مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۴۲)

تأثیر محصول سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در کاهش آسیب‌های وارد بر اسپرم در حین فریز و ذوب آن

فهیمه سقایتی[۱]، طباطبایی رضا[۲]، کلهر ناصر[۳]، نصری سیما[۴*]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران،[۳]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران،[۲] گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران، [۴]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: ناباروری و مشکلات فردی و اجتماعی ناشی از آن به عنوان یکی از مسایل و دغدغه‌های اصلی و مهم زوج‌ها می‌باشد و از این میان حدود نیمی‌از کل ناباروری‌ها مربوط به مردان است. لذا هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر محصول سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از بافت چربی(SPAS) در کاهش آسیب‌های وارده به اسپرم در حین فریز و ذوب آن بود.

روش بررسی: این پژوهش، یک مطالعه توصیفی ـ تحلیلی از نوع مقطعی می‌باشد که در سال ۱۳۹۸ بر روی ۲۰ نفر از مردان نابارور مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم انجام شد. تمامی‌این مردان دچار اختلال آستنواسپرمیا بودند. نمونه سمن از این افراد تهیه و سپس اندازه‌گیری‌های قبل از فریز از قبیل؛ بررسی زنده مانی، میزان شکست DNA، میزان مالون دی آلدهید و میزان استرس اکسیداتیو بر روی اسپرم‌ها انجام شد. پس از آن با محصول سوپرناتانت سلول‌های بنیادی فریز گشته و همان بررسی‌های قبلی بر روی نمونه دفریز شده انجام گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که میزان زنده مانی اسپرم پس از دفریز سوپرناتانت افزایش پیدا کرد. میزان زنده مانی اسپرم‌ها در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ درصد سپاس نسبت به شرایط محیط فریز بیشتر بوده است($p<0/05$)، ولی در رابطه با شکست DNA و استرس‌های اکسیداتیو تفاوت معنی دار در هیچیک از دوزها وجود نداشت($p>0/05$). هم‌چنین میزان مالون دی‌آلدهید نیز تغییر یافت. میزان مالون دی‌آلدئید در نمونه‌های سپاس و تیمار نشده نسبت به نمونه های فریز شده تفاوت معنی‌داری داشت($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر مثبت بر روی اسپرم ها و بالابردن کیفیت آن‌ها پس از دفریز با استفاده از سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از چربی می‌توان از آن به عنوان یک نگه دارنده مناسب به تنهایی و یا همراه با مکمل‌های دیگر استفاده کرد. به نظر می‌رسد که افزایش زنده مانی اسپرمها در محیط سپاس به دلیل وجود فاکتورهای رشد موجود در این سوپرناتانت باشد.

واژه‌های کلیدی: آستنواسپرمیا، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مالون دی آلدئید، شکستDNA ،سوپرناتانت، SPAS

***نویسنده مسئول: سیما نصری**، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی

Email: s_nasri1@pnu.ac.ir

مقدمه

یکی از اهداف و ثمرات مهم زندگی زناشویی نعمت داشتن فرزند و بقای نسل است که در همه جوامع و فرهنگها هدف پسندیده و ارزشمندی محسوب میشود و سبب استحکام خانواده میگردد(۱).

ناباروری عبارت است از عدم وقوع باروری زوج پس از یک سال زندگی زناشویی منظم و بدون استفاده از روشهای جلوگیری از بارداری، یکی از معضلات مهم بهداشتی ـ درمانی همه جوامع است. میزان متوسط شیوع ناباروری در جوامع مختلف ۱۲ـ۸ درصد میباشد(۱) که ۴۰ تا ۵۰ درصد آن به دلیل اختلال در فاکتورهای مردانه است و دو درصد از این مردان به دلیل پارامترهای کمتر از حد بهینه اسپرم مانند؛ پایین بودن تعداد اسپرم، کاهش تحرک اسپرم یا مورفولوژی غیرطبیعی آن دچار ناباروری هستند(۲).

انواع مختلفی از روشهای کمک باروری برای درمان زوجین نابارور وجود دارد . این روشها شامل تلقیح اسپرم به داخل رحم(IUI)[1]، لقاح داخل آزمایشگاهی(IVF)[2]، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم(ICSI)[3] میباشد که متداولترین آنها IUI است(۳).

به طور معمول این پارامترهای سمن هستند که تعیین میکنند چه روش آمادهسازی مناسبتر است. بیمارانی با کاهش در تعداد و تحرک اسپرم(الیگوآستنوزواسپرمی) به دلیل ناکارآمد بودن روشهای معمول آمادهسازی سمن ـ کاندید مناسبی جهت انجام IUI نبوده و در این افراد تزریق درون سیتوپلاسمیاسپرم پیشنهاد میشود که به لحاظ اقتصادی ممکن است فرد را دچار مشکل کند.

مشخص شده است که چرخههای فریز و ذوب شدن سبب افزایش شکست DNA و کاهش حرکت و زندهمانی اسپرم میشود(۴) که در نتیجه موجب کاهش میزان موفقیت در باروری زوجین نابارور میگردد. همچنین مشخص شده است که تولید گونههای اکسیژن واکنشی[4] با فریز و ذوب اسپرم افزایش مییابد. گونههای اکسیژن واکنشی زنجیرههایی از واکنشهای شیمیایی را آغاز میکنند که متابولیتهایی نظیر مالون دیآلدئید را تولید میکنند. بنابراین مالون دی آلدئید به عنوان یک شاخص پراکسیداسیون لیپیدی القا شده با گونههای اکسیژن واکنشی مورد استفاده قرار میگیرد(۵).

به این ترتیب به کارگیری شیوهای که باعث کاهش آسیب به اسپرم پس از طی مرحله فریز و ذوب مؤثر باشد میتواند در درمان بیماران مبتلا به الیگو استنو اسپرمی بسیار مؤثر باشد.

اخیراً استفاده از سوپرناتانت سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی(SPAS) به عنوان یک روش مؤثر در بهبود پارامترهای اسپرم از جمله حرکت و کاهش شکست DNA و ترمیم آسیبهای وارده بر اسپرم گزارش شده است(۶).

1-Intra Uterine Insemination(IUI)
2-In Vitro Fertilization(IVF)
3-Intra Cytoplasmic Sperm Injection(ICSI)
4-Reactive Oxygen Species(ROS)

به نظر می‌رسد پروتئین‌های مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل مشابهت فراوانی که با فاکتورهای موجود در مایع سمینال دارند، می‌توانند تأثیرات مثبت فراوانی بر روی رفع اختلالات اسپرم داشته و به درمان ناباروری کمک فراوانی کنند و همچنین پارامترهای اسپرم را بهبود بخشند(۷).

یکی از عوامل مهم بارداری در تلقیح مصنوعی، نمونه اسپرمی‌هست که برای این منظور آماده می‌شود(۶). از طرف دیگر، مشخص شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد مختلفی را ترشح می‌کنند، از جمله آنها می‌توان به اینترلوکین‌های ۸، ۱، ۶، فاکتور رشد اندوتلیال رگی، فاکتور رشد سلول بنیادی، فاکتور رشد شبه انسولین و فاکتور رشد هپاتوسیت اشاره کرد(۸). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌در ترمیم و رشد بافتی نقش دارند(۹).

بررسی‌های قبلی نشان می‌دهد که سانتریفیوژ با شیب چگالی سمن و SPAS تأثیری در بهبود پارامترهای حرکتی اسپرم ندارد و تنها تعداد کلی اسپرم‌های متحرک را افزایش می‌دهد(۶)

شواهد زیادی نشان می‌دهند که استرس اکسیداتیو بر ناباروری جنس نر، میزان تحرک اسپرم و شکست DNA اسپرم مؤثر است. همچنین ارتباط بین استرس اکسیداتیو و ناباروری مردان و نرخ بارداری با روش‌های کمک باروری مشخص شده است(۱۰). لذا هدف از پژوهش حاضر تعیین و تأثیر محصول سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از بافت چربی در کاهش آسیب‌های وارده به اسپرم در حین فریز و ذوب آن می باشد.

روش بررسی

این مطالعه یک مطالعه توصیفی ــ تحلیلی از نوع مقطعی می‌باشد که در سال۱۳۹۸ انجام شد. برای انجام آزمایش‌ها از نمونه اسپرم۲۰ نفر از افراد نابارور مبتلا به الیگو استنو اسپرمی شدید مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاددانشگاهی قم استفاده گردید. حجم نمونه بر اساس معیارهای آماری و محاسبه به روش کوکران به تعداد ۱۲ نفر به دست آمد که به منظور افزایش کیفیت تحقیق تصمیم گرفته شد از ۲۰ نمونه استفاده شود.

افراد دارای حجم مایع منی بیش از ۲/۵ سی سی، تعداد اسپرم ۱ تا ۵ میلیون، مورفولوژی ۱ تا ۴ درصد و میزان WBC کمتر از یک میلیون در سی‌سی برای ورود به مطالعه انتخاب گردید.

بعد از آنالیز سمن از نظر حجم، تعداد اسپرم، مورفولوژی و حرکت نمونه‌ها انتخاب و استفاده شد.

مردان نابارور برای انجام این آزمایش می‌باید سه روز از نزدیکی اجتناب نموده و سپس نمونه را در همان مرکز گرفته و سریعاً به آزمایشگاه تحویل دهند، پس از آن نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً برای بررسی آماده شود. سپس، سمن از نظر رنگ ، حجم و مدت زمان لازم برای برگشت به حالت اولیه(از نظر ویسکوزیته)بررسی شد. پس از آن زیر میکروسکوپ تعداد، حرکت و

مورفولوژی اسپرم‌ها بررسی گردید. در یک نمونه نرمال، اسپرم‌ها معمولاً دارای سر، گردن و دم به صورت کامل هستند و حرکت آن‌ها هر سه نوع گرید حرکتی را دار هستند و هم‌چنین تعداد اسپرم‌ها از صد میلیون بیشتر می‌باشد. در صورتی که نمونه مورد آزمایش گرید حرکتی A(بهترین نوع حرکت اسپرم و حرکت پیشرونده و مؤثر برای لقاح می‌باشد) را نداشت، اما تعداد اسپرم‌ها نرمال بود و حجم سمن هم بالای ۲/۵ سی‌سی بود، این نمونه برای انجام پژوهش مورد استفاده قرار می‌گرفت.

برای به دست آوردن زنده مانی از محلول رنگ ائوزین نکروزین استفاده شد، به این صورت که مقدار ۱۰ لاندا از نمونه اسپرم با ۱۰ لاندا ائوزین و ۲۰ لاندا نکروزین به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط شد، سپس یک لام گسترده از آن تهیه و پس از خشک شدن نمونه بر روی لام با عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ به کمک روغن ایمرسیون مشاهده و زنده مانی اسپرم‌ها محاسبه شد، معیار زنده بودن اسپرم عدم رنگ‌پذیری آن پس از رنگ‌آمیزی بود.

برای انجام تست بررسی میزان شکست DNA مقدار ۵۰۰λ از نمونه با ۱/۵ برابر PBS مخلوط گردید و در سانتریفیوژ با دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد.

در این مطالعه جهت بررسی میزان شکست DNA از کیت SDFA که در پژوهشگاه علوم زیستی ابن سینا و شرکت آوانیکا آیتک تهیه شده است، استفاده گردید. به این ترتیب که در یک بستر میکروژلی تحت تأثیر یک تیمار اسیدی، کروماتین DNA اسپرم دناتوره شد. در مرحله بعد با حذف پروتئین‌های کروماتین(به وسیله محلول های خاص موجود در کیت که باعث از بین رفتن پروتئین‌ها می‌شود)، رشته‌های DNA تا حد ممکن در اطراف سر اسپرم پخش می‌شوند که طی رنگ‌آمیزی به صورت هاله‌ای در اطراف سر اسپرم قابل مشاهده است. این در حالی است که شکست DNA اسپرم منجر به عدم گسترش رشته‌های DNA در اطراف سر و نیز عدم تشکیل هاله یا مشاهده هاله‌های خیلی کوچک در اطراف سر اسپرم می‌گردد. در این روش بر اساس دستورالعمل موجود در کیت تمامی مراحل انجام شد و لام های نهایی برای بررسی میزان شکست نهایی DNA آماده گردید.

سپس با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون میزان قطر هاله اطراف اسپرم بررسی شد. در این مرحله باید حداقل ۲۰۰ اسپرم کامل(سر و دم با هم باشند) شمارش می شد و تعداد اسپرم‌های دارای هاله و اسپرم فاقد هاله به صورت درصد گزارش می گردد.

اسپرم‌های دارای شکست DNA، اسپرم‌هایی با هاله کوچک(عرض هاله کمتر یا مساوی یک سوم قطر کوچک سر اسپرم باشد)، اسپرم بدون هاله و با هسته‌ی تخریب شده(هیچ هاله‌ای مشاهده نمی‌شود و هسته اسپرم به صورت خیلی ضعیف و نامنظم رنگ می‌گیرد)، اسپرم‌های سالم بدون شکستDNA، اسپرم با هاله‌ی بزرگ(عرض هاله بیشتر یا مساوی قطر

کوچک سر اسپرم می‌باشد)، اسپرم با اندازه هاله متوسط(اندازه هاله بین هاله بزرگ و هاله کوچک می‌باشد) هستند.

برای فریز شدن در تانک ازت، نمونه سمن به پنج قسمت تقسیم گردید و در پنج میکروتیوب به مقدار ۳۰۰ λ نمونه سمن ریخته و در اولی به همان میزان محلول سپاس ریخته و در میکروتیوب دوم به همان مقدار نمونه اسپرم محلول فریز اسپرم ریخته شد و در سومین میکروتیوب مقدار ۵۰ درصد از محلول فریز اسپرم و ۵۰ درصد محلول سپاس ریخته و مخلوط گردید، در چهارمین میکروتیوب مقدار ۳۰۰ لاندا اسپرم با مقدار ۷۵ درصد از محلول سپاس و ۲۵ درصد از محلول فریز اسپرم مخلوط و در میکروتیوب پنجم مقدار ۳۰۰ λ از اسپرم با مقدار ۲۵ درصد سپاس و ۷۵ درصد از فریز اسپرم مخلوط گردید و ده دقیقه در دمای محیط و سپس ۱۵ دقیقه روی بخار ازت قرار گرفت و پس از آن در تانک ازت قرار داده شد و به مدت دو هفته در تانک نگه داشته شد. دوزهای انتخاب شده در این بررسی بر اساس مطالعه مقدماتی انتخاب و مشخص شد که کدام دوز بهترین حالت تیمار اسپرم را دارد.

برای آماده سازی جهت تست مالون دی‌آلدهید و گونه‌های اکسیژن واکنشی مقدار ۵۰۰ لاندا از نمونه با یک و نیم برابر محلول نمکی بافر فسفات(PBS) مخلوط شد و به مدت ده دقیقه در دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و به وسیله کیت‌های خریداری شده که به روش الایزا می‌باشد میزان این ترکیبات اندازه‌گیری گردید. پس از دو هفته نمونه‌های اسپرم با غلظت‌های متفاوت از سپاس و محلول فریز اسپرم از تانک ازت خارج گردید و در دمای محیط ذوب و سپس آن‌ها سانتریفیوژ شدند. پس از آن محلول رویی را خارج و با اضافه کردن بافر محلول نمکی بافر فسفات مجدداً با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. این کار دوبار تکرار گردید و به این صورت نمونه ها دومرتبه شست و شو داده شد. پس از آن با اضافه کردن بافر میزان محلول هر میکروتیوب به یک سی‌سی رسانده شد و تمامی مراحل شامل بررسی زنده مانی و شکست DNA و اندازه‌گیری ROS, MDA انجام گردید و به این ترتیب نتایج قبل و بعد از فریز و با اضافه کردن محلول‌های مختلف و در غلظت‌های متفاوت سنجیده شد.

برای جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از بافت چربی(AT-MSCs)[1] نمونه بافت چربی که از بدن بیماری که لیپوساکشن انجام داده است و با رضایت قبلی این فرد از بیمارستان تهیه گردید و در اتاق کشت و زیر هود لامینار به وسیله قیچی استریل شده به قطعات ریزتری تقسیم شد. به منظور حذف سلول‌های خونی، چندین بار به وسیله بافر PBS شست و شو داده شد و محلول رویی دور ریخته شد. بافت چربی سفید باقی مانده در ته ظرف به لوله‌های فالکون منتقل گردید و ۵ ـ۶

1- Adipos Tissue drived Mesenchymal Stem Cells(AT-MSCs)

میلی‌لیتر آنزیم کلاژناز اضافه و در بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۱۸۰ـ۹۰ دقیقه قرار داده شد، در تمام این مدت با تکان‌های فیزیکی به تجزیه بافت چربی کمک شد. پس از این مرحله بافت چربی تقریباً حل شده است و لوله‌های فالکون حاوی این محلول‌ها از بن ماری خارج و با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از آن روغن و بافت چربی رویی را به آرامی برداشته و سلول‌های ته نشین شده چربی نگهداری شد. عمل سانتریفیوژ و برداشتن محلول رویی تا سه بار ادامه یافت. پس از آن سلول‌های ته نشین شده به فلاسک‌های مخصوص کشت که حاوی محلول DMEM با ۱۰ درصد FBS می‌باشد، منتقل گردید و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۵ درصد CO2 قرار داده شد و هر چهار روز یک بار محیط رویی تعویض گردید تا مواد لازم به سلول‌هایی که کشت داده شدند، برسد. در این مرحله رشد سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری معکوس قابل مشاهده است. پس از تعویض‌های مکرر محیط کشت وقتی سلول‌ها به تراکم[1] (۵×۱۰^{۵} و ۸×۱۰^{۵}) رسید، این محیطها که غنی از مواد مفید می‌باشند جمع‌آوری و در دمای ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. البته قبل از استفاده از این محیط‌ها PH اندازه‌گیری می‌شود، زیرا PH در محیط سپاس با تراکم ۵×۱۰^{۵} و ۸×۱۰^{۵} باید به ترتیب ۷/۱ و ۷/۶ باشد. تمامی این محیطها در میکروتیوب‌های مختلف در حجم‌های ۱ سی‌سی تقسیم گردید و در دمای ۲۰ ـ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در زمان لازم یک به یک از این میکروتیوب‌های حاوی سوپرناتانت سلول‌های بنیادی استفاده گردید. موارد احتمالی تورش مطالعه شامل میزان بالای گلبول‌های سفید در نمونه که ممکن است باعث افزایش میزان ROS گردد، آلودگی قارچی و باکتریایی در محلول سوپرناتانت با وجود استفاده ازآنتی‌بیوتیک بود.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

زنده مانی اسپرم‌ها هنگامی که از سوپرناتانت سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود، افزایش می‌یابد. میزان زنده مانی اسپرم‌ها در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ درصد سپاس نسبت به شرایط محیط فریز بیشتر بوده و این اختلاف معنی‌دار می‌باشد($p<۰/۰۵$) (نمودار۱).

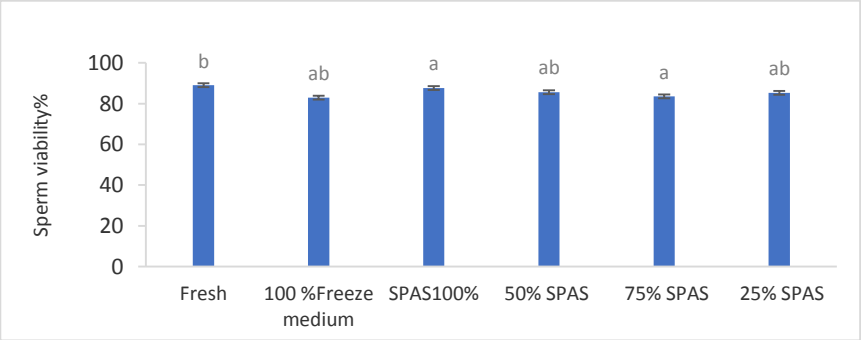
در مورد میزان شکست DNA نیز پس از بررسی به وسیله کیت‌های SDFA میزان شکست DNA در هر شش دسته به دقت مورد ارزیابی قرار گرفت و تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود ندارد($p<۰/۰۵$)(نمودار۲).

در مورد بررسی نمونه‌ها از لحاظ میزان مالون دی‌آلدهید، پس از ارزیابی نمونه‌ها در شش

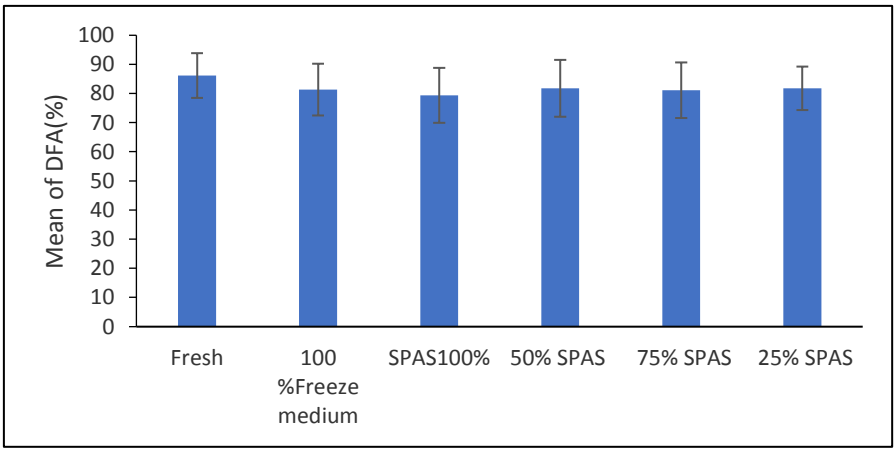
1-confluence

دسته متفاوت مشخص شد بین گروه‌های فریز با تیمار و فریز نشده اختلاف معنی‌داری وجود دارد($p<۰/۰۵$) (نمودار۳).

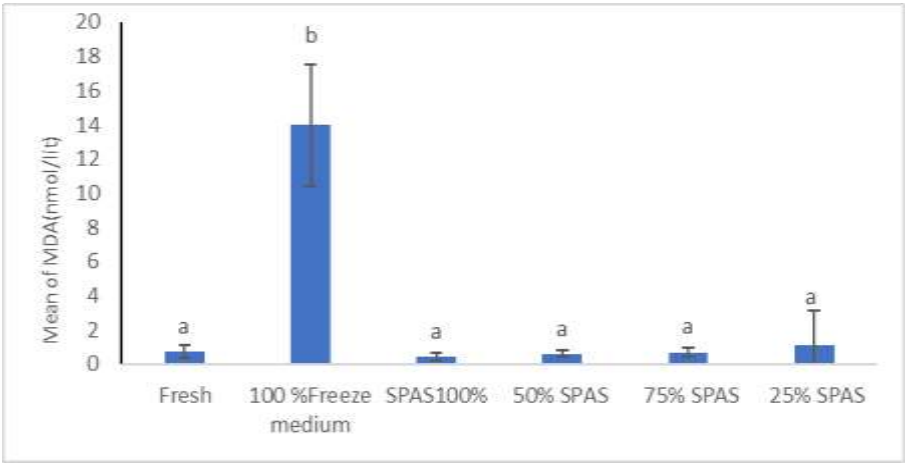
در مورد میزان استرس اکسیداتیو در نمونه‌ها تفاوت معنی‌داری بین تیمارها وجود ندارد($p>۰/۰۵$)(نمودار۴).



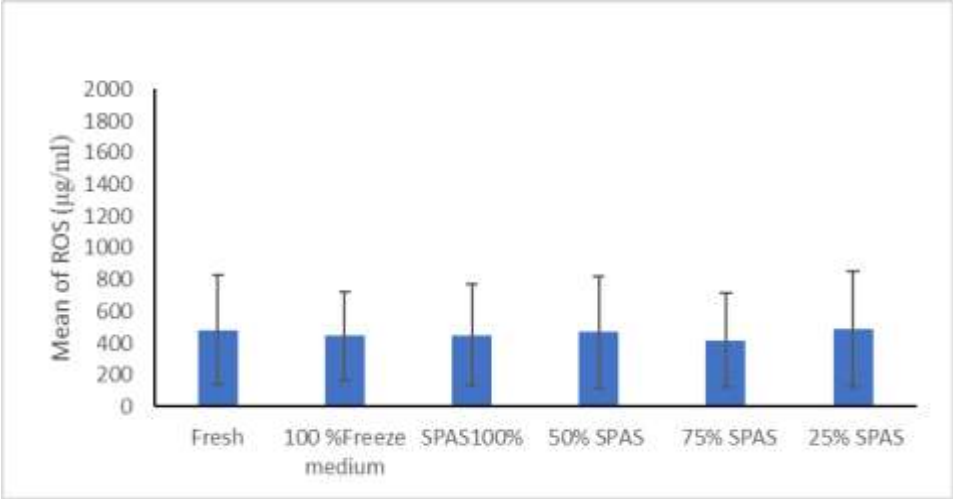
نمودار ۱: میزان زنده مانی اسپرم ها در غلظت های متفاوت سوپرناتانت و محیط فریز اسپرم. حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در زنده مانی اسپرم می‌باشد($p<۰/۰۵$)



نمودار ۲: میزان شکست DNA در غلظت های متفاوت سوپرناتانت و محیط فریز اسپرم. تفاوت بین گروه ها معنی‌دار نمی باشد ($p>۰/۰۵$)



نمودار۳: میانگین MDA در غلظت های متفاوت سوپرناتانت و محیط فریز اسپرم. حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در زنده مانی اسپرم می‌باشد($p<۰/۰۵$)



نمودار۴: میانگین ROS در غلظت های متفاوت سوپرناتانت و محیط فریز اسپرم. تفاوت بین گروه ها معنی‌دار نمی باشد($p>۰/۰۵$)

بحث

امروزه ناباروری یک مشکل بالینی محسوب شده و تقریباً ۴۰ تا ۵۰ درصد ازعلل ناباروری مربوط به مردان است(۲). از طرف دیگر مشخص شده است که فریز و ذوب اسپرم درصد شکستDNA، تحرک و زنده مانی آن را کاهش می دهد(۴). هم‌چنین، یکی از فرآیندهای درمان ناباروری فریز اسپرم برای نگهداری آنها به مدت طولانی به منظور استفاده بعدی احتمالی از آن می‌باشد، لذا هدف از پژوهش حاضر تعیین و تأثیر محصول سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از بافت چربی در کاهش آسیب‌های وارده به اسپرم در حین فریز و ذوب آن بود

اگر چه پژوهش‌های مختلفی در مورد پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان ناباروری و

بازگشت اسپرماتوژنز انجام شده، اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تأثیر محیط کشت رویی این سلول‌ها به عنوان محیط فریز انجام نگرفته است.

صدرایی و همکاران با مقایسه اثر درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و محیط کشت رویی آن در درمان استئوآرتریت مفصل زانوی خوکچه هندی، نشان دادند که محیط کشت رویی اثر درمانی مشابه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارد(۱۱). پژوهش‌های دیگر نیز نشان می‌دهند که ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان برخی از بیماری‌ها مانند؛ نارسایی کلیوی، نارسایی حاد کبدی، سکته حاد قلبی، آسیب هیپوکسی مغز، التیام زخم، ترمیم استخوان و بافت‌های نرم مؤثر است(۱۴-۱۲).

پژوهش‌ها نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مشتق از بافت چربی می‌توانند در محیط کشت، فاکتورهای رشد و سیتوکین‌هایی مانند؛ فاکتور نروتروفیک مشتق از گلیال(GDNF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه(bFGF)، فاکتور رشد شبه انسولینی ۱(IGF-1)، فاکتور رشد تغییر دهنده بتا(TGF-β)، فاکتور رشد هپاتوسیتی(HGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی(VEGF)، اینترلوکین ۶ (IL-6) و اینترلوکین ۱۰ (IL-10) را ترشح کنند(۱۵ و۱۲). به نظر می‌رسد فاکتورهایی از این قبیل می‌توانند به عنوان محیطی غنی در انجماد مورد استفاده قرار گیرند.

مطالعه فضائلی و همکاران نشان داد که تیمار اسپرم افراد کاندید سیکل IUI با سوپرناتانت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث بهبود شرایط اسپرم‌ها شده و نرخ باروری تا ۳۰ درصد افزایش می‌یابد، در این مطالعه از اسپرم تازه استفاده شد(۶). پژوهش‌های مختلفی نشان داده‌اند که روند انجماد و ذوب مجدد نمونه مایع سمینال سبب کاهش فعالیت متابولیک اسپرم‌ها و آسیب به غشای پلاسمایی آنها و در نتیجه کاهش اسپرم‌های دارای عملکرد طبیعی جهت استفاده در روش‌های لقاح خارج رحمی می‌گردد(۱۷ و۱۶). بنابراین، استفاده از نگهدارنده‌های مناسب و روش صحیح انجماد در حفظ و سلامت اسپرم بسیار مهم تلقی می‌گردد(۱۷).

نتایج پژوهش‌های قبلی بیانگر این است که پس از انجماد شیشه‌ای تحرک پیشرونده، قابلیت حیات، غلظت و مورفولوژی طبیعی اسپرم به طور معنی‌داری کاهش یافته و میزان آپوپتوزیس به طورمعنی‌داری افزایش می‌یابد. هر نوع انجماد صرف نظر از روش آن، اثر منفی بر تحرک اسپرم داشته و باعث کاهش مقدار شاخص‌ها پس از ذوب شدن در مقایسه با مرحله قبل از انجماد می‌گردد. بسیاری از محققان دریافته‌اند که انجماد سبب کاهش پارامترهای حرکتی اسپرم می‌شود(۱۹ و۱۸).

در این مطالعه نیز زنده مانی کل اسپرم پس از انجماد حدود ۵ درصد کاهش یافت، اما این کاهش در مواردی که با سوپرناتانت سلولی مورد تیمار قرار گرفت کمتر بوده و حتی مشاهده شد که محیط spas تأثیر مثبتی بر زنده مانی اسپرم‌ها گذاشته و نسبت به محیط انجماد تأثیر بهتری بر زنده مانی اسپرم داشته

است، علت آن نیز فراهم شدن فاکتورهای رشد و محیط بهتری به وسیله سوپرناتانت سلول‌های بنیادی است(۱۲)، که می‌تواند در هنگام فریز و ذوب به وسیله اسپرم مورد استفاده قرار گیرد.

تست شکنندگی کروموزوم DFA مشخص کرد که میزان شکنندگی کروموزوم در اسپرم منجمد بیشتر از اسپرم تازه بوده، اما در خصوص محیط‌های نگهدارنده تفاوتی بین محیط فریز و محیط spas مشاهده نشد و علت آن که در این پژوهش مورد بررسی دقیق قرار گرفت این بود که آسیب DNA اسپرم انسان اثر معکوس بر روی تکامل جنین حاصل شده در سیکل‌های درمانی خارج از رحمی دارد(۲۱ و ۲۰).

تست استرس اکسیداتیو MDA در خصوص نمونه‌های تازه و منجمد نشان داد که میزان استرس اکسیداتیو به طور معنی‌داری در نمونه‌های منجمد افزایش یافته، اما در بین رقت‌های مختلف محیط spas و محیط انجماد تفاوتی مشاهده نشد، به همین ترتیب تست استرس اکسیداتیو ROS نشان داد که میزان استرس اکسیداتیو در نمونه‌های منجمد افزایش یافته است.

محدودیت‌های مطالعه پیدا کردن نمونه مردان دچار آستنواسپرمیا بود. در انتها پیشنهاد می‌شود تا از سوپرناتانت سلول‌های بنیادی برای تیمار اسپرم در مرحله دفریز اسپرم استفاده شود. همچنین می‌توان فاکتورهای رشد موجود در سوپرناتانت سلول‌های بنیادی را جدا کرده و جداگانه اثرات آنها را بر اسپرم بررسی نمود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج تحقیق اخیر و نیز پژوهش‌های قبلی مشابه می‌توان نتیجه گرفت که می‌توان از محیط غنی سوپرناتانت سلول‌های بنیادی که غنی از فاکتورهای نگهدارنده و مفید رشد هستند به عنوان محیطی مساعد و کمک کننده در فریز اسپرم‌ها استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر برگرفته شده از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته سلولی و تکوینی دانشگاه پیام نور با کد اخلاق IR.ACECR.IDM.REC.1396.1 از سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی می‌باشد، که با حمایت این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Human Reproduction 2007; 22(6): 1506-12.
2.Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. J Hum Reprod Sci 2015; 8(4): 191–6.
3.Duran HE, Morshedi M, Kruger T, Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. Human Reproduction Update 2002; 8(4): 373-84.
4.Thomson LK, Fleming SD, Barone K, Zieschang J, Clark AM. The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. Fertility and Sterility 2010 ; 93(4): 1147-56.
5.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. International Journal of Immunopathology and Pharmacology 2015, 28(1): 69-76.
6.Fazaeli H, Davoodi F, Kalhor N, Qomi RT. The effect of supernatant product of adipose tissue derived mesenchymal stem cells and density gradient centrifugation preparation methods on pregnancy in intrauterine insemination cycles: An RCT. International Journal of Reproductive Biomedicine 2018; 16(3): 199.
7.Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2004; 32(6): 370-3.
8.Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. Stem Cell Res Ther 2016; 7(1): 131.
9.Kalinina NI, Sysoeva VY, Rubina KA, Parfenova YV, Tkachuk VA. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. Acta Naturae 2011; 3(4): 30–7.
10.Alahmar AT. Role of oxidative stress in male infertility: an updated review. J Hum Reprod Sci 2019 Jan-Mar; 12(1): 4–18.
11.Sadraie M, Mehrabani D, Vahdati A. Comparison of therapeutic effects of bone marrow mesenchymal stem cells and liquid culture environment (secreta) in the treatment of induced knee abrasion created in guinea pigs. Armaghane Danesh 2015; 20(8): 651-65.
12.Zhou BR, Xu Y, Guo SL, Xu Y, Wang Y, Zhu F, et al. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. BioMed Research International 2013; 2013: 519126.
13.Staff PO. Correction: Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. PloS one 2015;10(3): e0119262.
14.Moghadasali R, Mutsaers HA, Azarnia M, Aghdami N, Baharvand H, Torensma R, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates regeneration of human renal proximal tubule epithelial cells after gentamicin toxicity. Experimental and Toxicologic Pathology 2013; 65(5): 595-600.
15.Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. World Journal of Stem Cells 2014; 6(3): 312.
16.Lahav-Baratz S, Rothschild E, Grach B, Koifman M, Shiloh H, Ishai D, et al. The value of sperm pooling and cryopreservation in patients with transient azoospermia or severe oligoasthenoteratozoospermia. Human Reproduction 2002; 17(1): 157-60.
17.Hammadeh M, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. Andrologia 2001; 33(6): 331-6.
18.Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. Fertility and Sterility 2001; 76(5): 892-900.
19.Barthelemy C, Royere D, Hammahah S, Lebos C, Tharanne M-J, Lansac J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. Archives of Andrology 1990; 25(1): 29-40.
20.Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. Fertil Steril 2004; 82: 378-83.
21.Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 837-43.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Adipose-Derived Stem Cell Supernatant on Reducing Sperm Damage During Freezing and Thawing

Saghaiti F[1], Tabatabai R[2], Kalhor N[3], Nasri S[4]

[1]Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran, [2]Departments of Biology, University of Tehran, Tehran, Iran, [3]Departments of Mesenchymal Stem Cells, Jihad University Infertility Treatment Center, Qom, Qom, Iran, [4]Departments of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: 13 Jun 2020 Accepted: 31 Oct 2020

Abstract

Background & aim: Infertility and its individual and social problems are one of the main and important issues and concerns of couples and about half of all infertility is related to men. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell supernatant (SPAS) product in reducing sperm damage during freezing and thawing.

Methods: The present descriptive-analytical cross-sectional study was performed in 20 infertile men referred to Qom University Jihad Infertility Treatment Center in 2017. All of these men had asthenospermia. Samples were prepared from these individuals and then pre-freeze measurements such as; Sperm viability, DNA fragmentation, malondialdehyde and oxidative stress were assessed. After that, the stem cells were frozen with the supernatant product and the same previous studies were performed on the defrosted sample. Data were analyzed using one-way analysis of variance.

Results: The results of the present study indicated that sperm survival increased after supernatant defecation. Sperm survival at 25 and 50% concentration was higher than freezing conditions ($p < 0.05$), but no significant difference was seen in DNA doses and oxidative stress in any of the doses ($p > 0.05$). The amount of malondialdehyde also changed. The amount of malondialdehyde in SPAS and untreated samples was significantly different from the frozen samples ($p < 0.05$).

Conclusion: Due to the positive effect on sperm and improving their quality after defecation using fat-derived mesenchymal stem cell supernatant, it may be used as a suitable preservative alone or in combination with other supplements. It seems that the increase in sperm viability in the spasm environment was due to the presence of growth factors in this supernatant.

Keywords: Asthenospermia, Mesenchymal Stem Cells, Malondialdehyde, DNA Breakdown, Supernatant

[*]**Corresponding author: Nasri S,** Biology Departments, Payame Noor University, Tehran, Iran
Email: s_nasri1@pnu.ac.ir

Please cite this article as follows:
Saghaiti F, Tabatabai R, Kalhor N, Nasri S. The Effect of Adipose-Derived Stem Cell Supernatant on Reducing Sperm Damage During Freezing and Thawing. Armaghane-danesh 2020; 25(5): 681-692.