مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۰(شماره پی در پی ۱۴۸)

رابطه بین غلظت کلسیم داخل سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرماتوزوای تازه و منجمد- ذوب شده انسان

فریده ایروانپور[۱]، سارا کشتگر[۲*]، بهاره ابراهیمی[۳]

[۱] مرکز تحقیقات علوم اعصاب شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، [۲] گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، [۳] مرکز تحقیقات سالمندی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۰/۰۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۰۱

چکیده:

زمینه و هدف: نگهداری اسپرم ها به صورت منجمد در نیتروژن مایع یک روش پرکاربرد برای حفظ طولانی مدت آن‌ها است. بسیاری از این اسپرم‌ها پس از ذوب شدن، آسیب دیده و زنده نمی‌مانند و بسیاری نیز قدرت تحرک خود را از دست می‌دهند. این آسیب‌ها ناشی از آسیب به غشا اسپرم و تغییر نفوذپذیری به یون‌ها به خاطر تغییرات فشار اسمزی، تشکیل کریستال‌های یخ و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. هدف از این مطالعه تعیین رابطه بین غلظت کلسیم داخل سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرماتوزوای تازه و منجمد- ذوب شده انسان بود.

روش بررسی: در این مطالعه نیمه تجربی که در سال ۱۳۹۲ انجام شد، تعداد ۳۵ نمونه سیمن انسان بارور به طور تصادفی انتخاب و به دو گروه تازه و منجمد- ذوب شده تقسیم شدند. اسپرم‌های گروه دوم به روش‌های استاندارد انجماد برای یک ماه در نیتروژن مایع نگهداری شدند. اسپرم‌های تازه و اسپرم‌های منجمد، پس از ذوب شدن در معرض ۱۰ میکرومولار اینوفور کلسیم (A23187) قرار گرفتند. میزان تحرک، بقا و وضعیت آکروزوم در هر دو گروه در شروع آزمایش و بعد از قرار گرفتن در معرض اینوفور کلسیم بررسی شد. محتوای کلسیم داخل سلول، با روش فلوسیتومتری و استفاده از رنگ فلوروسنت Flou-3/AM و میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن با استفاده از لومینول و با روش کمی لومینیسنس ارزیابی شد. داده‌های جمع‌آوری شده با آزمون‌های من- ویتنی و پیرسون تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: درصد کل اسپرم‌های زنده، متحرک و پیشرونده و درصد اسپرم‌های با آکروزوم سالم پس از پروسه انجماد- ذوب به طور معنی‌داری کاهش یافت. افزودن A23187 به محیط سبب افزایش کلسیم داخل سلولی اسپرم‌های زنده شد، اما درصد اسپرم‌های زنده و متحرک هر دو گروه را کم کرد. تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را به ازای سلول‌های زنده در هر دو گروه بیشتر کرد، ولی این افزایش در گروه منجمد- ذوب شده به طور معنی‌داری از گروه تازه بیشتر بود($p<۰/۰۰۱$). نتایج وجود یک رابطه مثبت معنی‌دار بین کلسیم داخل سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را نشان داد.

نتیجه‌گیری: یون کلسیم برای عملکرد طبیعی اسپرم لازم است، اما افزایش ورود کلسیم به وسیله A23187 به اسپرم‌های تازه یا منجمد - ذوب شده، سبب آسیب بیشتر و کاهش حرکت و بقا می‌شود. میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن رابطه مستقیم و معنی‌داری با کلسیم داخل سلولی دارد. آسیب‌های ناشی از انجماد با مقادیر زیادتر کلسیم داخل سلولی تشدید می‌شوند و این مسئله ممکن است به خاطر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپرماتوزوا، انجماد-ذوب اسپرم، کلسیم داخل سلولی، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، آسیب ناشی از انجماد

***نویسنده مسئول: سارا کشتگر،** شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه فیزیولوژی

Email: keshtgar@sums.ac.ir

مقدمه

برای نگهداری اسپرم انسان برای مدت‌های طولانی، آن را به صورت منجمد شده در نیتروژن مایع قرار می‌دهند. با این روش، هر چند که درصدی از اسپرم‌ها پس از ذوب شدن، توانایی لقاح و باروری را حفظ می‌کنند، ولی تعداد قابل توجهی از آنها نیز در طی پروسه انجماد ـ ذوب، آسیب‌های زیادی می‌بینند(۱) که از جمله این آسیب‌ها می‌توان به کاهش تحرک، آسیب به DNA و افزایش تعداد اسپرم‌های مرده در هر نمونه اشاره کرد(٤ـ۲). این آسیب‌ها در مجموع به نام آسیب‌های ناشی از انجماد شناخته می‌شود(٦ و ٥) که علت‌های مختلفی شامل تغییرات فشار اسمزی در طی پروسه انجماد ـ ذوب، ایجاد کریستال‌های یخ، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ایجاد استرس اکسیداتیو برای بروز آنها وجود دارد(٦ و ٥).

پروسه انجماد ـ ذوب سبب کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود(٨ـ٦). اسپرم بالغ، حجم سیتوپلاسم اندکی دارد و بنابراین محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آن اندک است و از طرف دیگر، مقادیر زیادی اسیدهای چرب اشباع نشده در غشا اسپرم وجود دارد که این سلول را بسیار به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو حساس می‌نماید(۱۱ـ۹). به نظر می‌رسد که حداقل بخشی از آسیب‌های ناشی از انجماد به خاطر استرس اکسیداتیو باشد(۱۲).

میتوکندری و آنزیم غشایی NADPH اکسیداز ٥[1] دو منبع اصلی برای تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرم انسان هستند(۱٥ـ۱۳). افزایش کلسیم داخل سلولی سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرم تازه (منجمد نشده) اسب(١٦) و اسپرم انسان شده است(۱۸ و ۱۷). تأثیر مثبت افزایش کلسیم داخل سلولی بر روی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله میتوکندری نشان داده شده(۱۹). از این گذشته کشف وجود آنزیم NADPH اکسیداز ٥ بر روی اسپرماتوزوآی انسان(۱٥و١٤) و یافتن وابستگی فعالیت این آنزیم به کلسیم داخل سلولی این احتمال را تقویت نمود که بخشی از رادیکال‌های آزاد تولید شده در اسپرم، به دنبال افزایش کلسیم داخل سلولی، ممکن است به خاطر افزایش فعالیت این آنزیم باشد(۲۰). بنابراین افزایش بیش از حد کلسیم داخل سلولی و بروز استرس اکسیداتیو از جمله مکانیسم‌هایی هستند که به نظر می‌رسد در ایجاد آسیب‌های ناشی از انجماد نقش داشته باشند(٢٤ـ۲۱).

در حالی که بعضی از پژوهش‌ها به افزایش کلسیم داخل اسپرماتوزوآ بعد از ذوب شدن، تأکید می‌کنند(٢٦ و ٢٥)، در پژوهش‌های دیگر، کاهش غلظت کلسیم در طی پروسه انجماد ـ ذوب گزارش شده است(۲۸ و ۲۷). از طرف دیگر نشان داده شده است که استفاده از محلول‌های مخصوص انجمادی که حاوی غلظت‌های کمتری از کلسیم هستند یا محیط‌هایی که حاوی موادی نظیر EDTA هستند که با

چلات کردن کلسیم، از ورود آن به داخل اسپرم جلوگیری می کنند، سبب می‌شود که میزان بقا اسپرم و تحرک آن بعد از ذوب شدن، افزایش یابد(۲۹).

از طرف دیگر، نقش بسیار اساسی کلسیم برای حفظ عملکرد نرمال اسپرم انسان، شناخته شده است و در پژوهش‌های بسیاری به نقش این یون در تحرک اسپرم، ایجاد واکنش آکروزومی، ظرفیت‌پذیری و توانایی لقاح تأکید شده است(۳۱ و ۳۰). هدف از این مطالعه تعیین رابطه بین غلظت کلسیم داخل سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرماتوزوای تازه و منجمد- ذوب شده انسان بود.

روش بررسی

در این مطالعه نیمه تجربی که در سال ۱۳۹۲ انجام شد، آزمایش روی نمونه‌های مایع منی مردان ۲۰ تا ٤٠ ساله‌ای که برای تجزیه و تحلیل مایع منی به مرکز درمان ناباروری شیراز مراجعه کرده بودند و دست‌کم ۳ تا ٥ روز از آخرین فعالیت جنسی آن‌ها گذشته بود، انجام شد. نمونه‌های مایع منی نیم ساعت در دمای اتاق نگه‌داری و پس از روان شدن مایع منی، حجم، اسیدیته و میزان چسبندگی نمونه‌ها بررسی شد. درصد اسپرم‌های با حرکت پیش‌رونده و غیرپیش‌رونده، درصد اسپرم‌های بی‌تحرک، درصد اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های با شکل ظاهری طبیعی مطابق معیارهای سازمان بهداشت جهانی ارزیابی شد(۳۲). تا این قسمت از آزمایشات در مرکز درمان ناباروری انجام شد و حجم باقیمانده از ۳٥ نمونه که دیگر مورد استفاده آن مرکز نبود و مطابق معیارهای سازمان بهداشت جهانی طبیعی و بارور بودند، در کمتر از یک ساعت برای انجام آزمایش‌های این پژوهش به آزمایشگاه دانشگاه انتقال داده شد. انجام این پژوهش در کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز به تصویب رسیده است.

نمونه‌ها با محیط کشت همزاف۱۰ (سیگما، ان ٦٦٣٣) شست و شو داده شد تا سلول‌های مرده، گلبول‌های سفید و سلول‌های اپیتلیومی حذف شود. پس از آن نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ٥ درصد دی اکسیدکربن نگه داشته شد تا اسپرم‌های متحرک در محیط کشت شناور شوند. بعد از یک ساعت مایع رویی جمع‌آوری و تعداد اسپرم با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. درصد اسپرم‌های با حرکت پیش‌رونده و غیر پیش‌رونده، درصد اسپرم‌های بی‌تحرک و درصد اسپرم‌های زنده ارزیابی شد(۳۲). نمونه‌های مایع منی به شیوه تصادفی به دو دسته اصلی تازه و منجمد- ذوب شده تقسیم شد. چون تعداد اسپرم‌ها در هر نمونه با نمونه‌ی دیگر متفاوت بود، نمونه‌ها طوری رقیق شد که در نهایت تعداد اسپرم در هر یک از آن‌ها به ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر رسید و پنج نمونه از هر گروه برای ارزیابی کلسیم درون سلولی آماده شد.

برای نمونه‌های گروه منجمد- ذوب شده مرحله‌های زیر انجام شد. ابتدا محیط کشت خاص انجماد اسپرم(ORIGIO11010010) با حجم برابر با محیط کشت هر نمونه، با سرعت بسیار آهسته و در

عرض ۱۰ دقیقه به آن اضافه شد و با اضافه کردن هر قطره مخلوط به آهستگی و دقت هم زده شد. حدود ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط به لوله‌های موئین مخصوص انجماد کشیده شد، انتهای لوله‌ها بسته شد و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، برای ۳۰ دقیقه در فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد گذاشته، و سپس به مخزن ازت مایع انتقال داده شد. نمونه‌ها به مدت یک ماه در نیتروژن مایع نگه‌داشته شد. پس از گذشتن این زمان، نمونه‌ها در دمای اتاق ذوب و برای حذف‌کردن محیط کشت مخصوص انجماد، با همزـ اف۱۰ شست و شو داده شد(۳۳).

هر نمونه تازه یا منجمد ـ ذوب شده به سه گروه آزمایشی کنترل، حلال(۰/۱ درصد DMSO) و گروه حاوی ۱۰ میکرومولار A23187، به عنوان ایونوفور کلسیم، (سیگما سی۷۵۲۲) تقسیم شد. نمونه‌ها برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن نگهداری شدند.

برای ارزیابی حرکت اسپرم‌ها از میکروسکوپ فازـ کنتراست با بزرگنمایی ٤۰۰ برابر استفاده شد. حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه بر روی لام گذاشته و با لامل ۲۲×۲۲ روی آن پوشانده شد و با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ، از حداقل ۱۰ فیلد هر کدام به مدت حداقل ۱۵ ثانیه فیلم‌برداری شد. حرکت حداقل ۲۰۰ اسپرم بررسی شد و درصد اسپرم‌های با حرکات پیش‌رونده و غیرپیش‌رونده، درصد اسپرم‌های بی‌تحرک مطابق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی تعیین شد(۳۲).

برای تعیین درصد اسپرم‌های مرده و زنده، از روش رنگ‌آمیزی ائوزین استفاده شد، با این روش اسپرم‌های مرده با غشاء پلاسمایی آسیب دیده، رنگ قرمز می‌گیرند. برای تهیه رنگ ائوزین، ۰/۵گرم ائوزین۷ در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۹ درصد سدیم کلراید حل گردید و ۵ میکرولیتر از نمونه با ۵ میکرولیتر از محلول ائوزین، بر روی لام، مخلوط شد. سپس لامل ۲۲×۲۲ روی آن گذاشته و بعد از ۳۰ ثانیه، اسلایدها با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ٤۰۰ برابر مورد بررسی قرار داده شد، حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد. اسپرم‌هایی که رنگ نگرفته بودند، به عنوان زنده و اسپرم‌های که رنگ قرمز گرفته بودند، به عنوان اسپرم مرده شمارش شدند(۳۲).

از حجم ۱۰ میکرولیتر از نمونه هر گروه اسمیر کشیده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در هوای اتاق گذاشته شد تا خشک شود. سپس اسلایدها به مدت۳۰ ثانیه در حوضچه حاوی متانول خالص قرارداده شدند و پس از آن در معرض هوای اتاق گذاشته و خشک شدند و تا زمان انجام آزمایش، داخل فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در روز آزمایش، برای بررسی وضعیت آکروزومی اسپرم‌ها، لکتین FITC-PSA با فسفات بافر سالین(pH=۷/٤) به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق شد. اسلایدها از ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج شدند و در دمای اتاق، قرار داده شدند. هر نمونه در معرض ۵۰µL از محلول

رقیق شده (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) FITC-PSA قرار گرفت و به مدت ۳۰ دقیقه داخل اتاقک مرطوب و تاریک قرار داده شد. در پایان ۳۰ دقیقه اسلایدها به مدت ۱۵ دقیقه در ظرف حاوی آب مقطر گذاشته شد. سپس ۵۰ میکرولیتر DAPI با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر روی اسمیر ریخته شد و ۵ دقیقه در اتاقک مرطوب و تاریک انکوبه شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در ظرف حاوی آب مقطر گذاشته شد و در انتها اسلایدها از نظر واکنش آکروزومی به وسیله میکروسکوپ فلوروسنت با فیلترهای FITC و DAPI در بزرگنمایی ۱۰۰۰X بررسی شدند، به این ترتیب که ابتدا به وسیله فیلتر DAPI هسته سلول‌ها به صورت آبی درخشان تشخیص داده شد و سپس آکروزوم به وسیله فیلتر FITC مورد بررسی قرار گرفت(۳۲). در هر گروه حداقل ۱۰۰ اسپرم شمارش شد و اسپرم‌ها به سه دسته تقسیم شدند. اسپرم‌هایی که در ناحیه سر، رنگ سبز با درخشندگی زیاد داشتند(اسپرم‌های سالم، یعنی اسپرم‌هایی که واکنش آکروزومی نداشته‌اند)، اسپرم‌هایی که در ناحیه سر درخشندگی سبز ضعیفی داشتند(اسپرم‌هایی که واکنش آکروزومی نسبی داده‌اند)، اسپرم‌هایی که تنها ناحیه استوایی آن‌ها درخشندگی داشتند(اسپرم‌هایی که واکنش آکروزومی کامل داده‌اند).

میزان تولید پایه و تحریک شده رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله اسپرم به وسیله سنجش کِمی‌لومینسنس با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌ریدر اندازه‌گیری شد. برای این منظور از پروب لومینول به همراه Horseradish Peroxidase (HRP) استفاده شد. به طور خلاصه ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه شسته شده اسپرم با غلظت ۲۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر در پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد و پروب لومینول حل شده در DMSO با غلظت نهایی ۲۵۰ میکرومولار به آن اضافه گردید. سپس HRP با غلظت نهایی۱۲ واحد در هر میلی‌لیتر جهت تقویت سیگنال حاصله به هر چاهک اضافه گردید. سیگنال کِمی لومینسنس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در گروه های مختلف آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. زمان جمع آوری سیگنال در هر زمان ۱۰ ثانیه بود(۱۵).

میزان کلسیم داخل سلولی به وسیله دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظوراز پروب فلورسنتFluo-3 AM جهت شناسایی کلسیم درون سلولی و ماده فلوروسنت PI به منظور بررسی وضعیت بقای سلول‌ها استفاده شد. به ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه شسته شده اسپرم با غلظت ۱۰ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر پروبFluo-3 AMحل شده در DMSO با غلظت نهایی ۱ میکرومولار اضافه شد. نمونه ها در تاریکی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. پس از ۳۰ دقیقه به منظور حذف رنگ اضافی به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰×g سانتریفوژ شدند، سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب به دست آمده با استفاده از محلول همزـ اف۱۰ مجدداً به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد. پس از آن نمونه‌های همه گروه‌ها به لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری انتقال داده شد و

ماده PI حل شده در بافر فسفات سالین با غلظت نهایی ۵ میکرومولار اضافه شد. تمام مراحل در تاریکی انجام شد. تعداد ۵۰۰۰۰ اسپرم در هر گروه به وسیله دستگاه فلوسیتومتری(بیوساینسس، آمریکا) ارزیابی شد و نتایج با استفاده از نرم افزار FlowJo آنالیز شد(۳۳).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری من‌ویتنی و پیرسون تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نمونه‌ها، در ابتدای آزمایش و پس از شستشو، به صورت تصادفی به دو گروه تازه و منجمد- ذوب شده تقسیم شدند و قبل از این که پروسه انجماد روی نمونه ها صورت گیرد، مشخصات نمونه‌ها از جمله؛ میزان و انواع تحرک، درصد بقا و واکنش آکروزومی بررسی شد. نتایج در جدول ۱ آورده شده است و نشان می دهد که نمونه‌ها در شروع آزمایش از لحاظ حرکت، درصد بقا و درصد اسپرم‌هایی که واکنش آکروزومی خود به خود داشته‌اند، تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند.

درصد کل اسپرم‌های متحرک و درصد اسپرم‌های با حرکت پیشرونده پس از پروسه انجماد- ذوب به طور معنی‌داری کاهش یافت، در حالی که در این شرایط تعداد اسپرم‌های با حرکت غیر پیشرونده و اسپرم‌های بدون تحرک، افزایش پیدا کرد. ارزیابی بقا و وضعیت آکروزومی هم نشان دهنده کاهش بقا و افزایش از دست رفتن آکروزومی پس از پروسه انجماد - ذوب بود(جدول ۱).

حرکت پیشرونده و درصد اسپرم‌های زنده در اسپرم‌های گروه تازه و گروه منجمد- ذوب شده که برای یک ساعت در معرض A23187 داشته‌اند، به طور معنی‌داری کاهش یافت. در این شرایط، تمام اسپرم‌های گروه منجمد- ذوب شده و ۸/۹ ± ۴۰/۴ درصد از اسپرم‌های تازه، بدون تحرک شده بودند(شکل ۱). وجود A23187 در محیط سبب افزایش اسپرم‌های بدون آکروزوم در گروه تازه شد، اما این درصد گروه منجمد- ذوب شده تغییر نکرد؛ لذا در گروه حلال نیز تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد.

لومینول در مواجهه با عوامل اکسید کننده، نوری از خود ساطع می کند که به وسیله دستگاه پلیت ریدر مجهز به لومینوسنس قابل ارزیابی است. در این آزمایش میزان نور ساطع شده به عنوان واحد نسبی نور یا RLU گزارش شده است. واحد نسبی نور در بین گروه‌های آزمایشی حتی در حضور A23187 نیز تفاوت معنی‌داری در گروه‌های آزمایشی از خود نشان نداد، اما وقتی واحد نسبی نور ساطع شده به ازای سلول‌های زنده محاسبه شده، تفاوت آشکار شد. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، اختلاف معنی‌داری بین واحد نسبی نور تولید شده به وسیله سلول‌های زنده، بین گروه‌های تازه و منجمد- ذوب شده هم در حالت کنترل و هم در حضور A23187 مشاهده شد.

در تمام گروه‌های آزمایشی، میزان کلسیم داخل سلولی و بقا اسپرم با روش فلوسیتومتری و با استفاده از پروب‌های فلوروسنت Fluo-3 AM و PI ارزیابی شد و نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است. درصد اسپرم‌های مرده با کلسیم کم در گروه منجمد- ذوب شده به طور معنی‌داری بالاتر از گروه تازه بود و برعکس درصد سلول‌های زنده با کلسیم بالا در اسپرم‌های منجمد- ذوب شده کمتر از گروه تازه بود. گر چه درصد سلول‌های زنده با کلسیم بالا در محیط حاوی A23187 تغییری نیافت، اما شدت متوسط نورفلوروسنت به طور معنی‌داری زیاد شد و در گروه تازه از ۲۴/۶± ۲۸۷/۷ به ۳۶/۳±۵۸۴/۰ و در گروه منجمد- ذوب شده از ۱۲/۸±۱۷۵/۰ به ۳۷/۸±۳۰۰/۰ رسید(شکل ه -۲).

شکل ۳ نشان می دهد که یک رابطه مثبت معنی‌دار(p=۰/۰۳) بین متوسط نورفلوروسنت مربوط به Fluo-3 AM و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرم(بر اساس واحد نسبی نور ساطع شده یا RLU) وجود دارد.

جدول ۱: مشخصات اسپرم‌های گروه تازه و منجمد- ذوب شده در شروع آزمایش و پس از ذوب اسپرم‌های منجمد شده

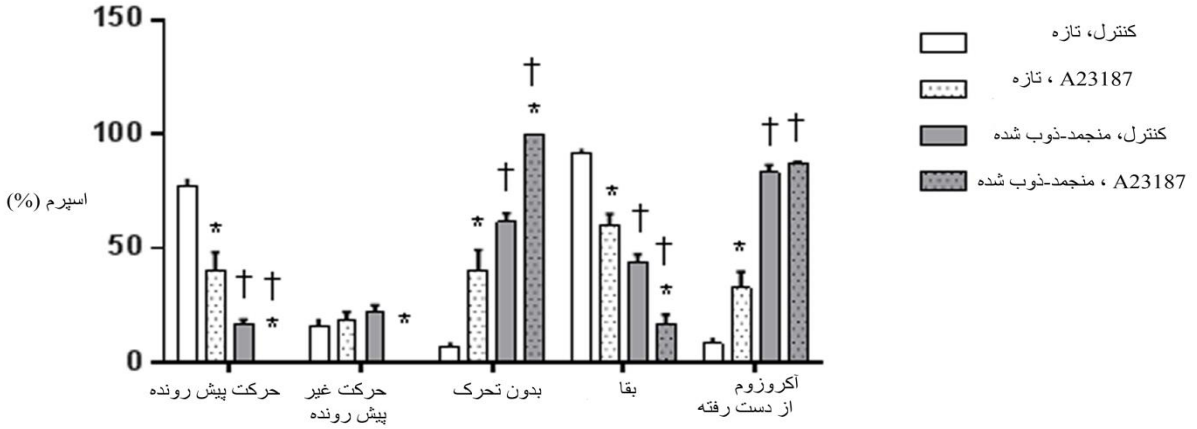
مشخصات اسپرم‌ها(درصد)	گروه تازه (تعداد =۱۸) میانگین ± خطای استاندارد	گروه منجمد - ذوب شده(تعداد =۱۷) میانگین ± خطای استاندارد	
		قبل از پروسه انجماد-ذوب	بعد از ذوب
حرکت پیشرونده	۲/۲ ±۷۱/۲	۲/۰±۷۱/۹	۲/۸±۱۲/۵**
حرکت غیر پیشرونده	۲/۷±۱۷/۶	۱/٤±۱۲/۰	۳/۰±۲۳/٦**
اسپرم های بدون حرکت	۱/۸±۱۱/۱	۱/۳±۱٦/۰	٤/٤±٦۳/۷**
حرکت کل	۸۸/۷± ۱/۸	۱/۳±۸۳/۹	٤/٤±۳٦/۱**
بقا	۱/٤±۹۰/۹	۱/٤±۸۸/۲	۲/۳±٤۳/۱**
واکنش آکروزومی	۸/۳ ±۱/۹	۸/۱ ±۱/٥	۳/۲±۸۳/٤**

**نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با اسپرم‌های تازه و اسپرم‌ها قبل از طی پروسه انجماد- ذوب(p<۰/۰۰۱)

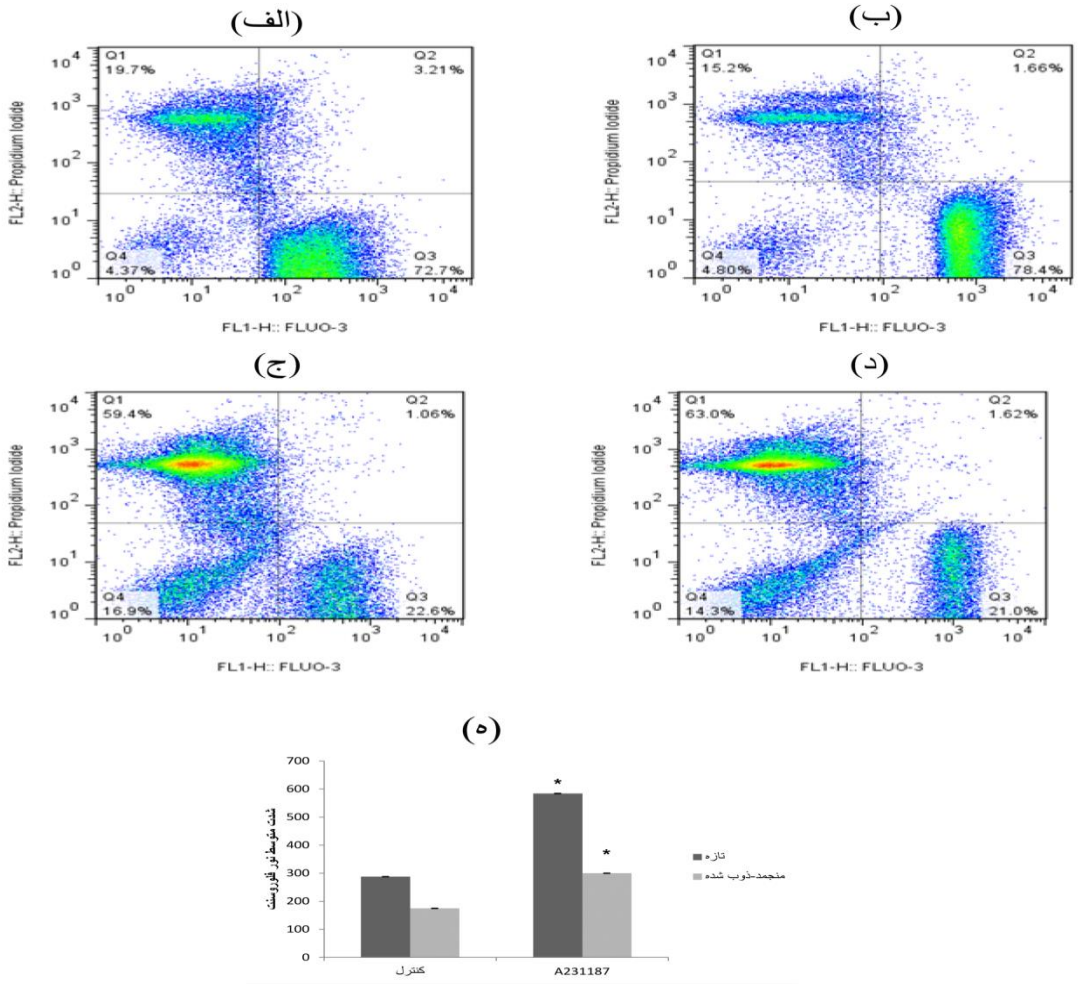
جدول ۲: اثر A23187 بر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گروه‌های تازه و منجمد-ذوب شده

گروه		واحد نسبی نور (RLU) میانگین ± خطای استاندارد	واحد نسبی نور ضربدر ۱۰۰۰۰ به ازاء هر سلول زنده میانگین ± خطای استاندارد
اسپرم های تازه	کنترل	۱۲۲۱۰/۰±۳۹۸۸/۹	٤٤/٥ ±۱٤/۱
	A23187 (۱۰ میکرومولار)	۱٤۹۷۹/۰±۲۲۹۲/٦	۸٤/۳ ±۱۰/۲*
اسپرم های منجمد-ذوب شده	کنترل	۸٤٦۱/۰±٦۰٥/۳	٦۸/۱±۷/۳†
	A23187 (۱۰ میکرومولار)	۱۰٦٦۹/۸±۱٦۳۷/۱	۲۹۸۲/۲±۱۷۷٦/۷*†

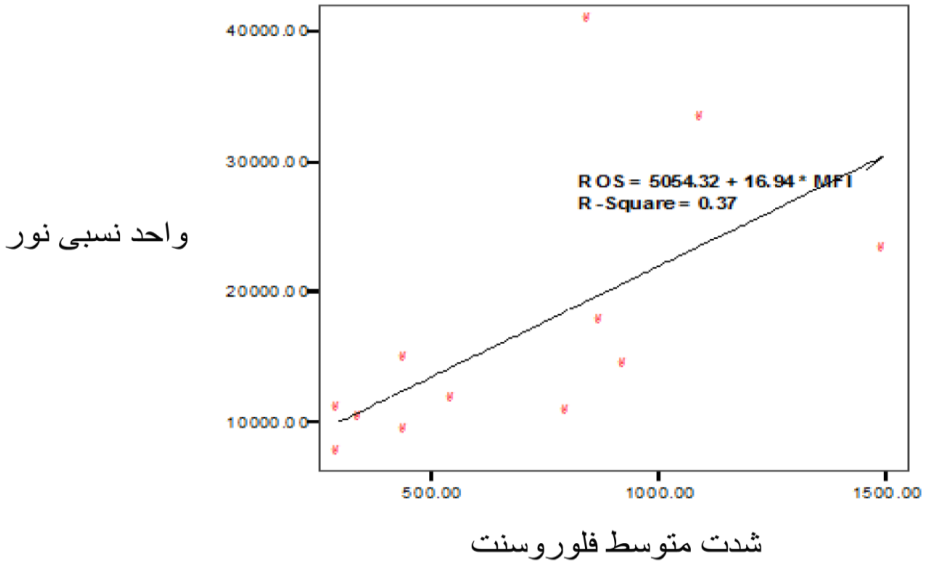
* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل مربوطه(p<۰/۰۱) و † نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با اسپرم تازه(p<۰/۰۰۱)



شکل ۱: اثر A23187 روی حرکت، بقا و وضعیت آکروزوم در گروه تازه و منجمد–ذوب شده. * نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه های کنترل مربوطه (p<۰/۰۰۱) و † نشان دهنده اختلاف معنی دار با اسپرم های تازه مشابه (p<۰/۰۰۱).



شکل ۲: رنگ‌آمیزی فلوروسنت اسپرماتوزوآی انسان با Fluo-3 AM و PI. الف و ب) به ترتیب، اسپرم‌های تازه در گروه کنترل و گروه حاوی A23187. ج و د) اسپرم‌های منجمد–ذوب شده در گروه کنترل و گروه حاوی A23187. ه) شدت متوسط نور فلوروسنت در گروه های آزمایشی.
***** نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه های کنترل مربوطه (**p<۰/۰۱**)



شکل ۳: رابطه بین شدت متوسط نورفلوروسنت ناشی از Fluo-3 AM و شدت نسبی نور

بحث

اسپرم‌ها در طی پروسه انجماد- ذوب، آسیب‌های زیادی می‌بینند که در مجموع به نام آسیب‌های ناشی از انجماد شناخته می‌شود و بخشی از این آسیب‌ها به خاطر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است(٦ و ٥). در ضمن رابطه مثبت بین افزایش کلسیم داخل سلولی و تولید رادیکال‌های آزاداکسیژن نشان داده شده(١٩). وابستگی فعالیت آنزیم NADPH اکسیدازه به کلسیم داخل سلولی نیز اثبات شده است(٢٠). لذا هدف از این مطالعه تعیین رابطه بین غلظت کلسیم داخل سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرماتوزوای تازه و منجمد- ذوب شده انسان بود.

در این مطالعه از روش‌های استاندارد برای انجماد و ذوب اسپرم‌ها استفاده شده، اما به هر حال تعداد اسپرم‌های زنده و درصد کل اسپرم‌های متحرک تا حدود ٥٠ درصد کاهش نشان داد و میزان اسپرم‌هایی که آکروزوم خود را در طی پروسه انجماد - ذوب از دست دادند نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. البته این نتایج دور از انتظار نبود و در تمام پژوهش‌ها نیز به این موارد اشاره شده است و تحت عنوان آسیب‌های ناشی از انجماد از آن یاد می‌شود(٦-١).

پژوهش‌های قبلی نقش کلسیم داخل سلولی در حرکت اسپرم، ظرفیت‌پذیری و توان لقاح و ایجاد واکنش آکروزومی را نشان داده‌اند(٣١، ٣٠، ١١ و ١٢). هر تغییری در غلظت کلسیم داخل سلولی اثرات مهمی بر علمکرد فیزیولوژیک اسپرم می‌گذارد و تغییرات شدید می‌تواند منجر به بروز علایم کلینیکی شود(١١). در مطالعه حاضر با استفاده از اینوفور کلسیم

A23187، کلسیم داخل سلولی را افزایش دادیم و تأثیر آن را بر روی علمکردهای اصلی اسپرم تازه انسان و اسپرمی که پروسه انجماد ـ ذوب را طی کرده است، بررسی نمودیم. در ضمن با استفاده از فلوسیتومتری، کلسیم داخل سلولی را نیز ارزیابی کردیم، دریافتیم که درصد اسپرم‌های زنده حاوی کلسیم بالا بعد از پروسه انجمادـ ذوب، به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد(۷۲/۷ درصد در گروه تازه و ۲۲/٦ درصد در گروه منجمدـ ذوب شده). استفاده از کلسیم اینوفور A23187 باعث ورود کلسیم به داخل سلول می‌شود، استفاده از این ماده در هر دو گروه آزمایشی، میانگین شدت نور فلوروسنت را زیاد کرد که نشان می‌دهد، کلسیم به وسیله این اینوفور به داخل سلول‌هایی که غشا سیتوپلاسمی سالم دارند، وارد شده است و در این سلول‌ها باقی مانده است. اضافه کردن A23187 به محیط سبب افزایش معنی‌دار مرگ سلولی در هر دو گروه آزمایشی شد، نشان داده شده است که مقادیر بالای کلسیم در داخل سلول سبب باز شدن منافذ موقتی در غشا داخلی میتوکندری می‌شود و سیتوکروم سی می‌تواند از این منافذ خارج شود و سبب فعال شدن کاسپاز و ایجاد پدیده‌ای مشابه آپپتوز گردد(۱۳). از این گذشته آسیب ایجاد شده در غشا میتوکندری، سبب اختلال در زنجیره انتقال الکترون شده و تولید ATP را کاهش می‌دهد و در عین حال تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد(۳۵). از طرف دیگر، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم NOX5 به کلسیم داخل سلولی وابسته است و افزایش در کلسیم داخل سلولی، فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد(۱٤). بنابراین یک توضیح محتمل دیگر درباره نحوه تأثیر کلسیم بر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، از طریق افزایش فعالیت NOX5 است(۳۳). کاهش درصد اسپرم‌های زنده، کاهش تحرک اسپرم و کاهش توان لقاح در اسپرم‌های منجمدـذوب شده ممکن است به خاطر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در آنها باشد(٦).

در مطالعه دیگری که بر روی اسپرم‌های تازه انجام شده بود، نشان داده شد که A23187 باعث افزایش کلسیم داخل سلولی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود و در عین حال میزان ATP و حرکت اسپرم را کم می کند(۳٦). مطالعه حاضر نشان داد که اثرات A23187 روی حرکت و بقا اسپرم‌های تازه و ذوب شده کاهشی و مشابه هم است. بر طبق این یافته‌ها، درصد اسپرم‌های زنده با کلسیم بالا، شدت متوسط نور فلوروسنت ناشی از حضور کلسیم و درصد اسپرم‌های زنده در گروه منجمدـذوب شده به طور معنی‌داری از گروه تازه کمتر است. یعنی در طی پروسه انجمادـ ذوب تعداد زیادی از سلول‌ها مرده‌اند و تعداد اسپرم‌های متحرک نیز کمتر از گروه تازه هستند. در مطالعه حاضر نشان داده شد که با اضافه کردن A23187 و افزایش کلسیم داخل سلولی به این سلول‌ها نه تنها به بهبود بقا و

تحرک اسپرم کمکی نمی کند، بلکه اثرات مخرب بیشتری نیز دارد.

این مطالعه نشان داد که تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله سلول‌های ذوب شده زنده نسبت به سلول‌های تازه بیشتر است. A23187 سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در هر دو گروه آزمایشی شد، اما این تأثیر در گروه منجمد ـ ذوب شده بیشتر از گروه تازه بود. به این ترتیب، ما وجود یک رابطه مثبت را بین کلسیم داخل سلولی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرم‌های انسانی نشان دادیم. بعضی گزارش‌ها نشان داده است که کاهش در کلسیم خارج سلولی، اسپرم را از آسیب‌های ناشی از انجماد حفظ می‌کند. استفاده از EDTA سبب کاهش آسیب به آکروزوم شده است و ترکیب EDTA با ترولوکس به عنوان یک آنتی‌اکسیدان توانسته حرکات پیشرونده اسپرم را بهبود دهد(۲۹).

واکنش آکروزومی، یک پروسه وابسته به کلسیم دیگر است که در اسپرم‌های تازه با کمک A23187 القا می شود، ورود کلسیم به اسپرم‌های تازه می‌تواند منجر به اگزوسیتوز آکروزوم شود. درصد اسپرم‌هایی که آکروزوم آنها آسیب دیده است در گروه منجمد ـ ذوب شده، حدود ۸۳ درصد بود و در این شرایط، اضافه کردن A23187 سبب بروز آسیب بیشتر به آکرزوم نشده است، یعنی از قبل و طی پروسه انجماد ـ ذوب آسیب شدید به آکروزوم وارد شده است. یکی از مکانیسم‌هایی که برای آسیب‌های ناشی از انجماد به اسپرم بیان شده است، آسیب به غشا در اثر انجماد است(۲۲) و ایجاد شوک اسموتیک و ایجاد کریستال‌های یخ ممکن است که این آسیب‌های غشایی را ایجاد کنند(۲۳). با این مکانیسم‌ها است که تعداد قابل توجهی از اسپرم‌هایی که منجمد می‌شوند، آسیب می‌بینند و آکروزوم خود را از دست می‌دهند. البته در این مطالعه به طور مستقل آسیب به غشاء سلولی بررسی نشد و تنها آکروزوم مورد بررسی قرار گرفت و بهتر است که آسیب‌های کلی به غشا اسپرم در طی پروسه انجماد ـ ذوب بررسی شود. در ضمن پیشنهاد می شود که اثر آنتی اکسیدان‌هایی که قابلیت نفوذ به داخل سلول دارند نیز بررسی گردد و این بررسی می‌تواند مهر تائیدی بر یافته‌های این مقاله باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت افزایش ورود کلسیم به وسیله کلسیم اینوفور A23187 به اسپرم‌های تازه یا منجمد ــ ذوب شده، سبب آسیب بیشتر به آنها و کاهش حرکت و بقا می‌شود. میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن رابطه مستقیم و معنی‌داری با میزان کلسیم داخل سلولی دارد و هر چند که افزایش کلسیم داخل سلولی برای ایجاد تحرک و ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی لازم است، اما مقادیر بیش از حد فیزیولوژیک آن و افزایش ورود آن به وسیله اینوفور کلسیم، برای سلول آسیب‌زا است. آسیب‌ها در اثر

انجماد با مقادیر زیادتر کلسیم داخل سلولی تشدید می‌شوند و این مسئله ممکن است به خاطر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی با کد اخلاق IR.SUMS.REC.1391.S6159 دانشگاه علوم پزشکی شیراز می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. از کارشناسان محترم مرکز درمان ناباروری شیراز مرجانه کازرونی و عبدالله ذبیحی برای کمک در آنالیز اولیه و جمع‌آوری نمونه‌ها و از کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده پزشکی شیراز برای کمک در انجام فلوسیتومتری صمیمانه سپاسگزاری می‌کنیم.

REFERENCES

1.Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. Journal of assisted reproduction and genetics 2008; 25(8): 403-11.
2.Cankut S, Dinc T, Cincik M, Ozturk G, Selam B. Evaluation of sperm DNA fragmentation via halosperm technique and TUNEL assay before and after cryopreservation. Reprod Sci 2019; 26(12): 1575–81.
3.Saeednia S, Bahadoran H, Amidi F, Asadi MH. Impact of cryopreservation process on viability, nitric oxide and dna apoptosis in fertile human spermatozoa. Anatomical Sciences Journal 2013; 10(4): 17-23.
4.Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. Fertil Steril 2004; 82(4): 913-8.
5.Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, et al. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. Acta Eur Fertil 1995; 26(4): 145-8.
6.Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. Cryobiology 2012; 64: 71–80.
7.Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Cryobiology 2011; 62(1): 40-6.
8.Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. Reprod Biomed Online 2009;18(2): 184-9.
9.Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. Indian Journal of Experimental Biology 2005; 43(11): 963-74.
10.Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. The Indian Journal of Medical Research 2009; 129(4): 357-67.
11.Bansal AK, Bilaspuri G. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Veterinary Medicine International 2011; (2011): 1-7.
12.Thomson 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. Human Reproduction(Oxford, England) 2009; 24(9): 2061-70.
13.Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2008; 93(8): 3199-207.
14.Musset B, Clark RA, DeCoursey TE, Petheo GL, Geiszt M, Chen Y, et al. NOX5 in human spermatozoa: expression, function, and regulation. The Journal of Biological Chemistry 2012; 287(12): 9376-88.
15.Ghani E, Keshtgar S, Habibagahi M, Ghannadi A, Kazeroni M. Expression of NOX5 in human teratozoospermia compared to normozoospermia. Andrologia 2013; 45(5): 351-6.
16.Burnaugh L, Sabeur K, Ball BA. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. Theriogenology 2007; 67(3): 580-9.
17.Tamburrino L, Marchiani S, Minetti F, Forti G, Muratori M, Baldi E. The catSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. Human Reproduction(Oxford, England) 2014; 29(3): 418-28.
18.Li D, Cao W. Role of intracellular calcium and NADPH oxidase NOX5-S in acid-induced DNA damage in Barrett's cells and barrett's esophageal adenocarcinoma cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2014; 306(10): G863-72.
19.Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fertil 1987; 81(2): 459-69.
20.Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, et al. Mechanism of Ca2+ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). The Journal of Biological Chemistry 2004; 279(18): 18583-91.

21.Hajnoczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Sinha Roy S, et al. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca2+ uptake in apoptosis. Cell Calcium 2006; 40(5-6): 553-60.
22.Mishra DP, Pal R, Shaha C. Changes in cytosolic Ca2+ levels regulate Bcl-xS and Bcl-xL expression in spermatogenic cells during apoptotic death. The Journal of Biological Chemistry 2006; 281(4): 2133-43.
23.John Morris G, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. Cryobiology 2012; 64(2): 71-80.
24.Zhang W, Li F, Cao H, Li C, Du C, Yao L, et al. Protective effects of l-carnitine on astheno-and normozoospermic human semen samples during cryopreservation. Zygote 2016; 24: 293–300.
25.Treulen F, Arias ME, Aguila L, Uribe P, Felmer R. Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. Cryobiology 2018; 83: 65-74.
26.Albrizio M, Moramarco AM, Nicassio M, Micera E, Zarrilli A, Lacalandra GM. Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. Theriogenology 2015; 83(3): 421-9.
27.Uumaresan A, Siqueira A, Hossain M, Johannisson A, Eriksson I, Wallgren M, et al. Quantification of kinetic changes in protein tyrosine phosphorylation and cytosolic Ca2+ concentration in boar spermatozoa during cryopreservation. Reproduction, Fertility and Development 2012; 24(4): 531-42.
28.Wang S, Wang W, Xu Y, Tang M, Fang J, Sun H, et al. Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation. Proteomics 2014; 14(2-3): 298-310.
29.Keshtgar S, Iravanpour F, Gharesi-Fard B, Kazerooni M. Combined effect of Trolox and EDTA on frozen-thawed sperm quality. Iranian Journal of Medical Sciences 2016; 41(3): 230-7.
30.Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. Front Biosci 1996; 15(1): 189-205
31.Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Treviño CL, Felix R, Beltrán C. Calcium channels and Ca2+ fluctuations in sperm physiology. Int Rev Cytol 2005; 243: 79-172.
32.World Health Organization(WHO). Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva 2010.
33.Keshtgar S, Ebrahimi B, Shid-Moosavi SM, Erfani N. NADPH oxidase 5 activation; a novel approach to human sperm cryoinjury. Cell Tissue Bank 2020; 21(4): 675-84.
34.Mendoza CCA, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. Journal of Reproduction and Fertility 1992; 95(3): 755-63.
35.Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. American Journal of Physiology Cell Physiology 2004; 287(4): C817-33.
36.Tateno H, Krapf D, Hino T, Sanchez-Cardenas C, Darszon A, Yanagimachi R, et al. Ca2+ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2013; 110(46): 18543-8.

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

The Relation Between Intracellular Calcium Concentration and Reactive Oxygen Species Production in Fresh and Cryopreserved-Thawed Human Spermatozoa

Iravanpour F[1], Keshtgar S[2*], Ebrahimi B[3]

[1] Shiraz Neuroscience Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran,[2]Department of Physiology, School of medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran,[3] Shiraz Geriatric Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 04 Aug 2021 Accepted: 23 Sep 2021

Abstract:

Background & aim: Storing frozen sperm in liquid nitrogen is a widely used method of preserving them for a long time. Many of these sperms are not damaged or survive after thawing, and many lose their motility. These injuries are caused by damage to the sperm membrane and changes in permeability to ions due to changes in osmotic pressure, the formation of ice crystals, and increased production of oxygen free radicals. The aim of the present study was to determine the relationship between intracellular calcium concentration and the production of oxygen free radicals in fresh and frozen human-thawed spermatozoa.

Methods: Thirty-five human sperm were washed and randomly allocated into fresh and frozen-thawed groups. The sperm of the frozen-thawed group were preserved under liquid nitrogen for one month. The effect of 10 µM calcium ionophore A23187 was evaluated on fresh and thawed sperm motility, viability, and acrosome reaction. Oxygen free radical production and intracellular calcium content were evaluated using luminol and Flou-3/AM staining by chemiluminescence and flowcytometric method, respectively. Data were compared using the Mann–Whitney test. $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results: The percentage of alive, motile and progressive sperm and the percentage of sperm with intact acrosome decreased significantly after the freezing-thawing process. The addition of A23187 to the medium increased intracellular calcium in live sperm but decreased the percentage of live and motile sperm in both groups. The production of free radicals increased per live cell in both groups, but this increase was significantly higher in the frozen-thawed group than in the fresh group. The results indicated a significant positive relationship between intracellular calcium and the production of oxygen free radicals.

Conclusion: Calcium ions were required for normal sperm function, but increased calcium entry by A23187 into fresh or frozen-thawed sperm causes more damage and reduced motility and survival. The amount of oxygen free radicals had a direct and significant relationship with intracellular calcium. Freezing damage was exacerbated by higher levels of intracellular calcium, which may be due to increased production of oxygen free radicals.

Keywords: Human spermatozoa, Cryopreservation, Intracellular calcium, Reactive oxygen species, Cryoinjury

***Corresponding Author:** Keshtgar S, Department of Physiology, Shiraz Medical School, Karim Khan Zand Boulevard, Shiraz, Iran

Email address: keshtgar@sums.ac.ir

Please cite this article as follows:

Iravanpour F, Keshtgar S, Ebrahimi B. The Relation Between Intracellular Calcium Concentration and Reactive Oxygen Species Production in Fresh and Cryopreserved-Thawed Human Spermatozoa. Armaghane-danesh 2021; 26(5): 729-743.