Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

# The Effect of L-Carnitine and Melatonin on Sperm Quality Parameters, DNA Fragmentation and Membrane Lipid Peroxidation during Sperm Freezing Process

**A. Hosseini (PhD)[1], Z. Khodakarami (MSc)[2], M. Zamani (MSc)[2], F. Zafari (PhD)[*1]**

1.Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Diseases, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R.Iran.
2.Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R.Iran.

**[*]Corresponding Author: F. Zafari (PhD)**
**Address:** Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Diseases, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, I.R.Iran.
**Tel:** +98 (28) 33336001. **E-mail:** fariba.zafari@yahoo.com

**Article Type**
**Research Paper**

**Received:**
**Feb 10th 2023**
**Revised:**
**Apr 16th 2023**
**Accepted:**
**Jun 7th 2023**

## ABSTRACT

**Background and Objective:** During sperm freezing, its functional indices, including survival and motility, are damaged and lead to a decrease in sperm quality and fertility. Studies have been performed to lower these damages, including adding antioxidants to the freezing environment. This study was conducted to investigate the effects of antioxidants melatonin and L-carnitine on the quality of sperm parameters after freezing and thawing.

**Methods:** In this interventional study, 40 sperm samples were divided into 4 groups including: control group (no antioxidant), melatonin group (0.01 mmol melatonin), L-carnitine group (100 µmol L-carnitine) and combined group (0.01 mmol melatonin and 100 µmol L-carnitine). The samples were thawed two weeks after freezing, then the motility, survival and morphology parameters were evaluated by Eosin-nigrosin staining and were counted. Lipid peroxidation was evaluated by measuring MDA with thiobarbituric acid reaction and DNA fragmentation through Tunnel kit.

**Findings:** The results showed that the combined use of melatonin and L-carnitine in the freezing medium had a significant effect on the rate of motility and survival (increase from 15% to 25%), DNA fragmentation (decrease from 32% to 23%) and MDA level (decrease from 10 to 6.5 µm/dl). However, the examination of sperm morphology did not show any significant difference between the studied groups.

**Conclusion:** The results of the study showed that melatonin and L-carnitine can reduce the damage caused by sperm manipulation during the freezing and thawing process.

**Keywords:** *Melatonin, L-Carnitine, Sperm Freezing, Apoptosis.*

**Cite this article:** Hosseini A, Khodakarami Z, Zamani M, Zafari F. The Effect of L-Carnitine and Melatonin on Sperm Quality Parameters, DNA Fragmentation and Membrane Lipid Peroxidation during Sperm Freezing Process. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2024; 26: e19.

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]

Copyright © 2024 Babol University of Medical Sciences. Published by Babol University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

# اثر آنتی اکسیدان‌های ال–کارنیتین و ملاتونین بر کیفیت پارامترهای اسپرم، میزان شکست DNA و سطح لیپید پراکسیداسیون غشاء در طی فرآیند انجماد اسپرم

امیر حسینی (PhD)[۱]، زینب خداکرمی (MSc)[۲]، مریم زمانی (MSc)[۲]، فریبا ظفری (PhD)[۱*]

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده پیشگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

**نوع مقاله**
**مقاله پژوهشی**

**دریافت:**
**۱۴۰۱/۱۱/۲۱**
**اصلاح:**
**۱۴۰۲/۱/۲۷**
**پذیرش:**
**۱۴۰۲/۳/۱۷**

**چکیده**

**سابقه و هدف:** در طی انجماد اسپرم شاخص‌های عملکردی آن از جمله بقا و تحرک آسیب دیده و منجر به کاهش کیفیت اسپرم و باروری می‌گردد. مطالعات جهت محدود کردن این آسیب‌ها از جمله افزودن آنتی اکسیدان‌ها به محیط انجماد صورت گرفته است. این مطالعه به منظور بررسی اثرات آنتی اکسیدان‌های ملاتونین و ال–کارنیتین برکیفیت پارامترهای اسپرم پس از انجماد و ذوب انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مداخله‌ای، ۴۰ نمونه اسپرم به ۴ گروه شامل: گروه کنترل (فاقد آنتی اکسیدان)، گروه ملاتونین (۰/۰۱ میلی‌مول ملاتونین)، گروه ال–کارنیتین (۱۰۰ میکرومول ال–کارنیتین) و گروه ترکیبی (۰/۰۱ میلی‌مول ملاتونین و ۱۰۰ میکرومول ال–کارنیتین) تقسیم شدند. نمونه‌ها دو هفته پس از انجماد ذوب شدند، سپس پارامترهای تحرک، بقا و مورفولوژی با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین نیگروزین و شمارش آن‌ها و لیپید پراکسیداسیون از طریق اندازه گیری MDA با واکنش تیوباربیتوریک اسید و میزان شکستگی DNA از طریق کیت تانل بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد استفاده از ملاتونین و ال–کارنیتین به صورت ترکیبی در محیط انجماد تاثیر معنی‌داری بر میزان تحرک و بقاء (افزایش از ۱۵٪ به ۲۵٪) ، شکست DNA (کاهش از ۳۲٪ به ۲۳٪) و میزان MDA (کاهش از ۱۰ µm/dl به ۶/۵) داشته است. اما بررسی مورفولوژی اسپرم نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه نبود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که ملاتنین و ال–کارنیتین می‌توانند به کاهش آسیب‌های ناشی از دستکاری اسپرم طی پروسه انجماد و ذوب، کمک کنند.

**واژه‌های کلیدی:** ملاتونین، ال–کارنیتین، فریز اسپرم، آپوپتوزیس.

**استناد:** امیر حسینی، زینب خداکرمی، مریم زمانی، فریبا ظفری. اثر آنتی اکسیدان‌های ال–کارنیتین و ملاتونین بر کیفیت پارامترهای اسپرم، میزان شکست DNA و سطح لیپید پراکسیداسیون غشاء در طی فرآیند انجماد اسپرم. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۱۴۰۳؛ ۲۶: e۱۹.

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه زینب خداکرمی دانشجوی رشته علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی قزوین می‌باشد.
* مسئول مقاله: دکتر فریبا ظفری
آدرس: قزوین، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، پژوهشکده پیشگیری از بیماری‌های غیر واگیر، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.
تلفن: ۰۲۸-۳۳۳۳۶۰۰۱ رایانامه: fariba.zafari@yahoo.com

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]

## مقدمه

ناباروری در حال حاضر حدود ۱۵٪ زوجین سراسر جهان را صرف نظر از نژاد و قومیت تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱). انجماد اسپرم به طور گسترده به عنوان یک تکنیک روتین در بالین برای حفظ باروری و درمان ناباروری و ایجاد بانک‌های اهدا کننده استفاده می‌شود (۲). در دهه ۱۹۶۰ انجماد به عنوان یک روش ارزشمند برای حفظ باروری در مردان معرفی شده است (۳). اما این فرآیند باعث آسیب در پارامترهای اسپرم می‌گردد. در مطالعه Karimfar و همکارانش بر روی اسپرم انسانی که پارامترهای اسپرم را قبل و پس از انجماد ارزیابی کرده بودند، میزان بقا و تحرک در اسپرم منجمد شده در مقایسه با اسپرم تازه به میزان قابل توجهی کاهش یافته بود. همچنین میزان لیپید پراکسیداسیون در اسپرم منجمد شده در مقایسه با اسپرم تازه افزایش یافته بود که نشان می‌دهد انجماد اسپرم می‌تواند اثرات مخربی بر روی پارامترهای اسپرم بگذارد (۴).

استرس اکسیداتیو مکانیسم قدرتمندی است که نوکلئیک اسید را در اسپرماتوزوآ تخریب می‌کند. این شرایط به دلیل غلظت بالای گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species= ROS) و عدم توازن آن با دفاع آنتی اکسیدانی ایجاد می‌شود (۵). در طی انجماد، میزان ROS در اسپرم انسانی بیش از حد تولید می‌شود. ROS سبب لیپید پراکسیداسیون در غشای پلاسمایی اسپرم، اختلال در سیالیت غشا و فعالیت آنزیم‌های غشایی و کانال‌های یونی و در نتیجه سبب تحرک و باروری ضعیف اسپرم می‌گردد (۶). افزودن ترکیبات آنتی اکسیدانی در محیط انجماد به عنوان روش مشخص شده‌ای برای جلوگیری از استرس اکسیداتیو است (۷). ملاتونین عمدتاً از غده صنوبری تولید می‌شود (۸). علاوه بر چندین عملکرد فیزیولوژیکی شناخته شده، ملاتونین نقش آنتی اکسیدانی قابل توجهی از طریق حذف مستقیم رادیکال آزاد دارد (۹).

در مطالعات گذشته استفاده از آنتی اکسیدان‌های ملاتونین و ال-کارنیتین توانسته کیفیت پارامترهای اسپرم را بهبود بخشد. در مطالعه Najafi و همکاران، Karimfar و همکاران، Pariz و همکاران و Deng و همکاران بر روی اسپرم انسانی، آنتی اکسیدان ملاتونین توانسته بود تاثیرات مثبتی در کیفیت اسپرم پس از ذوب بگذارد (۱۱و۱۰و۴و۳). ال-کارنیتین یک آمینواسید ضروری و طبیعی است که در بدن از لیزین و متیونین ساخته می‌شود. ال-کارنیتین ورود اسیدهای چرب زنجیره بلند را به داخل میتوکندری تسهیل کرده و افزایش می‌دهد (۱۲). علاوه بر این فعالیت آنتی اکسیدانی آن نیز گزارش شده است (۱۳). همچنین در مطالعه Ghorbani و همکاران و Chavoshi Nezhad و همکاران بر روی اسپرم انسانی ال-کارنیتین توانسته بود تاثیرات مثبتی بر کیفیت اسپرم پس از ذوب بگذارد (۱۴و۱۳). با وجود بررسی این آنتی اکسیدان‌ها به تنهایی، اما تاکنون اثر ترکیبی آنتی اکسیدان‌های ملاتونین و ال-کارنیتین ارزیابی نشده است. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر ترکیبی این دو آنتی اکسیدان بر پارامترهای اسپرم پس از ذوب می‌باشد.

## مواد و روش ها

این مطالعه مداخله‌ای پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد IR.QUMS.REC.1400.322، بر روی ۴۰ نفر از افراد ۴۰-۲۰ ساله داوطلب مراجعه کننده به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی خصوصی در شهر قزوین انجام شد. به افراد، چک لیست جهت تکمیل اطلاعات شامل سابقه کشیدن سیگار، اعتیاد به مواد مخدر، مصرف الکل و دارو، نداشتن سابقه جراحی‌هایی مانند واریکوسل، بیماری‌هایی مانند دیابت و الیگو اسپرمی داده شد. افرادی که سابقه یکی از موارد بالا را نداشتند، وارد مطالعه شدند و همچنین توصیه شد از مقاربت به مدت ۵-۳ شبانه روز جلوگیری شود. پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه، نمونه‌ها در ظروف پلاستیکی درپوش دار جمع آوری شد و به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در دستگاه انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ $CO_2$ انکوبه شده و از حالت ژل به مایع تبدیل شد و به آزمایشگاه جنین شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انتقال داده شد.

در مرحله انجماد هر نمونه به میزان لازم در لوله فالکون ریخته شد و در زیر هود در شرایط استریل محیط واشینگ (origio) و آلبومین ۲۰٪ به صورت ۱۰ به ۱ جهت رقیق شدن اسپرم به آن اضافه شد و لوله در دستگاه سانترفیوز با دور ۲۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. بعد از عمل سانتریفیوژ اسپرم‌ها به صورت پلیت در ته لوله رسوب کردند که لایه رسوب شده حاوی اسپرم‌های سالم است که در این مرحله مقداری از مایع رویی لوله دور ریخته شد و باقیمانده مایع داخل لوله همراه با پلیت رسوب شده دوباره با تکان دادن لوله مخلوط شدند و مجدداً عمل شستشو انجام شد و در نهایت این سوسپانسیون به دست آمده در زیر هود به چهار گروه تقسیم و به کرایوتیوپ منتقل شدند و محیط انجماد (origio) به صورت قطره‌ای و هر ۳۰ ثانیه یک قطره به آن‌ها اضافه شد. این چهار گروه شامل گروه کنترل (C) (فاقد آنتی اکسیدان و فقط دارای محیط انجماد)، گروه ملاتونین (M) (دارای محیط انجماد و ۰/۰۱ میلی‌مول یا ۱۰ میکرومول ملاتونین (۴))، گروه ال-کارنیتین (L) (دارای محیط انجماد و ۱۰۰ میکرومول ال-کارنیتین (۱۴)) و گروه ترکیبی (ML) (دارای محیط انجماد و هر دو آنتی اکسیدان با دوزهای قبلی) بودند. آنتی اکسیدان‌ها از شرکت بهنوژن تهیه گردیدند. آنتی اکسیدان‌ها در اتانول ۹۶٪ حل شدند. سپس کرایوتیوپ‌ها به مدت ۳ دقیقه در محیط آزمایشگاه تکان داده شدند و به مدت ۳ دقیقه در درجه حرارت ۵- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند سپس به مدت ۱ دقیقه با فورسپس از قبل



[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]

سرد شده القاء شد و مجدداً مخلوط به مدت ۷ دقیقه در درجه حرارت ۵- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و کرایوویال حاوی مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در بخار ازت قرار گرفت و در نهایت کرایوویال همراه با کرایوکن در تانک نیتروژن غوطه‌ور شد.

بعد از دو هفته کرایوتیوپ‌ها از تانک نیتروژن خارج گردیدند و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سپس ۵ دقیقه در ظرف آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و نمونه‌ها ذوب گردیدند. مجدداً نمونه‌ها با محیط شستشوی اسپرم واشینگ شدند و در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند، مایع روی پلیت تشکیل شده از اسپرم‌های سالم دور ریخته شد و مجدداً عمل شستشوی اسپرم و سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه مطابق پروتکل بالا انجام گردید و در نهایت اسپرم‌های ته نشین شده در کف لوله فالکون آماده آنالیز، از نظر حرکت، زنده مانی، شکل، میزان لیپید پراکسیداسیون و محصول نهایی آن مالون دی آلدئید و قطعه قطعه شدن DNA مورد بررسی قرار گرفت.

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

ارزیابی بقا با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین (هانکوک مدل سیتولوژی و هیستولوژی) مورد بررسی قرار گرفت. ۲۵ میکرولیتر از ائوزین Y ۱٪ با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ذوب شده مخلوط گردید و پس از۳۰ ثانیه، ۲۵ میکرولیتر از نگروزین ۱۰٪ به این مخلوط اضافه شد و پس از ۳۰ ثانیه از این مخلوط به دست آمده ۴ اسمیر بر روی لام‌های علامت گذاری شده تهیه گردید. پس از خشک شدن اسمیرها در دمای محیط تعداد ۲۰۰ اسپرم زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰x شمارش گردید.

مورفولوژی اسپرم با رنگ آمیزی هماتوکسیلین بررسی شد. بعد از تهیه اسمیر از نمونه و خشک شدن آن، با اتانول شستشو داده شد. پس از خشک شدن با هماتوکسیلین رنگ آمیزی شد و زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی x ۱۰۰ اسپرم شمارش گردید.

ارزیابی لیپید پراکسیداسیون (MDA) با استفاده از واکنش اسپرم با TBA (Thyobarbituric Acid) مورد ارزیابی قرار گرفت. یک میلی لیتر از نمونه به ترتیب با یک میلی لیتر BHT (Butylated Hydroxyltoulene)، یک میلی لیتر EDTA (Ethylenediamintetraacetic Acid) و دو میلی لیتر TCA (Trichloro acetic acid) مخلوط شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. یک میلی لیتر از مایع رویی در یک میکروتیوب با یک میلی لیتر TBA مخلوط شد. سپس در میکروتیوب‌ها بسته شده و بعد به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۵ درجه، به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگه داشته شدند. سپس یک میلی لیتر از نمونه حاصل، درون کوت (cuvett) ریخته شد. غلظت MDA موجود در نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد.

برای بررسی آسیب وارد شده به DNA از روش TUNNEL و کیت سلولی (Roche, Mannheim, Germany) استفاده شد که برای این کار ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه شسته شده با بافر PBS روی لام تمیز و عاری از چربی به صورت اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن با پارا فرمالدهید ۴٪ شستشو داده شد و به مدت ۴۵ دقیقه این ماده به صورت شناور بر روی اسپرم فیکس شده، قرار داده شد. پس از آن هر لام سه بار به فاصله هر پنج دقیقه با بافر PBS1X (Phosphate-Buffered Saline) شستشو داده شد. پس از گذشت یک ساعت روی لام‌ها سدیم سیترات ۰/۱٪ و تریتون X100 ریخته شد. سپس مجدداً هر لام سه بار به فاصله هر پنج دقیقه با بافر PBS1X شستشو داده شد و خشک گردید. آنزیم حاوی دئوکسی نوکلئوتید به نسبت ۱ به ۱۰ به محیط بافر در داخل یک میکروتیوپ اضافه شد. سپس این مخلوط آنزیم و بافر بر روی هر لام در محیط تاریک ریخته شد و به مدت نیم ساعت در انکوباتور گذاشته شد. پس از آن هر لام به فاصله هر پنج دقیقه با بافر PBS1X شستشو داده شد و زیر میکروسکوپ فلوئورسنت شمارش گردید. اسپرم‌هایی که از سر آن‌ها نور سبز رنگ ساطع می‌شد به عنوان اسپرم‌های دارای شکست DNA در نظر گرفته شد (۱۵). برای بررسی آسیب وارد شده به DNA از روش TUNNEL و کیت سلولی (Roche, Mannheim, Germany) استفاده شد. آنزیم به محیط بافر به نسبت ۱ به ۱۰ به داخل یک میکروتیوپ اضافه گردید. سپس این مخلوط بر روی هر لام در محیط تاریک ریخته شد و ۳۰ دقیقه در انکوباتور گذاشته شد. پس از آن هر لام هر پنج دقیقه با بافر PBS1X شستشو داده شد و زیر میکروسکوپ فلوئورسنت شمارش شد. آنالیز آماری نتایج به با روش ANOVA در نرم‌افزار SPSS و تست تعقیبی Tukey HSD انجام شد و $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]

## یافته ها

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که افزودن ملاتونین و ال-کارنتین به ترتیب با دوزهای میلی مولار و میکرومولار به محیط انجماد چه به صورت منفرد و چه به صورت ترکیبی به میزان چشمگیری ($p<۰/۰۵$) تحرک کل و زنده مانی را نسبت به گروه کنترل افزایش داد و همچنین باعث کاهش شکستگی DNA و MDA حاصل از لیپید پراکسیداسیون غشاء اسپرم شد (جدول ۱). نتایج نشان داد که افزایش تحرک اسپرم در گروه‌های M، L و ML افزایش چشمگیری نسبت به گروه C داشته‌اند ($p<۰/۰۵$). همچنین در مقایسه دو به دو گروه‌ها تغییرات معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). اما در مقایسه بین دو گروه M و ML تغییرات معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۱).

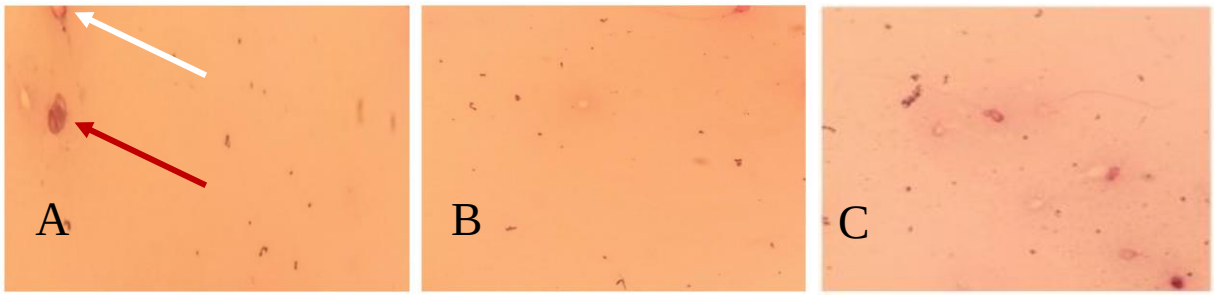
**جدول ۱. مقایسه میزان تحرک، بقا، مورفولوژی، لیپید پراکسیداسیون و شکست DNA اسپرم در گروه کنترل و گروه‌های دریافت کننده آنتی اکسیدان**

| گروه‌ها | تحرک Mean±SD | بقا Mean±SD | مورفولوژی Mean±SD | لیپید پراکسیداسیون (MDA) Mean±SD | شکست DNA Mean±SD |
|---|---|---|---|---|---|
| کنترل (D) | ۱۵/۷۰±۲/۳۵۵۵$^{a}$ | ۲۰/۲۷۵۰±۲/۶۹۸۴$^{a}$ | ۷/۱۵۱۲±۰/۰۲۹۷$^{a}$ | ۹/۶۲۵۸±۰/۰۲۸۷$^{a}$ | ۳۱±۲/۴۹۱۰$^{a}$ |
| ملاتونین (A) | ۲۳/۹۰±۲/۴۸۸۹$^{b}$ | ۲۵±۲/۴۳۹۰$^{b}$ | ۷/۱۵۵۳±۰/۰۲۳۳$^{a}$ | ۷/۸۳۷۰±۰/۰۲۲۶$^{b}$ | ۲۶/۶۲۵۰±۲/۴۹۸۰$^{b}$ |
| ال-کارنیتین (B) | ۲۰/۸۲۵۰±۲/۹۶۸۹$^{c}$ | ۲۲/۶۲۵۰±۲/۸۷۹۵$^{c}$ | ۷/۱۵۲۵±۰/۰۳۱۸$^{a}$ | ۸/۱۰۷۳±۰/۰۲۳۶$^{c}$ | ۲۸/۶۰±۲/۲۷۳۵$^{c}$ |
| ملاتونین-ال-کارنیتین (AB) | ۲۴/۵۰±۲/۴۹۱۰$^{b}$ | ۲۶/۴۲۵±۲/۳۴۱۲$^{b}$ | ۷/۱۵۷۵±۰/۰۲۶۴$^{a}$ | ۶/۴۶۴۷±۰/۰۲۷۹$^{d}$ | ۲۲/۱۰±۲/۱۶۹۷$^{d}$ |

**تفاوت حروف در یک ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگر می‌باشد.**

نتایج بقای اسپرم نشان داد که بقا در گروه‌های M، L و ML نسبت به گروه C افزایش چشمگیری داشته است ($p<۰/۰۵$). همچنین در مقایسه دو به دو گروه‌ها نیز تغییرات معنی‌داری وجود داشت. اگرچه در مقایسه بین گروه M و ML تغییرات معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱، جدول ۱). نتایج بررسی مورفولوژی اسپرم نشان داد در گروه‌های M، L، ML تفاوت معنی‌داری در افزایش کیفیت پارامترهای مورفولوژی در مقایسه با گروه C دیده شد. این در حالی بود که بین گروه‌های درمان شده تغییرات معنی‌داری دیده نشد (شکل ۲، جدول ۱).

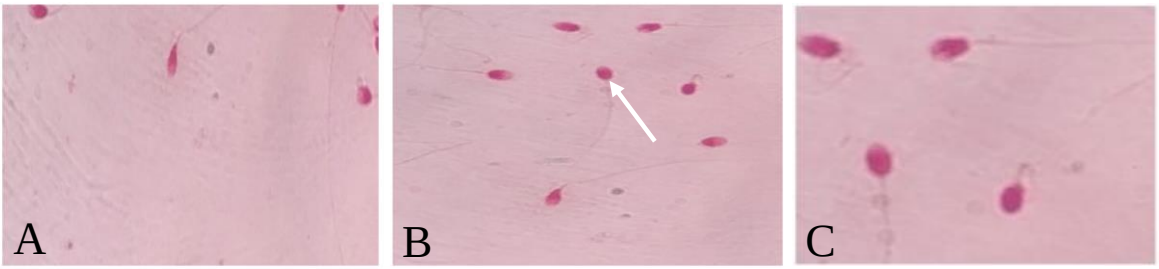
نتایج بررسی میزان MDA حاصل از لیپید پراکسیداسیون غشای اسپرم نشان داد تولید MDA اختلاف معنی‌داری بین همه گروه‌ها با گروه C داشته است ($p<۰/۰۵$). همچنین بیشترین کاهش را در تولید MDA به ترتیب در گروه‌های ML، M و در نهایت در گروه L وجود داشت (جدول ۱). نتایج مربوط به میزان شکست DNA نشان داد که میزان شکست DNA در گروه‌های M، L و ML در مقایسه با گروه C و همچنین مقایسه دو به دو گروه‌های درمان شده کاهش معنی‌داری داشته است ($p<۰/۰۵$) (شکل ۳، جدول ۱).




**شکل ۱. تصویر اسپرم پس از رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین**

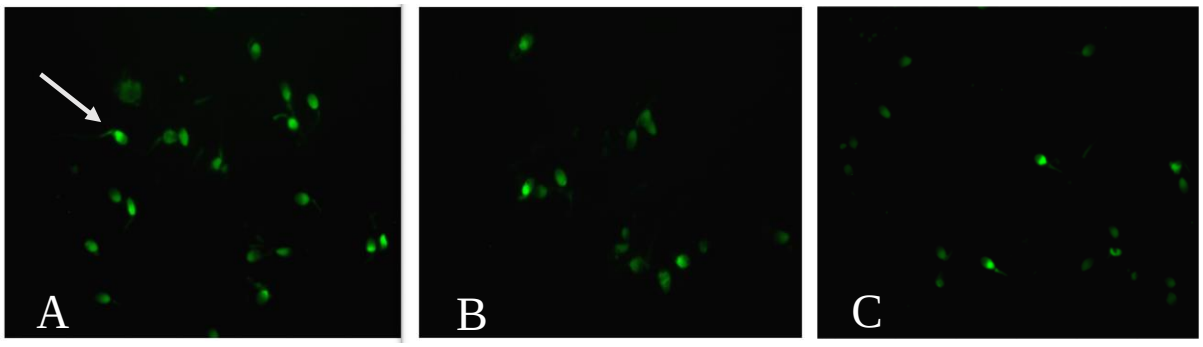
**فلش سفید: اسپرم‌های زنده با نمای سر سفید، فلش قرمز: اسپرم‌های مرده با نمای سر قرمز. A: گروه ملاتونین، B: گروه ال کارنیتین، C: گروه ترکیبی**

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]




**شکل ۲. تصویر اسپرم پس از رنگ آمیزی هماتوکسیلین**

**اسپرم دارای سر گرد غیر طبیعی در نظر گرفته شده است. A: گروه ملاتونین، B: گروه ال کارنیتین، C: گروه ترکیبی**




**شکل ۳. تصویر اسپرم پس از رنگ آمیزی با کیت تانل (فلش سفید نشان دهنده اسپرم با شکست DNA می‌باشد)**

**A: گروه ال کارنیتین، B: گروه ملاتونین، C: گروه ترکیبی**

## بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن ملاتونین و ال-کارنیتین به صورت منفرد و ترکیبی به محیط انجماد در مردان دارای اسپرم نرمال می‌تواند باعث بهبود تحرک کل اسپرم، افزایش زنده مانی و کاهش مرگ، کاهش میزان شکست DNA و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء همراه باشد که این اثرات می‌تواند به علت فعالیت آنتی اکسیدانی ملاتونین و ال-کارنیتین باشد. انجماد و ذوب اسپرم، آسیب مکانیکی، شوک سرد و قرار گرفتن در معرض اتمسفر اکسیژن، به نوبه خود حساسیت به پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش و سبب تولید ROS بیشتر می‌شود. اگر چه ROS برای عملکردهای مختلف فیزیولوژیک مهم است اما مقادیر بیش از حد آن به استرس اکسیداتیو کمک می‌کند. مکانیسم عمل ROS شامل پراکسیداسیون لیپیدی غشاء پلاسمایی اسپرم است که به دلیل وجود مقدار زیاد اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء خود، بسیار مستعد ابتلا به آسیب‌های اکسیداتیو است و این موضوع می‌تواند روی تحرک اسپرم، سیالیت غشا و توانایی لقاح آن اثر منفی گذارد. علاوه بر این ROS می‌تواند با کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌ها و تسریع و شتاب در مصرف ATP، به پروتئین‌های اکسونم اسپرم صدمه بزند و به این صورت در عملکرد میتوکندری و DNA اختلال ایجاد کند.

طبق نتایج به دست آمده از این مطالعه افزودن این آنتی اکسیدان‌ها به محیط انجماد تاثیری روی مورفولوژی اسپرم نخواهد داشت و همچنین ملاتونین تا حدودی اثر آنتی اکسیدانی بهتری نسبت به ال-کارنیتین دارد. بنابراین استفاده از ترکیب این دو آنتی اکسیدان ممکن است بتواند تا حدودی اثرات مخرب فرآیند انجماد و ذوب را کاهش داده و به بهبود عملکرد اسپرم کمک کند. ملاتونین با داشتن توانایی ضد التهابی، ضد آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده) (Anti apoptosis: programed death cell)، ضد سرطانی و همچنین حذف و خنثی سازی رادیکال‌های آزاد همچون آنیون‌های هیدروکسیل، پراکسیل و پراکسی نیترات مورد توجه قرار گرفته است. ملاتونین می‌تواند خود به طور غیر مستقیم اثرات تحریکی بر چندین آنزیم آنتی اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، ردوکتاز، کاتالاز و سوپراکسیداز دیسموتاز داشته باشد. مطالعه Chavoshi Nezhad و همکارانش و بر روی اسپرم انسانی ال-کارنیتین توانسته بود بقا و تحرک اسپرم را بهبود ببخشد که با مطالعه ما همسو می‌باشد (۱۴). غلظت یکسان در این مطالعه با مطالعه ما سبب نتایج یکسان شده است، اما نتایج برخی از مطالعات گذشته با نتایج ما مغایرت دارد. در مطالعه Alcay و همکارانش بر روی اسپرم زنبور عسل، میزان آسیب DNA در همه گروه‌ها

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]

تفاوت قابل توجهی نداشت که یکسان نبودن غلظت در این مطالعه در مقایسه با مطالعه ما سبب نتایج ناهمسو شده است (۱۶). همچنین در مطالعه دیگری که توسط ChaithraShree و همکارانش بر روی اسپرم گاو انجام شده بود افزودن ملاتونین به محیط انجماد توانسته بود تحرک اسپرم را بهبود ببخشد و یکپارچگی غشاء پلاسمایی و آکروزومی را در غلظت ۰/۱ میلی‌مول حفظ کند که نزدیک بودن غلظت در این مطالعه با مطالعه ما سبب نتایج یکسان شده است (۱۷). در مطالعه Karimfar و همکاران میزان پارامترهای اسپرم به میزان قابل توجهی تغییر کرده است که با مطالعه ما همسو بوده است. یکی از دلایل همسو بودن با مطالعه ما این است که غلظت آن ها در این مطالعه با غلظت ما یکسان بوده است (۴). همچنین در این مطالعه ال-کارنیتین توانست پارامترهای اسپرم را به جز مورفولوژی پس از ذوب به میزان قابل توجهی بهبود ببخشد. در مطالعاتی که در گذشته انجام شده مانند نتیجه مطالعه حاضر و مشابه داده‌های مطالعه Inyawilert و همکاران که اسپرم بوفالو را منجمد کرده و پس از ۱ روز، ۷ روز، ۱۵ روز و ۳۰ روز نمونه‌ها را ذوب کرده بودند، نشان داده شد که در گروهای تیمار با ملاتونین با ۴ غلظت مختلف تاثیرات مثبتی بر روی تحرک اسپرم در مقایسه با کنترل داشته است (۱۸).

همچنین در مطالعه Karimfar و همکارانش، ملاتونین بر روی اسپرم انسانی تاثیر آنتی اکسیدانی موثری در کاهش میزان MDA داشته است و میزان MDA در گروه‌های تیمار با ملاتونین وابسته به غلظت بوده که در غلظت مورد نظر در مطالعه ما به طور معنی‌داری کاهش یافته است که یکسان بودن غلظت در این مطالعه با مطالعه ما سبب نتایج یکسان شده است (۴). حال آن که در بعضی مطالعات ملاتونین به عنوام مکمل در محیط انجماد نتواسته است تاثیر چشمگیری در میزان پارامترهای اسپرم پس از ذوب بذارد. در مطالعه Chen و همکارانش که بر روی اسپرم موش انجام شد نمونه‌ها به گروه‌های تازه، کنترل، ملاتونین حاوی۰/۱۲ و ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تقسیم شدند. نتایج مطالعات نشان داد که افزودن ملاتونین نتواسته است تاثیر چشمگیری در میزان بقا پس از ذوب بگذارد که دور بودن غلظت در این مطالعه با مطالعه ما سبب نتایج غیر یکسان شده است (۱۹). مطالعه دیگری که بر روی تاثیر ملاتونین بر روی اسپرم بز منجمد و ذوب شده انجام شده بود نمونه‌ها به چند گروه کنترل، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌مول تقسیم شده بودند. طبق نتایج به دست آمده از مطالعه، ملاتونین نتوانسته بود تاثیر مثبتی بر روی سمن (semen) بگذارد حتی در برخی موارد (۴ میلی‌مول) می‌تواند برای سمن (semen) مضر باشد که دور بودن غلظت در این مطالعه از مطالعه ما سبب نتایج غیر یکسان شده است (۲۰). مصرف خوراکی ال-کارنیتین توانسته است کیفیت اسپرم را در افراد آستنوزواسپرمی ایدیوپاتیک (دلایل ناشناخته) بهبود ببخشد (۲۱). محققان دریافته‌اند که ال-کارنیتین نقش درمانی در بیماران آزواسپرمی دارد زیرا می‌تواند تعداد اسپرم را هم در این بیماران و هم در بیمارانی که بلوغ غیر طبیعی اسپرم را نشان می‌دهند، افزایش دهد (۲۲). تاثیر ال-کارنیتین بر بهبود تحرک اسپرم انسانی در افراد اولیگوزواسپرمی، آستنوزواسپرمی و تراتوزواسپرمی هم در انسان و هم در موش گزارش شده است. محققین نشان داده‌اند که مصرف ال-کارنیتین در موش‌های بالغ الیگواسپرمی تاثیرات توکسیک بوسولفان را کاهش می‌دهد و انرژی سلول را حفظ می‌کند (۲۴و۲۳و۱۶).

در مطالعه ما ال-کارنیتین تاثیر مثبتی بر روی تحرک، بقا، کاهش میزان MDA و کاهش شکست DNA داشت که در بسیاری از مطالعات نقش آنتی اکسیدانی آن ثابت شده است. حال آن که در بعضی از مطالعاتی که در گذشته انجام شده است نتایج به دست آمده با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارد. در مطالعه Alcay و همکارانش که بر روی اسپرم زنبور عسل انجام دادند میزان آسیب DNA در همه گروه‌ها پس از ذوب تفاوت معنی‌داری نداشت که دور بودن غلظت در این مطالعه با مطالعه ما سبب نتایج غیر یکسان شده است (۱۶). نتیجه به دست آمده در این مطالعه نشان داد که ترکیب این دو آنتی اکسیدان می‌تواند نقش موثرتری در بهبود اکثر پارامترهای اسپرم در مقایسه با استفاده منفرد آن‌ها داشته باشد.

در واقع آنتی اکسیدان‌های متعددی جهت درمان افراد نابارور و بهبود پارامترهای اسپرمی، سلامت DNA و قدرت باروری افراد استفاده شده است، تا بتوان از طریق کاهش سطح استرس اکسیداتیو به نتایج رضایت بخشی دست یافت (۲۶و۲۵). ولی نکته حائز اهمیت این است که نوع ناباروری، شدت ناباروری، نوع آنتی اکسیدان انتخابی، دوز مصرف آنتی اکسیدان و مدت مصرف آن خیلی مهم بوده و تفاوت نتایج مقالات، به این عوامل بستگی دارد. هنوز متاآنالیزی که مشخص کند که برای هر گروه افراد نابارور چه آنتی اکسیدانی مفید است، وجود ندارد ولی این نکته را باید مد نظر داشت که بهترین مدت زمان مصرف آنتی اکسیدان بین ۶-۳ ماه است. این امکان وجود دارد که مصرف بیش از حد آنتی اکسیدان‌ها منجر به اثرات مخرب بر روی سطح فیزیولوژیک ROSها شود و لذا اثرات معکوسی رخ دهد و فرآیندهای طبیعی از جمله ظرفیت یابی، واکنش آکروزومی که نیاز به ROS فیزیولوژیک دارند، به علت کاهش سطح ROS، نتوانند لقاح و باروری موفقی را کسب کنند (۲۷).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد اگر چه بدن جهت انجام واکنش‌های شیمیایی به اکسیژن نیاز دارد، ولی در برخی از شرایط مانند دستکاری اسپرم در فرآیند ذوب و انجماد، اکسیداسیون اکسیژن رخ داده و تولید بیش از حد ROSها منجر به آسیب ماکرومولکول‌های حیاتی از جمله پروتئین، لیپید، کربوهیدرات‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. این آسیب‌ها در اسپرم می‌تواند علاوه بر آسیب DNA سبب اکسید شدن اسیدهای چرب غیر اشباع غشاء و آسیب غشاء گردد که خود، اتصال اسپرم با تخمک و تمامی فرآیندهای بعدی مرتبط با لقاح را تحت تأثیر قرار می‌دهد و علاوه بر این می‌تواند کاهش حیات و تحرک اسپرم را به همراه داشته باشد و نهایتاً منجر به کاهش باروری طبیعی شود. شناخت مسیرهای سلولی و مولکولی این فرآیندها منجر به استفاده از راهکارهای درمانی از جمله

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها (ملاتونین و ال- کارنیتین) جهت به حداقل رساندن میزان آسیب‌های وارد به اسپرم در طی پروسه انجماد و ذوب می‌شود که تا حدی می‌تواند از اثرات مضر این فرآیند جلوگیری کند.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی قزوین به جهت حمایت از تحقیق (شماره گرنت: ۴۰۰۰۰۰۳۵۲)، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی به خاطر فراهم آوردن امکانات مورد نیاز جهت انجام این مطالعه و همچنین از آقای دکتر سید امیر فرزام که در خصوص استفاده از نمونه‌های آزمایشگاه مساعدت لازم را مبذول داشتند، قدردانی می‌گردد.

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]

## References

1.Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. Cent European J Urol. 2013;66(1):60-7.

2.Sharma Y, Sharma M. Sperm cryopreservation: principles and biology. J Infertil Reprod Biol. 2020;8(3):43-8.

3.Najafi A, Adutwum E, Yari A, Salehi E, Mikaeili S, Dashtestani F, et al. Melatonin affects membrane integrity, intracellular reactive oxygen species, caspase3 activity and AKT phosphorylation in frozen thawed human sperm. Cell Tissue Res. 2018;372(1):149-59.

4.Karimfar MH, Niazvand F, Haghani K, Ghafourian S, Shirazi R, Bakhtiyari S. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. Int J Immunopathol Pharmacol. 2015;28(1):69-76.

5.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):1-15.

6.Chaudhary SC, Aeksiri N, Wanangkarn A, Liao YJ, Inyawilert W. Effects of melatonin on cryopreserved semen parameters and apoptosis of thai swamp buffalo bull (bubalus bubalis) in different thawing conditions. Adv Anim Vet Sci. 2021;9(2):238-45.

7.Mehdipour M, Daghigh Kia H, Najafi A, Mohammadi H, Álvarez-Rodriguez M. Effect of crocin and naringenin supplementation in cryopreservation medium on post-thaw rooster sperm quality and expression of apoptosis associated genes. PLoS One. 2020;15(10):e0241105.

8.Pévet P. Melatonin. Dialogues Clin Neurosci. 2002;4(1):57-72.

9.Divar MR, Azari M, Mogheiseh A, Ghahramani S. Supplementation of melatonin to cooling and freezing extenders improves canine spermatozoa quality measures. BMC Vet Res. 2022;18(1):86.

10.Pariz JR, Ranéa C, Monteiro RAC, 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;2019:6472945.

11.Deng SL, Sun TC, Yu K, Wang ZP, Zhang BL, Zhang Y, et al. Melatonin reduces oxidative damage and upregulates heat shock protein 90 expression in cryopreserved human semen. Free Radic Biol Med. 2017;113:347-54.

12.Wafa WM, El-Nagar HA, Hussein YS, Saeed AM. Effect of different antioxidant sources added to buffalo semen extender during cryopreservation on freezability and fertility of buffalo spermatozoa. J Anim Health Prod. 2021;9(3):222-8.

13.Ghorbani F, Nasiri Z, Koohestanidehaghi Y, Lorian K. The antioxidant roles of L-carnitine and N-acetyl cysteine against oxidative stress on human sperm functional parameters during vitrification. Clin Exp Reprod Med. 2021;48(4):316-21.

14.Chavoshi Nezhad N, Vahabzadeh Z, Allahveisie A, Rahmani K, Raoofi A, Rezaie MJ, et al. The Effect of L-Carnitine and Coenzyme Q10 on the Sperm Motility, DNA Fragmentation, Chromatin Structure and Oxygen Free Radicals During, before and after Freezing in Oligospermia Men. Urol J. 2021;18(3):330-6.

15.Hassani Bafrani H, Saeedi Sadr A, Izadpanah F. Haddad Kashani H. The magnetic cell separation method reveals protective effect of melatonin on human spermatozoa from peroxide-induced apoptosis. Middle East Fertil Soc J. 2023;28:9.

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]

16.Alcay S, Cakmak S, Cakmak I, Aktar A, Yilmaz M, Ustuner B, et al. L-carnitine supplemented extenders improve post-thawing quality of honey bee drone (Apis mellifera) spermatozoa. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2021;27(4):489-93.

17.ChaithraShree AR, Ingole SD, Dighe VD, Nagvekar AS, Bharucha SV, Dagli NR, et al. Effect of melatonin on bovine sperm characteristics and ultrastructure changes following cryopreservation. Vet Med Sci. 2020;6(2):177-86.

18.Inyawilert W, Rungruangsak J, Liao YJ, Tang PC, Paungsukpaibool V. Melatonin supplementation improved cryopreserved Thai swamp buffalo semen. Reprod Domest Anim. 2021;56(1):83-8.

19.Chen XJ, Zhang Y, Jia GX, Meng QG, Bunch TD, Liu GS, et al. Effect of melatonin supplementation on cryopreserved sperm quality in mouse. Cryo Letters. 2016;37(2):115-22.

20.Mehaisen GMK, Partyka A, Ligocka Z, Niżański W. Cryoprotective effect of melatonin supplementation on post-thawed rooster sperm quality. Anim Reprod Sci. 2020;212:106238.

21.Manee-In S, Parmornsupornvichit S, Kraiprayoon S, Tharasanit T, Chanapiwat P, Kaeoket K. L-carnitine Supplemented Extender Improves Cryopreserved-thawed Cat Epididymal Sperm Motility. Asian-Australas J Anim Sci. 2014;27(6):791-6.

22.Vardiyan R, Ezati D, Anvari M, Ghasemi N, Talebi A. Effect of L-carnitine on the expression of the apoptotic genes Bcl-2 and Bax. Clin Exp Reprod Med. 2020;47(3):155-60.

23.Manee-In S, Parmornsupornvichit S, Kraiprayoon S, Tharasanit T, Chanapiwat P, Kaeoket K. L-carnitine Supplemented Extender Improves Cryopreserved-thawed Cat Epididymal Sperm Motility. Asian-Australas J Anim Sci. 2014;27(6):791-6.

24.Kowalczyk A. The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. Reprod Sci. 2022;29(5):1387-94.

25.Arbabian M, Amirzadegan M, Tavalaee M, Nasr-Esfahani MH. Oxidative Stress and Its Effects on Male Infertility: A Review Study. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2018;17(3):253-74. [In Persian]

26.Azadi L, Abbasi H, Deemeh MR, Tavalaee M, Arbabian M, Pilevarian AA, et al. Zaditen (Ketotifen), as mast cell blocker, improves sperm quality, chromatin integrity and pregnancy rate after varicocelectomy. Int J Androl. 2011;34(5 Pt 1):446-52.

27.Barekat F, Tavalaee M, Deemeh MR, Bahreinian M, Azadi L, Abbasi H, et al. A Preliminary Study: N-acetyl-L-cysteine Improves Semen Quality following Varicocelectomy. Int J Fertil Steril. 2016;10(1):120-6.

[ DOI: 10.22088/jbums.26.1.19 ]