Effect of Coenzyme Q10 on DNA Fragmentation, Membrane Integrity, and Sperm Chromatin Condensation after Thawing of Frozen Semen

Mohammad Jafar Rezaie[1], Masoomeh Rezaie[1], Bahram Nikkhoo[2], Deam Roshani[3], Azra Allahveisi[4]

1.PhD of Histology and Embryology, Infertility Center of Besat Hospital, Faculty of medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID: 0000-0001-7332-1217

1. Infertility fellowship, Infertility treatment Center of Besat Hospital, faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCI: 0000-0002-2919-1715.

2. Associated Professor pathology, Department of Pathology, Faculty of medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID: 0000-0002-5050-793X.

3 – Ph.D of Biostatistics. Social Determinants of Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
ORCID: 0000-0003-4746-1114.

4. PhD of Reproductive Biology, Infertility treatment Center of Besat Hospital, Faculty of medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, Email: a.allahveisi@muk.ac.ir ,Tel:08733664673, ORCID: 0000-0002-9760-5078

ABSTRACT

Background and Aim: In recent years, sperm cryopreservation has resulted in significant advances in assisted reproductive techniques (ARTs); and, has showed a crucial potential impact on infertility treatment and increasing success rates of ARTs. The negative effects of sperm freezing due to lack of antioxidants have been well recognized .The aim of this study was to determine the effect of coenzyme Q10 as a potent antioxidant on sperm parameters including DNA fragmentation, membrane integrity, and sperm chromatin condensation after thawing of frozen semen.

Materials and Methods: Semen samples were collected from 50 men referring to the infertility treatment center of Besat Hospital. According to WHO criteria, the men were normozoospermia. Semen samples were divided into three parts: 1) before freezing 2) freezing without coenzyme Q10 , and 3)freezing with coenzyme Q10. After freezing, samples were stored in liquid nitrogen. After two weeks, the samples were thawed and the parameters of sperm including DNA fragmentation, membrane integrity, and sperm chromatin condensation were evaluated. Data were analyzed by one way ANOVA and Pearson correlation test.

Results: After thawing the frozen samples, sperm parameters including number and concentration, total number of motile sperms and progressive movement of sperm, viability, membrane integrity, DNA fragmentation, chromatin density were significantly different from the same parameters before freezing ($P < 0.05$). Addition of coenzyme Q10 improved, viability, membrane integrity, chromatin density, and total number of motile sperms and reduced sperm DNA fragmentation. ($P < 0.05$) Sperm count and morphology showed no significant difference before and after freezing ($P > 0.05$). Also, the percentage of sperm DNA fragmentation was directly related to sperm chromatin before and after freezing.

Conclusion: Addition of Q10 coenzyme antioxidant to sperm freezing medium not only improved sperm parameters of membrane integrity and chromatin, but also resulted in reduced sperm DNA fragmentation after thawing.

Keywords: Coenzyme Q10, Sperm cryopreservation, Sperm DNA fragmentation**.**

Received: Sep 2, 2020 **Accepted:** Feb 22, 2021

How to cite the article: Mohammad Jafar Rezaie, Masoomeh Rezaie, Bahram Nikkhoo, Deam Roshani, Azra Allahveis. The Effect of Coenzyme Q10 on DNA Fragmentation, Membrane Integrity, and Sperm Chromatin Condensation after Thawing of Frozen Semen ﻩﻩSJKU 20200;26(7):34-44.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و شش / بهمن و اسفند ۱۴۰۰/۴۴۱-۳۱۴

اثر کوآنزیم Q10 برپارامترهای اسپرم،قطعه قطعه شدن DNA، تمامیت غشاءِ وتراکم کروماتین اسپرم پس از ذوب مایع منی فریز شده

محمدجعفر رضایی[۱] ،معصومه رضایی[۲]، بهرام نیکخو[۳] ،،دائم روشنی[۴] عذرا الله ویسی[۵*]

۱. دکتری بافت وجنین شناسی، مرکزدرمان ناباروری بیمارستان بعثت، دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی کردستان،سنندج،ایران.کد ارکید :-0000-0001-7332-1217

۲. مرکزدرمان ناباروری بیمارستان بعثت، دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی کردستان،سنندج،ایران.کد ارکید:0000-0002-2919-1715

۳. دانشیار پاتولوژی ،بخش پاتولوژی ، دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی کردستان،سنندج،ایران .شناسه ارکید: 0000-0002-5050-793X

۴. دکتری آمار زیستی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی کردستان،سنندج،ایران.کد ارکید:-0000-0003-4746-1114

۵. دکتری بیولوژی تولید مثل، مرکزدرمان ناباروری بیمارستان بعثت، دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی کردستان،سنندج،ایران.(نویسنده مسئول)

Email: a.allahveisi@muk.ac.ir تماس:۰۸۷۳۳۶۶۴۶۷۳،کد ارکید:0000-0002-9760-5078

چکیده:

زمینه وهدف : در سالهای اخیر ، انجماد اسپرم، پیشرفت قابل توجهی در تکنیک های کمک باروری (ART) داشته است و تاثیر مهمی در درمان ناباروری و همچنین افزایش میزان موفقیت ART داشته باشد. اثرات منفی انجمادبر اسپرم به دلیل کمبود آنتی اکسیدان ها بخوبی شناخته شده است بنابراین هدف ار این مطالعه ، تعیین اثر کوآنزیم Q10 به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی بر پارامترهای اسپرم ، DNA، تمامیت غشاءِ وتراکم کروماتین اسپرم پس از ذوب مایع منی فریز شده بود

روش بررسی : نمونه مایع منی از ۵۰مرد مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری بیمارستان بعثت سنندج که که طبق معیارهای WHO(2010نروموزواسپرمیا بودند جمع آوری شد.نمونه مایع منی به سه قسمت قبل از انجماد ، انجماد بدون کوآنزیم Q10 و انجماد با کوآنزیم Q10 تقسیم شدند .نمونه ها پس از انجماددر نیتروژن مایع نگهداری شدند سپس بعد از دو هفته نمونه ها ذوب و مجدا پارامترهای اسپرم ، DNAفراگمنتاسیون , تمامیت غشاءِ اسپرم وتراکم کروماتین اسپرم ارزیابی شدند .داده ها از طریق روش آماری اندازه گیری One way ANOVA و آزمون همبستگی پیرسون تحلیل و آنالیز شد .

یافته ها :بعداز ذوب نمونه های انجماد شده،پارامترهای اسپرم شامل تعداد و غلظت ، تحرک و حرکت پیشرونده اسپرم ، قابلیت حیات ، تمامیت غشاء ، قطعه قطعه شدن DNA، تراکم کروماتین تفاوت معناداری با قبل از انجماد داشتند ($P<0.05$). افزودن کوآنزیم Q10 نیز باعث بهبود تحرک ، حرکت پیشرونده اسپرم ، قابلیت حیات ، حفظ تمامیت غشاء و تراکم کروماتین ، کاهش قطعه قطعه شدن DNA شد($P< 0.05$) تعداد و مورفولوژی اسپرم قبل و بعد از انجماد تفاوت معناداری نداشتند ($P>0.05$). همچنین درصد اسپرم‌های دارای آسیب DNA دارای ارتباط مستقیمی با کروماتین اسپرم قبل و بعد از انجماد بود .

نتیجه گیری: افزودن آنتی اکسیدان کوآنزیم Q10 به محیط انجماد اسپرم میتواند موجب بهبود پارامترهای اسپرم ، حفظ تمامیت غشاء وکروماتین اسپرم و کاهش قطعه قطعه شدن DNA پس از ذوب شود.

کلیدواژه ها: کوآنزیم Q10، انجماداسپرم ، قطعه قطعه شدن DNAاسپرم

وصول مقاله:۹۹/۶/۱۲ اصلاحیه نهایی:۹۹/۱۰/۱۹ پذیرش:۹۹/۱۲/۴

مقدمه

امروزه انجماد اسپرم یکی از تکنیک های مهم کمک باروری برای حفظ باروری در مردانی که تحت شیمی درمانی ،رادیوتراپی، جراحی و نقائص انزالی قرار دارند انجام می شود (۱).ترکیب معمولی محیط های انجمادی برای انجماد اسپرم و مایع منی سالیان زیادی بدون تغییر باقی مانده است(۲). اثرات انجماد اسپرم بر توانایی لقاح ، تحرک ، مورفولوژی و حیات اسپرم ها بخوبی مشخص شده است(۳).همچنین نشان داده شده است انجماد اسپرم موجب افزایش شکست DNA اسپرم در مردان نابارور می شود شواهد جمع‌آوری شده نشان می‌دهند یک رابطه منفی بین به هم ریختگی انسجام مواد ژنومی در هسته اسپرم و پتانسیل باروری اسپرم چه به صورت in vivo و چه به صورت in vitro وجود دارد (۴).تاثیرقطعه قطعه شدن DNA اسپرم بر حاملگی به صورت طبیعی یا حاملگی از طریق ART شناخته شده است (۵). بااینحال، مکانیسم واقعی درگیر در قطعه قطعه شدن DNA اسپرم که یکی از علل آسیب به اسپرم بدلیل انجماد می باشد مشخص نشده است(۶). در مطالعات قبلی ارتباط بین DNA فراگمنتاسیون اسپرم و استرس اکسیداتیو بطور وسیعی مورد بررسی قرار گرفته است. استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم هایی است که بوسیله آن قطعه قطعه شدن DNA اتفاق می افتد. بنظر می رسد در طی انجماد اسپرم اکسیداتیو استرس بدلیل شوک ناشی از سرما افزایش پیدا می کند و احتمالا استرس اکسیداتیو مسوول آسیب به DNAاسپرم می شود. (۷) . همچنین وجود غلظت‌های بالای اسیدهای چرب زنجیر بلند در داخل ساختار لیپید غشاء اسپرم نیاز به سیستم آنتی-اکسیدانی موثر برای حفاظت اسپرم در مقابل آسیب پراکسیداسیون دارد. سیستم حفاظتی آنتی‌اکسیدانی در اسپرم بدلیل منشاء سیتوپلاسمی آن و بدلیل از دست رفتن بیشتر سیتوپلاسم در مرحله نهایی تمایز اسپرم، مقدار آن کم بوده و فاقد آنتی‌اکسیدان کافی برای خنثی کردن اثر Reactive Oxygen Species (ROS) و پر اکسیداسیون لیپیدی در طی انجماد می باشد و این یکی از علل اصلی حساسیت اسپرم نسبت به پراکسیداسیون ، تولید ROS و استرس اکسیداتیو در طول انجماد - ذوب می-باشد(۸). آنتی اکسیدان ها بعنوان عاملی برای غلبه بر اثرات اکسیداتیو استرس ثابت شده است(۹).کوآنزیم Q10که به عنوان یوبیکینون شناخته شده است آنتی اکسیدانی است که در اکثر سلول ها وجود دارد ودر واکنش های اکسیداسیونی که منجر به تولید رادیکال های آزاد می شود می تواند بعنوان آنتی اکسیدان منجر به کاهش آسیب سلولی شود آن اساسا در میتوکندری ها بعنوان جزء زنجیر انتقال الکترون می باشد که در تولید انرژی سلول از ATP نقش دارد و همچنین غلظت بالای کوآنزیم Q10 در سلولهایی که نیاز به انرژی زیاد دارند یافت می شود (۱۰). در مجموع بدلیل اهمیت اثر انجماد و علل کاهش باروری پس از انجماد اسپرم مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات آنزیم کوآنزیم Q10 بر پارامترهای اسپرم شامل تعداد (Count)وغلظت (Concentration) ، حرکت(Motility) ، مورفولوژی (Morphology)،قطعه قطعه شدن DNA (DNA fragmentation), تمامیت غشاء اسپرم (Membrane integrity)و تراکم کروماتین اسپرم (sperm chromatin condensation) پس از ذوب مایع منی منجمد شده انجام می گیرد مطالعه ما می تواند به ارتقاء محیط های انجمادی کمک کند وموجب افزایش میزان موفقیت های تکنیک های کمک باروری بدنبال انجماد اسپرم شود.

روش بررسی

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان (IR.MUK.REC.1394/171) تصویب شد.در این مطالعه تجربی ،نمونه های منی از ۵۰ نفر مرد مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری بیمارستان بعثت سنندج که ۲-۷ روز از مقاربت خودداری کرده بودند

جمع آوری شدند.سن افراد جمع کننده بین ۴۰-۲۰ سال بود و برای مایع شدن کامل ،نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه بدون CO_2 گذاشته شدند پس از مایع شدن آنالیز آن بر اساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت WHO (world Health Organization) 2010انجام شد (۱۱).نمونه ها به دو گروه کنترل(انجماد بدون کوآنزیم Q10)و آزمایش(انجماد با کوآنزیم Q10)تقسیم شدندو سپس هر نمونه به ۳ گروه مطالعاتی تقسیم شد۱) تازه(Fresh) قبل از انجماد ۲)انجماد با محیط انجماد (Sperm Freeze Solution, Vitrolife, Goteborg, Sweden) بدون کوآنزیمQ10 (گروه کنترل) ۳) انجماد با محیط انجماد بعلاوه ۱۰۰میکرومولار کوآنزیم Q10 (گروه آزمایش).نمونه ها داخل کرایوویال قرار داده شدندو به مدت ۱۵ دقیقه در بخار نیتروژن قرار گرفتند پس از غوطه ورشدن در نیتروژن مایع به داخل تانک نیتروژن مایع در دمای ۱۹۶ –درجه سانتی گراد انتقال و ذخیره شدند.برای ذوب بعد از ۲ هفته، نمونه ها ابتدا در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۲±۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند .پس از ذوب، نمونه ها با همرفتن ۱۰درصد دو بار با دور ۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. بررسی مجدد نمونه ها از نظرحرکت ، غلظت، تحرک و حرکت پیشرونده (Progressive motility) ، مورفولوژی ، قطعه قطعه شدن DNA ، کروماتین و تمامیت غشاء اسپرم انجام شد. معیارهای ورودمطالعه، مردان سالمی که مشکل ناباروری آنها به دلیل ناباروری همسرانشان بود و میانگین سنی بین ۲۰ تا ۴۰ سال داشتند.معیارهای خروج در این مطالعه افراد بالای ۴۰ سال و دارای مشکلات ناباروری بدلیل فاکتورهای مردانه وهمچنین بیماران مبتلا واریکوسل ، اولیگواسپرمیا و استنوتراتواسپرمیا وبیماری های هیپوفیزی ، پرولاکتینومی و اختلالات تیروئیدی و افراد الکلی و سیگاری ازاین مطالعه حذف شدند

بررسی قطعه قطعه شدن DNA اسپرم :

بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم با استفاده از کیت هالواسپرم (شرکت دایان زیست آزما) انجام شد ۲۵میکرولیتر از نمونه با آگارز با نقطه ی ذوب پایین مخلوط و بر روی لام شیشه ای قرار داده شد .پس از قرار دادن لامل، اسلاید ها به مدت ۵ دقیقه بر روی سطح سرد با دمای ۴درجه سانتی گراد انکوبه شد.سپس لامل برداشته و اسلاید در محلول دناتوره کننده و پس از آن در محلول لیز کننده غوطه ور شد. پس از شستشو با آب مقطر، برای آبگیری از محلول های اتانول با غلظت صعودی (۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ %)استفاده شد. پس از خشک شدن در دمای اتاق رنگ آمیزی مجددا با آب مقطر شستشو داده شد. شمارش اسپرم ها با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×)در هر لام حداقل 200 اسپرم صورت گرفت سپس تعداد اسپرم های دارای هاله بزرگ یا متوسط (نرمال) و دارای هاله کوچک یا بدون هاله (دارای شکست DNA) به صورت درصد محاسبه شد(۱۲).

بررسی بلوغ کروماتین:

از رنگ آمیزی آنیلین بلو (Aniline Blue) برای ارزیابی تراکم کروماتین اسپرم استفاده شد. در این روش، اسمیرهای خشک تهیه شده و در دمای هوا با استفاده از فرمالین ٪۴ (Chemical Junsei Japan, Tokoyo) , تثبیت شدند. سپس با آب شستشو داده شدند و در آنیلین بلو 5% (MO, USA Sigma-Aldrich Co., St. Louis,) در محلول اسید استیک ۰/ ۴۰و(pH 3.5) رنگ آمیزی شدند.. هر کدام از مراحل فیکساسیون و رنگ آمیزی به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق صورت گرفت. لام ها را با آب شسته، در دمای اتاق خشک و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی40 X ، مورد بررسی قرار گرفتند. حداقل 200اسپرم در ۲ الی ۳ میدان دید شمارش و بررسی گردید. اسپرم های رنگ شده به عنوان اسپرم های نابالغ با

هیستون اضافی و کروماتین غیرطبیعی اسپرم در نظر گرفته شدند.

بررسی تمامیت ویکپارچگی غشاء

برای بررسی تمامیت ویکپارچگی غشا ازتست هایپواسمولار HOST (hypo-osmotic swelling test) استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر محلول اسپرم آماده شده با محیط Human Tubal Fluid(HTF)به نسبت (۱/۱) رقیق شده انجام شد .پس از ۳۰ دقیقه ، حداقل ۲۰۰ اسپرم در ۲الی ۳ میدان دید برای هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت و دم اسپرم های متورم و پیچ خورده شمارش گردید(۱۳).

ارزیابی پارامترهای اسپرم:

برای مشاهده تحرک، ۱۰ میکرولیتر از مایع منی بر روی لام شیشه ای قرار داده شده و با لامل ۲۲*۲۲ پوشانده شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی40 X ،تعداد اسپرمهای دارای حرکت سریع پیشرونده و رو به جلو، آهسته پیشرونده رو به جلو، حرکت در جا و اسپرم های بیحرکت در ۲ الی ۳ میدان دید میکروسکوپی شمارش شده و درصد اسپرمهای متحرک و غیرمتحرک به دست آمد. نتایج برای هر نمونه ، قبل و بعد انجماد ثبت شد. برای تعیین غلظت (تعداد) اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از مایع منی با ۹۹۰ میکرولیتر محلول شمارش اسپرم رقیق شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از آن توسط لام نئوبار شمارش شد. مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی دیف کوئیک(Diff Quik) بررسی شد.در این روش حدود ۲۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده را بر روی لام قرار گرفت . پس از تهیه اسمیر ، در سه محلول متانول (جهت تثبیت بر روی لام)، ائوزین (جهت رنگ آمیزی سیتوپلاسم) و (like-Thiazineجهت رنگ آمیزی DNA)ه تر تیب به مدت ۳۰ ثانیه قرارداده شد و در دمای اتاق خشک شد . در هر لام حدود ۲۰۰ اسپرم از لحاظ مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی می شود.

آنالیز آماری:

پس از جمع آوری داده ها آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار آماری'Version 8 Graph Pad Prism مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. .نرمال بودن داده ها توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف تعیین گردید. برای مقایسه متغیرها آزمون آماری one way ANOVAبه کار رفت. برای محاسبه ضریب همبستگی از آزمون همبستگی پیرسون Correlation (Pearson's Coefficient)استفاده شد سطح معنی داری $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

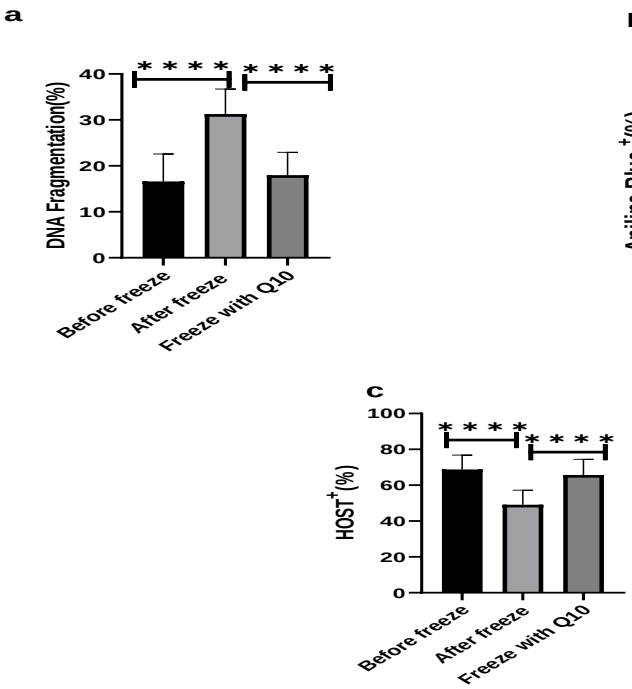
نتایج

مطالعه حاضر بر اساس جدول ۱ نشان داد که در انجماداسپرم یدون کوآنزیمQ10 ،تفاوت معنی داری بین میانگین متغیرهای تحرک کلی ،حرکت پیشرونده، مورفولوژی، قابلیت حیات، قطعه قطعه شدن DNA،تراکم کروماتین و تمامیت غشاء اسپرم قبل و بعد از انجماد وجود دارد($P<0.05$) . علیرغم اینکه با افزودن کوآنزیم Q10 ، بعد ازانجماد قطعه قطعه شدن DNA ،تراکم کروماتین وتمامیت غشاء اسپرم در مقایسه با اسپرم قبل از انجماد(تازه) و نیز انجماد بدون کوآنزیم Q10 تفاوت معنی داری داشت ($P<0.05$) با اینحال ، تفاوت معنی داری بین میانگین متغییرهای تعداد ، غلظت و مورفولوژی اسپرم قبل و بعد از انجماد وجود نداشت ($P>0.05$). مقایسه نمونه های قبل و بعد از انجماد نیز در دو گروه کنترل و آزمایش نشان دادکه ارتباط مستقیمی بین تراکم غیر طبیعی کروماتین و میزان فراگمنتاسیون DNAوجود دارد (نمودار۲).

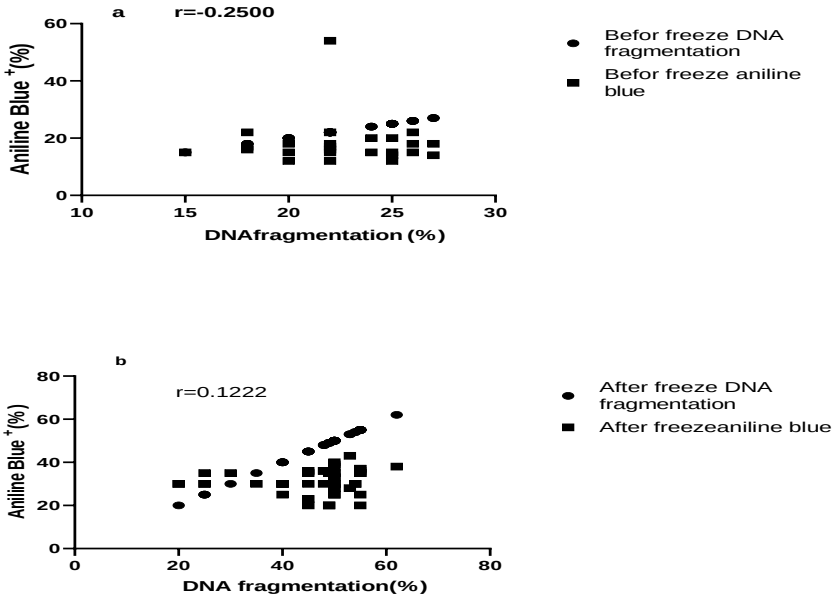
جدول ۱: درصد تعداد، غلظت، تحرک کلی، حرکت پیشرونده اسپرم

	Mean± SD			
متغییرها	**قبل از انجماد**	**بعداز انجماد بدون کوآنزیمQ10**	**بعدازانجماد با کوآنزیمQ10**	**P**
تعدادکل اسپرم (10^6)	112.3±34.5[a]	80.6±4.6[b]	112.3±34.5[a]	≤0.01[b,a]
(10^6/1ml) غلظت اسپرم	65.6 ± 22[a]	1 1.8 ± 1.9[b]	86.4 ± 22[a]	≤0.001[b,a]
کل اسپرم های (%) متحرک	85.6 ± 22[a]	26.4 ± 5.5[b]	100.6 ± 22[a]	0.02[b,a]
اسپرم های متحرک پیشرونده (a+b %) درجه	56.7± 2.1[a]	25.7± 4.5[b]	72.7± 9.1[a]	0.010[b,a]
مورفولوژی طبیعی (%)	15.8±2.2[a]	3.8±0.9[b]	13.8±3.2[a]	0.006[b,a]

توان حروفی نشان دهنده تفاوت معنی دار در هر ردیف می باشد P<0.05 معنی دار در نظرگرفته شد



نمودار ۱:a) درصد مثبت DNA فراگمنتاسیون b)درصد مثبت آنیلین بلو c)درصد مثبت تست هایپواسمولار(HOST)را نشان میدهد P<0.05معنی دار در نظرگرفته شد P<0.0001****



نمودار۲: :نتایج بررسی هم ارتباطی قبل (a) و بعد از انجماد اسپرم(b) با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون .

بحث

دراین مطالعه برای جبران کاهش اثر دفاع انتی اکسیدانی بعد از انجام انجماد اسپرم ، کوآنزیمQ10 به محیط انجماداسپرم افزوده شد و تاثیر آن بر پارامترهای اسپرم ، قابلیت حیات و تمامیت غشاِ، DNA فراگمنتاسیون تراکم کروماتین بعد از انجماد اسپرم بررسی شد. بر اساس نتایج به دست آمده افزودن کوآنزیمQ10 به محیط انجماد اسپرم باعث بهبود میزان تحرک کلی و حرکت پیشرونده اسپرم ، افزایش قابلیت حیات و حفظ تمامیت غشاِ ، حفظ تراکم کروماتین اسپرم و کاهش میزان قطعه قطعه شدن DNA و تغییرات معناداری در این پارامتر ها گردید.همچنین افزودن کوآنزیمQ10 تاثیر معناداری در بهبود مورفولوژی ، غلظت و تعداد اسپرم نداشت. نشان داده شده است که پراکسیداسیون اجزاء غشاء توسط استرس اکسیداتیو منجر به کاهش فعالیت پمپ ATPase+-K+/Na و در نهایت استنواسپرمیا شود. به دنبال اختلال در فرایندهای تبادل یونی غشاء و آنزیم های دخیل در آن،دراثر تغییرنفوذ پذیری غشاء بدنبال انجماد ،از میزان فعالیت و تحرک اسپرم کاسته می شود (۱۳).

محافظت ازغشای پلاسمایی اسپرم درمقابل واکنش های اکسیداتیو در زمان انجماد می تواند توسط آنتی اکسیدان ها انجام شود،درواقع آنتی اکسیدان ها منجر به کاهش تشکیل رادیکال های آزاد و حفظ تحرک اسپرم می شوند (۱۴). بر اساس مطالعات Talevi و همکارانش درسال ۲۰۱۳، آنتی اکسیدان Q10 با کاهش پراکسیداسیون لیپیداسپرم، موجب حفظ تحرک اسپرم میشود. که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد (۱۵). بر اساس مطالعات Aitkenو همکارانش در سال ۲۰۱۰ ، تولید بیش از حد ROS موجب بی حرکتی اسپرم از طریق پراکسیداسیون لیپید به علت تولید بیش از حد ROS و آسیب DNA میشود(۱۶). wail vafaو همکارانش در سال ۲۰۱۶ تاثیر آنتی اکسیدان کوآنزیم Q10 بر پارمترای اسپرم گاو و بوفالو را پس از انجماد بررسی کردند.در این مطالعه نشان دادند که افزودن ۳۰ میکرومول آنتی اکسیدان Q10به

محیط انجماد اسپرم ها می تواند موجب افزایش حرکت و قابلیت زنده ماندن اسپرم ها می شود (۱۷).

Melissa Rossi و همکارانش در مطالعه ایی در سال۲۰۱۶ نقش کوآنزیم Q10و ویتامین E را بر روی تحرک اسپرم های مایع منی اسب پس از انجماد بررسی کردند آنها نشان دادند که افزودن آنتی اکسیدان Q10 به محیط انجماد اسپرم ها تفاوت معناداری در پارامتر حرکت اسپرم ایجاد نمی کند. این نتیجه با مطالعه ی ما همخوانی نداشت که می تواند به علت متفاوت بودن نوع گونه و همچنین تفاوت در روش انجام انجماد باشد (۱۸).علیرغم اینکه بعد از انجماد ،درصد اسپرم های با دم کوتاه و پیچ خورده و سرهای جدا شده از دم ،افزایش یافته بود . اما این تفاوت مورفولوژی به لحاظ آماری معنادار نبود وافزودن Q10 به محیط انجماد اسپرم تاثیری بر غلظت و مورفولوژی ندارد. به نظر می رسد آن به دلیل تشکیل مورفولوژی اسپرم در طی اسپرمیوژنز باشدکه با نتایج مطالعات Palomar Rios و همکارانش در سال ۲۰۱۵ (۱۹).و حسین دقیق کیا و همکارانش در سال۲۰۱۶ (۲۰) .همخوانی دارد wail vafa و همکارانش درسال ۲۰۱۶ نشان دادند که کوآنزیم Q10 تاثیر معناداری در حفظ مورفولوژی اسپرم گاو و بوفالو پس از انجماد دارد(۱۷). این نتیجه با مطالعه ی ما همخوانی نداشت که می تواند به علت متفاوت بودن نوع گونه و روش ارزیابی پارامتر مورد نظرباشد.مطالعات نشان داده اند دم غیرطبیعی اسپرم ممکن است به دلیل بعضی آسیب های وارده به پروتئین های درگیر در تحرک اسپرم باشد (۲۱-۲۲) . درپژوهش حاضر،عملکردمثبت کوآنریم Q10 نه تنها سبب بهبودمعنادارپارامتر تحرک اسپرم شد بلکه باعث حفظ تمامیت غشاء و افزایش درصدزنده مانی اسپرم هابعد از انجماد با کوآنزیم Q10 در مقایسه باگروه بدون کوآنزیم Q10 گردید . کوآنزیم Q10 یک آنتی اکسیدان محلول در چربی از پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی جلوگیری کرده وباتثبیت غشاءسلول سبب حفظ استحکام وعملکردسلول می شود (۲۳).همچنین کوآنزیم Q10 باانتقال پروتون درغشاء وخاصیت آنتی اکسیدانی درزنجیره انتقال الکترون میتوکندری نقش مهمی درمتابولیسم انرژی داشته و سبب حفظ یکپارچگی و تمامیت غشاء می شود (۲۳) .مطالعه ما نشان داد انجماد اسپرم باعث کاهش کروماتین اسپرم و نیز قطعه قطعه شدن DNA می شود وافزودن Q10 باعث حفظ تراکم کروماتین و کاهش قطعه قطعه شدن DNA می شود. همچنین مطالعه ما نشان داد رابطه مستقیمی بین تراکم کروماتین اسپرم و شکست DNAوجود داشت که نتایج ما با نتایج گلشن ایرانپور و همکارانش در سال ۲۰۱۹ همخوانی داشت(۲۴). نقص درساختارکروماتین اسپرم معمولا با محتوای غیرطبیعی پروتئین های هسته ای و یا شکست رشته یDNAهمراه است (۲۵) که با مطالعه ما همخوانی داشت .در حالت طبیعی در بدن توازنی بین سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و ترمیم DNA وجود دارد و همیشه سطح پایینی از DNA که اکسید می شود سریعاً توسط مکانیسم های دفاعی ترمیم میگردد.مطالعه ما نشان داد که آنتی اکسیدانQ10 ، اثرحفاظتی برحفظ انسجام DNA دارد.Abad و همکارانش در سال۲۰۱۳در مطالعه خود بر روی ۲۰ مرد نابارور نشان دادند درمان خوراکی با آنتی اکسیدان ، بویژه کوآنزیم Q10 به مدت ۳ ماه ، موجب انسجام DNA و کاهش میزان قطعه قطعه شدن DNA می شود(۲۶) . انجماد اسپرم انسان بدلیل تولید رادیکال های آزاد می تواند موجب اکسیداسیون بازهای پورین و پیریمیدین و شکستگی در یک یا دو رشته و ایجاد جایگاههای بدون باز شود (۱۴).بنابراین، Q10 می تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان حامل انرژی از ژنوم اسپرم در برابر رادیکالهای آزاد محافظت می کند. در طول روند اسپرمیوزنز، هیستونها توسط پروتامین جایگزین می شوند.این بازآرایی ،موجب مقاوم سازی کروماتین می

شـود(۲۳) . وجـود پیونـد هـای دی سـولفیدی درون و بـین مولکولی بـین ریشـه هـای سیسـتئین پروتامین،باعـث ایجـاد تراکم و استحکام می شود. این پیوندها در افـزایش متـراکم شـدن کروماتین اسـپرم در فراینـد اسـپرماتوژنز و در نتیجـه محافظت بهتر طی فراینـد انجمـاد-ذوب مؤثرهسـتند (۲۷). مطالعات زیادی نشان داده اند کـه مصـرف خـوراکی آنتـی اکسیدان ها موجب حفظ انسجام DNA و تراکم هسته می شـود(۱۸). مطالعـات متعـددی در مـورد تـاثیرات Q10 بـر بهبـود پارامترهـای اسـپرم صـورت گرفتـه کـه گاهـا نتـایج متفاوتی در بر داشته است اما عمده ی این نتایج نشان دهنده ی تاثیر مثبت این آنتی اکسیدان بر بهبود پارامتر های اسـپرم می باشد.

نتیجه گیری

مطالعه ما نشان داد افزودن آنتی اکسیدان کوآنزیم Q10 به محـیط انجمـاد موجـب بهبـود پارامترهـای اسـپرم ، حفـظ تمامیت غشاء وکروماتین اسـپرم ونیـز کـاهش قطعـه قطعـه شدن DNA اسپرم پس از ذوب شود بنابراین افزودن این کوآنزیم بعنوان جزئی از محیط های فریز می تواند منجر به ارتقاء تکنیک های کمک باروری وافزایش میزان موفقیـت نتایج این تکنیک ها شود .

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدینوسیله ازمعاونت تحقیقـات و فنـاوری دانشگاه علوم پزشکی کردستان به خاطر تصویب و حمایت مالی طـرح تحقیقـاتی شـماره۹مراتـب تشـکر و قـدردانی را اعلام میدارند.

References

1.Jodar M, Soler-Ventura A, Oliva R, of Reproduction MB, Group DR. Semen proteomics and male infertility. J Proteomics 2017;162: 125-34.

2.O'Neill HC , Nikoloska M, Ho HT, Doshi A, Maalouf W.Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. J Assist Reprod Genet 2019; 36(8): 1713–20.

3.O'Connell, M., McClure N, Lewis SEM, The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Human Reprod 2002; 17(3): p. 704-9.

4.Thomson LK, Fleming SD, Barone K, Zieschang JA, Clark AM. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation.Fertil Steril 2010 1;93 (4):1147-56.

5. Domingo P, Olaciregui M, González N, De Blas I, Gil L.Long-term preservation of freeze-dried rabbit sperm by adding rosmarinic acid and different chelating agents.Cryobiology 2018; 81:174-7.

6. LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM.Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum Reprod 2009; 24(9) :2061–70.

7.Rahiminia T, Hosseini A , Anvari M, Ghasemi-Esmailabad s,Talebi AR.Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. Taiwan J Obstet Gynecol 2017;56(4):472-6

8.Barroso G , Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. Hum reprod 2000;15(6): 1338-44.

9. Birben E, Sahiner UR, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O.Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum reprod 2009; 24(9): 2061-70.

10.Duberley KE, Heales S J R , Abramov A Y, Chalasani A , Land J M, Rahman S ,et al. Effect of Coenzyme Q10 supplementation on mitochondrial electron transport chain activity and mitochondrial oxidative stress in Coenzyme Q10 deficient human neuronal cells. The Int J Biochem Cell Biol 2014; 50:60-3
11.Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. world health organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010;16: 231-45
12.José Luis Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M , et al, Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil and Steril 2005; 84(4): 833-42.
13. Gogol P, Szcześniak-Fabiańczyk B, Wierzchoś-Hilczer A. The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. Reprod Biol 2009 ; 9(1):39-49.
14. Soon Len J, Wen Shuo Darius Koh WS, Tan SX.The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation .*Biosci Rep* 2019; 39 (8): BSR20191601.
15. Talevi R, Barbato V, Fiorentino I.,Braun S, Longobardi S, Gualtieri R. Protective effects of in vitro treatment with zinc, daspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. Reprod Biol Endocrinol 2013; 11:81
16. Aitken, R.J.; De Iuliis G.N.; Finnie J.M.; Hedges A. and McLachlan R.I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. Hum Reprod 2010, 25:2415–2426.
17. Wafa w. Saeed AM, El-Nagar HA, Hussein YS .Effect of Coenzyme Q10 as an Antioxidant Added to Semen Extender During Cryopreservation of Buffalo and Cattle .J.Animal and Poultry Prod.2016; 7 (11): 403-8
18.Melissa R, Falomo ME, Mantovani R . Role of coenzyme Q and vitamin E on stallion semen motility evaluated both in frozen and cooled-storedsemen**.** Ital J Anim.Sci 2016; 15(4):595-603
19.Palomar Rios A, Gascón A, Martínez JV, Balasch S, Molina Botella I. Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility, and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process.J Assist Reprod Genet 2018; 35(2): 237–45.
20.Daghigh Kia H, Blooki Z, Vaseghi Dodran H and Mahdipour M. Effect of Adding Coenzyme Q10 and Ellagic Acid during Cryopreservation on Post-Thaw Quality of Ram. Iran J Appl Anim Sci 2017; 7(3):451-5.
21. Le MT, Nguyen TTT, Nguyen TT, Nguyen TV, Nguyen TAT, Nguyen QHV, Cao TN. Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? Clin Exp Reprod Med 2019; 46(2): 67–75.
22. Raad G , Lteif L, Lahoud R, Azoury J, Azoury J, Tanios J, et al. Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity .Andrology 2018 ;6(6):836-45.
23. Carneiroa AM, Igor F. Canissob RS, Bandeiraa VFC, Scheerena , Camila P,et al. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability.. anim Reprod Sci 2018; 192:107-18
24.Golshan-Iranpour F, Zamani Rarani F, Dashti GR. Effect of chromatin condensation on frozen-thawed sperm DNA integrity in normozoospermic men. SJKU 2019; 24(3):34-42.
25. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J Androl 2003; 24(1): 59-66

26. Abad MJ, Amengual J, Gosa´lvez K, Coward N, Hannaoui J, Benet A. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmenta- tion and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. Andrologia 2013; 45: 211–6
27.Palomar Rios A, Gascón A, Martínez JV, Balasch S, Molina Botella I.
Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility,
and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process.J Assist Reprod Gent 2018;35(2): 237-45.