Original Article

Effect of vitrification on apoptosis and some of parameter of sperm in infertile men

Ramezani M[1*], Khalili MA[2], Adib M[3]

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Ashtian Branch, Ashtian, I.R. Iran
2- Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoghi University of Medical Sciences, Yazd, I.R. Iran
3- Department of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Central Branch of Tehran, Tehran, I.R. Iran

Received September 21, 2009; Accepted January 30, 2010

Abstract:

Background: Nowadays, cryopreservation of human sperm is considered as a common technique for treating infertility. Although cryopreservation causes a decrease in sperm motility and viability in infertile men, the effect of freezing the sperm by vitrification in infertile men has not been evaluated. The aim of this study was to evaluate the effect of vitrification on some parameters of sperm including motility, morphology, viability, count and apoptosis after thawing in infertile men.

Materials and Methods: Semen samples (No=17) of participants referring to Clinical Center for Infertility of Yazd were collected by masturbation. Semen analysis was performed according to WHO standards. The smears provided were fixed for TUNEL staining. Some samples directly cryopreserved by cryoloope method and stored for at least 7 days. After thawing, samples were evaluated for sperm parameters. Data obtained before and after the vitrification were compared using paired t-test and Willcaxon statistical tests.

Results: A significant decrease in viability and morphology of the sperm and an increase in the rate of apoptosis were observed after vitrification. The percent of apoptosis was negatively correlated with normal parameters of spermatozoa (especially progressive motility and viability).

Conclusion: The results indicate that vitrification has a detrimental effect on sperm parameters and apoptosis rate in infertile men. However, the rate of apoptosis in this method was lower than that in other freezing methods.

Keywords: Vitrification, Sperm, Apoptosis, Male Infertility

* **Corresponding Author.**
Email: mina_ramezani@hotmail.com
Tel: 0098 912 223 8405
Fax: 0098 862 722 4373

conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences Spring 2010; Vol 14, No 1, Pages 18-25

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-13]

اثر انجماد شیشه‌ای بر پارامترهای حیاتی و میزان آپوپتوز اسپرم مردان نابارور

مینا رمضانی [1*]، محمد علی خلیلی [2]، مریم ادیب [3]

خلاصه

سابقه و هدف: امروزه انجماد اسپرم انسان به عنوان یک تکنیک رایج برای درمان ناباروری به کار می‌رود. مشخص شده است که انجماد به روش‌های مختلف کمابیش سبب کاهش تحرک و قابلیت حیات اسپرم در مردان بارور می‌شود. اما، هنوز اثر روش انجماد شیشه‌ای بر روی پارامترهای اسپرم مردان نابارور بررسی نشده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر انجماد شیشه‌ای بر پارامترهای حیاتی و میزان آپوپتوز اسپرم در مردان نابارور است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی نمونه‌های مایع منی ۱۷ بیمار مراجعه کننده به مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد، پس از خود انزالی جمع آوری و آنالیز آن طبق استانداردهای سازمان جهانی بهداشت انجام گرفت. سپس از نمونه‌ها اسمیر تهیه شده و لام‌ها برای رنگ آمیزی تانل و تعیین درصد مرگ سلولی فیکس شدند. مقداری از مایع منی توسط کرایولوپ برداشته شده و در نیتروژن مایع منجمد شد. پس از گذشت حداقل ۷ روز از انجماد، نمونه‌ها ذوب شده و پارامترهای حیاتی (تحرک، مورفولوژی، قابلیت حیات و شمارش) آن بررسی شدند. داده‌های قبل و بعد از انجماد توسط آزمون‌های t زوجی و ویل کاکسون مقایسه گردیدند.

نتایج: درصد تحرک پیشرونده بعد از انجماد شیشه‌ای به طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین، کاهش معنی‌داری در قابلیت حیات و مورفولوژی اسپرم و افزایش معنی‌داری در میزان آپوپتوز مشاهده شد. اما، پارامتر شمارش تغییر معنی‌داری نداشت.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انجماد شیشه‌ای بر روی پارامترهای حیاتی و میزان آپوپتوز اسپرم مردان نابارور اثر سوء دارد. هر چند میزان آپوپتوز ایجاد شده توسط این روش نسبت به سایر روش‌های انجماد کمتر است.

واژگان کلیدی: انجماد شیشه‌ای، اسپرم، آپوپتوز، ناباروری مردان

فصلنامه علمی ـ پژوهشی فیض، دوره چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، صفحات ۲۵-۱۸

مقدمه

امروزه انجماد اسپرم انسان برای افزایش موفقیت روش‌های کمک باروری، بانک اسپرم برای مردان در معرض شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، جراحی و نقائص انزالی به طور معمول انجام می‌گیرد [۱]. همچنین، در مورد مردان نابارور، ذخیره اسپرم این موقعیت را ایجاد می‌کند که زمان لازم برای به دست آوردن مقدار کافی اسپرم جهت لقاح مصنوعی یا آزمایشگاهی فراهم آید [۱]. انجماد شامل رسوب مولکول‌های آب به صورت کریستال‌های یخ می‌باشد که نتیجه آن جدا شدن آب از مواد محلول در آن است. در این روند تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی و غلظت مواد حل شده، مشکل ساز است و بقاء سلول‌های منجمد شده بستگی به نوع سلول، سرعت انجماد، نوع ضد یخ و روش انجماد دارد [۲].

روش‌های انجماد را می‌توان به سه دسته تقسیم نمود: انجماد آهسته، انجماد سریع و انجماد شیشه‌ای. روش انجماد آهسته در چند مرحله انجام می‌گیرد و دما به تدریج کاهش می‌یابد، اما در روش سریع سلول‌ها برای مدتی در فاصله‌ای خاص (۱۵ تا ۳۰ سانتیمتر) از سطح نیتروژن مایع و به عبارتی در معرض بخار نیتروژن، قرار گرفته (حدود ٦٠- درجه سانتیگراد)، سپس به درون مخزن نیتروژن مایع انتقال داده می‌شوند. در هر دو روش، به دلیل تشکیل کریستال‌های یخ، نتایج مطلوبی حاصل نمی‌شود. بنابراین مطالعات زیادی جهت کاهش زمان و حذف کریستال‌های یخ و تجهیزات گران قیمت مورد نیاز در انجماد آهسته صورت گرفته است. یکی از راه‌های اجتناب از آسیب به واسطه تشکیل کریستال‌های یخ، استفاده از روش شیشه‌ای شدن می‌باشد. در روش شیشه‌ای شدن، با فرو بردن مستقیم و سریع نمونه ها به درون تانک نیتروژن، عمل انجماد فوق العاده سریع انجام می‌شود. در این روش نمونه‌ها با سرعت‌های خیلی بالای سرما دهی (۷۲۰۰۰۰K/min) و مدت زمان کم (۸-۵ ثانیه) منجمد می‌گردند [۳]. در سال ۱۸٦٦، مشخص شد تنها تعداد کمی از اسپرم ها پس از ذوب مجدد مایع منی که مدت زیادی در درجه حرارت $^{\circ}C$ ۱۵- ذخیره شده بود، دوباره تحرک خود را به دست می‌آورند [٤]. در

[1] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان
[2] استادیار، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
[3] کارشناس ارشد علوم جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور- مرکز تهران
* نشانی نویسنده مسوول:
آشتیان، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی
تلفن: ۰۹۱۲ ۲۲۳ ۸۴۰۵ دورنویس: ۰۸۶۲ ۷۲۲ ۴۳۷۳
پست الکترونیک: mina_ramezani@hotmail.com
تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۳۰ تاریخ پذیرش نهایی: ۸۸/۱۱/۱۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-13]

سال ۱۹۳۸ Jhanel مشاهده کرد که بخشی از اسپرماتوزوئیدهای انسان با ذخیره سازی در حرارت $-79\ ^{\circ}C$، بعد از گذشت ۴۰ روز تا حدی زنده و دارای تحرک هستند [۵]. در سال ۱۹۴۲ انجماد اسپرم خرگوش و انسان با استفاده از لوپ باکتریولوژی گزارش شد که به دلیل حجم کم نمونه می‌توانست سرعت سرد شدن را افزایش دهد. با این روش بیش از ۴۰ درصد اسپرم زنده پس از انجماد در نیتروژن مایع و ذوب سریع این نمونه‌های کوچک به دست آمد [۶]. از آن زمان تاکنون دانشمندان همواره در اندیشه یافتن روش‌هایی هستند که بتواند به سادگی اسپرم را منجمد کرده و پس از ذوب نیز بر کمیت و کیفیت اسپرم تاثیر سوئی نگذارد. یکی از روش‌های نسبتا جدید انجماد، انجماد شیشه‌ای است. اساس انجماد شیشه‌ای بر عدم تشکیل کریستال‌های یخ به علت استفاده از غلظت‌های بالای ضد یخ و سرعت بالای سرد شدن به دلیل غوطه ورشدن مستقیم نمونه در نیتروژن مایع ($-196\ ^{\circ}C$) است. در این روش مایعات داخل نمونه به هنگام سرد شدن بدون تشکیل کریستال یخ به یک جامد شیشه‌ای تبدیل می‌شوند [۷]. در فرآیند انجماد به دلیل تبدیل آب داخل سلولی به کریستال یخ، به سلول، به ویژه غشاء آن آسیب وارد می شود [۸]. شکل، اندازه، وضعیت هیدراسیون و قابلیت نفوذپذیری غشاء یا توانائی پاسخ-گویی به تغییرات اسمزی از شاخص های عمده یک سلول برای حفظ قابلیت حیات خود در طول انجماد است. البته، انجماد موفق به روند برگشت سلول به حرارت طبیعی، بدون هیچ گونه آسیب ساختمانی و یا بیوشیمیایی که سبب مرگ سلولی شود نیز بستگی دارد. وقتی که سلول‌ها و بافت‌ها منجمد می‌شوند، به علت اینکه یخ ترکیبی از ذرات آب خالص می‌باشد، نمک‌ها و پروتئین‌ها در بخش‌های غیر منجمد که نقطه انجماد پایین‌تری دارند، تغلیظ می-شوند [۹]. استفاده از غلظت‌های بالای ضد یخ در مورد سلول‌های بزرگی مثل اووسیت، جنین و یا بافت و اندام، جهت جلوگیری از اثرات کشنده کریستال یخ ضروری است. اما، در سال ۲۰۰۳ میلادی، Isachenko و همکاران یک روش جدید انجماد شیشه-ای اسپرم با استفاده از انجماد مستقیم نمونه در نیتروژن مایع توسط کرایولوپ و بدون استفاده از ضد یخ را گزارش کردند. این روش به دلیل سرعت بالای سرد شدن نمونه (بیش از $10^{5}\ ^{\circ}C/min$ ×۷/۲) و عدم استفاده از ضد یخ که خود اثرات سمی و کشنده‌ای بر اسپرم دارد، قابلیت حیات و تحرک اسپرم را در مقایسه با روش معمولی انجماد افزایش داد [۱۰]. البته در این روش فقط اسپرم مردان بارور مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه روش‌های کمک باروری از جمله انجماد، بیشتر در مورد مردان نابارور استفاده می‌شود، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر انجماد شیشه-ای، یعنی انجماد سریع به وسیله فروبردن مستقیم نمونه در نیتروژن مایع و ذوب سریع با استفاده از قرار دادن نمونه در محیط $37\ ^{\circ}C$ بر اسپرم مردان نابارور است. با توجه به اینکه به رغم به کارگیری انجماد اسپرم، تاکنون اطلاعات بسیار کمی در رابطه با اثرات انجماد بر آپوپتوزیس (مرگ سلولی برنامه ریزی شده) که نقش مهمی در باروری دارد در دسترس است، در بخش دیگر این تحقیق تاثیر انجماد شیشه‌ای بر میزان آپوپتور اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. آپوپتوزیس فرآیند مهمی است که در اسپرم زایی نرمال دخالت دارد. عدم تنظیم این فرآیند بیولوژیکی ناهنجاری-هایی در گامت‌های مردان ایجاد کرده و باعث ناباروری می‌شود. در آپوپتوز دو رویداد مهم روی می‌دهد که اولی تغییرات غشاء است و باعث جا به جا شدن فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی به نیمه خارجی غشای پلاسمایی می‌شود و با آنکسین V قابل شناسایی است. مطالعات انجام شده با آنکسین V نشان داده که دیفوزیون لیپید در غشای پلاسمایی اسپرم منجمد- ذوب شده در مقایسه با اسپرم تازه انسان به طور معنی‌داری بیشتر است [۱۱]. دومین تغییر تکه تکه شدن منظم DNA است. تکه تکه شدن فرآیند غیر قابل برگشتی است که حتی قبل از اینکه تغییراتی در نفوذ پذیری غشاء روی دهد، صورت می‌پذیرد. به نظر می‌رسد فعال شدن اندونوکلئاز هسته‌ای وابسته به کلسیم و منیزیم باعث این رویداد می‌شود. این آنزیم به طور انتخابی، DNA را در محل بین واحدهای نوکلئوزومی می‌شکند و با نشاندار کردن آنزیمی توسط تانل که قادر است انتهای شکست‌ها در زنجیره DNA را شناسایی کند، بررسی می‌شود. حساسیت تانل بالا است و برای آپوپتوز اختصاصی است [۱۳،۱۲]. بنابراین، در مطالعه حاضر از روش تانل استفاده شد. در مجموع به دلیل اهمیت بررسی پروتکل‌های مختلف انجماد برای پی بردن به علل کاهش باروری پس از انجماد، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات انجماد شیشه-ای بر چند پارامتر مهم حیاتی و نیز میزان آپوپتوز اسپرم مردان نابارور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی نمونه‌های مایع منی افراد مراجعه کننده به مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد، پس از ۷-۲ روز خودداری از مقاربت، از طریق خود انزالی در ظروف استریل جمع‌آوری شدند. سن افراد مراجعه کننده بین ۵۰-۳۰ سال بود. سپس برای مایع شدن، نمونه‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در انکوباتور ($37\ ^{\circ}C$) بدون CO_2 نگهداری شدند. پس از برگشت مایع منی به حالت مایع، آنالیز آن بر اساس معیارهای سازمان بهداشت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-13]

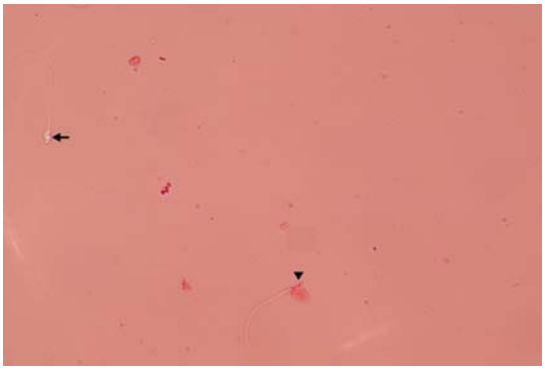
جهانی (WHO 1999) انجام شد [۱۴]. پس از ثبت رنگ و حجم، نمونه‌ها به دو قسمت تقسیم شدند. یک قسمت به عنوان نمونه کنترل به صورت تازه و قسمت دیگر آن به عنوان نمونه آزمون به روش انجماد شیشه‌ای منجمد شد تا پس از ذوب مورد بررسی قرار گیرد. تعداد نمونه‌های مورد بررسی ۱۷ نمونه بود که از نظر معیارهای سازمان بهداشت جهانی غیر نرمال یعنی نابارور ارزیابی شدند. افراد مورد مطالعه همگی الیگو اسپرم بودند.

ارزیابی تحرک و غلظت:

برای مشاهده تحرک، ۱۰ میکرولیتر از مایع منی بر روی لام شیشه‌ای قرار داده شده و با لامل پوشانده شد. با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی X ۴۰، تعداد اسپرم‌های دارای حرکت سریع پیشرونده و رو به جلو، آهسته پیشرونده رو به جلو، حرکت در جا و اسپرم‌های بی‌حرکت در چند میدان دید میکروسکوپی شمارش شده و درصد اسپرم‌های متحرک و غیر متحرک به دست آمد. نتایج برای هر نمونه در قبل و بعد از انجماد ثبت شد. برای تعیین غلظت (تعداد) اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از مایع منی با ۹۹۰ میکرولیتر محلول شمارش اسپرم رقیق شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از آن توسط لام نئوبار شمارش شد.

ارزیابی قابلیت حیات:

در رنگ آمیزی ائوزین، ۱۰ میکرولیتر مایع منی روی لام قرار داده شده و سپس ۱۰ میکرولیتر محلول ائوزین به آن افزوده شد. پس از پوشاندن سطح نمونه‌ها با لامل توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی X ۱۰۰ مشاهده شدند. اسپرم‌هایی که رنگ را به خود گرفته بوده و قرمز یا صورتی شده بودند، مرده محسوب شده و آنهایی که سر سفید بوده و رنگ را به خود نگرفته بودند، زنده در نظر گرفته شدند (شکل شماره ۱). تعداد اسپرم‌های زنده در ۱۰۰ اسپرم شمرده شد و نتایج قبل و بعد از انجماد ثبت گردید.



شکل شماره ۱- رنگ آمیزی ائوزین برای ارزیابی قابلیت حیات نمونه‌ها (X ۱۰۰).
پیکان: اسپرم‌های زنده پس از انجماد/ ذوب. سر پیکان: اسپرم‌های مرده پس از انجماد/ ذوب.

ارزیابی مورفولوژی:

شکل طبیعی اسپرم، بیضی شکل و دارای یک سر به ابعاد ۵×۲/۵ میکرون بوده که حدود ۷۰ درصد قدامی آن توسط آکروزوم واضح و یکنواخت پوشانده شده است. در ضمن دارای گردن سالم و بدون نقائص آناتومیکی با دم دراز و کشیده است [۱۵]. برای تعیین مورفولوژی اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از مایع منی روی لام قرار داده شده، سپس ۱۰ میکرولیتر محلول گیمسا به آن افزوده شد و در نهایت از آن اسمیر تهیه شد. حداقل ۱۰۰ اسپرم با بزرگنمایی x ۱۰۰ از نظر مورفولوژی طبیعی بررسی شد.

فیکس کردن نمونه برای مدت طولانی:

مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایع منی روی لام قرار داده شده و از آن اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن لام، به مدت ۲۰ دقیقه درون پارا فرمالدهید قرار داده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه درون بافر PBS گذاشته شد. در پایان به مدت ۲ دقیقه در اتانول ۹۶ درجه قرار داده شد. سپس لام از محلول خارج شده و پس از خشک شدن و شماره گذاری در فریزر نگهداری شد.

منجمد کردن نمونه‌ها به روش شیشه‌ای شدن:

برای منجمد کردن نمونه‌ها، ابتدا کرایولوپ‌ها را درون مایع منی فروبرده، سپس به آرامی بیرون آورده و در جعبه یونولیتی حاوی نیتروژن انداخته شدند. سپس، با کمک پنس، کرایولوپ‌ها را گرفته و بدون خارج کردن از نیتروژن به درون لوله کین که درون جعبه یونولیتی حاوی نیتروژن است، برده شدند. بعد از گذشت مدت زمان معینی (حداقل ۷ روز) نمونه‌ها از نیتروژن خارج شده و ذوب شدند.

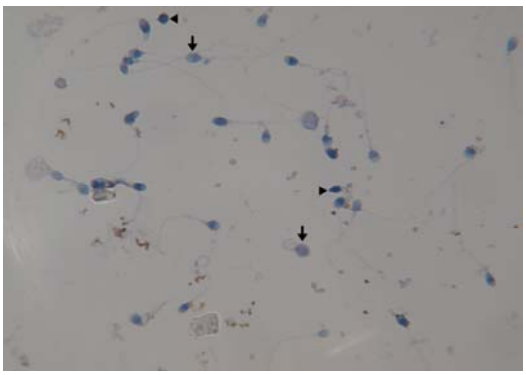
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-13]

ذوب کردن نمونه‌ها:

برای ذوب کردن نمونه‌ها کرایولوپ‌ها از تانک نیتروژن خارج شده، و به سرعت درون لوله آزمایش حاوی Hamm's F10 قرار داده شد. لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت. سپس کرایولوپ‌ها از آن خارج شده و لوله آزمایش به مدت ۸-۵ دقیقه با دور g ۳۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس، مایع روی آن دور ریخته شده و به پلیت کوچکی که ته لوله تشکیل شد یک یا دو قطره محیط Hamm's F-10 افزوده، پس از هموژن شدن، آزمایشات قبل از انجماد، دوباره تکرار شدند.

رنگ آمیزی تانل:

برای رنگ آمیزی تانل و بررسی آپوپتوزیس نمونه‌ها، از کیت آپوپتوزیس (Germany) استفاده شد. میزان آپوپتوزیس نمونه لام‌های فیکس شده قبل و بعد از انجماد به روش رنگ‌آمیزی تانل بررسی شد. به این صورت که ابتدا، لام‌های فیکس شده به مدت ۵ دقیقه در محلول PBS قرار داده شدند. سپس، لام‌ها به مدت ۱۵ -۱۰ دقیقه در محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن با متانول قرار داده شد. دوباره لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در PBS گذاشته شدند. ۰/۳ گرم سدیم سیترات را در لوله فالکون ریخته، سپس ۵۰ میلی‌لیتر PBS درون لوله حاوی سدیم سیترات ریخته شد و ۳۰۰ میکرولیتر تریتون به آن اضافه شد. لوله فالکون حاوی تریتون و سیترات بافر به مدت ۱۵-۲۵ دقیقه درون انکوباتور قرار داده شد تا تریتون که حالت روغنی دارد حل شود. لام‌ها بعد از ۵ دقیقه از PBS را قبلی برداشته شده و در PBS جدید قرار داده شدند. سپس ۲۵۰ میلی لیتر PBS درون جار ریخته، محتویات لوله فالکون درون آن ریخته شد. لام‌ها درون محلول تریتون و سیترات بافر گذاشته شده و به مدت ۵ دقیقه در یخچال (یا ۱۵ دقیقه در محیط) قرار داده شدند. تریتون باعث نفوذپذیر شدن غشای سلول-ها می‌شود. سپس با PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شده و برای هر نمونه ۵ میکرولیتر محلول آژیمی و ٤٥ میکرولیتر محلول نشان دار را با هم مخلوط کرده، از این مخلوط به تمام قسمت‌های لام اضافه شد. لام‌ها به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد تا واکنش‌های مربوطه صورت گیرند. پس از یک ساعت به هر لام ۵۰ میکرولیتر محلول POD (پراکسیداز) اضافه شد. لام‌ها به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور گذاشته شده و پس از ۱ ساعت لام‌ها از انکوباتور بیرون آورده شده و سه بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه در محلول PBS شستشو داده شدند. سپس، برای هر لام به میزان ٦٠-٥٠ میکرولیتر محلول DAB اضافه شد. لام‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محیط قرار گرفتند. در مرحله بعد لام‌ها دو بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه با محلول PBS شستشو داده شدند. سپس، لام‌ها توسط هماتوکسیلین رنگ آمیزی شدند. لام‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی شده و میزان سلول‌های آپوپتوز به صورت درصد تعیین شد. سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده‌اند، آبی پررنگ شده و سلول‌های طبیعی آبی کم رنگ بودند (شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲- رنگ آمیزی تانل برای ارزیابی آپوپتوزیس(X ۱۰۰).

پیکان: اسپرم‌های غیر آپوپتوتیک پس از انجماد/ ذوب. سر پیکان: اسپرم‌های آپوپتوتیک پس از انجماد/ ذوب.

آنالیز آماری:

به منظور تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف تعیین گردید. در مورد متغیرهای حرکت آهسته، درجا، قابلیت حیات و آپوپتوز اسپرم که توزیع نرمال داشتند، آزمون آماری پارامتریک t زوجی به کار رفت. در مورد متغیرهای شمارش، مورفولوژی، حرکت پیشرونده و کل که توزیع نرمال نداشتند، آزمون نا پارامتریک ویل کاکسون به کار رفت. در محاسبه ضریب همبستگی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-13]

از ضریب همبستگی پیرسون و اسپیرمن استفاده شد. سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در افراد نابارور، تفاوت معنی‌داری بین میانگین متغیرهای حرکت سریع، آهسته، درجا، بی‌حرکت، مورفولوژی، قابلیت حیات و آپوپتوز، قبل و بعد از انجماد شیشه‌ای وجود دارد. در مورد متغیر تعداد اسپرم تفاوت معنی‌داری بین میانگین این متغیر، قبل و بعد از انجماد وجود ندارد (جدول شماره ۱). در این مطالعه حرکت کل اسپرم پس از انجماد شیشه‌ای، ۴۷/۵ درصد کاهش؛ قابلیت حیات اسپرم، ۵۲ درصد و مورفولوژی اسپرم پس از انجماد شیشه‌ای، حدود ۷ ۰/ درصد کاهش داشت. اما، میزان آپوپتوز افزایشی در حدود ۰/۰۱۱ درصد داشت. نتایج ارتباط بین میزان آپوپتوز و سایر پارامترهای اسپرم، قبل و بعد از انجماد در جدول شماره ۲ آمده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان آپوپتوز با حرکت سریع، آهسته و قابلیت حیات اسپرم قبل و بعد از انجماد شیشه‌ای ارتباط معکوس دارد؛ یعنی در اسپرم‌های با حرکت سریع و قابلیت حیات بیشتر، میزان آپوپتوز به طور معنی‌داری کمتر است، ولی ارتباط معنی‌داری بین مورفولوژی و تعداد اسپرم با آپوپتوز وجود ندارد.

جدول شماره ۱ – شاخص‌های آماری پارامترهای اسپرم، قبل و بعد از انجماد شیشه‌ای در مردان نابارور

متغیرها	شاخص‌ها: قبل از انجماد $\overline{X} \pm SD$	شاخص‌ها: پس از انجماد $\overline{X} \pm SD$	مقدار P
حرکت سریع	۱۸/٦٤±٦/۱۰	۱/۹۹±۱/۳۵	<۰/۰۰۱
آهسته	۲۳/٤۷±۱۱/۲۵	۲/ ۳۰±۲/۰۰	<۰/۰۰۱
درجا	۱۳/٤۷±۵/۹۵	٤/۵۲±۲/۵۱	<۰/۰۰۱
بی‌حرکت	٤۱/۰۰±۲۰/۱۹	۹۲/۲۳±۷/۲۲	<۰/۰۰۱
مورفولوژی	۱۸/۵۲±۱۳/۸۷	۱۱/۵۲±۹/۵۷	۰/۰۱۸
قابلیت حیات	٦۰/۵۸±۱۹/۱۵	۸/٦٤±۳/٦٦	<۰/۰۰۱
آپوپتوز	۲۳/۵۰±۸/۳۱	۳٤/۲۹±۱۰/۰۲	<۰/۰۰۱
شمارش (غلظت) ^{٦} ۱۰	۱۹/۱۵±۲/۵۸	۱۷/۸۲±۲/۸۷	۰/۰٦۸
حرکت پیشرونده	٤۲/۱۱±۱٦/۱۵	۳/۷۰±۲/۳۵	<۰/۰۰۱
کل حرکت	۵۵/۵۸±۱۸/۹٤	۷/۸۸± ۳/۷٤	<۰/۰۰۱

جدول شماره ۲- شاخص‌های آماری همبستگی آپوپتوز با پارامترهای اسپرم، قبل و بعد از انجماد شیشه‌ای در مردان نابارور

		متغیرها: حرکت سریع	حرکت آهسته	حرکت درجا	بی‌حرکت	قابلیت حیات	مورفولوژی	شمارش
شاخص‌ها	قبل از انجماد	-۰/۷۳۰	-۰/۱۲٤	-۰/۲٦۵	۰/۷۷٦	-۰/٦۷٦	۰/۱۵۹	۰/۱۸۲
	مقدار P	۰/۰۰۱	۰/٦۳٦	۰/۳۰٤	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۳	۰/۵٤۲	۰/٤۸٤
	پس از انجماد	-۰/٦۰۲	-۰/٤۸٤	-۰/۳۷۳	۰/۵۲۰	-۰/۳۲۷	-۰/۳۷۵	-۰/۱۲۸
	مقدار P	۰/۰۱۱	۰/۰٤۹	۰/۱٤۱	۰/۰۳۲	۰/۲	۰/۱۳۸	۰/٦۲۳

بحث

نتایج به دست آمده 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 محققین دریافته‌اند که انجماد سبب کاهش پارامترهای حرکتی اسپرم می‌شود [۱۸-۱٦]. در این مطالعه نیز حرکت کل اسپرم پس از انجماد حدود ٤۷/۵ درصد کاهش یافت. Isachencho و همکاران پس از انجماد اسپرم مردان بارور با همین روش انجماد، میزان کاهش تحرک را در حدود ٤۰ درصد گزارش کردند که در مقایسه با روش‌های معمول انجماد تفاوت معنی‌داری نداشت [۱۹]. Glander و Schaller این کاهش را در روش انجماد آهسته ۳۷ درصد اعلام کردند [۲۰]. کاهش بیشتر تحرک اسپرم که در مطالعه حاضر دیده می شود احتمالا به این دلیل است که Isachencho [۱۹] ابتدا اسپرم‌های متحرک را توسط روش Swim up جدا کرده و سپس نمونه را منجمد کرد،

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-13]

ولی در این تحقیق نمونه اولیه اسپرم بدون هیچ تغییری منجمد شد و تفاوت دیگر اینکه در این مطالعه نمونه اسپرم مربوط به افراد نابارور بود. مایع انزال مردان طبیعی بر اساس برخی معیارها در حدود ١٤ درصد اسپرم طبیعی دارد [٢١]؛ در حالی‌که بر اساس معیارهای اصلی (WHO 1999) در حدود ٣٠ درصد از اسپرم‌ها دارای مورفولوژی طبیعی می باشند. لذا، در این تحقیق برای ارزیابی مورفولوژی اسپرم از معیارهای اصلی استفاده شد. پس از انجماد مشاهده شد که مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته است. تفاوتی که در نتایج تحقیق حاضر با سایر مطالعات دیده می‌شود در این است که در مطالعات آنها اختلاف معنی‌داری بین مورفولوژی اسپرم در مردان بارور و نابارور، قبل و بعد از انجماد مشاهده نمی‌شود. شاید این اختلاف مربوط به معیارهای بررسی مورفولوژی باشد. زیرا ارزیابی آنها بر اساس معیارهای اصلی نبود [٢٣،٢٢]. واضح است که فرایند انجماد و ذوب به قابلیت حیات اسپرم زیان می‌رساند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فرایند انجماد سبب کاهش قابلیت حیات اسپرم می‌شود که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد [٢٥،٢٤]. در مطالعه حاضر قابلیت حیات اسپرم پس از انجماد شیشه‌ای حدود ٥٢ درصد کاهش یافت؛ در صورتی‌که در تحقیقات Glander و Schaller قابلیت حیات اسپرم پس از انجماد به دو روش شیشه‌ای و آهسته با حضور محافظین انجمادی (البته در نمونه‌های مردان بارور) تغییر معنی‌داری نکرده بود [٢٠]. در بررسی آپوپتوز (با تکنیک آنکسین V)، گزارش شده که میزان آن پس از انجماد آهسته حدود ٢٦ درصد نسبت به قبل از انجماد افزایش نشان می‌دهد [٢٦]. همچنین، این میزان پس از انجماد شیشه‌ای حدود ٢٢ درصد افزایش یافته است [٢٠]. بر اساس نتایج تحقیقی که توسط پیروی و همکاران در مورد آپوپتوز اسپرم افراد نابارور توسط انکسین V و روش انجماد سریع انجام گرفت، نشان داده شد که درصد میانگین اسپرم‌های آپوپتوتیک بعد از انجماد سریع در افراد نابارور حدود ٦ برابر افزایش یافته است [٢٧]. گزارش شده که قبل از انجماد حدود ١٠ درصد اسپرم های گاو دارای DNA شکسته شده هستند [٢٨]. در مطالعه Zhang و همکاران در سال ٢٠٠٨ میزان قطعه قطعه شدن DNA با سنجش تانل حدود ١٤±٢٣ درصد در نمونه‌های منی قبل از انجماد گزارش شد و میزان آپوپتوز با پارامترهای نرمال اسپرم رابطه منفی داشت [٢٩]. در مطالعه حاضر میزان آپوپتوز اسپرم مردان نابارورحدود ١١ درصد افزایش یافت که در مقایسه با سایر مطالعات در صد کمتری از مرگ سلولی را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد استفاده نکردن از ضد یخ در این مطالعه اثرات سمی آن را بر روی DNA حذف کرده و در نتیجه مرگ سلولی کمتری را باعث شده است. همچنین، آپوپتوز ایجاد شده با پارامترهای نرمال اسپرم رابطه منفی داشت؛ یعنی هر چه نمونه اسپرم نرمال‌تر باشد، میزان آپوپتوز کمتراست. پژوهش‌ها نشان داده که آسیب DNA در اسپرم انزالی انسان توسط شکست‌هایی در دو زنجیره یا یک زنجیره DNA نمایان می‌شود. در مردانی که دارای پارامترهای منی غیر نرمال هستند، حفاظت DNA ضعیف‌تر است [٣١،٣٠].

نتیجه گیری

در مجموع می‌توان گفت انجماد شیشه‌ای اسپرم، باعث کاهش میزان تحرک، مورفولوژی و قابلیت حیات و افزایش آپوپتوز اسپرم در مردان نابارور می‌شود. اما، میزان آپوپتوز اسپرم در مقایسه با سایر روش‌های انجماد کمتر است. از طرف دیگر نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که اسپرم‌های با تحرک بالا، سطوح پایین آسیب DNA را نشان می‌دهند و میزان آپوپتوز رابطه معکوس با پارامترهای اسپرم نرمال (به ویژه حرکت پیشرونده و قابلیت حیات) دارد. بنابراین انجماد شیشه‌ای پس از جدا سازی اسپرم‌های با تحرک بالا، به دلیل میزان کمتر آپوپتوز، ساده و سریع بودن، عدم نیاز به ضد یخ و استفاده از دستگاه‌های گران قیمت، جهت استفاده در IVF (In Vitro fertilization) و ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولین محترم مرکز درمانی ناباروری شهید صدوقی یزد به دلیل حمایت‌های مالی و کمک‌های بی‌دریغشان کمال تشکر و سپاس را دارند.

References:

[1] Bahadur G, Ling KL, Hart R, Ralph D, Wafa R, Ashraf A, et al. Semen quality and cryopreservation in adolescent cancer patients. ***Hum Reprod*** 2002; 17(12): 3157-61.
[2] Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahusevinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. ***J Assist Reorod Genet*** 2008; 25(8): 403-11.
[3] Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. ***Theriogenology*** 2007; 67(1): 81-9.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-13]

[4] Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications methods and results. ***J Urol*** 2003; 170(4 pt 1): 1079-84.
[5] Jahnel F. Uber die widerstandsfahigkeit von menschlichen spermatozoonen gegenuber starker kalte. ***Klinische wochenschrift*** 1938; 17: 1273-74.
[6] Hoagland H, Pincus G. Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. ***J Gen Physiol*** 1942; 25(3): 337-44.
[7] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at-196ºC by vitrification. ***Nature*** 1985; 313(6003): 573-5.
[8] Mahadevan M, Trounson AO. Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. ***Andrologia*** 1983; 15(4): 355-66.
[9] Keel BA, Robert VM, May JV, Webster BW. A microcomputer data base system for an in vitro fertilization clinic programmed in BASIC. ***In Vitro Fert Embryo Transf*** 1990; 7(5): 249-53.
[10] Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants: review of problem and practical success. ***Reprod Biomed Online*** 2003; 6(2): 191-200.
[11] Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidyl serine. ***Fertile Steril*** 2001; 75(2): 263-8.
[12] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. ***Nature*** 2000; 407(6805): 770-6.
[13] Ramos L, Wetzels AM. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. ***Hum Reprod*** 2001; 16(8): 1703-7.
[14] World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction. Cambridge University Press; 1999. p. 4-34.
[15] Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. ***Fertil Steril*** 1988; 49(1): 112-7.
[16] Barthelemy C, Royere D, Hammahah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansac J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. ***Arch Androl*** 1990; 25(1): 29-40.
[17] Rao B, David G. Improved recovery of post–thaw motility and vitality of human spermatozoa cryopreserved in the presence of dithiothreitol. ***Crybiology*** 1984; 21(5): 536-41.
[18] Brotherton J. Cryopreservation of human semen. ***Arch Androl*** 1990; 25(2): 181-95.
[19] Isachenko V, Isachenko E, Montag M, Zaeva V, Krivokharchenko A, Nawroth F, et al. Clean technique for cryoprotectant– free vitrification of human spermatozoa. ***Reprod Biomed Online*** 2005; 10(3): 350-4.
[20] Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. ***Mol Hum Reprod*** 1999; 5(2): 109-15.
[21] Kruger TF, Haque D, Acosta AA, Pleban P, Swanson RJ, Simmons KF, et al. Correlation between sperm morphology, acrosin, and fertilization in an IVF program. ***Arch Androl*** 1988; 20(3): 237-41.
[22] Donnelly ET, Steele EK, Mcclure N, Lewise SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. ***Hum Reprod*** 2001; 16(6): 1191-9.
[23] Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. ***Int J Androl*** 1999; 22(3): 155-62.
[24] Morris GJ, Acton E, Avery S. A novel approach to sperm cryopreservation. ***Hum Reprod*** 1999; 14(4): 1013-21.
[25] Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A. Improvement in motion characteristic and acrosome reaction status in cryopreserved human spermatozoa by swim up processing before freezing. ***Hum Reprod*** 2000; 15(10): 2173-9.
[26] Paasch U, Grunewald S, Wuendrich K, Jope T, Glander HJ. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. ***Asian J Androl*** 2005; 7(1): 61-9.
[27] Peiravi T, Karimipor M, Soleimani Rad J, Ghafari M. The effect of vitrification on Apoptosis of spermatozoa in fertile and subfertile men. ***Urmia Medical Journal*** 2006; 16(4): 211-5. [in Persian]
[28] Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis – like mechanism in bull sperm. ***Biol Reprod*** 2004; 71(1): 28-38.
[29] Zhang HB, Lu SM, Ma CY, Wang L, Li X, Chen ZJ. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. ***Asian J Androl*** 2008; 2: 227-35.
[30] Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. ***J Surg Res*** 2007; 139(1): 143-56.
[31] Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. ***Cell Res*** 2007; 17(9): 759-71.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-13]