مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v19i1.3181

مقاله پژوهشی

ارزیابی تأثیرات ترکیب کلروژنیک اسید و لیپوئیک اسید بر شاخص‌های اسپرم بیماران مبتلا به الیگوآستنوزواسپرمیا پس از فرآیند انجماد–ذوب

زهرا خسروی‌زاده[۱]، محمدجواد بای[۲]، مرضیه اسلامی‌موید[۲،۳]، ناصر مقربیان[۳]، حامد قزوینی[۴،۵]، شادان نوید[۶]، علی طالبی[۳*]

۱- واحد توسعه پژوهش‌های بالینی، بیمارستان امیرالمومنین، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.
۲- گروه علوم بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.
۳- مرکز تحقیقات سلامت جنسی و باروری، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.
۴- دپارتمان علوم اعصاب، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
۵- مرکز تحقیقات روانپزشکی و علوم رفتاری، پژوهشکده اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.
۶- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی مؤثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی گناباد، گناباد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۲۳، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۱۰/۱۳

چکیده

مقدمه: *فرآیند انجماد با مکانیسم‌های مختلفی مانند ایجاد استرس‌های اکسیداتیو، اسمزی و دمایی سبب کاهش کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر افزودن همزمان کلروژنیک اسید و لیپوئیک اسید به‌عنوان مکمل آنتی‌اکسیدانی در محیط فریز اسپرم در بیماران مبتلا به الیگوآستنوزواسپرمیا است.*

مواد و روش‌ها: *نمونه‌های منی بیماران مبتلا به الیگوآستنوزواسپرمیا در ۵ گروه نمونه تازه (مایع منی قبل از فریز)، کنترل (محیط فریز اسپرم بدون مکمل)، گروه CGA (محیط فریز اسپرم همراه با ۱۰۰µM کلروژنیک اسید)، گروه ALA (محیط فریز اسپرم همراه با ۲۰۰µM لیپوئیک اسید) و گروه CGA+ALA (محیط فریز اسپرم همراه با کلروژنیک اسید و لیپوئیک اسید) قرار گرفتند. قبل و بعد از فرآیند انجماد-ذوب، تحرک کلی اسپرم، میزان زنده‌مانی به کمک رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین و میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم به روش Halo بررسی شد.*

نتایج: *در گروه کنترل، کاهش تحرک کلی و زنده‌مانی اسپرم و همچنین افزایش میزان DFI مشاهده شد. انجماد اسپرم در گروه‌های CGA، ALA و CGA+ALA با افزایش معنی‌دار در میزان زنده‌مانی و تحرک کلی اسپرم پس از ذوب همراه بود. همچنین، نتایج آزمون Halo نشان داد که افزایش میزان DFI اسپرم‌ها ناشی از فرآیند انجماد-ذوب در هر ۳ گروه آزمایش کمتر از گروه کنترل بود و این کاهش از لحاظ آماری معنادار (P<۰/۰۵) بود.*

نتیجه‌گیری: *افزودن همزمان کلروژنیک اسید و لیپوئیک اسیدبه محیط فریز اسپرم می‌تواند کیفیت نمونه‌های اسپرم را پس از فرآیند انجماد-ذوب از لحاظ تحرک، زنده‌مانی و قطعه قطعه شدن DNA افزایش دهد و در نتیجه بازدهی این تکنیک را در درمان ناباروری مردان بهبود بخشد.*

واژه‌های کلیدی: اسپرم، آنتی‌اکسیدان، کلروژنیک اسید، لیپوئیک اسید، انجماد.

***نویسنده مسئول:** شاهرود، میدان هفت تیر، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، دانشکده پزشکی، **تلفن:** ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴، **نمابر:** ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۰۹، **Email:** alitalebi.ir@gmail.com, alitalebi@shmu.ac.ir

ارجاع: خسروی‌زاده زهرا، بای محمدجواد، اسلامی موید مرضیه، مقربیان ناصر، قزوینی حامد، نوید شادان، طالبی علی. ارزیابی تأثیرات ترکیب کلروژنیک اسید و لیپوئیک اسید بر شاخص‌های اسپرم بیماران مبتلا به الیگوآستنوزواسپرمیا پس از فرآیند انجماد–ذوب. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۳؛۱۹(۱):۲۹-۲۲.

CC BY NC

مقدمه

تکنیک‌های کمک باروری (ARTs: Assisted reproductive technologies) راهکارهای مهمی را در درمان ناباروری ارائه کرده است (۱). انجماد اسپرم، به‌عنوان یک تکنیک کمک باروری در موارد مختلفی از جمله در بیماران تحت درمان‌های انکولوژیک، در مردان مبتلا به اختلال عملکرد اسپرماتوژنز شدید و در ذخیره‌سازی اسپرم در بیوبانک‌ها کاربرد دارد (۲). با این حال، روش‌های دست‌ورزی گامت مانند انجماد، سانتریفیوژ، قرار گرفتن در معرض نور، تغییرات pH و دما سلول‌ها را بیشتر در برابر استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیر می‌کند (۳). فرآیند انجماد باعث تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species)، قطعه قطعه شدن DNA، آپوپتوز و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود و به ژن‌های حیاتی درگیر در لقاح و رشد اولیه جنین آسیب می‌رساند (۴ و ۵).

به‌طور کلی، مقدار فیزیولوژیکی ROS برای تحرک اسپرم، ظرفیت‌یابی، واکنش آکروزومی و تعامل اسپرم–اووسیت ضروری است (۶). با این حال، تولید بیش از حد ROS باعث آسیب‌های متفاوتی به اسپرم در سطوح غشا، DNA و پروتئین می‌شود. فرآیند انجماد با مکانیسم‌های مختلفی مانند ایجاد استرس‌های اکسیداتیو، اسمزی و دمایی سبب تغییر ساختار چربی‌ها و پروتئین‌ها، کاهش تحرک و زنده‌مانی، آسیب به میتوکندری، قطعه قطعه شدن DNA و در نتیجه کاهش کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد–ذوب می‌شود (۷). یک استراتژی برای غلبه بر مشکلات مربوط به استرس اکسیداتیو ناشی از روش‌های دست‌ورزی گامت‌ها استفاده از مکمل‌های آنتی اکسیدانی محیط فریز در طول دست‌ورزی اسپرم است (۸ و ۹). برای این منظور، بسیاری از مطالعات توانایی محافظتی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در برابر استرس اکسیداتیو القا شده در فرآیند انجماد اسپرم انسان و حیوان را گزارش کرده‌اند (۷ و ۸).

کلروژنیک اسید (CGA: Chlorogenic acid)، استری مشتق شده از اسید کافئیک و اسید کوئینیک، یکی از ترکیبات اسید فنولیک موجود در مواد غذایی مانند سبزیجات، میوه‌ها، قهوه و چای است (۱۰). این ترکیب در مطالعات گوناگون ویژگی‌های مختلفی مانند آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد دیابت را از خود نشان داده است (۱۱). غلظت ۱۰۰ میکرومولار CGA اثرات مفیدی بر تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی غشای پلاسمایی اسپرم گراز در طول انجماد و سرد شدن در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد داشت (۱۲، ۱۳ و ۱۴). CGA همچنین تأثیر مثبتی در تولید آزمایشگاهی جنین خوک و محافظت در برابر آسیب DNA ناشی از استرس اکسیداتیو در تخمک‌ها نشان داد (۱۵).

آلفا لیپوئیک اسید (ALA: Alpha Lipoic Acid) یک ترکیب میتوکندریایی با گروه‌های سولفیدریل است که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و یک عامل سم‌زدایی شناخته می‌شود (۱۶). ALA می‌تواند انواع رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال‌های هیدروکسیل، اکسیدهای نیتریک، پراکسی نیتریت و پراکسید هیدروژن را از بین ببرد و استرس اکسیداتیو را کاهش دهد (۱۷). از آنجایی که ALA میزان ROS را کاهش می‌دهد، می‌تواند فرآیندهای مرگ سلولی، از جمله آپوپتوز را نیز مهار کند. ALA به‌طور غیرمستقیم به بازیابی سایر آنتی‌اکسیدان‌های درون‌سلولی مانند ویتامین C کمک می‌کند و باعث سنتز گلوتاتیون می‌شود (۱۶ و ۱۷).

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر افزودن همزمان CGA و ALA به‌عنوان مکمل آنتی‌اکسیدانی در محیط فریز اسپرم در بیماران مبتلا به الیگوآستنوزواسپرمیا بود. اثرات حفاظتی این دو آنتی‌اکسیدان از طریق ارزیابی شاخص‌های اسپرم شامل تحرک، زنده‌مانی و یکپارچگی DNA پس از فرآیند انجماد–ذوب بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تأیید شده است (IR.SHMU.REC.1400.172: کد اخلاق). نمونه منی از مردان نابارور ۲۰ تا ۴۰ ساله مبتلا به الیگواستنوزواسپرمیا مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه جمع‌آوری گردید. الیگواستنوزواسپرمیا بر اساس دستورالعمل WHO2010 با تعداد کمتر از ۱۵ میلیون اسپرم در میلی‌لیتر و درصد تحرک کل اسپرمی کمتر از ۴۰ درصد تشخیص داده شد. برای کاهش اثرات تداخلی، مردان نابارور مبتلا به عفونت ادراری تناسلی، واریکوسل، لکواسپرمی، هیدروسل، اختلالات هورمونی، دیابت و مصرف الکل و دخانیات از مطالعه خارج شدند.

نمونه منی هر بیمار در ۵ الیکوت با حجم ۳۰۰ میکرولیتر تقسیم شد و در ۵ گروه نمونه تازه (مایع منی قبل از فریز)، کنترل (محیط فریز اسپرم بدون مکمل)، گروه CGA (محیط فریز اسپرم همراه با ۱۰۰µM CGA)، گروه ALA (محیط فریز اسپرم همراه با ۲۰۰µM ALA) و گروه CGA+ALA (محیط فریز اسپرم همراه با CGA و ALA) قرار گرفتند.

انجماد نمونه‌ها با محیط فریز اسپرم Quinn’s advantage sperm freezing medium و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. نمونه‌ها پس از مخلوط شدن با محیط انجماد به میزان یک به یک، به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال، سپس ۲۰ دقیقه بر روی بخار ازت مایع و پس از آن در ازت مایع قرار گرفتند و به مدت دو هفته در تانک ازت نگهداری و سپس ذوب شدند. قبل و بعد از فرآیند انجماد–ذوب، تحرک اسپرم بر اساس دستورالعمل WHO2010و میزان زنده‌مانی به کمک رنگ‌آمیزی ائوزین–نگروزین و بر اساس کیت زنده‌مانی از شرکت ایده‌ورزان فردا ارزیابی شد. روش رنگ‌آمیزی ائوزین–نگروزین به‌طور خلاصه بدین شرح انجام گرفت: ۵۰ میکرولیتر از رنگ‌های ائوزین و نگروزین آماده و با ۵۰ میکرولیتر از نمونه مخلوط و سپس اسمیر خشک تهیه شد. در زیر میکروسکوپ نوری به کمک عدسی ۱۰۰ تعداد ۲۰۰ اسپرم ارزیابی شدند. در این روش، قسمت سر اسپرم‌های مرده به رنگ قرمز و سر اسپرم‌های زنده بی‌رنگ خواهد بود. میزان قطعه قطعه شدن DNAبه روشHalo و بر اساس کیت SDFA (Sperm DNA Fragmentation) شرکت ایده‌ورزان فردا انجام گرفت. در این روش ۵۰

میکرولیتر از نمونه سمن در میکروتیوب‌های حاوی آگارز که قبلاً در بن‌ماری ۱۰۰ درجه ذوب شده بودند مخلوط و سپس به میزان ۳۰ میکرولیتر بر روی لام‌های مخصوص کیت قرار داده شد و به یخچال منتقل گردیدند. پس از ۵ دقیقه، لام‌ها در معرض محلول A موجود در کیت به مدت ۷ دقیقه و محلول B به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. آبگیری نمونه به کمک اتانول و پس از شستشو لام‌ها به کمک آب مقطر انجام گرفت. پس از آن لام‌ها به کمک میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰ مشاهده و تعداد ۲۰۰ اسپرم بر اساس میزان هاله تشکیل شده در قسمت سر اسپرم ارزیابی شدند. در این روش اسپرم‌های بدون هاله و یا دارای هاله کوچکتر از یک سوم قطر کوچک سر اسپرم به‌عنوان اسپرم‌های دارای شکست کروماتین و اسپرم‌های دارای هاله بزرگتر از یک سوم قطر کوچک سر اسپرم به‌عنوان اسپرم‌های سالم در نظر گرفته می‌شود.

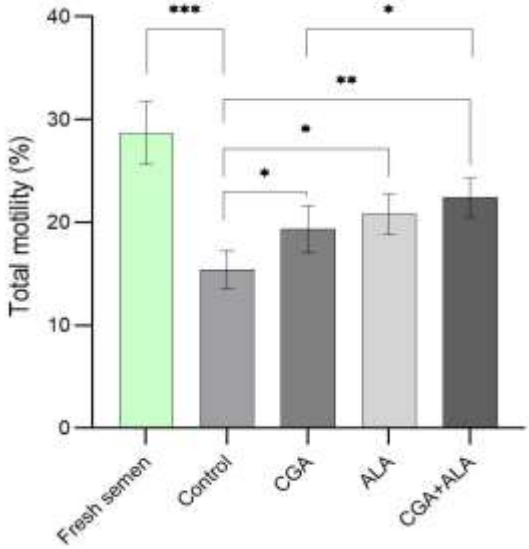
نتایج آزمون‌ها به کمک روش‌های آماری توصیفی و تحلیلی و از طریق نرم‌افزار GraphPad Prism v.9 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به‌منظور مقایسه بین‌گروهی از آزمون One-way ANOVA استفاده شد و میزان P>۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

مشاهدات تحرک اسپرم به کمک میکروسکوپ نوری نشان داد که تحرک کلی اسپرم در گروه کنترل ۳/۰۶۳ ± ۲۸/۶۷ درصد بود. این مقدار برای گروه‌های CGA ۲/۲۸۹ ± ۱۹/۳۳درصد، گروه ALA ۱/۹۳۵ ± ۲۰/۸۰ درصد و گروه CGA+ALA ۱/۸۸۲ ± ۲۲/۴۰ درصد بود. همان‌طور که در نمودار ۱آمده است افزودن مکمل آنتی‌اکسیدانی سبب تغییر معنادار در میزان تحرک کلی اسپرم‌ها پس از فرآیند انجماد–ذوب شد (P<۰/۰۵ برای گروه‌های CGA و ALA و P<۰/۰۱ برای CGA+ALA). تحرک کلی اسپرم در گروه CGA+ALA در مقایسه با گروه‌های ALA و CGA به‌طور معناداری بیشتر بود (P<۰/۰۵).

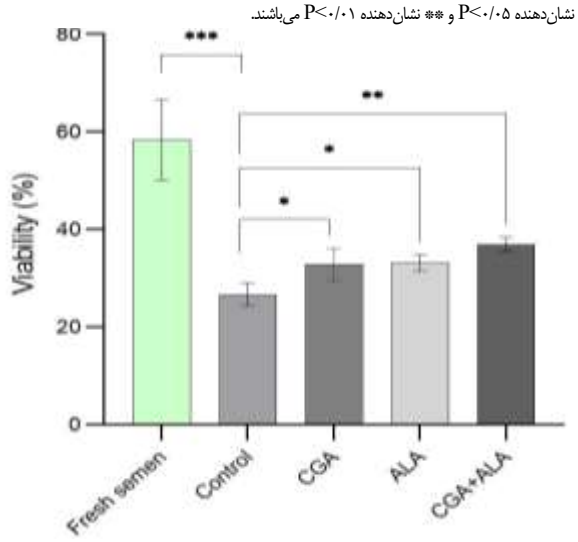
نتایج آزمون زنده‌مانی نشان داد که فرآیند انجماد–ذوب سبب کاهش معنادار زنده‌مانی اسپرم‌ها می‌گردد. افزودن CGA و ALA سبب افزایش میزان زنده‌مانی اسپرم‌ها به‌ترتیب ۳/۲۷۰ ± ۳۲/۸۷ درصد و ۱/۶۵۶ ± ۳۳/۲۰ درصد در مقایسه با گروه کنترل گردید (P<۰/۰۵). همان‌طور که در نمودار ۲ نمایش داده شده است افزودن هر دو آنتی‌اکسیدان به محیط فریز اسپرم نیز سبب افزایش بیشتری در میزان زنده‌مانی اسپرم (۱/۴۳۹ ± ۳۶/۹۳) پس از فرآیند انجماد–ذوب شد (P<۰/۰۱). اگرچه میزان زنده‌مانی در گروه CGA+ALA در مقایسه با گروه‌های ALA و CGA بیشتر بود اما این تفاوت از لحاظ آماری معنادار نبود.

نتایج آزمون Halo نشان داد که فرآیند انجماد–ذوب موجب افزایش میزان DFI می‌شود (شکل ۱) که این میزان در گروه کنترل قبل و بعد از فرآیند انجماد–ذوب به‌ترتیب ۲/۸۶۵ ± ۲۵/۹۳ درصد و ۲/۸۷۵ ± ۳۶/۱۳ درصد بود. میزان DFI در نمونه‌های اسپرم پس از ذوب در گروه CGA ۲/۸۰۸ ± ۳۱/۸۰ درصد، در گروه ALA ۳/۱۲۷ ± ۳۱/۰۷ درصد و در گروه ترکیب هر دو آنتی‌اکسیدان ۲/۸۵۴ ± ۳۰ درصد بود. نمودار ۳ کاهش معنادار میزان DFI پس از فرآیند انجماد–ذوب را با افزودن آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. اگرچه میزان DFI در گروه CGA+ALA در مقایسه با گروه‌های ALA و CGA کمتر بود اما این تفاوت از لحاظ آماری معنادار نبود.



نمودار ۱- تحرک کلی اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه بعد از فرآیند انجماد در حضور آنتی‌اکسیدانت‌های کلروژنیک اسید، لیپوئیک اسید و ترکیب هر دو در محیط انجمادی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل (محیط انجمادی بدون آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه)

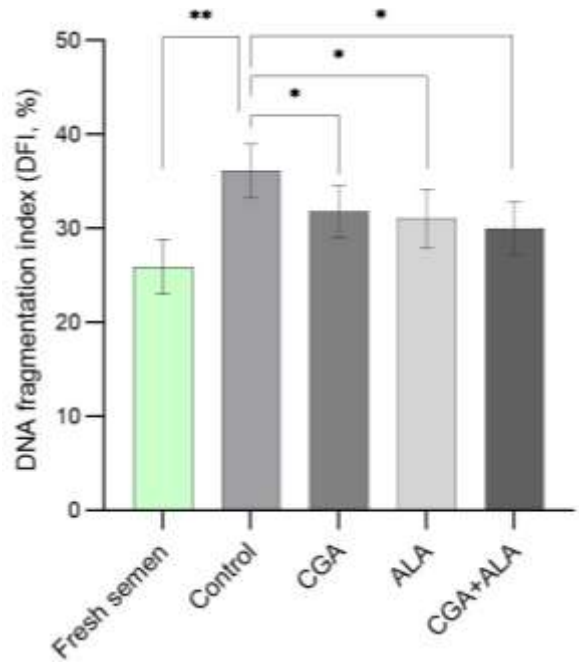
* نشان‌دهنده P<۰/۰۵ و ** نشان‌دهنده P<۰/۰۱ می‌باشند.



نمودار ۲- زنده‌مانی اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه بعد از فرآیند انجماد در حضور آنتی‌اکسیدان‌های کلروژنیک اسید، لیپوئیک اسید و ترکیب هر دو در محیط انجمادی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل (محیط انجمادی بدون آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه).

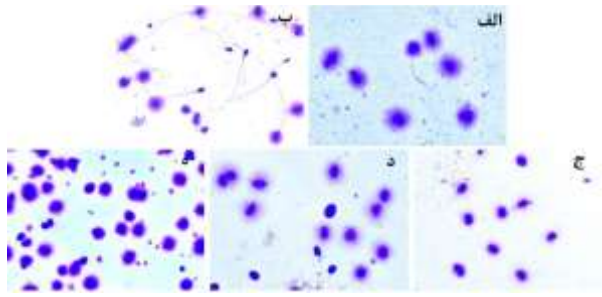
* نشان‌دهنده P<۰/۰۵ و ** نشان‌دهنده P<۰/۰۱ می‌باشند.

CC BY NC



نمودار ۳- شاخص قطعه‌قطعه شدن DNA اسپرم (DNA fragmentation index) در گروه‌های مورد مطالعه بعد از فرآیند انجماد در حضور آنتی‌اکسیدان‌های کلروژنیک اسید، لیپوئیک اسید و ترکیب هر دو در محیط انجمادی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل (محیط انجمادی بدون آنتی‌اکسیدان‌های مورد مطالعه).

* نشان‌دهنده $P<0.05$ می‌باشد.



شکل ۱- آزمون Halo جهت ارزیابی میزان DFI نمونه‌های اسپرم

الف: نمونه مایع منی قبل از فریز (تازه)، ب: گروه کنترل (نمونه بعد از فریز)، ج: گروه فریز در محیط تکمیل شده با CGA، د: گروه فریز در محیط تکمیل شده با ALA و ه: گروه فریز در محیط تکمیل شده با CGA و ALA.

اسپرم‌های دارای هاله بزرگ یا متوسط به‌عنوان اسپرم‌های سالم و اسپرم‌های دارای هاله کوچک، بدون هاله و یا بدون هاله با هسته تخریب شده به‌عنوان اسپرم‌های دارای شکست DNA در نظر گرفته شدند.

بحث

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، ترکیب همزمان CGA و ALA با محیط فریز اسپرم منجر به بهبود تحرک کلی، زنده‌مانی و یکپارچگی DNA اسپرم پس از فرایند انجماد-ذوب شد. اگرچه تأثیر ترکیب همزمان CGA و ALA با محیط فریز اسپرم بر هر سه شاخص تحرک کلی، زنده‌مانی و یکپارچگی DNA در مقایسه با تأثیر هرکدام از آنتی‌اکسیدان‌ها به تنهایی بیشتر بود اما تنها در مورد تحرک اسپرم این تأثیر معنادار بود .

در روش‌های انجماد سلولی، سلول‌ها در معرض دماهای بسیار پایین قرار می‌گیرند که طی این فرآیند سلول‌ها دچار آسیب‌هایی ازجمله استرس اکسیداتیو، اسمزی و دمایی می‌شوند. این صدمات می‌توانند تحرک اسپرم، زنده‌مانی، یکپارچگی غشاء، قطعه قطعه شدن DNA و فعالیت میتوکندری را تحت تأثیر قرار دهند (۱۸). گزارش شده است که انجماد اسپرم حتی به ژن‌های مهم درگیر در لقاح و رشد اولیه جنین آسیب می‌زند (۱۹) و با افزایش استرس اکسیداتیو باعث افزایش قطعه قطعه شدن DNA می‌شود (۲۰). انجماد اسپرم به‌طور مشهود سبب کاهش تحرک اسپرم پس از ذوب می‌گردد، به‌طوری‌که گزارش شده است درصد اسپرم متحرک می‌تواند پس از انجماد از ۵۰/۶٪ به ۳۰/۳٪ کاهش یابد (۲۱)، تحمل سرما و حساسیت اسپرم به دماهای پایین عمدتاً به دلیل ترکیب لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم است. نسبت امگا ۳ به امگا ۶ مشخصات اسیدهای چرب و همچنین اندازه و شکل در اسپرم گونه‌های مختلف متفاوت است و این شاخص‌ها می‌توانند بر واکنش به انجماد تأثیر بگذارند (۱۸). گزارش شده است که مایع منی با ناهنجاری در تحرک ممکن است بیشتر مستعد آسیب انجماد باشد و در نتیجه نرخ لقاح کمتری داشته باشد (۲۲). مطالعات نشان می‌دهند که افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها به مایع منی منجر به افزایش کیفیت اسپرم پس از ذوب در چندین گونه (۲۵-۲۳)، از جمله انسان شده است (۲۸-۲۶). اخیراً سان و همکاران نشان دادند که افزودن رسوراترول (Resveratrol) به محیط extender باعث بهبود تحرک اسپرم، یکپارچگی غشاء و آکروزوم و محافظت از اسپرم گراز در برابر استرس اکسیداتیو در طی نگهداری مایع منی و فرآیند سردشدن سریع شد (۲۳).

CGA یک مکانیسم آنتی‌اکسیدانی جامع دارد که به شرح زیر خلاصه می‌شود: (۱) ساختار پلی‌هیدروکسیل به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد (۲). مسیر سیگنالینگ آنتی‌اکسیدانی را فعال می‌کند، سطح بیان ژن‌های مرتبط را تنظیم می‌کند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد. (۳) به‌طور مستقیم فعالیت سیستم اکسیداز درون‌زا و پروتئین‌های مرتبط را تنظیم می‌کند (۲۹). نتایج مطالعه وانگ و همکاران نشان داد که افزودن CGA به محیط فریز اسپرم گوسفند منجر به کاهش میزان ROS و افزایش فعالیت کاتالاز (CAT: Catalase) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD: Superoxide dismutase) شد و همچنین غلظت ATP (Adenosine triphosphate) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC: Total antioxidant capacity) را افزایش داد. به‌علاوه، CGA باعث بهبود یکپارچگی غشای پلاسمایی و آکروزوم اسپرم‌ها پس از فرآیند انجماد-ذوب شد (۳۰). نوتو و همکاران در سال ۲۰۲۱ به بررسی تأثیر افزودن CGA به محیط فریز اسپرم انسان پرداختند و گزارش کردند که CGA می‌تواند آسیب‌های ناشی از انجماد اسپرم را تعدیل کند. در مطالعه آنان، افزودن CGA سبب افزایش

تحرک اسپرم و بهبود یکپارچگی DNA گردید و همچنین پتانسیل غشا میتوکندری که پس از انجماد کاهش پیدا می‌کند را افزایش داد (۳۱). مطالعات دیگری نیز نشان دادند که CGA در مقایسه با ویتامین E دارای یک عملکرد محافظتی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر در شرایط ذخیره مایع منی گراز است. این پایداری در نگهداری طولانی مدت به‌ویژه برای استفاده در پروتکل‌های انجماد مورد توجه قرار گرفته است (۱۴ و ۳۲). مطالعه ما نیز همسو با این مطالعه افزودن CGA را به‌عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدانی در محیط فریز اسپرم انسان پیشنهاد می‌کند.

ALA و شکل احیا شده آن ترکیبات دی‌سولفیدی هستند که در میتوکندری به‌عنوان کوآنزیم برای پیروات دهیدروژناز و-α کتوگلوتارات دهیدروژناز یافت می‌شوند. آنها می‌توانند رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند، پتانسیل غشای میتوکندری را افزایش دهند و آنتی‌اکسیدان‌های دیگر مانند ویتامین C را بازسازی کنند (۳۳). مطالعات محققین نشان می‌دهد که ALA می‌تواند به‌عنوان یک محافظت‌کننده در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد اسپرم باشد (۳۶-۳۴). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که افزودن ALA به محیط فریز منجر به افزایش تحرک اسپرم گراز پس از ذوب شد. همچنین، فعالیت SOD، لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase)، گلوتامیک اگزالواستیک ترانس آمیناز (Glutamic-oxaloacetic transaminase) و CAT بهبود یافت. نتایج تلقیح مصنوعی نشان داد که میزان بارداری در گروه ALA به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود (۳۷).

در مطالعه شایگان نیا و همکاران ALA به محیط فریز اسپرم افزوده شد و نویسندگان گزارش کردند که ALA می‌تواند تحرک اسپرم انسان را پس از فرآیند انجماد–ذوب افزایش دهد و پراکسیداسیون لیپید و آسیب DNA را نیز کاهش دهد (۳۸). در سال ۲۰۲۰، آسا و همکاران نشان دادند که افزودن ALA به محیط فریز اسپرم بیماران مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمیا می‌تواند تحرک و زنده‌مانی اسپرم را با کاهش آسیب DNA و محافظت از یکپارچگی آکروزوم با کاهش سطح ROS در طول انجماد اسپرم، بهبود بخشد. همچنین، ALA با افزایش سطح بیان BCL2 (B-cell lymphoma 2) و HSP70 (Heat shock 70 kDa protein) از طریق کاهش قطعه قطعه شدن DNA، آپوپتوز را کاهش دهد (۳۴). در مطالعه ما نیز همسو با مطالعات ذکر شده، ALA سبب بهبود شاخص‌های نمونه‌های اسپرم پس از فرآیند انجماد–ذوب گردید.

مطالعاتی که به بررسی ترکیب همزمان دو آنتی‌اکسیدان در محیط فریز اسپرم پرداخته‌اند نتایج مختلفی را گزارش کرده‌اند. در مطالعه رن و همکاران تأثیر افزودن لیکوپن و ALA به محیط فریز اسپرم بیشتر از افزودن هر کدام از آنتی‌اکسیدان‌ها به تنهایی بود. آنان گزارش کردند که افزودن لیکوپن و ALA به محیط فریز اسپرم بز می‌تواند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد و نمونه‌های اسپرم را از استرس اکسیداتیو محافظت کند و میزان حاملگی را نیز افزایش دهد (۳۶). با این حال در مطالعه جنتی‌فر و همکاران افزودن N–استیل سیستئین و ALA هر کدام به تنهایی و همچنین ترکیب هر دو سبب بهبود شاخص‌های نمونه‌های اسپرم بیماران مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمیا پس از فرآیند انجماد–ذوب شد، اما تأثیر هر کدام از آنتی‌اکسیدان‌ها به تنهایی بهتر از ترکیب آنها بود و به‌طور معنادار سبب افزایش تحرک و زنده‌مانی و همچنین کاهش DFI نمونه‌ها شدند (۳۹). استرس اکسیداتیو عموماً به‌دلیل عدم تعادل در میزان تولید رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی رخ می‌دهد. بنابراین افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز می‌تواند سبب بروز استرس اکسیداتیو و آسیب به سلول شود. به همین علت در مطالعه جنتی‌فر و همکاران تأثیر مثبت افزودن دو ترکیب آنتی‌اکسیدانی کمتر از افزودن هر کدام به تنهایی گزارش شد. اما در مطالعه ما همسو با مطالعه رن و همکاران ترکیب CGA و ALA در مقایسه با افزودن هر کدام از این آنتی‌اکسیدان‌ها به تنهایی نتایج بهتری را نشان داد، هرچند این تأثیر تنها در مورد تحرک کلی اسپرم معنادار بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب همزمان CGA و ALA با محیط فریز اسپرم می‌تواند منجر به بهبود تحرک کلی، زنده‌مانی و یکپارچگی DNA اسپرم بیماران مبتلا به الیگوآستنوزواسپرمیا پس از فرآیند انجماد–ذوب شود. با این حال انجام مطالعات بیشتر با حجم نمونه بیشتر جهت پیشنهاد افزودن این ترکیب به محیط‌های فریز اسپرم ضروری است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود انجام شد (کد طرح ۱۴۰۰۳۸) و نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

بنا به اظهار نویسندگان، در این مقاله هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی و طراحی مطالعه: علی طالبی و زهرا خسروی‌زاده؛ اجرا: محمدجواد بای و علی طالبی، تحلیل و تفسیر داده‌ها: ناصر مقربیان و حامد قزوینی، نگارش دست‌نوشته: شادان نوید و مرضیه اسلامی موید.

حمایت مالی

مطالعه حاضر تحت حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود انجام شد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تأیید شده است (کد اخلاق: IR.SHMU.REC.1400.172).

کد اخلاق

کد اخلاق: IR.SHMU.REC.1400.172.

References

1. Farquhar C, Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. Cochrane Database Syst Rev 2018;(8). doi: 10.1002/14651858.cd010537.pub5
2. Tamburrino L, Traini G, Marcellini A, Vignozzi L, Baldi E, Marchiani S. Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. Int J Mol Sci 2023;24:4656. doi: 10.3390/ijms24054656
3. Zavareh S, Talebi A, Hasanzadeh H. Amending in vitro culture condition to overcome oxidative stress in assisted reproduction techniques (ART). Arch Adv Biosci 2015;6:135-48. doi: 10.22037/jps.v6i2.9012
4. Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. Mol Cell Endocrinol 2000;169:3-10. doi: 10.1016/s0303-7207(00)00343-9
5. Khosravizadeh Z, Khodamoradi K, Rashidi Z, Jahromi M, Shiri E, Salehi E, et al. Sperm cryopreservation and DNA methylation: possible implications for ART success and the health of offspring. J Assist Reprod Genet 2022;39:1815-24. doi: 10.1007/s10815-022-02545-6
6. Dutta S, Henkel R, Sengupta P, Agarwal A. Physiological role of ROS in sperm function. Male infertility: Contemporary clinical approaches, Andrology, ART and antioxidants 2020;2 nd.p.337-45 doi: 10.1007/978-3-030-32300-4_27
7. Ezzati M, Shanehbandi D, Hamdi K, Rahbar S, Pashaiasl M. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: An overview. Cell Tissue Bank 2020;21:1-15. doi: 10.1007/s10561-019-09797-0
8. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell Tissue Bank 2016;745:56-17. doi: 10.1007/s10561-016-9566-5
9. Navid S, Saadatian Z, Talebi A. Assessment of developmental rate of mouse embryos yielded from in vitro fertilization of the oocyte with treatment of melatonin and vitamin C simultaneously. BMC Womens Health 2023;23:525. doi: 10.1186/s12905-023-02673-w
10. Naveed M, Hejazi V, Abbas M, Kamboh AA, Khan GJ, Shumzaid M, et al. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. Biomed Pharmacother 2018;97:67-74. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064
11. Lu H, Tian Z, Cui Y, Liu Z, Ma X. Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. Compr Rev Food Sci Food Saf 2020;19:3130-58. doi: 10.1111/1541-4337.12620
12. Namula Z, Hirata M, Wittayarat M, Tanihara F, Thi Nguyen N, Hirano T, et al. Effects of chlorogenic acid and caffeic acid on the quality of frozen-thawed boar sperm. Reprod Domest Anim 2018;53:1600-4. doi: 10.1111/rda.13288
13. Pereira BA, Chaves BR, Teles MC, Pontelo TP, Oliveira CR, de Souza RV, et al. Chlorogenic acid improves the quality of boar semen subjected to cooled storage at 15°C. Andrologia 2018;50:e12978. doi: 10.1111/and.12978
14. Rabelo SS, Resende CO, Pontelo TP, Chaves BR, Pereira BA, Silva WEd, et al. Chlorogenic acid improves the quality of boar semen processed in Percoll. Anim Reprod 2020;17. doi: 10.21451/1984-3143-ar2019-0021
15. Nguyen TV, Tanihara F, Do LTK, Sato Y, Taniguchi M, Takagi M, et al. Chlorogenic acid supplementation during in vitro maturation improves maturation, fertilization and developmental competence of porcine oocytes. Reprod Domest Anim 2017;52:969-75. doi: 10.1111/rda.13005
16. Salehi B, Berkay Yılmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tumer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, et al. Insights on the use of α-lipoic acid for therapeutic purposes. Biomolecules 2019;9:356. doi: 10.3390/biom9080356
17. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic Biol Med 1995;19:227-50. doi: 10.1016/0891-5849(95)00017-r
18. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Reprod Biomed Online 2018;37:327-39. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.05.012
19. Valcarce D, Cartón-García F, Riesco M, Herráez M, Robles V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. Andrology 2013;1:723-30. doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00116.x
20. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang J-A, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum Reprod 2009;24:2061-70. doi: 10.1093/humrep/dep214
21. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y, et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. Reprod Biomed Online 2009;19:202-6. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60073-9
22. Borges Jr E, Rossi LM, de Freitas CVL, Guilherme P, Bonetti TCS, Iaconelli A, et al. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. Fertil Steril 2007;87:316-20. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.06.032
23. Sun L, Fan X, Zeng Y, Wang L, Zhu Z, Li R, et al. Resveratrol protects boar sperm in vitro via its antioxidant capacity. Zygote 2020;28:417-24. doi: 10.1017/s0967199420000271
24. Nouri H, Shojaeian K, Samadian F, Lee S, Kohram H, Lee JI. Using resveratrol and epigallocatechin-3-gallate to improve cryopreservation of stallion spermatozoa with low quality. J Equine Vet Sci 2018;70:18-25. doi: 10.1016/j.jevs.2018.07.003
25. Andersen AH, Thinnesen M, Failing K, Goericke-Pesch S. Effect of reduced glutathione (GSH) supplementation to Tris-egg yolk extender on chilled semen variables of dogs. Anim Reprod Sci 2018;198:145-53. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.09.013
26. Pariz JR, Ranéa C, Monteiro RA, Evenson DP, Drevet JR, Hallak J. Melatonin and caffeine supplementation used, respectively, as protective and stimulating agents in the cryopreservation of human sperm improves survival, viability, and motility after thawing compared to traditional TEST-yolk buffer. Oxid Med Cell Longev 2019;2019. doi: 10.1155/2019/6472945
27. Mohammadi F, Varanloo N, Heydari Nasrabadi M, Vatannejad A, Amjadi F, Javedani Masroor M, et al. Supplementation of sperm freezing medium with myoinositol improve human sperm parameters and protects it against DNA fragmentation and apoptosis. Cell Tissue Bank 2019;20:77-86. doi: 10.1007/s10561-018-9731-0
28. Abdolsamadi M, Mohammadi F, Nashtaei MS, Teimouri M, Sardar R, Dayani M, et al. Does myoinositol supplement improve sperm parameters and DNA integrity in patients with oligoasthenoteratozoospermia after the freezing–thawing process? Cell Tissue Bank 2020;21:99-106. doi: 10.1007/s10561-019-09801-7
29. Wang L, Pan X, Jiang L, Chu Y, Gao S, Jiang X, et al. The biological activity mechanism of chlorogenic acid and its applications in food industry: A review. Front Nutr 2022;9:943911. doi: 10.3389/fnut.2022.943911
30. Wang Y, Zhang L, Sohail T, Kang Y, Sun X, Li Y. Chlorogenic acid improves quality of chilled ram sperm by mitigating oxidative stress. Animals 2022;12:163. doi: 10.3390/ani12020163
31. Noto D, Collodel G, Cerretani D, Signorini C, Gambera L, Menchiari A, et al. Protective Effect of Chlorogenic Acid on Human Sperm: In Vitro Studies and Frozen—Thawed Protocol. Antioxidants 2021;10:744. doi: 10.3390/antiox10050744
32. Pereira B, Chaves B, Teles M, Pontelo T, Oliveira C, de Souza R, et al. Chlorogenic acid improves the quality of boar semen subjected to cooled storage at 15 C. Andrologia 2018;50:e12978. doi: 10.1111/and.12978

33. Tibullo D, Li Volti G, Giallongo C, Grasso S, Tomassoni D, Anfuso CD, et al. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. Inflamm Res 2017;66:947-59. doi: 10.1007/s00011-017-1079-6

34. Asa E, Ahmadi R, Mahmoodi M, Mohammadniya A. Supplementation of freezing media with alpha lipoic acid preserves the structural and functional characteristics of sperm against cryodamage in infertile men with asthenoteratozoospermia. Cryobiology 2020;96:166-74. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.07.001

35. İnanan BE, Kanyılmaz M. Effect of alpha-lipoic acid on oxidative stress, viability and motility in the common carp (Cyprinus carpio) spermatozoa after short-term storage and cryopreservation. Cryobiology 2020;94:73-9. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.04.006

36. Ren F, Feng T, Dai G, Wang Y, Zhu H, Hu J. Lycopene and alpha-lipoic acid improve semen antioxidant enzymes activity and cashmere goat sperm function after cryopreservation. Cryobiology 2018;84:27-32. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.08.006

37. Shen T, Jiang Z-L, Li C-J, Hu X-C, Li Q-W. Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing–thawing. Zygote 2016;24:259-65. doi: 10.1017/S0967199415000155

38. Shaygannia E, Ghandehari-Alavijeh R, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. The Protective Effects of Alpha Lipoic Acid on Human Sperm Function During Freezing-Thawing. Cryo Letters 2020;41:344-50. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.04.006

39. Jannatifar R, Asa E, Sahraei SS, Verdi A, Piroozmanesh H. N-acetyl-l-cysteine and alpha lipoic acid are protective supplement on human sperm parameters in cryopreservation of asthenoteratozoospermia patients. Andrologia 2022;54:e14612. doi: 10.1111/and.14612

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2024; Vol 19, No 1

DOI: 10.22100/jkh.v19i1.3181
Original Article

Evaluation of the Combination Effects of Chlorogenic Acid and Lipoic Acid on the Sperm Parameters of Patients with Oligoasthenozoospermia after Freeze-thaw Process

Zahra Khosravizadeh (Ph.D.)[1], Mohammad Javad Bai (M.D.)[2], Marzieh Eslami Moayed (M.D.)[2,3], Nasser Mogharabian (M.D.)[3], Hamed Ghazvini (Ph.D.)[4,5], Shadan Navid (Ph.D.)[6], Ali Talebi (Ph.D.)[3*]

1- Clinical Research Development Unit, Amir-al-Momenin Hospital, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2- Dept. of Clinical Sciences, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
3- Sexual Health and Fertility Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
4- Dept. of Neuroscience, School of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
5- Psychiatry and Behavioral Sciences Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
6- Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Social Determinants of Health Research Center, Gonabad University of Medical Science, Gonabad, Iran.

Received: 14 Agust 2023**, Accepted:** 3 January 2024

Abstract:

Introduction: *Cryopreservation by various mechanisms, such as the induction of oxidative, osmotic, and temperature stress, causes a reduction in sperm quality after the freeze-thaw process. This study aimed to investigate the effect of the simultaneous addition of chlorogenic acid and lipoic acid as an antioxidant supplement to sperm freezing medium in patients with oligoasthenospermia.*
Methods: *Sperm samples from patients with oligoasthenozoospermia were divided into five groups as follows: fresh sample (pre-frozen semen), control (sperm freezing medium without supplements), CGA group (sperm freezing medium with 100 µM chlorogenic acid), ALA group (sperm freezing medium with 200 µM lipoic acid) and CGA+ALA group (sperm freezing medium with chlorogenic acid and lipoic acid). Total mobility, viability rate (eosin-nigrosin staining) and DNA fragmentation index (Halo test) were assessed before and after freeze-thawing.*
Results: *In the control group, there was a decrease in total sperm motility and viability and an increase in DFI. Freezing sperm in the CGA, ALA, and CGA+ALA groups was associated with a significant increase in viability and total sperm motility after thawing. The results of the Halo test also showed that the increase in sperm DFI caused by the freeze-thaw process was less in all three experimental groups than in the control group, and this decrease was statistically significant ($P<0.05$).*
Conclusion: *The simultaneous addition of chlorogenic acid and lipoic acid to the sperm freezing medium can improve the quality of sperm samples after the freeze-thaw process in terms of mobility, viability, and DNA fragmentation, thus increasing the efficiency of this technique in the treatment of male infertility.*

Keywords: Sperm, Antioxidant, Chlorogenic acid, Lipoic acid, Cryopreservation.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** A. Talebi, **Email**:* alitalebi.ir@gmail.com, alitalebi@shmu.ac.ir

Citation: Khosravizadeh Z, Bai MJ, Eslami Moayed M, Mogharabian N, Ghazvini H, Shadan N, Talebi A. Evaluation of the combination effects of chlorogenic acid and lipoic acid on the sperm parameters of patients with oligoasthenozoospermia after freeze-thaw process. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2024;19(1):22-29.

CC BY NC