذکور به مدت ۴۰ دقیقه در حمام آب با دمای °C ۵۶ انکوبه و به دنبال آن pH بین ۶/۸ تا ۷/۲ متعادل شد. محلول با فیلتر ۰/۴۴ میکرومتر (شرکت مرک، آمریکا) فیلتر و در °C ۲۰- نگهداری شد (۴۳).

فرآیند انجماد-یخ‌گشایی: ابتدا پایوت‌های حاوی اسپرم و محیط انجمادی به مدت ۱۵ دقیقه در ۵ سانتی‌متری بالاتر از سطح نیتروژن مایع نگهداری و سپس در نیتروژن مایع فرو برده شدند. بعد از اینکه دو تا سه هفته از قرارداد

رنگ‌پذیری صورت بگیرد. سپس با یک لام ساده با زاویه ۴۵ درجه روی نمونه و لام تا انتها کشیده تا اسمیر تهیه شد و اجازه داده شد تا در دمای اتاق خشک شود. سپس با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰x شمارش انجام و زنده‌مانی برحسب درصد بیان شد (۱۵).

بررسی یکپارچگی

غشا (HOST) (Hypo-Osmotic Swelling Test)

به منظور بررسی یکپارچگی غشای سلول مقدار ۰/۷۳۵ گرم از دهیدرات سدیم سیترات با ۱/۳۵۱ گرم از D-فرکتوز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد (محلول تهیه شده به محلول Swelling معروف است). سپس محلول Swelling با نسبت ۱:۲ رقیق شده و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

مقدار ۸۰ میکرولیتر از محلول Swelling با ۴۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مقدار ۱۰ میکرونی‌تر از نمونه تهیه شده را با ۱۰ میکرولیتر از رنگ اتوزین روی لام حاشیه‌دار گذاشته و مخلوط کرده و یک دقیقه زمان داده می‌شود تا واکنش انجام شود. سپس با یک لام ساده روی آن کشیده و اسمیر تهیه می‌شود. لام در دمای محیط خشک شده و با میکروسکوپ نوری (مدل CKX41، شرکت اولیمپوس، ژاپن) با عدسی ۴۰X بررسی شد. اسپرم‌ها با دم بدون تغییر، مرده و اسپرم‌هایی که دم آن‌ها پیچ‌خورده و متورم است و واکنش در آن‌ها صورت گرفته زنده در نظر گرفته شدند.

اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد سلول

اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد با دستگاه کمی لومینسانس انجام گرفت. اساس دستگاه کمی لومینسانس (مدل INDRA 200، شرکت آپتاسیس، چین) شمارش فوتون‌ها در دقیقه است و با واحد RLU/S/million sperm بیان می‌شود.

در این روش، ابتدا مایع منی با دور ۳۰۰g و مدت زمان ۷

دقیقه سانتریفیوژ شد تا مایع منی از سلول‌های اسپرم جدا شود. سپس رسوب محتوی سلول‌ها با محلول PBS به حجم ۳ میلی‌لیتر رسانده شد و دوباره با دور ۳۰۰g و مدت زمان ۷ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار 20×10^6 سلول از محلول برداشته و با محلول PBS به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس در چاهک‌های پلیت سفید در یک ستون از بالا به پایین به ترتیب: بلانک حاوی ۲۰۰ میکرو لیتر محلول PBS، کنترل منفی شامل ۱۹۶ میکرو لیتر به اضافه ۵ میکرو لیتر محلول لومینال، کنترل مثبت شامل ۱۷۵ میکرو لیتر محلول PBS به اضافه ۲۰ میکرو لیتر H_2O_2 و ۵ میکرو لیتر لومینال افزوده شد. به دنبال آن مقدار ۱۹۵ میکرو لیتر از نمونه و ۵ میکرو لیتر از محلول لومینال به هر چاهک اضافه شد و پس از تنظیمات دستگاه به مدت ۱۵ دقیقه خوانش صورت گرفت (۱۳).

اندازه‌گیری میزان تغییرات مالون دی‌آلدنید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای منی با استفاده از روش TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances)

ابتدا نمونه منی به مدت ۵ دقیقه و با دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۲ پلاسمای منی به TBA (۱۰۰ میکرو لیتر از مایع رویی (پلاسمای منی) به همراه ۹۰۰ میکرو لیتر آب مقطر در لوله آزمایش ریخته شد و به هر لوله ۵۰۰ میکرو لیتر معرف TBA اضافه شد) با همدیگر مخلوط و بلافاصله به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به مدت ۵ دقیقه نمونه روی یخ انکوبه و به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شد و مایع رویی با دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانش شد. جذب نوری نمونه‌های مختلف یادداشت و در پایان، غلظت MDA (نانومول در میلی‌لیتر) بر اساس ضریب جذب مولی آن محاسبه شد (۳).

آنالیز آماری

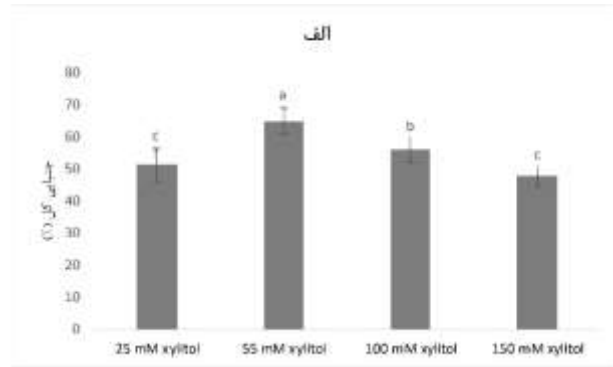
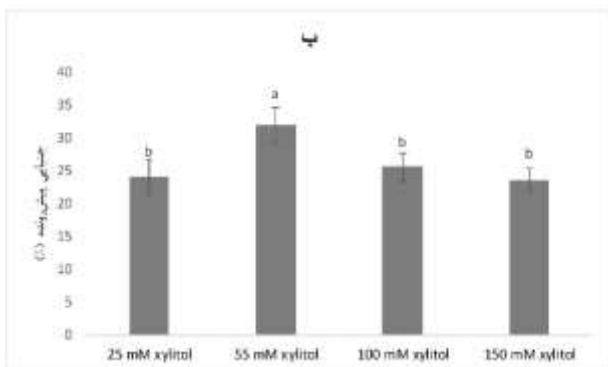
داده‌های حاصل از مطالعه حاضر به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آنالیز واریانس یک‌راهه و به دنبال آن آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه چندگروهی استفاده شد. نمایش داده‌ها به صورت $Mean \pm SD$ ارائه شد و معنی‌دار بودن نتایج در سطح ($P < 0.05$) در نظر گرفته شده است.

نتایج

تعیین غلظت زیلیتول

مرحله نخست مطالعه تعیین غلظت مناسب زیلیتول است. زیلیتول در غلظت‌های ۲۵، ۵۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار

محاسبه شده و به محیط انجمادی اضافه شد. سپس فراسنجه‌های اسپرمی شامل جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده در حضور هر غلظت و بعد از طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده شده است، میانگین جنبایی کل ($4/11\% \pm 4/93/64$) و جنبایی پیش‌رونده ($2/73\% \pm 3/1/93$) در حضور غلظت ۵۵ میلی‌مولار بیشترین درصد را نشان می‌دهد ($P < 0.05$); بنابراین، از بین غلظت‌های مورد مطالعه، غلظت ۵۵ میلی‌مولار به‌عنوان غلظت نهایی ضد اکسیدانت انتخاب شد و سایر ارزیابی‌های اسپرمی در حضور این غلظت انجام گرفت.



شکل ۱- میانگین جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده برحسب درصد در غلظت‌های مختلف زیلیتول. درصد جنبایی کل (الف) و جنبایی پیش‌رونده (ب) در غلظت ۵۵ میلی‌مولار از پلی‌الکل زیلیتول نسبت به غلظت‌های دیگر به‌طور معنی‌دار بالاتر است. ستون‌های با حروف غیرمشابه، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند ($P < 0.05$) و ستون‌های با حروف مشابه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند. حرف a برای گروه با بالاترین مقدار به کار می‌رود و مقادیر پایین‌تر به ترتیب حروف الفبا مشخص می‌شوند.

بررسی فراسنجه‌های اسپرمی

میانگین درصد جنبایی در گروه‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. بالاترین درصد جنبایی مربوط به گروه کنترل تازه و پایین‌ترین درصد جنبایی مربوط به گروه انجمادی ($P < 0.05$) است. گروه تیمار انجمادی نیز با گروه کنترل انجمادی دارای تفاوت معنی‌داری در میزان جنبایی کل بود، همچنین با گروه کنترل تازه نیز تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

همچنین درصد جنبایی پیش‌رونده نیز دارای روند مشابهی بود. بالاترین درصد جنبایی پیش‌رونده مربوط به گروه کنترل تازه و پایین‌ترین مربوط به کنترل انجمادی بود ($P < 0.05$). گروه کنترل تازه با گروه تیمار انجمادی نیز تفاوت معنی‌دار داشت. بین کنترل بعد از انجماد و گروه تیمار بعد از انجماد نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۱- درصد جنبایی کل و پیش‌رونده گروه‌های مورد مطالعه طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی.

جنبایی (%)	کنترل تازه	کنترل انجمادی	تیمار انجمادی	P-value
جنبایی کل	۷۹/۰۵ ± ۳/۳۷ ^a	۴۹/۹۴ ± ۱/۵۹ ^c	۶۰/۰۷ ± ۳/۲۳ ^b	۰/۰۰۰۱
جنبایی پیش‌رونده	۵۹/۶۸ ± ۱۱/۱۹ ^a	۲۳/۱۱ ± ۶/۹۵ ^c	۳۱/۵۸ ± ۱۰/۷۲ ^b	۰/۰۰۰۳
جنبایی غیرپیش‌رونده	۲۰/۶ ± ۹/۲	۲۳/۸ ± ۶/۶	۲۸/۴۶ ± ۱۰/۹۹	۰/۰۷۱

میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند، تفاوت معنی‌دار دارند ($P < ۰/۰۵$). تعداد تکرار = ۲۰. از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه چندگروهی استفاده شد.

ارزیابی شاخص‌های حرکتی

بالاتر بود. شاخص‌های یادشده در دو گروه کنترل بعد از انجماد و گروه تیمار بعد از انجماد اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند. دو شاخص LIN و ALH در دو گروه کنترل تازه و تیمار انجمادی اختلاف معنی‌دار نداشتند. شاخص STR در هر سه گروه مورد مطالعه فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($P > ۰/۰۵$).

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، شاخص VCL، VSL و VAP در گروه کنترل انجمادی نسبت به کنترل تازه و تیمار انجمادی به‌طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) پایین‌تر بود.

شاخص‌های LIN، ALH و BCF در گروه کنترل انجمادی نسبت به گروه کنترل تازه به‌طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$)

جدول ۲- مقایسه شاخص‌های حرکتی اسپرم طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی.

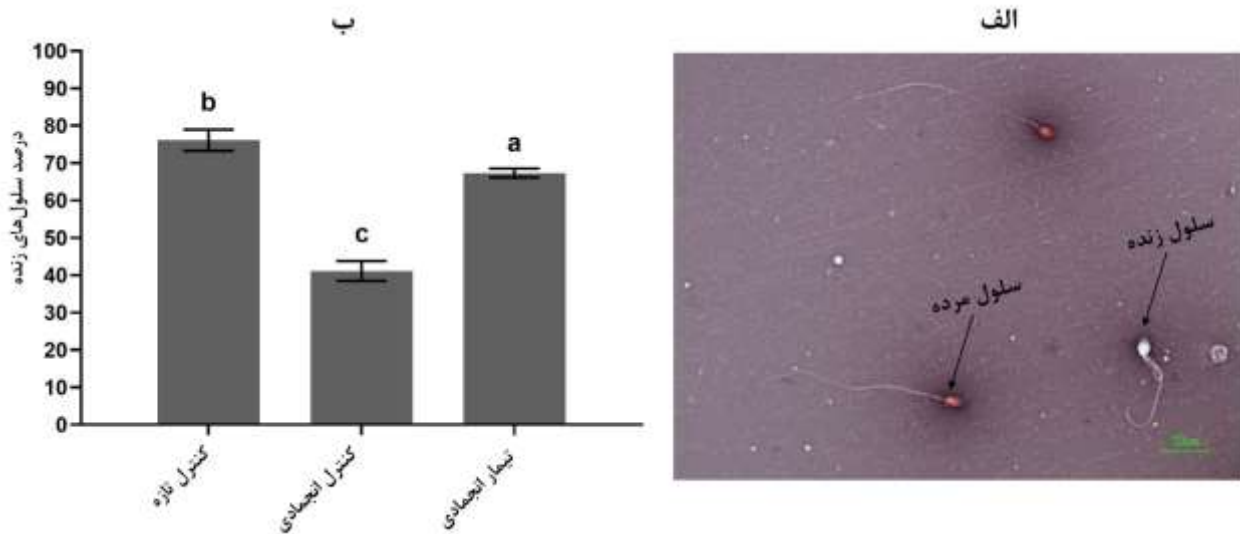
شاخص‌های حرکتی	کنترل تازه	کنترل انجمادی	تیمار انجمادی	P-value
VCL ($\mu\text{m/s}$)	۸۷/۱۴ ± ۹/۸۷ ^a	۴۹/۲۶ ± ۱۴/۷ ^c	۶۵/۵۹ ± ۱۴/۰۱ ^b	۰/۰۰۰۱
VSL ($\mu\text{m/s}$)	۴۲/۹۹ ± ۱۸/۰۱ ^a	۲۲/۵۸ ± ۹/۱۶ ^c	۳۲/۶۱ ± ۸/۸۹ ^b	۰/۰۰۰۳
VAP ($\mu\text{m/s}$)	۵۷/۴۵ ± ۲۱/۱۷ ^a	۲۸/۵۹ ± ۱۱/۱۳ ^c	۳۶/۸۱ ± ۸/۲۲ ^b	۰/۰۰۰۲
LIN (%)	۴۸/۵۷ ± ۸/۳۳ ^a	۳۴/۳۷ ± ۱۵/۳۲ ^b	۳۹/۳۸ ± ۸/۷۳ ^{ab}	۰/۰۰۰۵
STR (%)	۷۳/۹۷ ± ۷/۶۹	۶۴/۹۲ ± ۱۵/۵۸	۶۸/۱۲ ± ۹/۸۶	۰/۱۰۶
ALH (μM)	۲/۲۹ ± ۰/۶۳ ^a	۱/۵۲ ± ۰/۴۹ ^b	۱/۸۴ ± ۰/۳۸ ^{ab}	۰/۰۰۰۱
BCF (Hz)	۱۵/۲۳ ± ۳/۸ ^a	۹/۸۳ ± ۲/۱۵ ^b	۱۰/۲۶ ± ۳/۴۷ ^b	۰/۰۰۰۴

میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند، تفاوت معنی‌دار دارند ($P < ۰/۰۵$). مقادیر به صورت \pm میانگین بیان شدند. تعداد تکرار = ۲۰. از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه چندگروهی استفاده شد.

بررسی زنده‌مانی اسپرم

اسپرم‌ها در گروه کنترل تازه در مقایسه با گروه تیمار انجمادی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < ۰/۰۵$). زنده‌مانی طبیعی

مطابق شکل ۲، درصد اسپرم‌ها با زنده‌مانی طبیعی در دو گروه کنترل تازه (۷۶/۱۳ ± ۲/۸) و گروه تیمار انجمادی (۶۷/۳۳ ± ۲/۶) به‌طور معنی‌دار در مقایسه با کنترل انجمادی

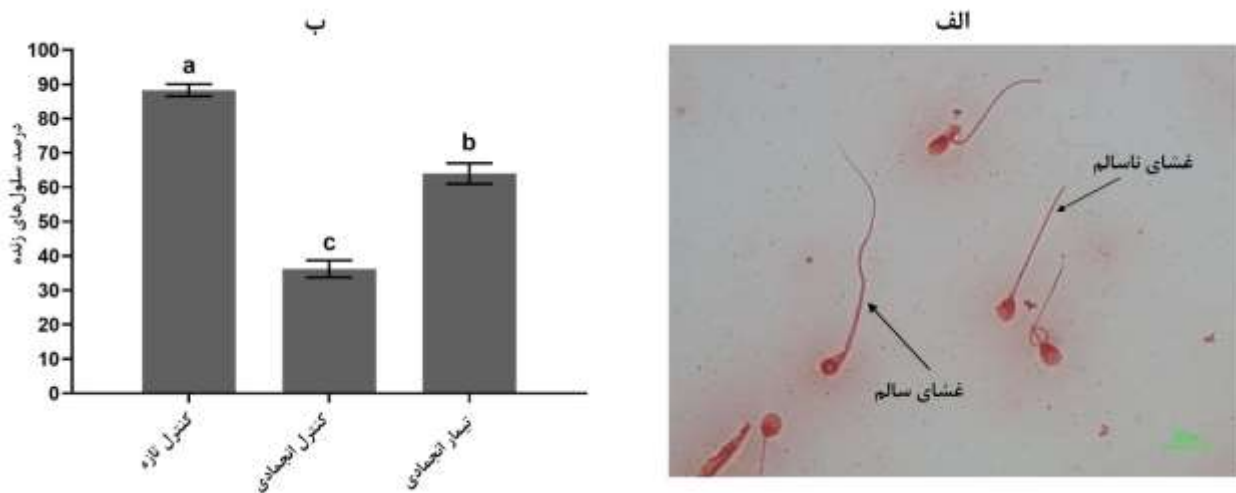


شکل ۲- درصد زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه. الف) تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست سلول‌های اسپرم؛ اسپرم‌های رنگ گرفته (قرمز) مرده و اسپرم‌های رنگ نگرفته (سفید) زنده هستند. ب) نرخ زنده‌مانی اسپرم در گروه کنترل تازه به‌طور معنی‌دار در مقایسه با کنترل انجمادی و گروه تیمار انجمادی بالاتر است. میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند، تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$). مقادیر به‌صورت \pm میانگین بیان شدند. تعداد تکرار = ۲۰، از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه چندگروهی استفاده شد.

انجماد ($36/76 \pm 0/68$) بالاتر بود ($P < 0.05$). یکپارچگی غشای اسپرم‌ها در گروه کنترل تازه در مقایسه با گروه تیمار بعد از انجماد به‌طور معنی‌داری متفاوت بود.

یکپارچگی غشا اسپرم در حضور و نبود زلیتول

مطابق شکل ۳ یکپارچگی غشای اسپرم‌ها در دو گروه کنترل تازه ($88/24 \pm 0/68$) و گروه تیمار بعد از انجماد ($64/4 \pm 0/68$) به‌طور معنی‌دار در مقایسه با کنترل بعد از

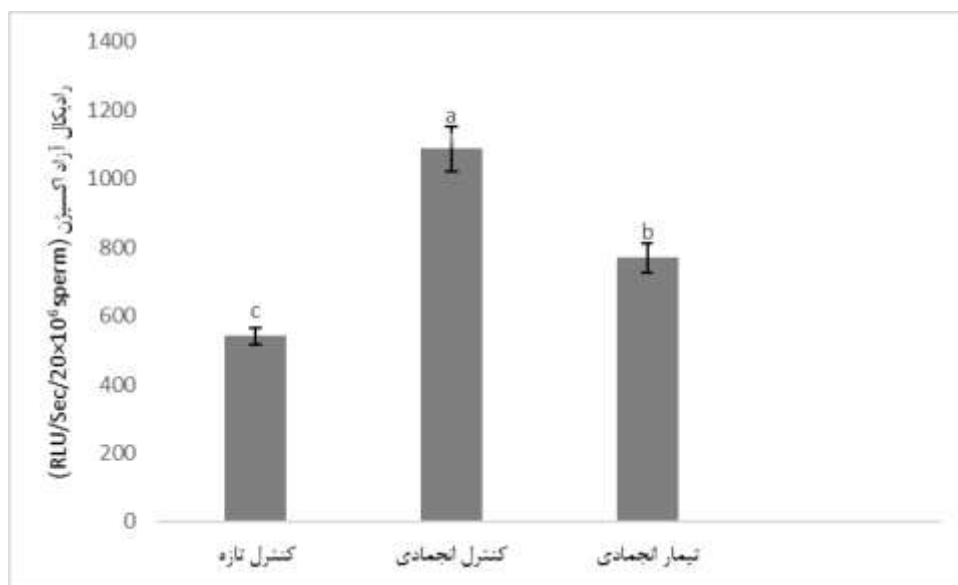


شکل ۳- یکپارچگی غشای اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه. الف) تصویر میکروسکوپ فاز کنتراست سلول‌ها؛ اسپرم‌های با دم متورم و پیچ‌خورده در محلول هیپواسموتیک دارای غشای سالم هستند در حالی که اسپرم با غشای ناسالم در محیط هیپواسموتیک تغییری نشان نمی‌دهد. ب) یکپارچگی غشای اسپرم در گروه کنترل تازه و گروه تیمار انجمادی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با کنترل انجمادی بالاتر است. میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند، تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$). تعداد تکرار = ۲۰، از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه چندگروهی استفاده شد.

اندازه‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژن

تیمار انجمادی ($769/00 \pm 42/73$ RLU/Sec/ 20×10^6 sperm) به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0/05$). همچنین رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گروه تیمار انجمادی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل تازه بالاتر بود ($P < 0/05$).

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گروه کنترل انجمادی ($1088/11 \pm 65/34$ RLU/Sec/ 20×10^6 sperm) نسبت به کنترل تازه ($540/34 \pm 25/01$ RLU/Sec/ 20×10^6 sperm) و



شکل ۴- سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گروه‌های مورد مطالعه. سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گروه کنترل انجمادی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با دو گروه کنترل تازه و تیمار انجمادی بالاتر است. میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند، تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0/05$). تعداد تکرار = ۲۰، از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه چندگروهی استفاده شد.

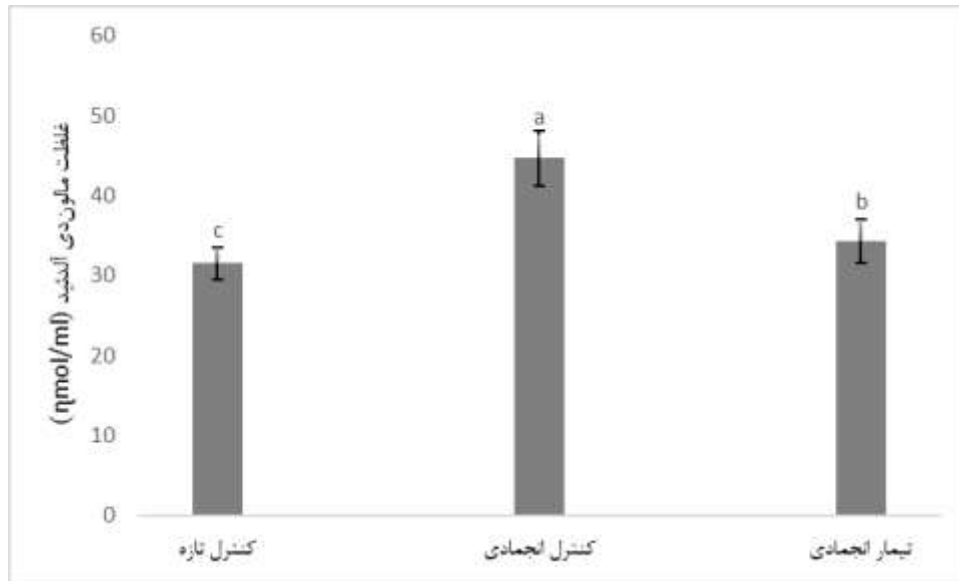
اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای منی

که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به تنش‌های گرمایی و سرمایایی اشاره کرد. این تنش‌ها که هنگام فرایند سردسازی و یخ-گشایی به اسپرم وارد می‌شوند، منجر به تولید تنش دیگری به نام تنش اکسیداتیو می‌شوند که احتمالاً دلیل اصلی کاهش پارامترهای حرکتی اسپرم است (۴۶). این تنش می‌تواند منجر به آسیب غشای اسپرم، آسیب DNA و شروع آپوپتوز شود (۳۹). یکی از مهم‌ترین عواملی که باعث آسیب به سلول اسپرم طی فرایند انجماد می‌شود، رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. رادیکال‌های آزاد را می‌توان اصلی‌ترین عامل تنش شیمیایی یا تنش اکسیداتیو طی فرایند انجماد-یخ-گشایی دانست.

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، سطح مالون دی-آلدئید در گروه کنترل انجمادی ($44/69 \pm 3/41$ nmol/ml) به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل تازه (nmol/ml) $31/54 \pm 2/02$ و گروه تیمار بعد از انجماد (nmol/ml) $34/36 \pm 2/71$ بیشتر بود ($P < 0/05$). همچنین سطح مالون دی‌آلدئید در گروه تیمار انجمادی نسبت به گروه کنترل تازه به‌طور معنی‌دار بالاتر بود ($P < 0/05$).

بحث

فرایند انجماد-یخ‌گشایی باعث تغییراتی در اسپرم می‌شود



شکل ۵- غلظت مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های مورد مطالعه. سطح مالون‌دی‌آلدئید در گروه کنترل انجمادی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با دو گروه کنترل تازه و تیمار انجمادی بالاتر است. میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند، تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$). تعداد تکرار = ۲۰، از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه چندگروهی استفاده شد.

اگرچه این روزها از انجماد اسپرم به‌طور گسترده برای حفظ باروری استفاده می‌شود، اما اثرات نامطلوب آن بر پارامترهای کلاسیک اسپرم، جنبایی، زنده‌مانی و سایر فراسنجه‌های اسپرم را نباید نادیده گرفت (۲۳). استفاده از ضد اکسیدانت‌ها در طول انجماد نشان‌دهنده اثرات مثبت بر فراسنجه‌های اسپرم است. مکمل ضد اکسیدانتی در اسپرم در افزایش جنبایی پس از یخ‌گشایی، حفظ نرخ بقای سلولی و مهار افزایش آسیب DNA که در طول اسپرم فعال نشده در طول ذخیره‌سازی رخ می‌دهد، کارآمدتر بود. (۴۸؛ ۵۰).

در مطالعه حاضر، اثرات ۵۵ میلی‌مولار ضد اکسیدانت زیلیتول بر پارامترهای کلاسیک اسپرم، نرخ زنده‌مانی، پراکسیداسیون غشای لیپیدها و رادیکال‌های اکسیژن آزاد پس از انجماد مایع منی بررسی شده است.

استرس اکسیداتیو به دلیل تولید ROS و کاهش ضد اکسیدانت‌های محیطی طی انجماد اسپرم رخ می‌دهد (۱۲) و استرس اکسیداتیو در اسپرم انسان بر ترکیب لیپیدها،

مقادیر اندک انواع گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (Reactive oxygen species) از نظر فیزیولوژیکی برای توانایی لقاح و واکنش آکروزومی و ظرفیت‌پذیری اسپرم نیاز است، هرچند مقادیر زیاد آن موجب آسیب به اسپرم می‌شود (۶). گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن از فعالیت آنزیم‌های مؤثر در فرایندهای فسفریلاسیون اکسیداتیو، گلیکولیز یا دیگر مسیرهای تولیدکننده ATP برای سلول اسپرم جلوگیری می‌کنند. مجموعه این عوامل باعث تنش اکسیداتیو خواهند شد که نتیجه آن در فاز اول، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا است و سپس تخریب و عبور از غشای سلول و در نهایت، دسترسی به اندامک‌های درون‌سلولی و تأثیر بر فعالیت‌های آن‌ها و تغییر برهم‌کنش‌های بیوشیمیایی در داخل سلول و نیز ایجاد شکستگی در DNA سلول‌های اسپرم که منجر به کاهش توان باروری اسپرم می‌شود (۱۱؛ ۱۹). این امر سبب می‌شود که محققین اقدام به استفاده از ضد اکسیدانت‌های سنتتیک در محیط‌های انجماد اسپرم به‌منظور جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد فعال و سپس خنثی‌سازی آنان در داخل و خارج سلول‌ها نمایند (۲۷).

را مهار و باعث احیای آهن می‌شود (۱۰) و در نتیجه، احتمال آسیب به سلول‌ها به حداقل می‌رسد و این یافته‌ها در تطابق با نتایج مطالعه حاضر است.

علاوه بر این، پراکسیداسیون لیپیدی به‌عنوان یک نشانگر اصلی استرس اکسیداتیو در سیستم فیزیولوژیکی شناسایی شده است که می‌تواند با اندازه‌گیری TBARS به‌عنوان معادل MDA تعیین شود (۸؛ ۴۹). این امر به دلیل تجمع ROS است که باعث اختلال در مونتاژ غشای سلولی می‌شود و باعث تغییر در سیالیت و نفوذپذیری، تغییر در انتقال یون و مهار فرآیندهای متابولیک می‌شود (۳۳). سطح پراکسیداسیون لیپید در پلاسما منی نشانگر خوبی از انواع اختلالات اسپرم است. افزودن ضد اکسیدانت‌ها به محیط انجماد خطرات پراکسیداسیون لیپیدی در غشای اسپرم را کاهش می‌دهد (۳۲). در این مطالعه، افزودن زیلتول باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در پلاسما مایع منی و کاهش سطح MDA شد که این یافته با یافته‌های پیشین مطابقت دارد (۳۰). همچنین با نتایج نیگو و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت دارد که در آن‌ها رابطه منفی معنی‌داری بین غلظت MDA پلاسما منی و تحرک اسپرم مشاهده شد و تأیید می‌کند که پراکسیداسیون لیپیدی مسئول کاهش قابل‌توجه در تحرک است (۳۱).

اثرات حفاظت انجمادی زیلتول بر سلول‌های اسپرم طی فرایند انجماد- یخ‌گشایی به‌خوبی شناخته‌نشده است. باین‌حال، ژانگ و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش دادند که زیلتول به‌طور قابل‌توجهی آسیب ناشی از بلوره‌های یخ بزرگ به بافت‌های عضلانی را کاهش می‌دهد. در اینجا، مولکول‌های زیلتول احتمالاً با تشکیل پیوندهای هیدروژنی بزرگ با پروتئین‌های ماهیچه‌ای، جایگزین مولکول‌های آب شدند و در نتیجه، ساختار آن‌ها در غیاب آب در حالت یخ‌زده تثبیت شده و مانع از تخریب ساختار بافتی شد (۴۷). گزارش‌ها حاکی از آن است که برخی از الکل‌های قندی، مانند زیلتول و سوربیتول، می‌توانند تثبیت برخی از

پروتئین‌ها و DNA تأثیر می‌گذارد و منجر به کاهش زنده ماندن، تحرک و پتانسیل باروری می‌شود (۱). نتایج حاصل از این مطالعه نیز در تطابق با مطالعات پیشین است (۱۳؛ ۱۵) و طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی زنده‌مانی و جنبایی سلول‌های اسپرم کاهش چشمگیری نشان داد. یکی از راهکارهای موجود برای مقابله با شرایط فرسایش اکسیداتیو در طول فرایند انجماد، استفاده از ضد اکسیدانت‌ها است. استفاده از ضد اکسیدانت زیلتول به‌عنوان یک پلی‌الکل قندی در محیط انجماد به‌عنوان یک ماده محافظ غیرقابل نفوذ به داخل سلول، احتمالاً با جلوگیری از تشکیل بلوره‌های یخ درون سلولی، کارکرد و ساختار اسپرم را تا حدودی محافظت می‌کند. این یافته در تطابق با یافته‌های پیشین است که نشان دادند که ترکیبات ضد اکسیدانت باعث کاهش آسیب‌های ناشی از انجماد اسپرم از جمله ترمیم کارکرد اسپرم و محافظت از ساختار آن می‌شوند (۲؛ ۲۵).

چنین آسیبی می‌تواند اندام‌های درون سلولی درگیر در تحرک و بقای سلول را به دلیل تغییر در فشار اسمزی و تشکیل بلوره‌های یخ که در طول فرایند انجماد رخ می‌دهد، به خطر بیندازد (۹)؛ بنابراین فرایند انجماد به‌تنهایی می‌تواند باعث تولید مولکول‌های ROS شود (۲۶). همان‌طور که از نتایج این مطالعه مشاهده می‌شود، در حضور زیلتول آسیب ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن به سلول‌های اسپرم طی فرایندهای انجماد-یخ-گشایی به حداقل می‌رسد و یکی از دلایل این امر این است که زیلتول می‌تواند به لیپیدهای غشای سلول‌ها متصل شود و با پوشاندن آن‌ها مانع از اکسیداسیون لیپیدها و افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن شود (۲۸). چکوما و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که زیلتول باعث افزایش سطح آنزیم‌های ضد اکسیدانت از جمله گلوتاتیون ردوکتاز، سوپراکسید موتاز و کاتالاز در شرایط آزمایشگاهی و در بدن موجودات زنده می‌شود. زیلتول در شرایط آزمایشگاهی اکسید نیتریک و رادیکال هیدروکسیل

از مولکول‌های آب را در اطراف سطح میوزین جایگزین کرده‌اند که منجر به تثبیت ساختاری پروتئین Ca^{2+} -ATPase می‌شود (۴۷).

نتیجه‌گیری

طبق نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه مشخص شد که در نتیجه افزودن زیلیتول با غلظت ۵۵ میلی‌مولار به محیط انجمادی اسپرم، بهبودی فراسنجه‌های اسپرمی از جمله جنبایی کل و جنبایی پیش‌رونده و همچنین زنده‌مانی سلول‌ها به‌طور قابل‌توجهی مشاهده می‌شود. همچنین افزودن زیلیتول به‌عنوان ضد اکسیدانت طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی در کاهش سطح رادیکال‌های آزاد مؤثر است و باعث بهبود شرایط انجماد می‌شود؛ بنابراین چنین مطالعاتی از جمله این مطالعه می‌تواند راه را برای بهینه‌سازی محیط کشت انجمادی اسپرم طی فرایند انجماد-یخ‌گشایی هموارتر کند که منجر به معرفی یک محیط کشت انجمادی جدید در این زمینه شود.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی (گرنه با شماره ۱۴/۲۰/۱۴۶۹۷) دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل انجام شده است. همچنین نویسندگان از معاونت پژوهشی پژوهشگاه رویان و گروه اسپرم بیولوژی کمال تشکر را دارند.

درشت‌مولکول‌های بیولوژیکی را در برابر تغییرات ساختاری ناشی از دمای پایین و دنا توره شدن متعاقب آن حفظ کنند (۲۲). بر اساس مطالعات ساختار مولکولی، الکل‌های قندی خطی مانند زیلیتول، مانیتول و سوربیتول به احتمال فراوان به‌خوبی بتوانند مولکول‌های آب را متصل به خود نگه دارند و از این طریق مانع از تشکیل بلوره‌های منظم و آسیب‌پذیر آب به سلول‌ها شوند (۴۷). تغییر در پروتئین‌های رشته‌ای ماهیچه‌ای (میوفیبریلار) ممکن است به دلیل فقدان فعالیت پمپ کلسیم Ca^{2+} -ATPase باشد. سرهای کروی میوزین مسئول اصلی فعالیت Ca^{2+} -ATPase است (۴۵). برای نمونه‌های موجود در محیط آبی، کاهش قابل‌توجه فعالیت پمپ Ca^{2+} -ATPase احتمالاً به دلیل تجمع سرهای کروی میوزین و بازآرایی پروتئین‌ها از طریق برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین طی تشکیل بلوره‌های یخ رخ دهد. پایداری پروتئین‌های میوفیبریل ممکن است به‌طور گسترده به‌وسیله برخی از ترکیبات پلی‌هیدروکسیل کنترل شوند. کونگ و همکاران نشان دادند که ترکیبات پلی‌الکل مانند سوربیتول می‌توانند با ممانعت از کاهش فعالیت پمپ Ca^{2+} -ATPase اثرات محافظ انجمادی قابل‌قبولی بر سلول‌های عضلانی منجمد نشان دهند (۲۴). در اینجا، مانیتول و زیلیتول آزمایش شده از تعداد زیادی گروه هیدروکسیل روی زنجیره کربنی تشکیل شده است که هر دو با وزن مولکولی کوچک و ساختار خطی، احتمالاً با میوزین برهمکنش داشته و بخشی

منابع

- [1] Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. 2010. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human reproduction (Oxford, England)* 25:2415-26.
- [2] Akbarzadeh-Jahromi M, Jafari F, Parsanezhad ME, Alaei S. 2022. Evaluation of supplementation of cryopreservation medium with gallic acid as an antioxidant in quality of post-thaw human spermatozoa. *Andrologia* 54:e14571
- [3] Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. 2008. The Influence of Oxidative Damage on Viscosity of Seminal Fluid in Infertile Men. *Journal of andrology* 29:41-6
- [4] Bansal AK, Bilaspuri G. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international* 2011
- [5] Barati F, Papahn AA, Afrough M, Barati M. 2011. Effects of Tyrode's solution osmolarities and milk on bull sperm storage above zero temperatures. *Iran J Reprod Med* 9:25-30

- characteristics of freezing media during the human sperm cryopreservation. *Cryobiology* 85:162
- [18] Ghorbani M, Tavilani H, Khodadadi I, Amiri I. 2015. Comparisons between two antioxidant butylated hydroxytoluene and glutathione supplemented cryopreservation medium on human sperm DNA integrity .
- [19] Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F, Jorsaraei SGA. 2013. Correlation of Sperm Parameters With Semen Lipid Peroxidation and Total Antioxidants Levels in Astheno- and Oligoastheno- Teratospermic Men. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 15:780-5
- [20] Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive biomedicine online* 6:191-200
- [21] Jee BC, Chang HJ, Jeon YT, Lee JR, Suh CS, Kim SH. 2010. Comparison of human sperm quality and nuclear DNA integrity between slow and rapid freezing. *Journal of Womens Medicine* 3:57-62
- [22] Kadoya S, Fujii K, Izutsu K, Yonemochi E, Terada K, et al. 2010. Freeze-drying of proteins with glass-forming oligosaccharide-derived sugar alcohols. *Int J Pharm* 3۱۳-۸۹:۱۰۷
- [23] Karabulut S, Demiroglu-Zergeroglu A, Yilmaz E, Kutlu P, Keskin I. 2018. Effects of human sperm cryopreservation on apoptotic markers in normozoospermic and non-normozoospermic patients. *Zygote (Cambridge, England)* 26:308-13
- [24] Kong B, Guo Y, Xia X, Liu Q, Li Y, Chen H. 2013. Cryoprotectants Reduce Protein Oxidation and Structure Deterioration Induced by Freeze-Thaw Cycles in Common Carp (*Cyprinus carpio*) Surimi. *Food Biophysics* 8:104-11
- [25] Kowalczyk A. 2022. The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. *Reproductive Sciences* 29:1387-94
- [26] Liman MS, Hassen A, McGaw LJ, Sutovsky P, Holm DE. 2022. Potential Use of Tannin Extracts as Additives in Semen Destined for Cryopreservation: A Review. *Animals (Basel)* 12
- [27] Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57:327-44
- [28] Nag A, Waterland M, Singh H. 2021. Effect on cell membrane structural integrity of xylitol-coated probiotics when stabilised with milk solids – A FTIR study. *International Journal of Dairy Technology* 74:128-38
- [29] Najafi A, Asadi E, Moawad AR, Mikaeili S, Amidi F, et al. 2016. Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. *Fertility and Sterility* 106:1658-65. e4
- [6] Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking* 10:49-62
- [7] Brugnon F, Ouchchane L, Pons-Rejraji H, Artonne C, Farigoule M, Janny L. 2013. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoastheno-teratozoospermia. *Human reproduction* 28:2045-57
- [8] Cherian DA, Peter T, Narayanan A, Madhavan SS, Achammada S, Vynat GP. 2019. Malondialdehyde as a Marker of Oxidative Stress in Periodontitis Patients. *Journal of pharmacy & bioallied sciences* 11:S297-S300
- [9] Chhillar S, Singh VK, Kumar R, Atreja SK. 2012. Effects of Taurine or Trehalose supplementation on functional competence of cryopreserved Karan Fries semen. *Anim Reprod Sci* 135:1-7
- [10] Chukwuma C, Islam M. 2017. Xylitol improves anti-oxidative defense system in serum, liver, heart, kidney and pancreas of normal and type 2 diabetes model of rats. *Acta poloniae pharmaceutica* 74:817-26
- [11] Coyan K, Baspinar N, Bucak MN, Akalin PP, Ataman MB, et al. 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Res Vet Sci* 89:426-31
- [12] Estudillo E, Jiménez A, Bustamante-Nieves PE, Palacios-Reyes C, Velasco I, López-Ornelas A. 2021. Cryopreservation of Gametes and Embryos and Their Molecular Changes. *International journal of molecular sciences* 22:10864
- [13] Gholami D, Ghaffari SM, Riazi G, Fathi R, Benson J, et al. 2019. Electromagnetic field in human sperm cryopreservation improves fertilizing potential of thawed sperm through physicochemical modification of water molecules in freezing medium. *PLOS ONE* 14:e0221976
- [14] Gholami D, Riazi G, Fathi R, Sharafi M, Shahverdi A. 2019. Comparison of polymerization and structural behavior of microtubules in rat brain and sperm affected by the extremely low-frequency electromagnetic field. *BMC Molecular and Cell Biology* 20:41
- [15] Gholami D, Sharafi M, Esmaeili V, Nadri T, Alaei L, et al. 2023. Beneficial effects of trehalose and gentiobiose on human sperm cryopreservation. *PLOS ONE* 18:e0271210
- [16] Gholami D, Sharafi M, Shahverdi A, Riazi GH, Fathi R, et al. 2018. Microtubule dynamicity of human sperm in cryopreservation process and 1000 Hz repetition rate elef-water made freezing media. *cryobiology* 85:162
- [17] Gholami D, Sharafi M, Shahverdi A, Riazi GH, Fathi R, et al. 2018. The modification of physicochemical

- [40] Sherman J. 1990. Cryopreservation of human semen. in *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, B. Keel and B. W. Webster, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla, USA .
- [41] Sun TC, Liu XC, Yang SH, Song LL, Zhou SJ, et al. 2020. Melatonin Inhibits Oxidative Stress and Apoptosis in Cryopreserved Ovarian Tissues via Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Frontiers in Molecular Biosciences* 7
- [42] Thakrar RR, Patel VP, Hamilton G, Fuller BJ, Seifalian AM. 2006. Vitreous cryopreservation maintains the viscoelastic property of human vascular grafts. *FASEB J.* 20(7):874-81 .
- [43] WHO. 2010. World Health Organization laboratory manual for the examination and processing of human semen .
- [44] Zandiyeh S, Shahverdi A, Ebrahimi B, Sabbaghian M. 2020. A novel approach for human sperm cryopreservation with AFPIII. *Reproductive Biology*
- [45] Zhang B, Hao G-j, Cao H-j, Tang H, Zhang Y-y, Deng S-g. 2018. The cryoprotectant effect of xylooligosaccharides on denaturation of peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) protein during frozen storage. *Food Hydrocolloids* 77:228-37
- [46] Zhang B, Wang Y, Wu C, Qiu S, Chen X, et al. 2021. Freeze-thawing impairs the motility ,plasma membrane integrity and mitochondria function of boar spermatozoa through generating excessive ROS. *BMC Veterinary Research* 17:127
- [47] Zhang B, Yao H, Qi H, Ying X-g. 2020. Cryoprotective characteristics of different sugar alcohols on peeled Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during frozen storage and their possible mechanisms of action. *International Journal of Food Properties* 23:95-107
- [48] Zidni I, Lee HB, Yoon JH, Park JY, Oh YD, et al. 2022. Effect of antioxidants in cryopreservation media on spotted halibut (*Veraser variegatus*) sperm quality during cryopreservation. *Aquaculture* 557:738351
- [49] امانی ن. شریعتی م. احمدی ر. خاتم ساز س. مختاری م. ۲۰۲۲. بررسی اثرات سایتوتوکسیک تستوسترون بر رده سلولی سرطان کولون (HCT) و ارزیابی فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۵۹-۳۵:۴۴
- [50] عرب نژاد س. قرایی ا. غفاری م. راهداری ع. ۲۰۱۵. بررسی تغییرات کیفی اسپرم ماهی سفیدک سیستان (Schizothorax zarudnyi Nikolskii, 1897) در پاسخ به القاء هورمونی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۷-۲۷:۶۱۱
- [30] Nazari M, Daghigh-Kia H, Mehdipour M, Najafi A. 2022. Comparison of the performance of targeted mitochondrial antioxidant mitoquinone and non-targeted antioxidant pentoxifylline in improving rooster sperm parameters during freezing and thawing. *Poultry science* 101:102035
- [31] Neagu VR, García BM, Rodríguez AM, Ferrusola CO, Bolaños JM, et al. 2011. Determination of glutation peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. *Theriogenology* 75:10-6
- [32] Neild DM, Brouwers JF, Colenbrander B, Agüero A, Gadella BM. 2005. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Molecular reproduction and development* 72:230-8
- [33] Nigam S, Schewe T. 2000. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1488:167-81
- [34] Oberoi B, Kumar S, Talwar P. 2014. Study of human sperm motility post cryopreservation. *medical journal armed forces india* 70:349-53
- [35] Pesch S, Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron (Oxford, England : 1993)* 37:597-612
- [36] Petrushko M, Pavlovich E, Pinyaev V, Volkova N, Podyfaliy V. 2017. Apoptosis and the processes of DNA fragmentation in native and cryopreserved human sperm cells with normo-and pathosperma. *Cytology and Genetics* 51:278-81
- [37] Salamon S, Maxwell W. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science* 38:1-36
- [38] Sarıözkan S, Türk G, Cantürk F, Yay A, Eken A, Akçay A. 2013. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. *Cryobiology* 67:1-6
- [39] Sharma P, Kaushal N, Saleth LR, Ghavami S, Dhingra S, Kaur P. 2023. Oxidative stress-induced apoptosis and autophagy: Balancing the contrary forces in spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*:166742

The antioxidant role of xylitol on the cellular parameters of human sperm during the sperm cryopreservation

Gholami D.¹ and Alijani Ardeshir R.²

¹ Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, I.R. of Iran

² Department of Marine Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, I.R. of Iran

Abstract

Sperm cryopreservation is a suitable method for the survival of reproduction in men with cancer as well as people with sperm deficiency such as azoospermia and oligospermia. The cryopreservation damage leads to a decrease in the survival rate of sperm and fertility handicap. The aim of this study is to investigate the effect of the polyalcohol xylitol as an antioxidant during sperm cryopreservation and, finally, to reduce the level of free radicals. In this study, 60 normal human sperm samples were collected from 60 people referred to the Infertility Research Center of Royan Research Institute and divided into three groups, including a fresh control group, a frozen control group (samples that were frozen with sperm freezing medium alone) and frozen treatment group (They were frozen with freezing medium supplemented with a concentration of 55 mM xylitol). Sperm motility, viability, and membrane swelling were evaluated based on WHO criteria and the level of free radicals in the mentioned samples. The results of this study showed that adding xylitol to the freezing medium improved the sperm parameters and also increased the survival rate of the cells. The level of free radicals decreased significantly in the presence of xylitol. From this study, it can be concluded that adding xylitol as an antioxidant compound to the freezing medium during sperm cryopreservation is a suitable strategy to reduce the free radicals level in the freezing medium.

Keywords: Antioxidants, Frozen- thawed semen, Sperm, Xylitol