اثر انجماد شیشه‌ای برروی پارامترها و آپوپتوز اسپرم مردان بارور

مریم ادیب*
مینا رمضانی**
محمدعلی خلیلی***

* کارشناس ارشد علوم جانوری ـ تکوینی، دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
** دکترای زیست شناسی سلولی و تکوینی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
*** دکترای جنین‌شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری

تاریخ وصول:۱۳۸۹/۵/۲
تاریخ پذیرش:۱۳۸۹/۷/۲۰

مؤلف مسئول: مینا رمضانی
پست الکترونیک: mina.ramezani@gmail.com

چکیده:

مقدمه و هدف: امروزه انجماد اسپرم انسان به عنوان تکنیک رایجی برای درمان ناباروری به کار می‌رود. انجماد به روش‌های مختلف کم و بیش سبب کاهش تحرک و قابلیت حیات اسپرم در مردان بارور می‌شود، اما هنوز اثر روش انجماد شیشه‌ای بر روی پارامترهای اسپرم مردان بارور و نیز میزان آپوپتوز آنها بررسی نشده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر انجماد شیشه ای بر روی پارامترهای اسپرم (تحرک، مورفولوژی، قابلیت حیات و شمارش) و میزان آپوپتوز آن در مردان بارور است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۸ در مرکز تحقیقاتی ــ درمانی ناباروری یزد انجام شد، نمونه های سیمن ۱۷ نفر مراجعه کننده به مرکز، به وسیله خود انزالی جمع‌آوری و آنالیز آن طبق استانداردهای سازمان بهداشت جهانی انجام گرفت. سپس از نمونه‌ها اسمیر تهیه شد و لام‌ها برای رنگ‌آمیزی تانل و تعیین درصد مرگ سلولی فیکس شدند. مقداری از سیمن با کرایو لوپ برداشته شد و مستقیماً در نیتروژن مایع منجمد شد. پس ازگذشت حداقل ۷ روز از انجماد، نمونه‌ها طی مراحلی ذوب شده و پارامترهای اسپرمی‌آن بررسی شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری تی زوجی و ویل کاکسون تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: درصد تحرک پیش‌رونده بعد از انجماد شیشه‌ای به طور معنی‌داری کاهش یافت($p<۰/۰۵$). هم‌چنین کاهش معنی‌داری در قابلیت حیات و مورفولوژی اسپرم و افزایش معنی‌داری در میزان آپوپتوز مشاهده شد($p<۰/۰۵$)، اما پارامتر شمارش اسپرم تغییر معنی‌داری نداشت ($p>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که انجماد شیشه‌ای بر روی پارامترها و میزان آپوپتوز اسپرم مردان بارور اثر سوئی دارد. هر چند میزان آپوپتوز نسبت به سایر روش‌های انجماد کمتر است.

واژه های کلیدی: انجماد شیشه‌ای، اسپرم، آپوپتوز، باروری

مقدمه

انجماد اسپرم انسان به عنوان تکنیکی عملی و مفید جهت سهولت دسترسی به مایع سمینال اهداء کنندگان می‌باشد. امروزه از اسپرم منجمد شده و ذوب شده انسان در بسیاری از روش‌های کمک باروری نظیر تلقیح داخل رحمی اسپرم درآزمایشگاه‌ها استفاده می‌شود(۱). در روند انجماد، تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی مشکل ساز است و بقاء سلول‌های منجمد شده بستگی به نوع سلول، سرعت انجماد، نوع ضد یخ و روش انجماد دارد(۲).

انواع روش‌های انجماد شامل؛ انجماد آهسته، انجماد سریع و انجماد شیشه‌ای می‌باشند. در روش انجماد آهسته، دما به تدریج کاهش می‌یابد، اما در روش سریع سلول‌ها برای مدتی در فاصله ۱۵ تا ۳۰ سانتی‌متر از سطح نیتروژن مایع قرار گرفته، سپس به درون مخزن نیتروژن مایع انتقال داده می‌شوند. در هر دو روش کریستال‌های یخ تشکیل می‌شود(۱). بنا بر این مطالعه‌های زیادی جهت کاهش زمان و حذف کریستال‌های یخ و تجهیزات گران قیمت مورد نیاز در روش انجماد آهسته صورت گرفته است. یکی از راه‌های اجتناب از آسیب اسپرم، استفاده از روش شیشه‌ای شدن می‌باشد. در این روش، با فرو بردن سریع نمونه به درون نیتروژن مایع، عمل انجماد فوق‌العاده سریع انجام می‌شود و نمونه‌ها با سرعت‌های خیلی بالای سرما دهی (۷۲۰۰۰۰ کیلومتر بر دقیقه) و مدت زمان کم (۸ ـ۵ ثانیه) منجمد می‌گردند(۳).

در اوایل سال ۱۹۸۰،رال و فاهی[1] روش انجماد شیشه‌ای بدون تشکیل کریستال‌های یخ را برای جنین با استفاده از غلظت‌های بالای ضد یخ ارایه کردند. اساس انجماد شیشه‌ای بر عدم تشکیل کریستال‌های یخ به علت استفاده از غلظت‌های بالای ضد یخ و سرعت بالای سرد شدن است(۴).

ایساچنکو و همکاران[2](۲۰۰۳) انجماد شیشه‌ای اسپرم را به وسیله کرایو لوپ و بدون استفاده از ضد یخ گزارش نمودند. این روش به دلیل سرعت بالای سرد شدن نمونه و عدم استفاده از ضد یخ که خود اثرات سمی بر اسپرم دارد قابلیت حیات و تحرک اسپرم را در مقایسه با روش معمولی انجماد افزایش داد(۵).

آپوپتوزیس در اسپرم‌زایی نرمال دخالت دارد و عدم تنظیم این پروسه ناهنجاری‌هایی در اسپرم ایجاد می‌کند. در آپوپتوز دو رویداد مهم روی می‌دهد که اولی تغییرات غشاء است و باعث جا به جایی فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی به نیمه خارجی غشاء می‌شود. دومین تغییر فراگمنته شدن منظم DNA است. به نظر می‌رسد فعال شدن اندونوکلئاز هسته‌ای، DNA را در محل‌های خاص می‌شکند که با نشان‌دار کردن آنزیمی به وسیله تانل که قادر است انتهای شکسته‌ها در زنجیره DNA را شناسایی کند، بررسی می‌شود(۶).

با توجه به این که تاکنون اطلاعات بسیار کمی در رابطه با اثرات این نوع انجماد بر پارامترهای

1-Rall & Fahy
2-Isachenko et al

اسپرم و آپوپتوزیس که نقش مهمی در باروری دارد در دسترس است، در این تحقیق تأثیر انجماد شیشه‌ای بر روی پارامترها و میزان آپوپتوز اسپرم مردان بارور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۸ در مرکز تحقیقاتی ـ درمانی ناباروری یزد انجام شد. پس از کسب رضایت کتبی از افراد مورد مطالعه نمونه‌های سیمن ۱۷ فرد مراجعه کننده به مرکز، پس از ۷ـ۲ روز خودداری از مقاربت، از طریق خود انزالی در ظروف استریل جمع‌آوری شد. سن افراد مراجعه کننده بین ۵۰ ـ۳۰ سال بود. سپس برای مایع شدن، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه درانکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون CO_2 نگهداری شدند. پس از برگشت سیمن به حالت مایع، آنالیز آن بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی انجام شد(۷). سپس نمونه به دو قسمت تقسیم شد؛ یک قسمت به عنوان نمونه کنترل به صورت تازه و قسمت دیگر آن به عنوان نمونه آزمون به روش انجماد شیشه‌ای و بدون استفاده از ضد یخ منجمد شد تا پس از ذوب مورد بررسی قرار گیرد.

برای مشاهده تحرک اسپرم‌ها ۱۰ میکرولیتر از سیمن را بر روی لام شیشه‌ای قرار داده و با بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری، تعداد اسپرم‌های دارای حرکت سریع پیش‌رونده و رو به جلو، آهسته پیش‌رونده رو به جلو، حرکت در جا و اسپرم‌های بی‌حرکت را در چند میدان دید میکروسکوپی شمارش کرده و در صد اسپرم‌های متحرک و غیر متحرک را به دست آورده و نتایج برای هر نمونه در قبل و بعد از انجماد ثبت شد. برای تعیین غلظت(تعداد) اسپرم، ۱۰ میکرولیتر از سیمن با ۹۹۰ میکرولیتر محلول شمارش اسپرم رقیق شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از آن با لام نئوبار شمارش شد.

جهت رنگ‌آمیزی ائوزین، ۱۰ میکرولیتر از سیمن را روی لام قرار داده سپس ۱۰ میکرولیتر محلول ائوزین به آن افزوده شد و با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده شد. اسپرم‌هایی که رنگ را به خود گرفته‌اند و قرمز یا صورتی شده‌اند مرده و آنها که سر سفیدند و رنگ را به خود نگرفته‌اند، زنده‌اند. در هر لام تعداد اسپرم‌های زنده در ۱۰۰ اسپرم شمرده شد و نتایج قبل و بعد از انجماد ثبت گردید.

شکل طبیعی اسپرم، بیضی شکل و دارای سر به ابعاد ۲/۵×۵ میکرون است و حدود ۷۰ درصد قدامی سر به وسیله آکروزوم واضح و یکنواخت پوشانده شده است. همچنین دارای گردن سالم و بدون نقایص آناتومیکی با دم کشیده است. برای تعیین مرفولوژی اسپرم، مایع سیمن با محلول گیمسا رنگ‌آمیزی شد. در هر لام حداقل ۱۰۰ اسپرم با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری از نظر مورفولوژی طبیعی بررسی شد.

مقدار ۱۰ میکرولیتر از سیمن روی لام قرار گرفته و از آن اسمیر تهیه شد. پس از خشک شدن، لام

درون پارا فرمالدهید به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس درون بافر PBS به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته شد. در پایان به مدت ۲ دقیقه در اتانل ۹۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لام خارج شده و پس از خشک شدن، شمارش شده و در فریزر نگهداری شد.

برای منجمد کردن نمونه ها، ابتدا کرایولوپ‌ها را درون مایع سیمن فرو برده و آرام بیرون آورده و در جعبه یونولیتی حاوی نیتروژن انداخته شد. 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 شد. سپس کین در یکی از لوله‌های تعبیه شده در تانک نیتروژن قرار داده شد. بعد از گذشت مدت زمان معینی (حداقل ۷ روز) نمونه ها خارج وذوب شد.

برای ذوب کردن نمونه‌ها، کرایولوپ‌ها از تانک نیتروژن خارج شده و فوراً درون لوله آزمایش حاوی محیط Hams F10 قرار داده شد. لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت. سپس کرایولوپ‌ها از آن خارج شد و لوله آزمایش در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۸ ـ ۵ دقیقه با دور ۳۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع روی آن دور ریخته شده و به پلیت کوچکی که ته لوله تشکیل شد یک یا دو قطره محیط Hams F10 افزوده و پس از هموژن شدن، آزمایش‌های قبل از انجماد، مجدداً تکرار شدند.

از کیت تانل ساخت کشور آلمان برای رنگ‌آمیزی تانل و بررسی آپوپتوزیس نمونه‌ها استفاده شد. پس از شستشوی لام‌های فیکس شده در محلول PBS ، لام‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن در متانول قرار داده شد و مجدداً شستشو شدند. سپس سدیم سیترات و تریتون به آن اضافه شد و به مدت ۲۵ـ۱۵ دقیقه درون انکوباتور قرار داده شد تا تریتون که حالت روغنی دارد حل شود. لام‌ها پس از ۵ دقیقه از PBS قبلی برداشته و در PBS جدید گذاشته شدند. سپس لام‌ها را درون محلول تریتون و بافر سیترات گذاشته و به مدت ۵ دقیقه در یخچال قرار داده شد. تریتون باعث نفوذپذیر شدن غشای سلول‌ها می‌شود. پس از شستشوی لام‌ها برای هر نمونه ۵ میکرولیتر آنزیم سولوشن و ۴۵ میکرولیتر لیبل سولوشن 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 به میزان ۵۰ میکرولیتر محلول پراکسیداز اضافه شد و لام‌ها به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور گذاشته شدند. سپس لام‌ها خارج شده و سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه در بافر شستشو شدند. برای هر لام به میزان ۶۰ ـ۵۰ میکرولیتر محلول داب[1] اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در محیط قرار داده شد. در مرحله بعد لام‌ها دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر شستشو شدند. سپس لام‌ها به وسیله هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها

1-Di Amino Bezidine (DAB)

بـا میکروسـکوپ نـوری بررسـی شـده و میـزان سلول‌های آپوپتـوز شـده بـه صـورت درصـد تعیـین شدند. سـلول‌هـایی کـه دچـار آپوپتـوز شـده‌انـد آبـی پررنگ شده و سلول‌های طبیعی آبی کم رنگ بودند.

داده‌هـای جمـع‌آوری شـده بـا اسـتفاده از نرم‌افزار SPSS [1] و آزمون‌های آماری تی زوجی[2] و ویل کاکسون[3] تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج مطالعه نشان داد که تفـاوت معنـی‌داری بین میانگین متغیرهای حرکت سـریع، آهـسته، درجـا، بـی‌حرکـت، مورفولـوژی، قابلیـت حیـات و آپوپتـوز اسـپرم، قبـل و بعـد از انجمـاد شیـشه‌ای وجـود دارد($p<۰/۰۵$). در مورد متغیر تعـداد اسـپرم، تفـاوت معنی‌داری بین میانگین این متغیر، قبل و بعد از انجماد وجود ندارد($p>۰/۰۵$)(جدول ۱).

بر اساس نتایج حاصله، حرکت کل اسپرم پـس از انجماد شیشه‌ای ۵۹ درصـد کـاهش، قابلیـت حیـات اسپرم ۶۷ درصد و مورفولوژی اسپرم پس از انجمـاد شیشه‌ای حدود ۹ درصد کاهش داشت. میزان آپوپتوز افزایشی در حدود ۸ درصد را نشان داد. نتایج ارتباط بین میزان آپوپتوز و سایر پارامترهای اسـپرم، قبـل و بعد از انجماد در جدول ۲ آمده اسـت. همـان‌طـور کـه مشاهده می‌شود میزان آپوپتوز با حرکت پیش‌رونده و قابلیت حیات اسـپرم قبـل و بعـد از انجمـاد شیـشه‌ای ارتباط معکوس دارد. یعنی در اسـپرم‌هـای بـا حرکـت پیش‌رونده و قابلیت حیات بیـشتر میـزان آپوپتـوز بـه طور معنی‌داری کمتر است.

جدول ۱: مقایسه میانگین و انحراف‌معیار پارامترهای اسپرم قبل و بعد از انجماد شیشه‌ای در مردان بارور مطالعه شده

پارامتر	قبل از انجماد	بعد از انجماد	سطح معنی داری
حرکت سریع (درصد)	۳۱/۱۱ ± ۱۴/۲۷	۴/ ۴۷ ± ۲/۸۸	< ۰/۰۰۱
حرکت آهسته (درصد)	۲۵/۰۰ ±۱۱/۹۹	۲/۱۷ ±۱/۴۲	< ۰/۰۰۱
حرکت درجا (درصد)	۱۱/۴۷±۴/۳۶	۳/۵۸ ± ۲/۴۵	< ۰/۰۰۱
بی‌حرکت (درصد)	۳۲/۴۱±۱۰/۰۱	۹۰/۷۶± ۷/۵۲	< ۰/۰۰۱
مورفولوژی طبیعی(درصد)	۴۶/۰۵± ۱۰/۴۶	۳۷/۰۰ ± ۱۱/۷۲	< ۰/۰۵
قابلیت حیات (درصد)	۷۸/۴۷ ±۹/۳۸	۱۱/۰۵ ± ۷/۳۰	< ۰/۰۰۱
آپوپتوز (درصد)	۱۶/ ۴۱ ± ۴/۵۳	۲۴/۷۶± ۵ /۰۳	< ۰/۰۵
حرکت پیشرونده (درصد)	۵۶/۱۱ ± ۱۰/۴۵	۵/۲۹ ± ۵/۰۵	< ۰/۰۰۱
کل حرکت(درصد)	۶۷/۵۸ ± ۱۰/۰۱	۸/۶۴ ± ۶/۸۱	< ۰/۰۰۱
تعداد اسپرم(میلیون در سانتی‌متر مکعب)	۱۲۰/ ۷۰ ± ۹۸ /۱۴	۸۹/۰۰ ± ۵۹/۳۰	۰/۱۳۴

1-Statistical Package for Social Sciences
2-Paired T-Test
3-Wilcoxon Singed Ranks

جدول ۲: شاخص‌های آماری همبستگی آپوپتوز با پارامترهای اسپرم قبل و بعد از انجماد شیشه‌ای در مردان بارور مورد مطالعه*

شاخص	حرکت سریع	حرکت آهسته	حرکت درجا	بی‌حرکت	قابلیت حیات	مورفولوژی	تعداد
قبل از انجماد	−۰/۲۳۸	/۰۸	۰/۰۶۷	۰/۲۱۵	−۰/۰۳۵	−۰/۸۵۳	۰/۱۵۸
سطح معنی‌داری	۰/۳۵۷	۰/۷۶۱	۰/۷۹۹	۰/۴۰۷	۰/۸۹۴	<۰/۰۰۱	۰/۵۴۵
پس از انجماد	− ۰/۴۹۳	− ۰/۴۱۱	− ۰/۶۳۳	۰/۶۶۸	− ۰/۶۶۰	۰/۴۵۴	۰/۵۳۲ −
سطح معنی‌داری	< ۰/۰۵	۰/۱۰۱	۰/۰۰۶	<۰/۰۵	<۰/۰۵	۰/۰۶۷	۰/۰۲۸

*اعداد ضریب همبستگی هستند، علامت منفی نشان‌دهنده ارتباط عکس آپوپتوز با هر یک از پارامترهای اسپرم است.

بحث و نتیجه‌گیری

از آنجا که مشخص شده است روش‌های مختلف انجماد کم و بیش سبب کاهش تحرک و قابلیت حیات اسپرم و هم‌چنین افزایش آپوپتوز در مردان بارور می‌شود(۶ و۲)، هدف پژوهش حاضر بررسی اثر انجماد شیشه‌ای بدون استفاده از ضد یخ، بر پارامترهای مختلف اسپرم و میزان آپوپتوز است.

نتایج به دست آمده بیانگر این است که پس از انجماد شیشه‌ای و بدون استفاده از ضد یخ، تحرک پیش‌رونده، قابلیت حیات، غلظت و مورفولوژی طبیعی اسپرم به طور معنی‌داری کاهش یافته و میزان آپوپتوزیس به طورمعنی‌داری افزایش می‌یابد، اما میزان آپوپتوز نسبت به سایر مطالعه‌ها کمتر است. نتایج این مطالعه مطابق با یافته‌های سایر محققین نشان داد که انجماد سبب کاهش پارامترهای حرکتی اسپرم می‌شود(۸). در این مطالعه حرکت کل اسپرم پس از انجماد حدود ۵۹ درصد کاهش یافت. ایساچنکو و همکاران(۲۰۰۳) پس از انجماد اسپرم مردان بارور با همین روش انجماد، میزان کاهش تحرک را حدود ۴۰ درصد گزارش کردند که در مقایسه با روش‌های معمول انجماد تفاوت معنی‌داری نداشت(۹).

کاهش بیشتر تحرک اسپرم که در مطالعه حاضر دیده می‌شود، احتمالاً به این دلیل است که در مطالعه مذبور ابتدا اسپرم‌های متحرک به وسیله روش شناوری جدا کرده و سپس نمونه منجمد می‌شود، ولی در این تحقیق نمونه اولیه اسپرم بدون هیچ تغییری منجمد شد. به نظر می‌رسد میزان کاهش تحرک و یا به عبارت دیگر میزان بقاء حرکت پس از انجماد بستگی به عوامل مختلفی از جمله روش انجماد و کیفیت اولیه نمونه داشته باشد. مطابق با نتایج سایر محققان نشان داده شد که بدون توجه به روش بررسی، مورفولوژی اسپرم در طی انجماد کاهش می‌یابد(۱۰). مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهند که سرعت ذوب و روش‌های مختلف آن می‌تواند در کیفیت اسپرم پس از ذوب مؤثر باشند. نتایج حاصل از

این مطالعه نشان داد که فرآیند انجماد سبب کاهش قابلیت حیات اسپرم می‌شود که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد(۱۱). در مطالعه حاضر قابلیت حیات اسپرم پس از انجماد شیشه‌ای حدود ۶۷ درصد کاهش یافت، در صورتی که در مطالعه گلندرو اسکالر[۱](۱۹۹۹) قابلیت حیات اسپرم پس از انجماد به دو روش شیشه‌ای و آهسته با حضور ضدیخ تغییر معنی‌داری نکرده بود(۱۲).

در بررسی آپوپتوز، گزارش شده که میزان آن پس از انجماد آهسته حدود ۲۶ درصد نسبت به قبل از انجماد افزایش نشان می‌دهد(۱۳). هم‌چنین گزارش شده که این میزان پس از انجماد شیشه‌ای حدود ۲۲ درصد افزایش یافته است(۱۲). طبق تحقیقی که به وسیله پیروی و همکاران (۲۰۰۶) در مورد آپوپتوز اسپرم افراد بارور انجام گرفت نشان داده شد که درصد میانگین اسپرم‌های آپوپتوتیک بعد از انجماد سریع در افراد بارور حدود ۳ برابر افزایش یافته است(۱۴). طبق مطالعه مارتین و همکاران[۲](۲۰۰۴) قبل از انجماد حدود ۱۰ درصد اسپرم‌های دارای DNA قطعه قطعه شده مشاهده شدند(۱۵). آنالیسا و همکاران[۳](۲۰۰۶) نشان دادند که عفونت باکتریایی می‌تواند سبب آپوپتوزیس در اسپرم انسان شود و با سنجش تانل مشخص شد که قطعه قطعه شدن DNA در این افراد افزایش می‌یابد(۱۶). در مطالعه هائوبو و همکاران[۴] (۲۰۰۸) میزان قطعه قطعه شدن DNA با سنجش تانل حدود ۱۴± ۲۳ درصد در نمونه‌های سیمن قبل از انجماد گزارش شد و میزان آپوپتوز با پارامترهای نرمال اسپرم رابطه منفی داشت(۱۷). طبق یافته‌های مارتین و همکاران[۵] (۲۰۰۷) از طریق سنجش تانل ثابت شد که۱۴ درصد سلول‌ها دارای DNA قطعه قطعه شده بودند. هم‌چنین مشخص شد که میزان قطعه قطعه شدن DNA رابطه منفی با پتانسیل باروری دارد (۱۸).

در مطالعه حاضر میزان آپوپتوز اسپرم مردان بارور حدود ۸ درصد افزایش یافت که در مقایسه با سایر مطالعه‌ها درصد 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 نرمال تر باشد میزان آپوپتوز کمتراست. در مردانی که دارای پارامترهای سیمن غیر نرمال هستند حفاظت DNA ضعیف‌تر است(۱۹).

در مجموع از این مطالعه چنین بر می‌آید که انجماد شیشه‌ای اسپرم، باعث کاهش میزان تحرک، مورفولوژی و قابلیت حیات و افزایش آپوپتوز اسپرم در مردان بارور می‌شود، اما میزان آپوپتوز اسپرم در مقایسه با سایر روش‌های انجماد کمتر

1-Glander & Schaller
2-Martin et al
3-Annalisa et al
4-Hao-Bo et al
5-Martin et al

است. از طرف دیگر مشاهده شد که اسپرم‌های با تحرک بالا، سطوح پایین آسیب DNA را نشان می‌دهند. میزان آپوپتوز رابطه معکوس با پارامترهای اسپرم نرمال به ویژه حرکت پیش‌رونده و قابلیت حیات داشت. بنابراین انجماد شیشه‌ای با روش اخیر، پس از جداسازی 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 درلقاح آزمایشگاهی[1] و تزریق داخل سیتوپلاسی اسپرم[2] پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

از پرسنل مرکز درمانی ناباروری یزد به دلیل همکاری در اجرای این طرح تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

1-In Vitro Fertilization
2-Intra Cytoplasmic Sperm Iinjection

Effect of Vitrification on Sperm Parameters and Apoptosis in Fertile Men

Adib M*,
Ramezani M,**
Khalili MA***
*MSc in Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran.
**Assistant Professor of Developmental Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University- Ashtian Branch, Ashtian, Iran.
*** Assistant Professor of Embryology, Research and Clinical Center for Infertility, Shahid Sadoghi University of Medical Science, Yazd, Iran.

Received:24/07/2010
Accepted:12/10/2010

Corresponding Author: Ramezani M
Email: mina.ramezani@gmail.com

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Today, cryopreservation of the human sperm is a common technique for treating infertility. It has been indicated that cryopreservation by different methods decrease the sperm motility and viability in fertile men, but still effect of freezing of the sperm by vitrification method have not been evaluated on sperm parameters and apoptosis. The aim of this study was to evaluate the effect of vitrification of sperm of fertile men on different sperm parameters (motility, morphology, viability and count) and apoptosis after thawing.

Materials & Methods: In this experimental study which was conducted at Yazd Infertility Research and Clinical Center in 2009, seventeen semen samples were collected by masturbation from people who came to this centre. Semen analysis was performed according to WHO standards. Smear was provided from these samples and fixed for TUNEL staining. Some samples were directly cryopreserved by cryoloope in liquid nitrogen and stored at least for Seven days. After thawing, samples were evaluated for sperm parameters. The collected data was analyzed by the SPSS software using paired T-test and Willcoxon statistical test.

Results: The progressive movement of sperm was significantly decreased by vitrification. Also significant decrease in viability and morphology of the sperm and increase in the rate of apoptosis was observed after vitrification. The amount of apoptosis had negatively correlated with normal parameters of spermatozoa (especially progressive motility and viability).

Conclusion: These results indicated that vitrification is harmful for sperm parameters and of apoptosis rate in fertile men. However, the apoptosis rate was lower compared to other freezing methods.

Key words: Vitrification, Sperm, Apoptosis, fertility

REFRENCES:

1.Mahadevan M, Trounson AO. Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa. Andrologia 1984 ;16:1.52-60.

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; 8: 403-11.

3.Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. Theriogenology 2007; 1: 81-9.

4.Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196ºC by vitrification. Nature 1985; 313: 573-5.

5.Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Nawroth F. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants: review of problem and practical success. RBMonline 2003; 6: 191-200.

6.Ramos L, Wetzels AM. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. Hum Reprod 2001; 8: 1703-7.

7.World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction. Cambridge University Press: New York: 1999; 4-34.

8.Brotherton J. Cryopreservation of human semen. Arch Androl 1990; 25:181-95.

9.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 2005; 10(3): 350-4.

10.Dalzell LH, Thompson –Cree ME, Mc Clure N, Traub AI. Lewis SE Effects of 24 hour incubation after freeze-thawing on DNA fragmentation of testicular sperm from infertile and fertile men. Fertil Steril 2003, 79: 1670-2.

11.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: 2173-9.

12.Glander HJ. Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. Medicine 1999; 2: 109-15.

13.Uwe P, Sonja G, Katja W, Torsten J. Hans-Jurgen G. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. Asian J Androl 2005; 1: 61-9.

14.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.

15.Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis – like mechanism in bull sperm. Biol Reprod 2004; 1: 28-8.

16.Annalisa S, Aldo S, Adriana G, Angela M, Anna P, Enso V, et al. Experimental chlamydia trachomatis infection causes apoptosis in human sperm. Hum Reprod 2006 21(1): 134-7.

17.Hao-Bo Z, Shao-ming L, Chan–Yan M, Li W, Zi-Jiang C. Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. Asian J Androl 2008; 2: 227-35.

18.Martin CF, Dode MN, Bao SN, Rump f R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. Genet Mol Res 2007; 6(1):94-104.

19.Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. J Surg Res 2007; 1: 143-56.