Increasing viability, numbers, and motility of sperm in men with normal spermatogenesis exposed to saffron extract after freezing- thawing process

Y. Khazaei[1], S. Moghbelinejad[2]

[1] Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[2] Department of Biochemistry and Genetic, School of Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran

Corresponding Address: Sahar Moghbelinejad, Department of Biochemistry and Genetic, School of Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran
Tel: +98-28-3336001, Email: smoghbelinejad@qums.ac.ir
Received: 25 May 2016; Accepted: 24 Jan 2017

✵Abstract

Background: Sperm freezing method is used frequently in assisted reproductive techniques, on the other hand in different studies negative effect of freezing have been shown on different sperm parameters.

Objective: The aim of this study was to determine the effect of saffron extract as an antioxidant, on the different sperm parameters in men with normal spermatogenesis after freezing-thawing process.

Methods: In this case-control study, collecting of samples was done in 2015 year from the Infertility Treatment Center, ACECR Branch of Qazvin, Qazvin, Iran. These men had normal spermatogenesis and their spouse had infertility problem. Semen samples was divided in two groups, control without saffron extract, and case with 50 mg/ml saffron extract. Then, samples freezed with snap freezing method. After two weeks, they were thawed and different sperm parameters were assessed. Data were analyzed by two-tail T test.

Findings: Our results showed, mean percent of viability (72±0.99), motility (87±0.43), and the number of sperm cells (62.5±3.8) in treaded group was elevated significantly ($P<0.01$) compared to the control group (46.6±1.1), (62.3±0.33), and (45±4.3) respectively. However, about the morphology we don't observed significant difference ($P>0.05$).

Conclusion: Our results showed that possibly antioxidant agents of saffron extract could scavenge free radicals and thus, optimize different sperm parameters (viability, motility, and number) after freezing and thawing.

Keywords: Saffron extract, Freezing, Thawing, Sperm parameters

Citation: Khazaei Y, Moghbelinejad S. Increasing viability, numbers, and motility of sperm in men with normal spermatogenesis exposed to saffron extract after freezing-thawing process. J Qazvin Univ Med Sci. 2017; 21 (1): 12-20.

افزایش میزان حیات، تعداد و تحرک اسپرم مردان با اسپرماتوژنزیس طبیعی تحت تأثیر عصاره زعفران پس از پدیده انجماد- ذوب

یوسف خزایی[۱]، دکتر سحر مقبلی‌نژاد[۲]

[۱] کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
[۲] گروه بیوشیمی- ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی- ژنتیک، تلفن ۳۳۳۳۶۰۰۱- ۰۲۸
تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۵

✱چکیده

زمینه: امروزه در استفاده از روش‌های کمک باروری شاهد به کار بردن روش انجماد اسپرم بـه میـزان زیـادی هسـتیم. از طرفـی در مطالعـه‌هـای مختلف، تأثیر منفی انجماد بر شاخص‌های مختلف اسپرم نشان داده شده است.

هدف: مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر زعفران به عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان بر شاخص‌های مختلف اسپرم مردان با اسپرماتوژنزیس طبیعی پس از پدیده انجماد- ذوب انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۱۳۹۴ بر روی ۴۲ نمونه مایع سمن از مردان که جهت اقدامات تشخیصی و درمانی بـه مرکـز ناباروری جهاد دانشگاهی قزوین مراجعه کرده بودند، انجام شد. این افراد دارای اسپرماتوژنزیس نرمال بودند و مشکل ناباروری مربـوط بـه همسـران این افراد بود. نمونه‌های مایع سمن هر نفر به ۲ گروه شاهد (بدون عصاره زعفران) و مورد (با عصاره زعفران با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) تقسیم و سپس با روش انجماد سریع منجمد شدند. اثر عصاره زعفران پس از گذشت دو هفته از انجماد و ذوب نمودن نمونه‌ها، بر روی شاخص‌های مختلف اسپرم بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تی تست زوجی تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که میانگین درصد زنده ماندن (۷۲±۰/۹۹)، تحرک (۸۷±۰/۴۵) و تعـداد اسـپرم‌هـا (۶۲/۵±۳/۸) در نمونـه‌هـای دارای زعفران نسبت به نمونه‌های شاهد به‌ترتیب ۴۶/۶±۱/۱، ۶۲/۳±۰/۳۳ و ۴۵±۴/۳ افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۱)، امـا میـانگین درصـد شـکل طبیعی، علی‌رغم بهبود شاخص مورد نظر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: یافته‌های مطالعه ما نشان داد که احتمالاً مواد آنتی‌اکسیدان موجود در عصاره زعفران می‌تواند رادیکال‌های آزاد ایجاد شده را حذف و بدین ترتیب در بهبود برخی شاخص‌های اسپرم (میزان زنده ماندن، تعداد و حرکت) که طی پدیده انجماد و ذوب دچار تغییر شده‌اند مؤثر واقع شود.

کلیدواژه‌ها: عصاره زعفران، انجماد، ذوب، شاخص‌های اسپرم

✱مقدمه:

ناباروری در ۱۵ تا ۲۰ درصد زوج‌هایی که قصد بچه‌دار شدن دارند، مشاهده می‌گردد.[۱] ۵۰ درصد موارد نابـاروری مربوط به ناباروری مردان می‌باشد. اسپرماتوژنزیس ناقص بیش‌ترین موردی است که در نابـاروری مـردان مشـاهده شده و گفته می‌شـود ۱۵ تـا ۳۰ درصـد نابـاروری مـردان مربوط به عوامل ژنتیکی مـی‌باشـد کـه شـامل ریزحـذف بـازوی بلنـد کرومـوزوم Y، ناهنجاری‌هـای کروموزومـی و جهش‌های تک ژنـی اسـت.[۲] یکـی از مـوارد مهـم در نابـاروری مـردان اسـپرماتوژنزیس نـاقص اسـت کـه بـه صورت‌های مختلف در بررسی سـمن ایـن افـراد خـود را نشان می‌دهد. این موارد شـامل آزوسـپرمی (عـدم وجـود اسپرم)، الیگواسـپرمی (تعـداد کـم اسـپرم)، استنواسـپرمی (کاهش حرکـت اسـپرم)، تراتواسـپرمی (شـکل نامناسـب اسپرم) می‌باشد.[۳-۵] امروزه برای درمان ناباروری بـه‌طـور وسیع از روش‌هـای کمـک بـاروری اسـتفاده مـی‌شـود و انجماد اسپرم انسان یکی از مواردی است که به‌خصـوص

در مورد افراد سرطانی قبل از انجام شیمی‌درمانی به‌منظور نگه‌داری اسپرم این افراد استفاده می‌گردد. در برخی از مراکز ناباروری بانک نگه‌داری اسپرم به‌منظور اهداء اسپرم به افرادی که مشکلات اسپرماتوژنزیس دارند وجود دارد. غشای اسپرم در بسیاری از عملکردهای آن مثل متابولیسم، تحرک، غلظت و واکنش‌های آکروزومی نقش دارد. از این‌رو انجماد منجر به آسیب‌هایی مانند تنش اکسیداتیو، تنش اسموتیک، تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی و تخریب عملکرد غشای پلاسمایی و تخریب اندامک‌های داخل سلولی می‌شود.[۶]

یکی از دلایل مهم تنش اکسیداتیو، حاصل عدم توازن میان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و دفاع آنتی‌اکسیدان بدن می‌باشد که در شرایط پاتولوژیک موجب ایجاد مرگ سلول‌های جنسی، اختلال در عملکرد سلول‌های سرتولی و لیدیگ و اختلال در اسپرماتوژنزیس می‌شود.[۸-۶] در مطالعه‌های صورت گرفته وجود سطوح بالایی از رادیکال آزاد در مایع سمن ۸۰ درصد از بیماران نابارور گزارش شده است.[۹] رادیکال‌های آزاد اکسیژن عوامل اکسیدکننده بسیار فعالی هستندکه آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیلاز، مهم‌ترین آن‌ها در زیست‌شناسی تولید مثل به‌حساب می‌آیند.[۱۰و۱۱] از بین سلول‌های تولیدکننده رادیکال آزاد اکسیژن لکوسیت‌های مایع سمن واسپرم غیرطبیعی منابع اصلی در انزال انسان هستند.[۱۲] عوامل محافظتی در برابر رادیکال آزاد، مانند آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند معرف‌های درمانی مفیدی برای ناباروری مردان باشند.[۱۳]

مکانیسم‌های متفاوتی برای مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکال آزاد اکسیژن وجود دارد که یکی از آن‌ها سیستم آنتی‌اکسیدان است. آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان پاکسازی‌کننده رادیکال‌های آزاد، اسپرم را در برابر گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند.[۱۴] رنگ‌دانه‌های موجود در کلاله زعفران از گروه کاروتنوئیدهای دارای عامل کربوکسیل است. از میان گلیکوزیدهای کاروتنوئیدی محلول در آب، کروسین اهمیت بیش‌تری دارد.[۱۵] پیکروکروسینوس افرانال عامل طعم، عطر و خاصیت آنتی‌اکسیدانی زعفران است. عصاره زعفران، کروسینوس افرانال مانع عمل بی‌رنگ‌کنندگی رادیکال‌ها می‌شود و مقدار آن در عصاره الکلی زعفران نسبت به عصاره آبی آن بیش‌تر است.[۱۶] با توجه به این‌که در سطح بالینی انجماد اسپرم یکی از روش‌های دخیل در کمک باروری است، ولی از طرفی عاملی در ایجاد رادیکال آزاد و آسیب به اسپرم نیز می‌باشد. با توجه به این‌که نقش زعفران به‌عنوان یک ماده طبیعی و در دسترس آنتی‌اکسیدان به‌خوبی نشان داده شده است، هدف از انجام این مطالعه، تعیین نقش زعفران به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان بر شاخص‌های مختلف اسپرم افراد با اسپرم طبیعی پس از پدیده انجماد و ذوب می‌باشد.

❋مواد و روش‌ها:

مطالعه حاضر، مطالعه‌ای مورد- شاهدی است که در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کُد IR.QUMS.REC.1394.215 مورد تأیید قرار گرفت. جمعیت مورد مطالعه، ۴۲ نفر با شاخص‌های اسپرم نرمال که جهت اقدامات تشخیصی و درمانی به مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی قزوین در سال ۱۳۹۴ مراجعه کرده بودند. معیار ورود در این مطالعه، مردان مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری با اسپرماتوژنزیس نرمال که مشکل ناباروری مربوط به همسرانشان بود و معیار خروج از مطالعه، دوری از مقاربت به‌مدت ۳ تا ۷ شبانه‌روز، عدم سابقه مصرف سیگار، مواد مخدر، الکل، نداشتن پرتودرمانی، شیمی‌درمانی، مصرف آنتی‌بیوتیک و عکس‌برداری در یک ماه آخر بود. از این افراد نمونه مایع سمن گرفته شد. پس از تهیه نمونه به روش استمناء، نمونه در داخل ظرف پلاستیکی درپوش‌دار ریخته شده و داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا پس از ۳۰ تا ۴۰ دقیقه نمونه از حالت سل- ژل به مایع تبدیل شود. نمونه‌های مایع سمن هر نفر به ۲ گروه شاهد (بدون عصاره زعفران)

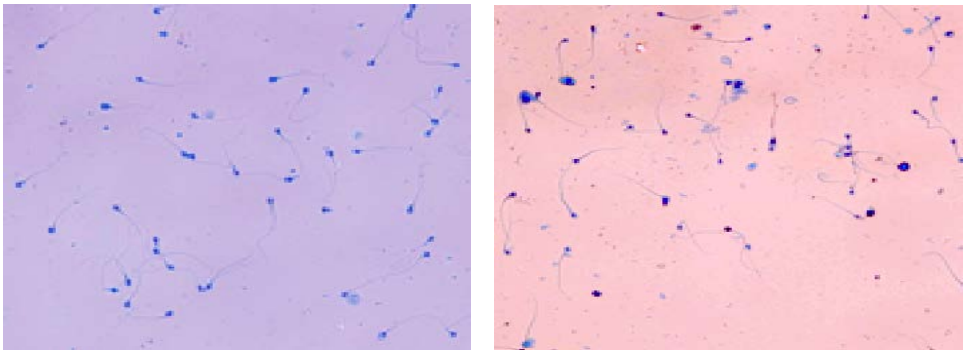
و مورد (با عصاره زعفران با غلظت۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) تقسیم شد. برای تهیه عصاره، ابتدا زعفران به‌صورت پودر تهیه و سپس به کمک حلال اتانول۱۰ گرم پودر در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول۸۰ درجه با روش ماسراسیون عصاره‌گیری شد.[۱۶] سپس نمونه‌ها در تانک نیتروژن با استفاده از روش انجماد سریع فریز شدند. بدین منظور نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۱ با محیط ضد یخ (Global,USA) مخلوط شده و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت یک ساعت دیگر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در نهایت به نیتروژن مایع انتقال داده شدند. دو هفته بعد نمونه‌ها از تانک نیتروژن خارج شده و برای ذوب شدن حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب ۳۷ درجه قرار داده شدند. پس از ذوب شدن محیط ضد انجمادی و دیگر قسمت‌های مایع سمن از اسپرم‌ها جدا شدند. پس از حذف مایع رویی به پلت (رسوب) باقی‌مانده ۲ میلی‌لیتر محیط Hams-F10 اضافه و آن را مخلوط کرده و جهت بررسی حرکت، شکل، غلظت و زنده ماندن بررسی شدند.

برای شمارش تعداد اسپرم‌ها از لام نئوبار استفاده گردید. در این لام دو قسمت برای شمارش وجود دارد و در هر قسمت یک مربع بزرگ ۳×۳ میلی‌متر روی لام حک شده است و این مربع بزرگ به ۹ مربع کوچک‌تر ۱×۱ میلی‌متر تقسیم شده است. لام نئوبار با لامل مخصوصی پوشانده شد که وقتی روی لام گذاشته می‌شود عمقی برابر ۰/۱ میلی‌متر ایجاد کند. مایع منی به نسبت ۱:۲رقیق و همه مربع‌ها (۱ تا ۹) در شمارش منظور گردید. در هنگام شمارش فقط اسپرم‌هایی شمارش شدند که دارای سر و دم بودند (اسپرم کامل). مرز هر کدام از مربع‌های ۹گانه دارای سه خط می‌باشد. در صورتی که سر اسپرم داخل مربع یا روی دو خط داخلی حاشیه آن باشد آن اسپرم در شمارش منظور شد، اما اگر سر اسپرم بیش‌تر روی دو خط خارجی بود در شمارش محسوب نگردید.[۱۷] جهت تعیین درصد اسپرم‌های متحرک، یک قطره کوچک از نمونه روی لام قرار گرفت و با بزرگ‌نمایی ۴۰ در زیر درجه‌های مختلف میکروسکوپ حرکت اسپرم‌ها براساس معیار WHO مورد بررسی قرار گرفت.[۱۸] براساس این معیار حرکت اسپرم‌ها به ۴ دسته تقسیم شد: A- حرکت سریع و جلورونده B- حرکت آرام و درجا C- بدون حرکت جلورونده D- بدون حرکت. به منظور بررسی تحرک اسپرم‌ها میانگین دو حرکت A+B مورد بررسی قرار گرفت.

به‌منظور بررسی شکل اسپرم از رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو استفاده گردید. در این رنگ‌آمیزی، سر در ناحیه آکروزوم به رنگ آبی روشن و ناحیه پشت آکروزوم به رنگ آبی تیره و قطعه گردن اسپرم ممکن است کمی قرمز و دم آن به رنگ آبی و بقایای سیتوپلاسمی اطراف گردن صورتی شد.[۱۸] سپس با استفاده از میکروسکوپ CX31 و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ حداقل۲۰۰ اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل شماره ۱).

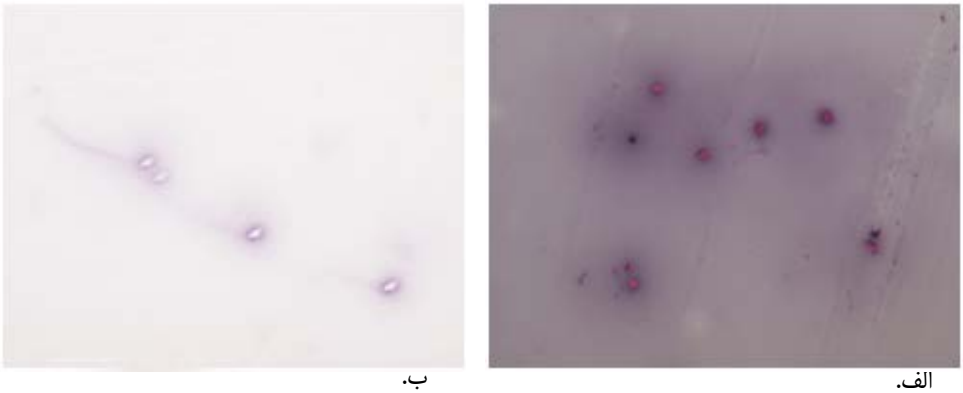
برای بررسی حیات و زنده بودن اسپرم از رنگ‌آمیزی ائوزین- نکروزین استفاده شد که در آن اساس بر میزان نفوذپذیری رنگ ائوزین- نکروزین به درون غشای سلولی که آسیب‌دیده است و عدم نفوذ رنگ به درون غشای سلولی سالم می‌باشد. اگر سر اسپرم به رنگ قرمز و یا صورتی تیره دربیاید، آن اسپرم مرده محسوب می‌شود و اگر سر آن صورتی روشن و یا سفید شود، زنده تلقی می‌گردد. اگر ناحیه گردن رنگ صورتی به خود بگیرد ولی باقی‌مانده سر رنگ نگیرد نشان‌دهنده مرگ سلولی نیست، سلول مذکور زنده است و این حالت نشان‌دهنده نشت غشا در قسمت گردن آن است.[۱۸] پس از رنگ‌آمیزی از هر نمونه، ۱۰۰ عدد اسپرم با استفاده از میکروسکوپ CX31 و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل شماره ۲).

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS۱۶ و آزمون آماری تی تست زوجی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



الف. ب.

شکل ۱- شکل اسپرم در نمونه‌های مایع سمن بدون زعفران (الف) و در مجاورت زعفران (ب) پس از دو هفته انجماد (رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو، بزرگ‌نمایی ۱۰۰)



الف. ب.

شکل ۲- مقایسه زنده‌ماندن اسپرم در نمونه‌های مایع سمن بدون زعفران (الف) و در معرض زعفران (ب) پس از دو هفته انجماد (رنگ‌آمیزی ائوزین- نکروزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰)

✵یافته‌ها:

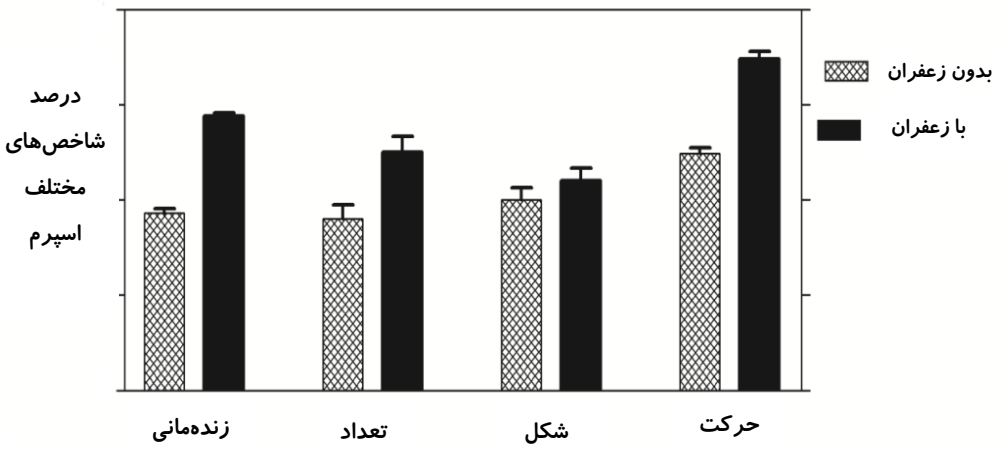
درصد زنده ماندن اسپرم‌ها در نمونه‌های دارای زعفران (۷۲±۰/۹۹) نسبت به نمونه‌های بدون زعفران (۴۶/۶±۱/۱) افزایش معنی‌داری را نشان داد که بیان‌گر اثر مثبت زعفران بر روی میزان زنده ماندن بیش‌تر اسپرم‌ها پس از پدیده انجماد می‌باشد (P<۰/۰۰۱). همچنین میانگین شمارش اسپرم‌ها در نمونه‌های دارای زعفران (۶۲/۵±۳/۸) نسبت به نمونه‌های بدون زعفران (۴۵±۴/۳) افزایش معنی‌داری نشان داد که بیان‌گر اثر مثبت زعفران بر روی تعداد اسپرم‌ها پس از پدیده ذوب و انجماد می‌باشد (P<۰/۰۰۱).

درحالی‌که درصد اسپرم‌ها با شکل طبیعی در نمونه‌های دارای زعفران (۵۵±۳/۱) نسبت به نمونه‌های بدون زعفران (۵۰/۱±۳/۴) با این‌که افزایش یافته بود ولی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵) که این نتیجه بیان‌گر عدم تأثیر زعفران بر روی این شاخص از اسپرم‌ها پس از پدیده ذوب و انجماد است. همچنین درصد حرکت اسپرم‌ها در نمونه‌های دارای زعفران (۸۷±۰/۴۵) نسبت به نمونه‌های شاهد (۶۲/۳±۰/۳۳) افزایش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱) که بیان‌گر تأثیر زعفران بر روی این شاخص از اسپرم‌ها پس از پدیده ذوب و انجماد است (جدول و نمودار شماره ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین شاخص‌های اسپرم در دو گروه مورد و شاهد (هر گروه ٤٢ نفر)

گروه / شاخص اسپرم	شاهد (بدون عصاره زعفران)	مورد (حاوی عصاره زعفران۵۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	سطح معنی‌داری
درصد زنده ماندن	۴۶/۶±۱/۱	۷۲±۰/۹۹	<۰/۰۱
میانگین تعداد (۱۰ً)	۴۵±۴/۳	۶۲/۵±۳/۸	<۰/۰۱
درصد شکل طبیعی	۵۰/۱±۳/۴	۵۵±۳/۱	>۰/۰۵
درصد تحرک (A+B)	۶۲/۳±۰/۳۳	۸۷±۰/۴۵	<۰/۰۱

نمودار ۱- مقایسه شاخص های مختلف اسپرم در نمونه‌های مایع سمن بدون زعفران (الف) و در معرض زعفران (ب) پس از دو هفته انجماد (رنگ‌آمیزی ائوزین- نکروزین، بزرگ‌نمایی ۱۰۰)



❋بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه اثر مثبت زعفران بر شاخص‌های مختلف اسپرم مانند درصد زنده‌مانی، غلظت و حرکت اسپرم‌ها پس از انجماد نشان داده شد. به‌طور کلی انجماد صرف‌نظر از این‌که از چه روشی استفاده کرده باشیم اثر منفی بر شاخص‌های مختلف اسپرم دارد.[۱۹و۲۰] در این زمینه ونگ در سال ۲۰۰۳ یکی از دلایل آسیب‌های سلولی در نتیجه انجماد را تخریب غشای میتوکندری عنوان کرد. با توجه به این‌که یکی از مسیرهای مرگ سلولی از طریق میتوکندری می‌باشد و سیتوکروم c در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد، تنش‌های اکسیداتیو حاصل از انجماد باعث تخریب غشای میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم c شده و در نهایت سلول را به سمت مرگ پیش می‌برد. در زمینه اثر انجماد بر کاهش حیات اسپرم‌ها این یک دلیل منطقی می‌تواند باشد.[۲۱] در مورد اثر مواد آنتی‌اکسیدان بر شاخص‌های مختلف اسپرم پس از پدیده انجماد و ذوب در سال ۲۰۱۴ رضائیان و همکاران نشان دادند که استفاده از دوز ۵ میکروگرم در لیتر سلنیوم اثر مطلوبی در تحرک، شکل و غلظت اسپرم (تعداد در میلی‌لیتر) پس از انجماد و ذوب داشت، مخصوصاً این تأثیر بر روی اسپرم‌های شسته شده بیش‌تر از نمونه‌های شسته نشده بود.[۲۲] در مورد اثر گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانی نیز در یک مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره انار بر شاخص‌های مختلف اسپرم مورد بررسی گرفت. نتایج این گروه نشان داد که این ماده آنتی‌اکسیدان بیش‌ترین تأثیر را بر روی میزان حرکت و حیات اسپرم دارد.[۲۳] در سال ۲۰۱۲ فلورین و همکاران نشان دادند که اضافه کردن مکمل ویتامین‌های E و C به محیط فریز باعث افزایش میزان تحرک اسپرم‌ها پس

از ذوب می‌شود. آن‌ها توجیه نمودند که ویتامین E باعث شکست پیوندهای کووالانتی شده و ویتامین C در مهار رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده نقش دارد.[۲۴]

در راستای مطالعه‌های قبلی، در این مطالعه نیز افزایش معنی‌داری در درصد زنده ماندن، تعداد و حرکت اسپرم‌ها تحت تأثیر عصاره زعفران به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان مشاهده گردید. در مطالعه ساپانیدوا و همکاران (۲۰۱۵) نیز اثر آنتی‌اکسیدانی کروسین بر میزان زنده ماندن و تحرک اسپرم‌ها نشان داده شد.[۲۵] در دو تحقیق ضریبی و همکاران (۲۰۱۰) و عمیدی و همکاران (۲۰۱۵) که به‌ترتیب به بررسی اثر پدیده انجماد و ذوب بر روی شاخص‌های مختلف اسپرم و اثر عصاره زعفران بر شاخص‌های اسپرم موش مبتلا به واریکوسل پرداختند، بیان‌گر افزایش زنده ماندن و تحرک اسپرم‌ها بود.[۲۶و۲۷] در زمینه مکانیسم تأثیر عصاره زعفران بر روی میزان حرکت اسپرم‌ها، تارانتیلیس نشان داد که رنگ‌دانه‌های موجود در کلاله زعفران از گروه بتاکاروتنوئیدهای دارای عامل کربوکسیل می‌باشند که یکی از رنگ‌دانه‌های محلول در چربی آن بتاکاروتن است. این مولکول قادر است با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن واسطه‌ای از ادامه اکسیداسیون مولکول‌های دیگر جلوگیری نماید و انرژی لازم برای حرکت فراهم گردد.[۲۸]

در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین شکل اسپرم‌ها در دو گروه مورد و شاهد مشاهده نشد. شکل اسپرم نشان‌دهنده چگونگی وضعیت لوله‌های منی‌ساز می‌باشد. تغییرات دژنراتیو لوله‌های اپی‌تلیوم تأثیر منفی بر شاخص‌های اسپرم دارد.[۲۹]

در مطالعه سبحانی و همکاران (۲۰۱۵) که به بررسی اثر مواد آنتی‌اکسیدان بر شاخص‌های مختلف اسپرم پرداخته بودند، تفاوت معنی‌داری بین شکل دو گروه مورد و شاهد بیان کردند که با مطالعه حاضر مغایرت داشت.[۳۰]

در این مطالعه، برخلاف مطالعه عمیدی و همکاران که در آن تأثیر مثبت زعفران بر شکل اسپرم نشان داده شد،[۲۷] با این‌که زعفران باعث بهبود شاخص‌های شکل اسپرم گردید ولی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به‌نظر می‌رسد آسیب‌های تنش اکسیداتیو در پدیده انجماد شدیدتر از تنش اکسیداتیو ایجاد شده در شرایط واریکوسل می‌باشد و مقدار انتخابی زعفران در این تحقیق به منظور بهبود شکل پس از پدیده انجماد کافی نبوده و باید از مقدار بیش‌تری استفاده کرد. مطالعه حاضر نشان داد که عصاره زعفران تأثیر مثبتی بر روی میزان زنده ماندن اسپرم‌ها و همچنین تعداد اسپرم‌ها پس از پدیده ذوب و انجماد حاصل از ذخیره‌سازی اسپرم‌های نرمال که به‌عنوان یک راهکار درمانی در ناباروری آقایان استفاده می‌شود، دارد.

❋مراجع:

1. O'Flynn, O'Brien KL, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: a review. Fertil Steril 2010; 93(1): 1-12. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.045.

2. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. Endocr Rev 2001; 22(2): 226-39.

3. Dowsing AT, Yong EL, Clark M, McLachlan RI, de Kretser DM, Trounson AO. Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. Lancet 1999; 354 (9179): 640-3.

4. Bashamboo A, Ferraz-de-Souza B, Lourenço D, Lin L, Sebire NJ, Montjean D, Bignon-Topalovic J, et al. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. Am J Hum Genet 2010; 87(4): 505-12. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.09.009.

5. Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. Endocr Rev 2008; 29(5): 560-80. doi: 10.1210/er.2007-0042.

6. Redmon JB, Carey P, Pryor JL.Varicocele-the most common cause of male factor infertility? Hum Reprod Update 2002; 8(1): 53-8.
7. Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. Endocrinology 1999; 140(4): 1709-17.
8. Mehraban D, Ansari M, Keyhan H, Sedighi Gilani M, Naderi G, Esfehani F. Comparison of nitric oxide concentration in seminal fluid between infertile patients with and without varicocele and normal fertile men. Urol J 2009; 2(2): 106-10.
9. Assimopoulou AZ, Sinakos Z, Papageorgiou V. Radical scavenging activity of Crocus sativus L. extract and its bioactive constituents. Phytother Res 2005; 19(11): 997-1000.
10. Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. Asian J Androl 2003; 5(3): 231-42.
11. Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Turkoz Y, Soylu A, Ilbey YO, et al. Comparison of antioxidant enzyme activity in the internal spermatic vein and brachial veins of patients with infertile varicocele. Int Urol Nephrol 2008; 40(3): 679-83. doi: 10.1007/s11255-008-9339-6.
12. Kumar R, Venkatesh S, Kumar M, Tanwar M, Shasmsi MB, Kumar R, et al. Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men. Indian J Biochem Biophys 2009; 46(2): 172-7.
13. Martin-Du Pan RC, Sakkas D. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? Hum Reprod 1998; 13(11): 2984-5.
14. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urol Clin North Am 2002; 29(4): 817-27.
15. Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. J Chromatogr A 1994; 664(1): 55-61.
16. Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. Crocus sativus L.(Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. Evid Based Complement Alternat Med 2009; 6(3): 343-50. doi: 10.1093/ecam/nem125.
17. Seed J, Chapin RE, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI risk science institute expert working group on sperm evaluation. Reprod Toxicol 1996; 10(3): 237-44.
18. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: WHO Press; 2010.
19. Üsturen B, Zekariya NUR, Alcay S, Toker MB, Sagirkaya H, Kemal Soylu M. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. Turk J Vet Anim Sci 2015; 39: 110-4.
20. Oberoi B, Kumar S, Talwar P. Study of human sperm motility post cryopreservation. Med J Armed Forces India 2014; 70(4): 349-

53. doi: 10.1016/j.mjafi.2014.09.006.
21. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. Fertil Steril 2003; 80(3): 531-5.
22. Nasri S, Amidi F, Rezaeian Z. Effect of Selenium on the motility, morphology and viability of sperm cells after freezing and thawing procedure. J Qazvin Univ Med Sci 2014; 18(1): 11-7. [In Persian]
23. Amini Rad O, Khalili A, Soltani HR, Faramarzi G, et al. Influence of pomegranate juice on sperm parameters and fertility in mice. J Hormozgan Univ Med Sci 2009; 13: 183-7. [In Persian]
24. Florin V, Ghioro L, Roman I, et al. Antioxidant medium for mangalitaboar semen cryopreservation. Bulletin UASVM-CN 2010; 67(1-2): 445-51.
25. Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, Kourtzelis I, Fletouris D, Theodoridis A, et al. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. Theriogenology 2015; 84(8): 1273-82. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.005.
26. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. Fertil Steril 2010; 93(1): 159-66. doi: 10.1016/j.fertnstert. 2008.09.038.
27. Amidi F, Ebrahimi S, Abbasi M, Yazdani M, Ghasemi S. Effects of saffron extract on sperm parameters in rats with experimentally induced varicocele. J Qazvin Univ Med Sci 2014; 18(5): 4-11. [In Persian]
28. Tarantilis PA, Polissiou M, Manfait M. Separation of picrocrocin, cis-trans-crocins and safranal of saffron using high-performance liquid chromatography withphotodiode-array detection. J Chromatogr A 1994; 664(1): 55-61.
29. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Kumar HH, Abhilash K, Bairy KL. Effects of methyl parathion (o, o-dimethyl o-4-nitrophenyl phosphorothioate) on rat sperm morphology and sperm count, but not fertility, are associated with decreased ascorbic acid level in the testis. Mutat Res 2005; 588(1): 28-34.
30. Sobhani A, Eftekhaari TE, Shahrzad ME, Natami M, Fallahi S. Antioxidant effects of Brown Algae Sargassum on sperm parameters: CONSORT-compliant article. Medicine (Baltimore) 2015; 94(52): e1938. doi: 10.1097/MD.0000000000001938.