Journal of Arak University of Medical Sciences
Volume 28, Issue 6
February& March 2026

Research Article

The Effect of Platelet-Rich Plasma on Parameters of Frozen-Thawed Sperm in Asthentertospermia

Mahsa Soltani[1], Elham Shojafar[2], Ali Asghar Ghafarizadeh[2], Azam Moslemi[3], Maryam Baazm[4,5*]

[1] MSc, Students Research Committee, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[2] PhD, Rastak Infertility Treatment Center, Sina Hospital, Arak, Iran
[3] PhD, Department of Biostatistics, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[4] PhD, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[5] PhD, Molecular and Medicine Research Center, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

*** Corresponding author**: Maryam Baazm, Molecular and Medicine Research Center, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. Email:. dr.baazm@arakmu.ac.ir

DOI: 10.61882/jams.28.6.440

How to Cite this Article:
Soltani M, Shojafar E, Ghafarizadeh AA, Moslemi A, Baazm M. The Effect of Platelet-Rich Plasma on Parameters of Frozen-Thawed Sperm in Asthentertospermia. *J Arak Uni Med Sci*. 2025;**28**(6): 440- 9. DOI: 10.61882/jams.28.6.440

Received: 13.01.2025
Accepted: 30.01.2026
Keywords:
Cryopreservation;
Spermatozoa;
Asthenoteratozoospermia;
Platelet-Rich Plasma

© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Sperm cryopreservation is a crucial method for preserving fertility in patients with asthenoteratozoospermia. However, this process can lead to a reduction in sperm parameters due to the production of free radicals and damage to the cell membrane. Various substances are added to the cryopreservation medium to prevent cellular damage. In this study, platelet-rich plasma (PRP), which contains growth factors and bioactive molecules, was used to improve sperm parameters after freezing.

Methods: Semen samples were collected from 20 men diagnosed with asthenoteratozoospermia. The samples were randomly divided into five groups: control (no PRP), PRP_{50}, PRP_{100}, PRP_{200}, and PRP_{400}. Homologous PRP was prepared and added to the respective groups. The sperm samples were cryopreserved in liquid nitrogen. Twenty days after freezing, samples were thawed and subjected to a comprehensive evaluation of viability, motility, morphology, malondialdehyde (MDA) levels, and DNA fragmentation using specific assay kits. The findings were evaluated using one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test.

Results: The results of this study demonstrated that cryopreservation led to a significant decrease in all sperm parameters in the control group. The addition of PRP at concentrations of 50 and 400 among the concentrations used resulted in a significant increase in total motility, progressive and non-progressive motility, sperm viability, and a decrease in immotile sperm, DNA fragmentation, and MDA levels compared to the control group ($P < 0.05$).

Conclusions: Cryopreservation and subsequent thawing can have detrimental effects on the biological properties of sperm samples. Therefore, the dose-dependent addition of platelet-rich plasma as a cryoprotectant may offer a promising approach to mitigate the negative impacts of freezing on samples from men with asthenoteratozoospermia.

Copyright *© 2024 The Author(s); Published by Journal of Arak University of Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http"//creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) witch permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مقاله پژوهشی

تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت بر پارامترهای اسپرم منجمد– ذوب شده در آستنوتراتواسپرمی

مهسا سلطانی[۱]، الهام شجاع‌فر[۲]، علی‌اصغر غفاری‌زاده[۲]، اعظم مسلمی[۳]، مریم باعزم[۴، ۵*]

[۱] کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۲] دکترای تخصصی، مرکز ناباروری رستاک، بیمارستان سینا، اراک، ایران
[۳] دکترای تخصصی، گروه آمار زیستی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۴] دکترای تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[۵] مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

* نویسنده مسئول: مریم باعزم، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. ایمیل: dr.mbaazm@arakmu.ac.ir

DOI: 10.61882/jams.28.6.440

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۰
واژگان کلیدی:
انجماد؛
اسپرماتوزوآ؛
آستنوتراتواسپرمی؛
پلاسمای غنی از پلاکت

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: انجماد اسپرم، یکی از روش‌های مهم حفظ باروری در بیماران مبتلا به آستنوتراتواسپرمی است. با این وجود، این فرایند به دلیل تولید رادیکال آزاد و آسیب به غشای سلول سبب کاهش پارامترهای اسپرم می‌شود. جهت جلوگیری از آسیب سلولی مواد مختلفی به محیط انجمادی استفاده می‌شود. در این مطالعه جهت بهبود پارامترهای اسپرم پس از انجماد از پلاسمای غنی از پلاکت که حاوی فاکتورهای رشد و مولکول‌های فعال زیستی است استفاده شد.

روش کار: نمونه سمن ۲۰ مرد مبتلا به آستنوتراتواسپرمی به ۵ گروه تقسیم شد: کنترل (فاقد PRP)، PRP_{50}، PRP_{100}، PRP_{200} و PRP_{400}. PRP به صورت هموگ تهیه و به نمونه‌ها اضافه شد. اسپرم‌ها منجمد و در تانک نیتروژن نگهداری شدند. ۲۰ روز بعد از انجام انجماد، نمونه‌ها ذوب و میزان حیات اسپرم، تحرک، مورفولوژی، سطح MDA و میزان شکست DNA اسپرم با استفاده از کیت‌های مربوطه مورد ارزیابی قرارگرفت. یافته‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون تعقیبی Tukey ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که انجماد باعث کاهش قابل توجهی در تمامی پارامترهای اسپرم در گروه کنترل می‌شود. افزودن PRP در غلظت‌های ۵۰ و ۴۰۰ در بین غلظت‌های مورد استفاده موجب افزایش معنی‌داری در تحرک کلی، تحرک پیشرونده و غیر پیشرونده، زنده‌مانی اسپرم‌ها و کاهش اسپرم‌های غیر متحرک، شکست DNA و سطح MDA نسبت به گروه کنترل شد ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: انجماد و ذوب می‌تواند تأثیرات منفی بر عوامل بیولوژیکی در نمونه‌های اسپرم ایجاد کند. از این‌رو، اضافه کردن PRP به عنوان یک ماده محافظت‌کننده به صورت وابسته به دوز می‌تواند یک راهکار امیدوارکننده برای کاهش اثرات منفی انجماد بر نمونه‌های آستنوتراتواسپرمی باشد.

ارجاع: سلطانی مهسا، شجاع‌فر الهام، غفاری‌زاده علی‌اصغر، مسلمی اعظم، باعزم مریم. تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت بر پارامترهای اسپرم منجمد-ذوب شده در آستنوتراتواسپرمی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک* ۱۴۰۴؛ ۲۸ (۶): ۴۴۰ – ۴۴۹.

مقدمه

انجماد و ذخیره‌سازی اسپرم با دو هدف حفظ باروری و درمان ناباروری در بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، بیماری‌های خود ایمنی، بیماری‌های ادراری تناسلی و ناباروری کاربرد دارد (۱). یکی از این بیماری‌های ناباروری که برای افزایش شانس باروری فرایند انجماد در آن صورت می‌گیرد بیماری آستنوتراتواسپرمی است. در این بیماری، تحرک کل اسپرم کمتر از ۴۰ درصد و مورفولوژی طبیعی اسپرم کمتر از ۴ درصد بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی کاهش یافته است (۲). علیرغم مزایایی که انجماد دارد اما این روش منجر به آسیب به غشای پلاسمایی اسپرم، یکپارچگی DNA، کاهش تحرک، زنده‌مانی، مورفولوژی و اختلال در تعادل بین گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) ROS و سطوح آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های اسپرم می‌شود (۳، ۴). و در نهایت به دلیل تولید بیش از حد ROS در طول انجماد کیفیت پارامترهای اسپرم وعملکردهای اسپرم کاهش می‌یابد (۵). در فرایند اسپرم‌زایی، اسپرم بالغ مقدار قابل توجهی از سیتوپلاسم خود را از دست داده و سطح آنتی‌اکسیدان‌های اسپرم کاهش می‌یابد (۶). با توجه به افزایش سطح ROS در طی فرایند انجماد و کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در اسپرم در طی اسپرماتوژنز، کیفیت اسپرم‌ها بعد از فرایند ذوب کاهش می‌یابد. در حال حاضر دستورالعمل‌های گوناگونی برای انجماد اسپرم در سراسر جهان استفاده می‌شود که از لحاظ نوع ماده محافظ انجمادی و نیز روش انجام انجماد باهم تفاوت دارند (۷).

در سال‌های اخیر، پژوهشگران به دنبال راهکارهایی برای کاهش آسیب‌های ناشی از فرایند انجماد و بهبود نتایج آن بوده‌اند. یکی از استراتژی‌های مهم در این زمینه، استفاده ازمواد مختلفی از جمله آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز) و آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی (ویتامین E و C) است. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، از آسیب به سلول‌های اسپرم جلوگیری می‌کنند (۸). یکی از موادی که به دلیل نقش بالقوه آن در بهبود کیفیت اسپرم و افزایش میزان موفقیت درمان های نابارروری مورد توجه قرار گرفته است، پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet-rich plasma) PRP است. PRP یک محصول بیولوژیکی است که به عنوان بخشی از پلاسمای خون با غلظت پلاکت بالاتر از سطح پایه تعریف می‌شود. PRP در حال حاضر در زمینه‌های مختلف پزشکی از جمله بازسازی بافت، ترمیم زخم، بازسازی اسکار، جوانسازی پوست، آلوپسی و تولیدمثل استفاده می شود (۹). فعالیت بیولوژیکی و درمانی PRP عمدتاً ناشی از سیتوکین‌های مختلف موجود در آن ازجمله فاکتور رشد مشتق از پلاکت (Platelet-Derived Growth Factor) PDGF، فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal Growth Factor) EGF، فاکتور رشد شبه انسولین (Insulin-like Growth Factor) IGF، فاکتور رشد عصبی (Nerve Growth Factor) NGF، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor) VEGF، فاکتور رشد هپاتوسیت (Hepatocyte Growth Factor) HGF و یون‌های کلسیم، روی، هیستامین، سروتونین و سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase) SOD می‌باشد که ازعوامل مهم برای حفظ هموستاز بافت و سلول هستند (۱۰).

تزریق PRP به بیضه‌ها در مردان مبتلا به واریکوسل با تحریک آنژیوژنز باعث افزایش خونرسانی به بافت بیضه و درنتیجه بهبود پارامترهای اسپرم می‌شود. همچنین قطر لوله‌های منی‌ساز را افزایش داده و عملکرد سلول‌های سرتولی و لایدیگ را تنظیم می‌کند (۱۱). مطالعات نشان داد انکوباسیون نمونه‌های اسپرم با PRP باعث بهبود غلظت اسپرم، حرکت اسپرم، حرکت پیشرونده، مورفولوژی اسپرم در مردان تحت درمان ناباروری می‌شود (۱۲). همچنین افزودن PRP به محیط انجماد نمونه منی نرمال باعث بهبود حرکت پیشرونده اسپرم، زنده‌مانی اسپرم و یکپارچگی غشای اسپرم پس از انجماد می‌شود (۱۳). مکانیسم دقیق نحوه عملکرد PRP در فرایند انجماد اسپرم هنوز به طور کامل شناخته نشده است. با این حال، تصور می‌شود که فاکتورهای رشد و مولکول‌های فعال زیستی موجود در PRP به حفظ یکپارچگی غشاهای اسپرم، حفظ تحرک اسپرم و کاهش آسیب DNA در هنگام انجماد و ذوب کمک می‌کنند (۱۴). با افزودن PRP به نمونه اسپرم قبل از انجماد، این فرضیه وجود دارد که خواص محافظتی PRP می‌تولند کیفیت اسپرم پس از ذوب را افزایش دهد و به طور بالقوه شانس لقاح و بارداری موفق را بهبود بخشد (۱۳). با توجه به کاهش توانایی اسپرم‌های افراد مبتلا به آستنوتراتواسپرمی به دنبال انجماد، هدف از این مطالعه، استفاده از PRP هترولوگ جهت بهبود شرایط اسپرم این افراد متعاقب انجماد بود.

روش کار

در این مطالعه آزمایشگاهی، ۲۰ مرد داوطلب در محدوده سنی ۲۰ تا ۴۰ سال با تشخیص آستنوتراتواسپرمی (تحرک ≤۴۰ درصد و مورفولوژی ≥ ۴ درصد) که به مراکز ناباروری شهر اراک مراجعه کردند، شرکت نمودند. افراد مبتلا به عفونت‌های دستگاه ادراری تناسلی، آزواسپرمی، الیگواسپرمی شدید یا لوکوسیتواسپرمی، سابقه مثبت کریپتورکیدیسم یا واریکوسل، بیماری‌های سیستمیک اختلالات هورمونی، چاقی، سابقه مصرف الکل، دیابت، سیگار و اعتیاد از مطالعه خارج شدند. هیچ یک از شرکت‌کنندگان در طول مطالعه از داروهای تجویزی، مکمل‌های ویتامینی، الکل یا دخانیات استفاده نمی‌کردند (۱۵). نمونه‌های منی با روش خودارضایی و با رعایت دوره پرهیز جنسی ۳ تا ۵ روزه با استفاده از ظروف مخصوص استریل و غیرسمی جمع‌آوری شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک (IR.ARAKMU.REC.1403.019) مورد تأیید قرار گرفت و تمامی شرکت‌کنندگان رضایت‌نامه آگاهانه را برای شرکت در مطالعه امضا نمودند.

آماده‌سازی نمونه‌های اسپرم

در این مطالعه تجربی، ابتدا نمونه‌های مایع منی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت مایع‌شدن انکوبه شدند. سپس، با حجم مساوی از محیط Ham's/F10 (HF10؛ BioIdea، ایران) با مایع منی جهت شستشو مخلوط و به مدت ۶ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، ۵۰۰ میکرولیتر HF10 به رسوب اضافه شد. سپس نمونه‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند: کنترل (فاقد PRP)، PRP50، PRP100، PRP200 و PRP400 (۱۶، ۱۷). مایع منی به تدریج با حجم مساوی از PRP مخلوط شد و به دنبال آن محیط انجماد اسپرم (Cooper Surgical، دانمارک) به مخلوط اضافه گردید. کریوویال‌های حاوی نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بالای بخار نیتروژن مایع در ارتفاع ۳-۵ سانتی‌متری از سطح نیتروژن مایع قرار گرفتند و پس از آن بلافاصله در تانک نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. پس از ۲۰ روز، کریوویال‌ها در حمام آب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب شدند. HF10 حاوی ۱۰ درصد آلبومین سرم انسانی (Kedrion SpA، ایتالیا) به هر نمونه اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل برای ارزیابی پارامترهای اسپرم مورد استفاده قرار گرفت (۱۸).

آماده‌سازی پلاسمای غنی از پلاکت

برای تهیه PRP هترولوگ، نمونه خون از یک داوطلب گرفته شد و از کیت PRP (رویاژن، ایران) طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. به طور خلاصه، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ضد انعقاد به ۸/۵ میلی‌لیتر خون اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰g سانتریفیوژ گردید. سپس، مایع رویی حاصل مجدداً به مدت ۶ دقیقه با سرعت ۳۳۰۰g سانتریفیوژ شد. دو سوم بالایی پلاسمای فاقد پلاکت دور ریخته شد و یک سوم پایینی که حاوی PRP بود باقی ماند. تعداد پلاکت‌ها با استفاده از دستگاه آنالایزر سلولی تعیین شد. برای فعال‌سازی PRP و آزادسازی فاکتورهای رشد، نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند و سپس قبل از استفاده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق ذوب شدند (۱۶).

آنالیز اسپرم: تحرک، تعداد، مورفولوژی و زنده‌مانی

پس از ذوب هر نمونه، پارامترهای اسپرم شامل تحرک کلی، تحرک پیشرونده، تحرک غیر پیشرونده و درصد اسپرم‌های بی‌حرکت با استفاده از

دستگاه Computered-assisted semen analysis: CASA و بر اساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت ارزیابی شدند. برای این منظور، ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی لام شیشه‌ای مخصوص در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و تعداد ۲۰۰ اسپرم در سه میدان میکروسکوپی مختلف شمارش شدند و نتایج به صورت درصد گزارش گردید (۱۹).

برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم، از کیت رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین (ایده ورزان فردا، ایران) استفاده شد. از نمونه‌ها بر روی لام شیشه‌ای اسمیر تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی، اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ x بررسی شدند (۱۳).

برای بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها از کیت رنگ‌آمیزی Diff-Quick (ایده ورزان فردا، ایران) استفاده شد. از نمونه‌ها بر روی لام اسمیر تهیه شد و اجازه داده شد تا در دمای اتاق خشک شود. سپس مراحل رنگ‌آمیزی طبق دستورالعمل کیت انجام شد. ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ x، در هر نمونه بررسی گردید. درصد اسپرم از نظر مورفولوژیکی نرمال گزارش شد (۱۳).

تست شکست DNA/اسپرم

قطعه قطعه شدن DNA اسپرم با استفاده از کیت DFI (ایده ورزان فردا، ایران) ارزیابی شد. برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از نمونه اسپرم با آگارز از قبل گرم شده مخلوط شد. سپس، ۲۵ میکرولیتر از این مخلوط را با دقت روی لام موجود در کیت قرار گرفت. لامل برای پخش یکنواخت نمونه بر روی لام قرار داده شد. لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، لامل با دقت برداشته و رنگ‌آمیزی مطابق پروتکل انجام شد. ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰ x در هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

بررسی سطح Malondialdehyde (MDA)/اسپرم

سطح MDA برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی در نمونه‌های اسپرم منجمد- ذوب شده اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری MDA با استفاده از کیت MDA (کوشان زیست، ایران) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. پس از ذوب، نمونه‌های اسپرم با استفاده از امواج ماورای صوت به مدت ۱۰ دقیقه لیز شدند و سپس با سرعت ۴۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. از مایع رویی برای سنجش استفاده شد. سطح MDA در هر نمونه با واکنش رنگ‌سنجی با معرف تیوباربیتوریک اسید در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت تعیین شد که حداکثر جذب آن در طول موج ۵۳۰ نانومتر می‌باشد (۲۱).

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. تفاوت معنی‌دار آماری بین مقادیر میانگین با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون تعقیبی Tukey ارزیابی شد. مقدار $P < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأثیر PRP بر تحرک اسپرم

در این مطالعه، تحرک کلی شامل اسپرم‌هایی با تحرک پیشرونده و غیر پیشرونده می‌باشد. تحرک پیشرونده شامل اسپرم‌هایی بود که به شکل سریع یا آهسته به سمت جلو در یک مسیر مستقیم یا دوار حرکت می‌کردند. اسپرم‌هایی با تحرک غیر پیش‌رونده شامل اسپرم‌هایی بود که به دور خود می‌چرخیدند و یا به صورت درجا دارای حرکت در دم بودند. اسپرم‌های غیر متحرک شامل اسپرم‌هایی بود که فاقد هرگونه تحرکی بودند. نتایج نشان داد که درصد تحرک کلی اسپرم (شکل-A۱)، تحرک پیشرونده (شکل-B۱) و غیر پیشرونده (شکل-C۱)، در گروه‌های PRP_{50} و PRP_{400} به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). علاوه بر این، درصد اسپرم‌های بی‌حرکت در این گروه‌های آزمایشی به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت($P < ۰/۰۵$) (شکل-D۱).

تأثیر PRP بر زنده‌مانی اسپرم

در بررسی زنده‌مانی، اسپرم‌های بی‌رنگ به عنوان زنده و اسپرم‌های صورتی یا قرمز به عنوان اسپرم‌های مرده شمارش شدند (شکل-A۲). فرایند انجماد و ذوب منجر به کاهش معنی‌داری در درصد اسپرم‌های زنده در گروه کنترل گردید. در مقابل، در تمام گروه‌های درمان شده با PRP، افزایش معنی‌داری در درصد زنده‌مانی اسپرم مشاهده شد ($P < ۰/۰۱$). قابل ذکر است، درمان با PRP در غلظت ۵۰ و ۴۰۰ اثرات بارزتری را در مقایسه با سایر گروه‌های تجربی نشان دادند ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل-B۲).

تأثیر PRP بر مورفولوژی اسپرم

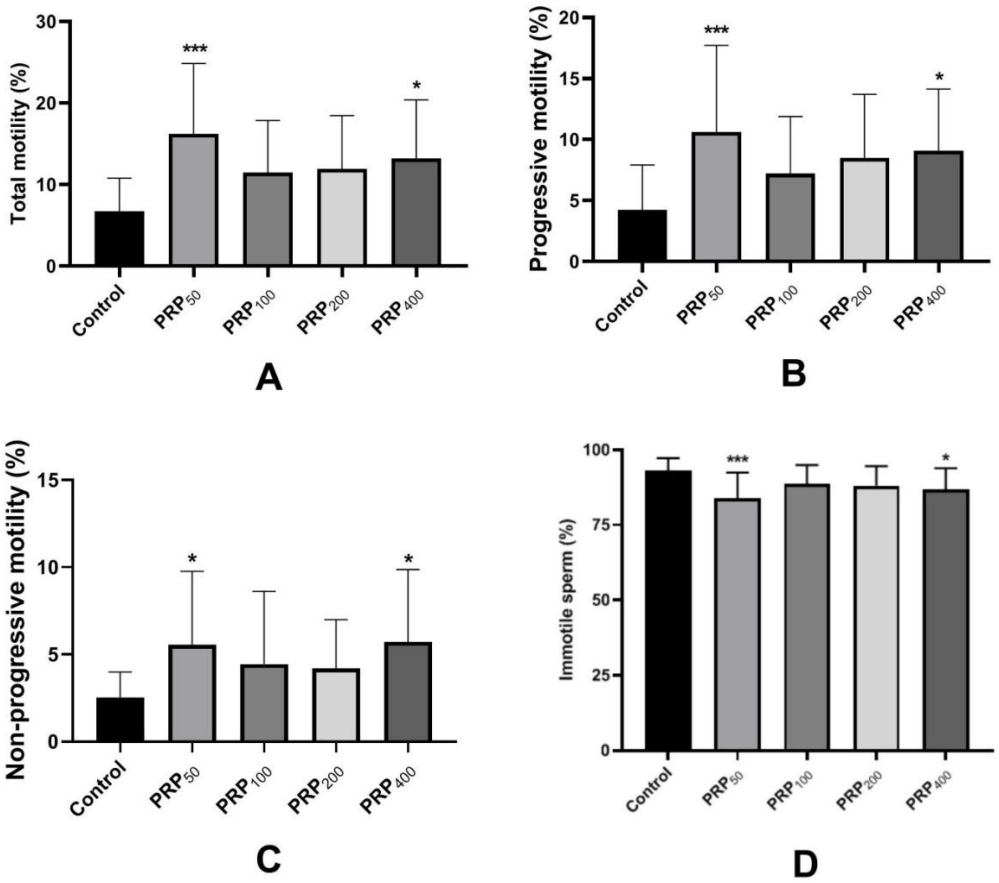
جهت بررسی مورفولوژی اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف، از رنگ‌آمیزی diff-quick استفاده شد (شکل-۳). نتایج نشان داد که PRP در غلظت‌های ۵۰ (۰/۷۹۱۷ ±۰/۱۸۰۴)، ۱۰۰ (۰/۸۳۳۳ ± ۰/۱۷۷۲)، ۲۰۰ (۱/۱۶۷ ± ۰/۲۴۵۷) و ۴۰۰ (۱/۱۲۵ ± ۰/۲۲۷۷) موجب تغییر معنی‌داری در مورفولوژی اسپرم پس از انجماد و ذوب نشد (جدول ۱).

تأثیر PRP بر شکست DNA/اسپرم

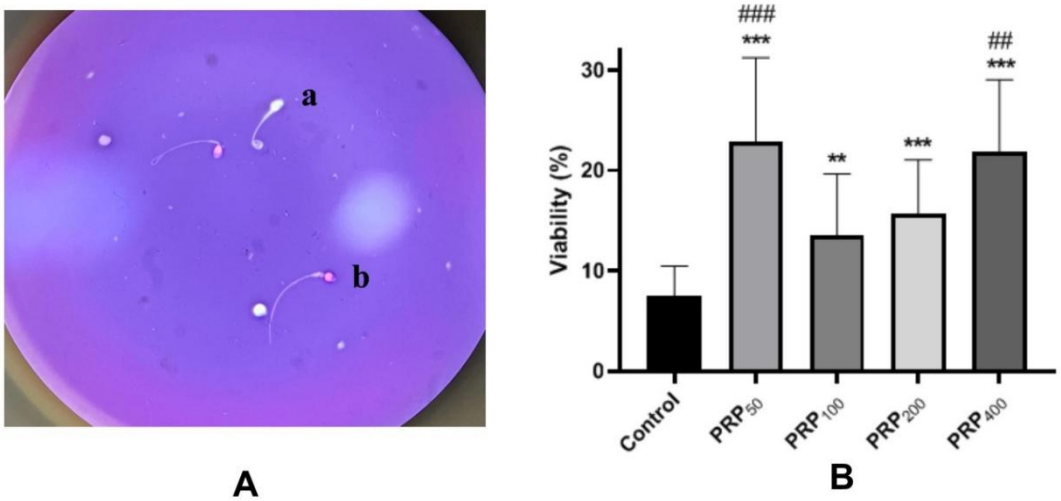
اندازه هاله اطراف هر هسته اسپرم، نشان‌دهنده میزان شکست DNA است. هاله‌های بزرگ یا متوسط نشان‌دهنده DNA سالم و هاله‌های کوچک یا غیر قابل مشاهده نشان‌دهنده قطعه قطعه شدن DNA بودند (شکل-A۴ و B). بر اساس داده‌های ما، درصد شکست DNA در گروه کنترل کمتر از سایر گروه‌ها بود. در این مطالعه از PRP جهت کاهش شکست DNA استفاده شد. افزودن PRP (در تمام غلظت‌های مورد بررسی) به محیط انجماد به طور قابل‌توجهی باعث کاهش شکست DNA شد ($P < ۰/۰۰۱$). در بین گروه‌های درمانی، PRP در غلظت ۵۰ و ۴۰۰ در کاهش شکست DNA مؤثرتر از سایر گروه‌های درمانی بودند ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل-C۴).

تأثیر PRP بر سطح MDA/اسپرم

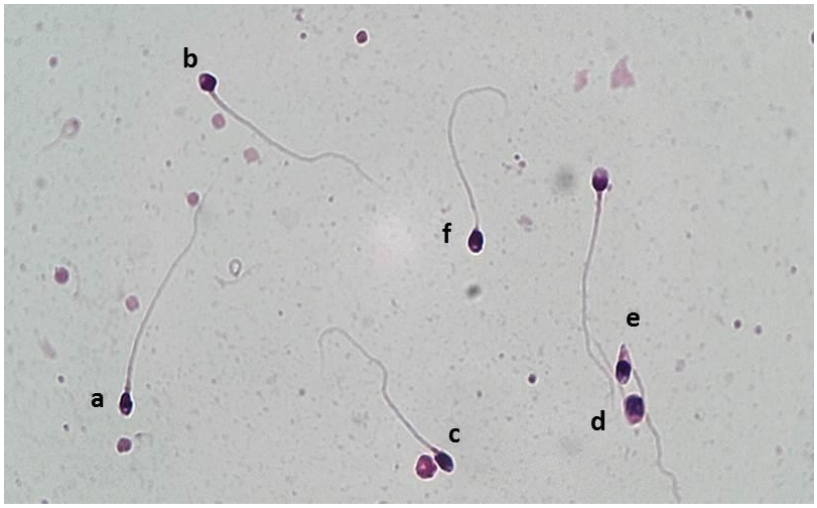
داده‌های ما نشان داد که فرایند انجماد اسپرم باعث افزایش سطح MDA می‌شود، در حالی که استفاده از تمامی غلظت‌های PRP سطح MDA را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($P < ۰/۰۰۱$). در بین گروه‌های درمانی، PRP در غلظت ۵۰ و ۴۰۰ کاهش بیشتری در سطوح MDA نسبت به گروه‌ها PRP با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ نشان دادند ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۵).



شکل ۱. میزان تحرک در اسپرم‌های منجمد- ذوب شده افراد مبتلا به آستنوتراتواسپرمی در گروه های مورد آزمایش. نتایج نشان داد که درصد تحرک کلی اسپرم (A)، تحرک پیشرونده (B) و غیر پیشرونده (C)، در گروه‌های PRP50 و PRP400 به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. درصد اسپرم‌های بی‌حرکت (D) در گروه‌های PRP50 و PRP400 به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. *: معنی‌دار با گروه کنترل (P < ۰/۰۵)؛ ***: معنی‌دار با گروه کنترل (P < ۰/۰۰۱).



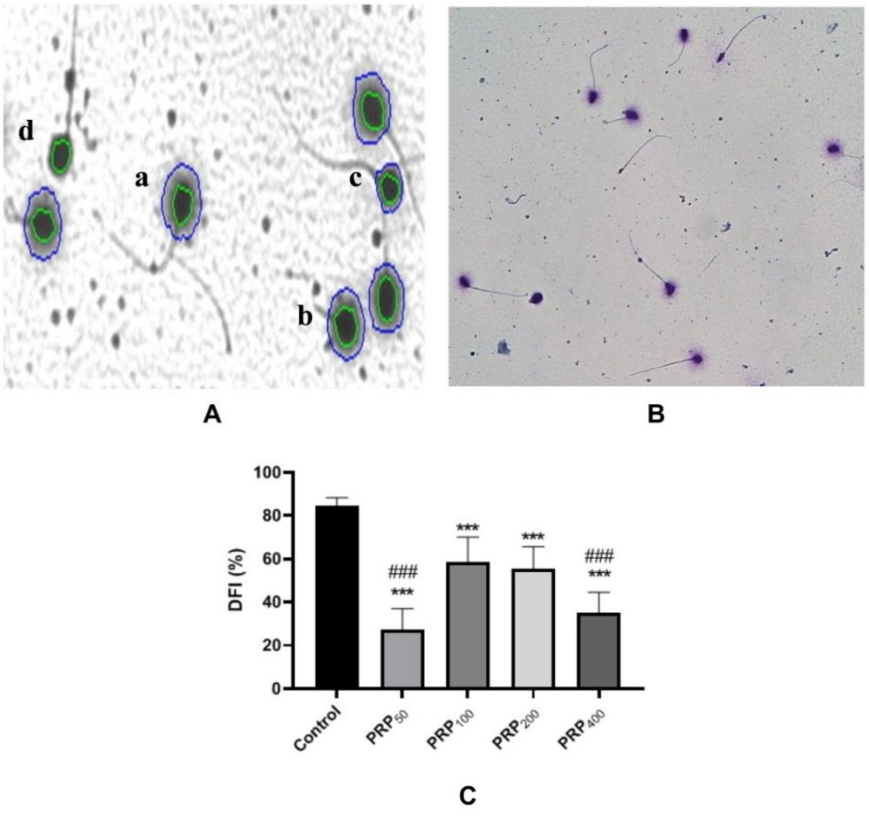
شکل ۲. میزان حیات اسپرم‌های منجمد- ذوب شده افراد مبتلا به آستنوتراتواسپرمی در گروه‌های مورد آزمایش. A) رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین. اسپرم زنده (a)، اسپرم مرده (b). B) استفاده از PRP در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ موجب افزایش معنی‌دار زنده مانی اسپرم در مقایسه با گروه کنترل شد. درصد اسپرم‌های زنده در گروه PRP با غلظت ۵۰ و ۴۰۰ در مقایسه با غلظت‌های ۲۰۰ و ۱۰۰ افزایش معنی‌داری داشت. **: معنی‌دار با گروه کنترل (P < ۰/۰۱)؛ ***: معنی‌دار با گروه کنترل (P < ۰/۰۰۱)؛ ##: معنی‌دار با سایر گروه‌های درمانی (P < ۰/۰۱)؛ ###: معنی‌دار با سایر گروه‌های درمانی (P < ۰/۰۰۱).



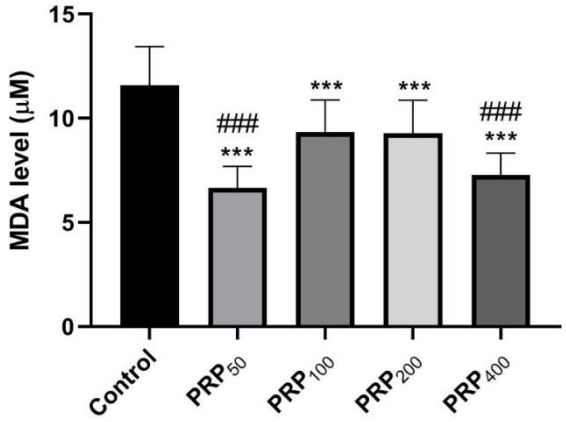
شکل ۳. مورفولوژی اسپرم‌های منجمد- ذوب شده با استفاده از سیستم CASA. a: سر کوچک، b: سرگلابی شکل، c: سر مخروطی، d: سر بزرگ، e: قطعه میانی ضخیم، f: اسپرم نرمال.

جدول ۱. میزان مورفولوژی اسپرم‌های منجمد- ذوب شده افراد مبتلا به آستنوتراتواسپرمی در گروه‌های مورد آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد.

کنترل	PRP_{50}	PRP_{100}	PRP_{200}	PRP_{400}
۰/۱۶۸۲±۰/۶۲۵۰	۰/۱۸۰۴±۰/۷۹۱۷	۰/۱۷۷۲±۰/۸۳۳۳	۰/۲۴۵۷±۱/۱۶۷	۰/۲۲۷۷±۱/۱۲۵



شکل ۴. میزان شکست DNA اسپرم‌های منجمد- ذوب شده افراد مبتلا به آستنوتراتواسپرمی در گروه‌های مورد آزمایش. A) تصویر شکست DNA با استفاده از سیستم CASA . B) تصویر شکست DNA با استفاده از میکروسکوپ نوری a: هسته اسپرم با هاله بزرگ (بدون قطعه قطعه شدن DNA)، b: هسته اسپرم با هاله متوسط (بدون قطعه قطعه شدن DNA)، c: هسته اسپرم با هاله کوچک (با قطعه قطعه شدن DNA) و d: هسته اسپرم بدون هاله (با آسیب شدید DNA). C) میزان شکست DNA اسپرم در گروه‌های PRP با غلظت‌های ۴۰۰ ، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. همچنین استفاده از PRP با غلظت ۵۰ و ۴۰۰ باعث کاهش معنی‌داری در میزان شکست DNA در مقایسه با گروه‌های ۲۰۰ و ۱۰۰ شد. ***: معنی‌دار با گروه کنترل ($P < ۰/۰۰۱$)؛ ###: معنی‌دار سایر گروه‌های درمانی ($P < ۰/۰۰۱$).



شکل ۵. میزان سطح MDA اسپرم‌های منجمد- ذوب شده افراد مبتلا به آستنوتراتواسپرمی در گروه‌های مورد آزمایش. میزان سطح MDA اسپرم در گروه‌های PRP با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. همچنین استفاده از PRP با غلظت ۵۰ و ۴۰۰ باعث کاهش معنی‌داری در سطح MDA در مقایسه با گروه‌های ۲۰۰ و ۱۰۰ شد. ***: معنی‌دار با گروه کنترل ($P < ۰/۰۰۱$)؛ ###. معنی‌دار با سایر گروه‌های درمانی ($P < ۰/۰۰۱$).

بحث

در این مطالعه جهت کاهش اثرات مضر انجماد بر اسپرم افراد مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمی از پلاسمای غنی از پلاکت هترولوگ با دوزهای مختلف استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد PRP هترولوگ به صورت وابسته به دوز سبب بهبود کیفیت اسپرم‌های منجمد شده می‌شود.

یکی از اختلالات ناباروری در مردان که جهت حفظ اسپرم مناسب برای باروری از انجماد اسپرم استفاده می‌شود، آستنوتراتوزواسپرمی است. با توجه به اختلال در مورفولوژی و تحرک اسپرم این افراد، ممکن است در زمان لقاح اسپرم با کیفیت مناسب در مایع منی وجود نداشته باشد، از این‌رو از انجماد اسپرم جهت حفظ باروری این افراد استفاده می‌شود (۲). اما این فرایند دارای مشکلات و عوارض مخرب بر عملکرد اسپرم است (۳). مطالعه ما نشان داد، فرایند انجماد- ذوب، باعث کاهش قابل توجه کیفیت پارامترهای اسپرم از جمله تحرک کلی، تحرک پیشرونده و غیر پیشرونده، زنده‌مانی اسپرم‌ها و افزایش اسپرم‌های غیرمتحرک، شکست DNA و سطح MDA در گروه کنترل در مقایسه با گروه‌های درمانی می‌شود. فرایندهای انجماد و ذوب با استرس اکسیداتیو مرتبط هستند که می‌توانند عملکرد و باروری اسپرم را مختل کنند. در شرایط استرس اکسیداتیو، رادیکال‌های آزاد تولید شده، از جمله رادیکال‌های هیدروکسیل، آنیون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن، بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها غلبه می‌کنند. استرس اکسیداتیو از طریق آسیب به غشا سلول و DNA اسپرم اثرات سمی بر باروری اسپرم دارد (۲۲).

در حین انجماد، زمانی که دما به صفر می‌رسد، تولید ATP متوقف می‌شود و با توقف تولید ATP، سلول می‌میرد و یا به حالت خواب می‌رود و تمام فعالیت‌های آن متوقف می‌شود. آسیب سلولی زمانی رخ می‌دهد که سلول از حالت عادی به حالت منجمد و سپس به حالت عادی برمی‌گردد. در طول سال‌ها، روش‌ها و محیط‌های مختلفی برای انجماد اسپرم انسانی و کاهش آسیب‌های ناشی از فرایند انجماد و ذوب پیشنهاد شده است (۲۳). استفاده از عوامل محافظتی مانند آنتی‌اکسیدان‌ها و ویتامین‌ها می‌تواند اثرات مخرب انجماد اسپرم را کاهش دهد و کیفیت اسپرم را پس از ذوب بهبود بخشد (۸). در این پژوهش جهت حفظ اسپرم‌ها در مقابل فرایند انجماد از PRP هترولوگ استفاده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن PRP هترولوگ به عنوان عامل محافظتی در برابر انجماد به صورت وابسته به دوز توانست سبب بهبود تحرک کلی، حرکت پیشرونده اسپرم، افزایش زنده مانی اسپرم و کاهش درصد اسپرم‌های بی‌حرکت، کاهش قطعه قطعه شدن DNA، کاهش سطح MDA به‌عنوان شاخص آسیب اکسیداتیو نسبت به گروه کنترل شود. طبق مطالعه ما، PRP هترولوگ در غلظت‌های ۵۰ و ۴۰۰ اثر محافظتی بیشتری بر تحرک، زنده‌مانی، یکپارچگی DNA اسپرم و کاهش سطح MDA داشت. این اثر مفید را می‌توان به فاکتورهای رشد موجود در PRP نسبت داد. PRP حاوی فاکتورهای رشد مختلفی مانند PDGF، IGF، VEGF، SOD، NGF، فاکتور رشد تبدیل کننده بتا (Transforming Growth Factor-β: TGF-β)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (Brain-Derived Neurotrophic Factor) BDNF، فاکتور رشد فیبروبلاست (Fibroblast Growth Factor) FGF و سروتونین است (۶).

FGF موجود در PRP می‌تواند اثرات خود را با افزایش فسفوریلاسیون گیرنده FGF موجود در تاژک‌های اسپرم و فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ مختلف از جمله کیناز که توسط سیگنال‌های خارج سلولی و پروتئین کیناز B تنظیم می‌شود، اعمال کند و درصد تحرک پیشرونده اسپرم را افزایش‌دهد (۱۴). Saucedo و همکاران نشان دادند که انکوباسیون نمونه اسپرم انسان با FGF2 منجر به افزایش در درصد حرکت کلی و پیشرونده اسپرم می‌شود (۱۴).

NGF به عنوان ماده موجود درPRP با تنظیم گیرنده‌های خود در قطعه میانی اسپرم زنده‌مانی و تحرک اسپرم را افزایش می‌دهد همچنین با افزایش سطح نیتریک اکسید داخل سلولی آپوپتوز و آسیب اکسیداتیو ناشی از انجماد را کاهش می‌دهد (۲۴).

وجود VEGF و گیرنده‌های آن در سیستم تولید مثل مردان تأیید شده است، پروتئین VEGF به طور قابل توجهی در اسپرماتیدها، پلاسمای منی، سلول‌های سرتولی و لیدیگ تشخیص داده شده است (۲۵).

Tohidnezhad و همکاران در مطالعه خود نشان دادند VEGF با کاهش استرس اکسیداتیو از طریق مسیر Nrf2، تحرک اسپرم را حفظ می‌کند (۲۶). در مطالعه Iyibozkurt و همکاران، نشان داده شد که انکوباسیون نمونه اسپرم با VEGF اثرات مفیدی بر تحرک اسپرم دارد (۲۵).

IGF-I در بافت بیضه، سلول‌های زایا و پلاسمای منی یافت شده است. ارتباط مستقیمی بین سطح IGF-I و کیفیت مایع منی وجود دارد. همچنین گیرنده IGF-I در غشای پلاسمایی اسپرم بیماران با سابقه شکست های مکرر لقاح وجود ندارد (۲۷). این ماده تأثیرات مثبتی بر روی غشای پلاسمایی اسپرم، یکپارچگی غشای آکروزومی و پایداری DNA اسپرم انسان دارد (۱۳) و با افزایش غلظت یون‌های کلسیم داخل سلولی و بهبود انتقال کلسیم، تحرک پیشرونده اسپرم را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، IGF-I با حفظ پروتئین‌های غشای اسپرم مانند کالمودولین و

درمسیدین و همچنین پروتئین‌های مرتبط با غشای آکروزوم، آسیب‌های ناشی از انجماد را کاهش می‌دهد (۲۸). همچنین ممکن است با حفظ سیتوکروم C در میتوکندری و کاهش فعالیت کاسپاز-۳ از آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری کند (۲۹).

از اجزای دیگر PRP می‌توان به BDNF اشاره کرد. BDNF به عنوان یک فاکتور نورون‌زا شناخته می‌شود که تأثیر قابل توجهی در حفظ سلامت اسپرم دارد. mRNA و پروتئین BDNF در قسمت‌های مختلف اسپرم انسان، از جمله سر، گردن و دم بیان می‌شوند. ناهنجاری در بیان BDNF ممکن است با پاتوژنز اختلالات ناباروری مردان ارتباط داشته باشد. BDNF با تنظیم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش مرگ سلولی می‌تواند به بهبود کیفیت اسپرم کمک کند.

علاوه بر این، برخی پژوهشگران نشان داده‌اند که BDNF در کاهش آپوپتوز نقش مؤثری دارد و این کار را از طریق فعال‌سازی مسیرهای مختلفی مانند مسیر کیناز فسفاتیدیل اینوزیتول PIK۳ / AKT۳ انجام می‌دهد. BDNFهمچنین باعث افزایش بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 و کاهش فعال‌سازی کاسپازهای ۲ و ۳ می‌شود. سروتونین، یکی دیگر از اجزای PRP می‌باشد که می‌تواند سرعت حرکت خطی اسپرم را بهبود بخشد (۳۰). PDGF و TGF-β عوامل دیگری در PRP هستند که می‌توانند بر کیفیت اسپرم مانند حرکت و زنده‌مانی تأثیر مثبت بگذارند (۳۱).

در مطالعه ما PRP تأثیر معنی‌داری بر مورفولوژی اسپرم نداشت. Fazli و همکاران در مطالعه خود نشان دادند، تزریق PRP به بیضه مردان مبتلا به الیگوآستنوتراتوزواسپرمی تفاوت معنی‌داری در مورفولوژی ایجاد نمی‌کند (۲۴). اما Hernández-Corredor و همکاران در مطالعه خود نشان دادند، PRP تحرک و مورفولوژی اسپرم قوچ را بهبود می‌بخشد (۳۲). عدم تغییر در مورفولوژی اسپرم در مطالعه حاضر ممکن است به این دلیل باشد که نمونه‌های آستنوتراتوزواسپرمی مورفولوژی بسیار پایینی دارند. در این مطالعه، اگرچه نمونه‌های آستنوتراتوزواسپرمی درصد بالایی از آسیب DNA را داشتند، اما PRP در کلیه غلظت‌ها بویژه غلظت‌های ۵۰ و ۴۰۰ توانست به طور قابل توجهی قطعه قطعه شدن DNA و سطح MDA را کاهش دهد. انجماد با تولید بیش از حد ROS با آسیب به DNA اسپرم مرتبط است و می‌تواند منجر به شکست‌های رشته‌ای DNA، پیوندهای متقابل DNA و تغییرات کروموزومی شود (۳۳).

PRP منجر به افزایش قابل توجهی در بیان ژن NRF2 و متعاقباً افزایش بیان آنزیم‌های اکسیداتیو مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود (۳۴).

در مطالعه حاضر، افزودن PRP هترولوگ در غلظت‌های ۵۰ و ۴۰۰ در بین غلظت‌های مورد استفاده موجب بهبود پارامترهای اسپرم نسبت به گروه کنترل شد. در مطالعات مختلف، غلظت‌های متعددی از PRP و همچنین منابع اتولوگ و هترولوگ آن با توجه به هدف مطالعه استفاده شده است.

Nabavinia و همکاران نشان دادند که غلظت 100×10^3 $^{pl}/_{\mu l}$ از PRP هترولوگ سبب بهبود حرکت پیشرونده اسپرم پس از انجماد و ذوب در افراد سالم شد (۱۶). همچنین در بین غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و 100×10^3 $^{pl}/_{\mu l}$ از PRP اتولوگ، غلظت 100×10^3 $^{pl}/_{\mu l}$ اثر محافظتی بیشتری در بهبود پارامترهای اسپرم در نمونه‌های اسپرم پس از ذوب در افراد مبتلا به اولیگواستنوتراسپرمی نشان داد (۱۷).

مطالعه Bader و همکاران نشان داد، غلظت ۲ درصد از PRP اتولوگ در بین غلظت‌های ۰، ۲، ۵ و ۱۰ درصد در شرایط استرس اکسیداتیو ناشی از H2O2 بهبود قابل توجهی در تحرک کلی و تحرک پیشرونده، و همچنین کاهش سلول‌های ROS، تکه تکه شدن DNA و تعداد سلول‌های آپوپتوز گردید (۳۵).

این تفاوت در غلظت‌ها ممکن است به عوامل متعددی از جمله روش‌های فعال‌سازی PRP، اتولوگ یا هترولوگ بودن PRP مرتبط باشد. برای فعال‌سازی پلاکت می‌توان از طریق روش‌های مختلفی مانند افزودن کلسیم کلرید یا ترومبین، انجماد- ذوب پلاکت‌ها و امواج اولتراسونیک استفاده کرد (۳۶).

از این‌رو در مطالعه حاضر جهت به دست آوردن غلظت مناسب PRP از چندین غلظت استفاده شد و روش انجماد- ذوب جهت فعال‌سازی آن به کار برده شد. Lorian و همکاران در مطالعه مشابهی از PRP اتولوگ جهت کاهش اثرات نامطلوب انجماد پس از ذوب در نمونه‌های اسپرم افراد مبتلا به الیگوآستنوتراتوسپرمی استفاده کردند (۱۷). اما در این مطالعه جهت یکسان بودن کلیه نمونه‌ها از نظر فاکتورهای موجود در PRP، صرفه‌جویی در هزینه، امکان انجام انجماد- ذوب جهت فعال‌سازی PRP و سرعت در دسترس بودن از نوع هترولوگ آن استفاده شد.

در افراد مبتلا به سرطان و بیماران با نقص ایمنی یک التهاب مزمن وجود دارد که منجر به حضور فاکتورها و سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1β، IL-17 و TNF-α در پلاسما می‌شود (۳۷)، حضور این فاکتورهای التهابی در نوع اتولوگ PRP منجر به کاهش تحرک اسپرم‌ها (۳۸) و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم می‌گردد (۳۹). PRP را بر اساس حضور یا عدم حضور لکوسیت به گروه غنی از لکوسیت (Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma : LR-PRP) و گروه کم لکوسیت (Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma LP-PRP) طبقه‌بندی می‌کنند (۴۰) و لکوسیت‌ها در LR-PRP به طور قابل توجهی آزادسازی سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند IL-1β، TNF-α، IL-6 و IL-8 را در مقایسه با LP-PRP افزایش می‌دهند و می‌توانند به بافت‌های تحت درمان آسیب برسانند (۴۱). از این‌رو در این مطالعه جهت بررسی اثرات PRP هترولوگ از نوع LP-PRP استفاده شد.

نکته جالب در مطالعه حاضر، مؤثرتر بودن غلظت پایین ۵۰ و غلظت بالای ۴۰۰ در مقایسه با سایر غلظت‌ها بود. مشخص شدن علت این مسأله نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتری دارد. به نظر می‌رسد، افزایش IGF-1 که یکی از فاکتورهای رشد موجود در PRP است منجر به افزایش فشار اسمزی و هیپرتونیک می‌شود که متعاقبا آسیب به اسپرم را در پی خواهد داشت. اما در غلظت‌های پایین، بدون اینکه فشار اسمزی زیادی ایجاد کند عمل حفاظتی خود را اعمال می‌کند. از طرفی دوزهای بالای PRP بالاتر (1200×10^3 $^{pl}/_{\mu l}$) به دلیل افزایش زیاد اسیدآمینه‌ها و بهم خوردن فشار اسمزی می‌تواند باعث ایجاد عوارض جانبی بیشتری شود (۴۲، ۴۳). شاید علت مؤثرتر بودن دوز ۵۰ در این مطالعه به این دلیل باشد. از طرفی

دوز ۴۰۰ نیز در مقایسه با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ اثرات حفاظتی بیشتری نشان داد. این مسأله ممکن است به دلیل افزایش فاکتورهای رشد در این غلظت و یا فعال شدن سایر مسیرهای حفاظتی رخ داده باشد. هر چند همانطور که ذکر شد این قسمت نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

نتیجه‌گیری

PRP به عنوان یک ماده محافظت‌کننده به صورت وابسته به دوز، در غلظت‌های ۵۰ و ۴۰۰ سبب افزایش در تحرک کلی، تحرک پیشرونده، غیر پیشرونده و زنده‌مانی اسپرم‌ها و کاهش اسپرم‌های غیر متحرک، شکست DNA و سطح MDA در نمونه‌های اسپرم منجمد- ذوب شده بیماران مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمی شود. از این‌رو به نظر می‌رسد اضافه کردن PRP به عنوان یک ماده محافظت‌کننده به صورت وابسته به دوز می‌تواند یک راهکار امیدوارکننده برای کاهش اثرات منفی انجماد بر نمونه‌های آستنوتراتواسپرمی باشد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بر اساس پایان‌نامه کارشناسی ارشد (۷۳۱۳) مورد تأیید معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است. از همه کسانی که ما را در این راه یاری کردند بویژه کارشناسان مرکز ناباروری رستاک، تشکر و قدردانی می‌شود.

سهم نویسندگان

مهسا سلطانی (نمونه‌گیری، انجام کارهای آزمایشگاهی، نوشتن پیش‌نویس اصلی مقاله)، علی اصغر غفاری‌زاده (نظارت، راه‌اندازی روش کار)، الهام شجاع فر (طراحی، راه‌اندازی روش کار)، اعظم مسلمی (تجزیه و تحلیل داده‌ها)، مریم باعزم (نظارت، تجزیه و تحلیل داده‌ها، ویرایش نهایی مقاله).

تضاد منافع

نویسندگان مقاله، هیچگونه تعارض منافعی نداشته‌اند.

References

1. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spanò M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. Cell Tissue Bank. 2006;7(2):91-8. **pmid**: 16732411 **doi:** 10.1007/s10561-005-0275-8
2. Hamilton J, Cissen M, Brandes M, Smeenk J, De Bruin J, Kremer J, et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. Hum Reprod. 2015;30(5):1110-21. **pmid**: 25788568 **doi:** 10.1093/humrep/dev058
3. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini AJAiu. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. Adv Urol. 2012:2012:854837. **pmid**: 22194740 **doi:** 10.1155/2012/854837
4. Satorre M, Breininger E, Beconi M. Cryopreservation with α-tocopherol and Sephadex filtration improved the quality of boar sperm. Theriogenology. 2012;78(7):1548-56. **pmid**: 22925635 **doi:** 10.1016/j.theriogenology.2012.06.023
5. Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfouri F, Bergere M, Vialard F, et al. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. J Androl. 2012;33(6):1371-8. **pmid**: 22700764 **doi:** 10.2164/jandrol.112.016980
6. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Reprod Biomed Online. 2018;37(3):327-39. **pmid**: 30143329 **doi:** 10.1016/j.rbmo.2018.05.012
7. von Wolff M, Nawroth F. Fertility preservation in oncological and non-oncological diseases: a practical guide: Springer Nature; 2020.
8. Moghbeli M, Kohram H, Zare-Shahaneh A, Zhandi M, Sharideh H, Sharafi M. Effect of sperm concentration on characteristics and fertilization capacity of rooster sperm frozen in the presence of the antioxidants catalase and vitamin E. Theriogenology 2016;86(6):1393-8. **pmid**: 27444422 **doi:** 10.1016/j.theriogenology.2016.03.038
9. Almadaly EA, Ibrahim IM, Salama MS, Ashour MA, Sahwan FM, El-Kon II, et al. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on post-thaw quality, kinematics and in vivo fertility of fertile and subfertile buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa. Vet Res Commun. 2023;47(1):61-72. **pmid**: 35451670 **doi:** 10.1007/s11259-022-09928-1
10. Chicharro-Alcántara D, Rubio-Zaragoza M, Damiá-Giménez E, Carrillo-Poveda JM, Cuervo-Serrato B, Peláez-Gorrea P, Sopena-Juncosa JJ. Platelet rich plasma: new insights for cutaneous wound healing management. J Funct Biomater. 2018;9(1):10. **pmid**: 29346333 **doi:** 10.3390/jfb9010010
11. Epifanova MV, Kostin AA, Chalyy ME, Gvasalia BR, Gameeva EV, Artemenko SA, Epifanov AA. Autologic platelet-rich plasma use in varicocelectomy. Genes & Cells. 2020;15(3):39-43. **doi:** 10.23868/202011005
12. Angellee J, Ginting CN, Chiuman L, Halim B. Role of platelet-rich plasma to sperm quality in male partners undergoing infertility treatment. IEEE International Conference on Health, Instrumentation & Measurement, and Natural Sciences (InHeNce); 2021: IEEE. **doi:** 10.1109/InHeNce52833.2021.9537240
13. Yan B, Zhang Y, Tian S, Hu R, Wu B. Effect of autologous platelet-rich plasma on human sperm quality during cryopreservation. Cryobiology. 2021;98:12-6. **doi:**10.1016/j.cryobiol.2021.01.009
14. Saucedo L, Buffa GN, Rosso M, Guillardoy T, Gongora A, Munuce MJ, et al. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs) in human sperm: expression, functionality and involvement in motility regulation. PLoS One. 2015;10(5):e0127297 **pmid**: 25970615 **doi:** 10.1371/journal.pone.0127297
15. Cheraghi E, Sajadi SMS, Soleimani Mehranjani M. The effect of Quercetin on the quality of sperm parameters in frozen-thawed semen of patients with Asthenospermia. Andrologia. 2021;53(9):e14167. **pmid**: 34219267 **doi:** 10.1111/and.14167
16. Nabavinia MS, Yari A, Ghasemi-Esmailabad S, Gholoobi A, Gholizadeh L, Nabi A, et al. Improvement of human sperm properties with platelet-rich plasma as a cryoprotectant supplement. Cell Tissue Bank. 2023;24(2):307-15. **pmid**: 36074213 **doi:** 10.1007/s10561-022-10032-6
17. Lorian K, Haghdani S, Vahidi S, Nabi A. Application of Autologous Platelet-rich Plasma Exerts Cryoprotective Effects on Biological Characteristics of Human Oligoasthenoteratospermia Samples after Freezing and Thawing Procedures. Urol J. 2024;21(5):340-7. **pmid**: 38733230 **doi:** 10.22037/uj.v21i.8013

18. Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nabi A, Ashourzadeh S. Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. Reprod Biomed Online. 2014;28(3):352-8. **pmid**: 24444814 **doi:** 10.1016/j.rbmo.2013.11.015
19. Organisation WH. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction: Cambridge university Press; 1999.
20. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril. 2005;84(4):833-42. **pmid**: 16213830 **doi:** 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089
21. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. J Androl. 2005;26(6):654-60. **pmid**: 16291955 **doi:** 10.2164/jandrol.05016
22. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. Hum Reprod Update. 2008;14(3):243-58. **pmid**: 18281241 **doi:** 10.1093/humupd/dmn004
23. Fazli F, Torkashvand H, Soltanian AR, Babalhavaeji A, Olomi H, Pilehvari S. Effects of Testicular Platelet-Rich Plasma Injection on Sperm Parameters in Men with Severe Oligoasthenoteratozoospermia: A Clinical Trial Evaluation. Int J Fertil Steril. 2024;18(Suppl 1):71-76. **PMID**: 39033373 **doi:** 10.22074/ijfs.2024.2011066.1535
24. Salama MS, Shehabeldin AM, Ashour MA, Al-Ghadi MQ, Marghani BH, El-kon I, Shukry M. Effect of the addition of platelet-rich plasma to Boer Buck semen on sperm quality and antioxidant activity before and after cryopreservation and in vivo fertility. Small Ruminant Research. 2024;230: 107167. **doi:**10.1016/j.smallrumres.2023.107167
25. Iyibozkurt AC, Balcik P, Bulgurcuoglu S, Arslan BK, Attar R, Attar E. Effect of vascular endothelial growth factor on sperm motility and survival. Reprod Biomed Online. 2009;19(6):784-8. **pmid**: 20031017 **doi:** 10.1016/j.rbmo.2009.09.019.
26. Tohidnezhad M, Wruck C-J, Slowik A, Kweider N, Beckmann R, Bayer A, et al. Role of platelet-released growth factors in detoxification of reactive oxygen species in osteoblasts. Bone. 2014:65:9-17. **pmid**: 24798492 **doi:** 10.1016/j.bone.2014.04.029.
27. Ghasemian Nafchi H, Azizi Y, Amjadi F, Halvaei I. In vitro effects of plasma rich in growth factors on human teratozoospermic semen samples. Syst Biol Reprod Med. 2023;69(4):255-63. **pmid**: 36919463 **doi:** 10.1080/19396368.2023.2180455
28. Almadaly EA, Mansour I, Sahwan F, M Shehabeldin A, El-Kon I, Sakr A, et al. Effect of Adding Autologous Platelet-rich Plasma to the Freezing Extender on the Post-thaw Quality and In vitro Fertility of Buffalo (Bubalus Bubalis) Spermatozoa. " Egyptian Journal of Veterinary Science. 2024;56(3):617-26. **doi:**10.21608/EJVS.2024.254249.1712
29. Selvaraju S ,Krishnan BB, Archana SS, Ravindra JP. IGF ۱ stabilizes sperm membrane proteins to reduce cryoinjury and maintain post-thaw sperm motility in buffalo (Bubalus bubalis) spermatozoa. Cryobiology. 2016;73(1):55-62. **pmid**: 27256665 **doi:** 10.1016/j.cryobiol.2016.05.012
30. Jiménez-Trejo F, Tapia-Rodríguez M, Cerbon M, Kuhn DM, Manjarrez-Gutiérrez G, Mendoza-Rodríguez CA, Picazo O. Evidence of ۵-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. Reproduction. 2012;144(6):677-85. **pmid**: 23028123 **doi:** 10.1530/REP-12-0145.
31. Sharkey DJ, Tremellen KP, Briggs NE, Dekker GA, Robertson SA. Seminal plasma transforming growth factor-β, activin A and follistatin fluctuate within men over time. Hum Reprod. 2016;31(10):2183-91. **pmid**: 27609985 **doi:** 10.1093/humrep/dew185
32. Hernández-Corredor L, León-Restrepo S, Bustamante-Cano J, Báez-Sandoval G, Jaramillo X. Effect of the incorporation of plasma rich of platelets on the spermatozoa physiology of ram semen. J Dairy Vet Anim Res. 2020;9(1):34-8. **doi:** 10.15406/jdvar.2020.09.00275
33. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang J-A, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum Reprod. 2009;24(9):2061-70. **pmid**: 19525298 **doi:** 10.1093/humrep/dep214
34. Bellezza I. Oxidative stress in age-related macular degeneration: Nrf ۲as therapeutic target. Front Pharmacol. 2018;9:1280. **pmid**: 30455645 **doi:** 10.3389/fphar.2018.01280
35. Bader R, Ibrahim J, Moussa M, Mourad A, Azoury J, Azoury J, Alaaeddine NJA. In vitro effect of autologous platelet-rich plasma on H۲O۲-induced oxidative stress in human spermatozoa. Andrology. 2020;8(1):191-200. **pmid**: 31079423 **doi:** 10.1111/andr.12648
36. Brokhman I, Galea AM. A novel method for the preparation and frozen storage of growth factors and cytokines obtained from platelet-rich plasma. Journal of Cartilage & Joint Preservation. 2023;3(2):100089. **doi**:10.1016/j.jcjp.2022.100089
37. Rogovskii V. Cancer and autoimmune diseases as two sides of chronic inflammation and the method of therapy. Curr Cancer Drug Targets. 2024;24(11):1089-103. **pmid**: 38288812 **doi**: 10.2174/0115680096282480240105071638.
38. Martinez MS, Ferreyra FN, Paira DA, Rivero VE, Olmedo JJ, Tissera AD, et al. COVID- ۱۹associates with semen inflammation and sperm quality impairment that reverses in the short term after disease recovery. Front Physiol. 2023:14:1220048. **pmid**: 37497433 **doi:** 10.3389/fphys.2023.1220048
39. Fraczek M, Sanocka D, Kamieniczna M, Kurpisz M. Proinflammatory cytokines as an intermediate factor enhancing lipid sperm membrane peroxidation in in vitro conditions. J Androl. 2008;29(1):85-92. **pmid**: 17804865 **doi:** 10.2164/jandrol.107.003319
40. Yan R, Gu Y, Ran J, Hu Y, Zheng Z, Zeng M, et al. Intratendon delivery of leukocyte-poor platelet-rich plasma improves healing compared with leukocyte-rich platelet-rich plasma in a rabbit Achilles tendinopathy model. Am J Sports Med. 2017;45(8):1909-20. **pmid**: 28301205 **doi:** 10.1177/0363546517694357
41. Zhang B, Dong B, Wang L, Wang Y, Gao Z, Li Y, et al. Comparison of the efficacy of autologous Lp-PRP and Lr-PRP for treating intervertebral disc degeneration: in vitro and in vivo study. J Orthop Surg Res 2024;19(1):731. **pmid**: 39506797 **doi:** 10.1186/s13018-024-05196-8
42. Ali Al Ahmad M, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, Fieni F. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. Reprod Domest Anim. 2008;43(4):429-36. **pmid**: 18179634 **doi:** 10.1111/j.1439-0531.2007.00930.x
43. Khlifaoui M, Battut I, Bruyas JF, Chatagnon G, Trimeche A, Tainturier D. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. Theriogenology 2005;63(1):138-49. **pmid**: 15589280 **doi:** 10.1016/j.theriogenology.2004.04.012