

بررسی اثر انجماد در فاز بخار بر آکروزوم اسپرم افراد بارور و نابارور

تهمینه پیروی (Ph.D.)^۱، معرفت غفاری نوین (M.D., Ph.D.)^۲، جعفر سلیمانی‌راد (Ph.D.)^۳، لعیا فرزندی (M.D.)^۴

۱- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولید مثل و نازایی، پژوهشکده ابن‌سینا، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

۴- استادیار، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

مقدمه: آکروزوم ساختمانی کلاهد مانند است و حاوی آنزیم‌های هیدرولیتیک متعدد لازم برای واکنش آکروزومی می‌باشد. به‌طور کلی اهمیت واکنش آکروزومی اسپرم در این است که روی سطح زوناپلوسیدا رخ دهد؛ در غیر این صورت اسپرم نمی‌تواند از این لایه عبور کند. از سوی دیگر روند انجماد-ذوب می‌تواند باعث پارگی غشاء آکروزوم و در نتیجه کاهش قدرت باروری آن گردد. با توجه به اطلاعات بسیار کم موجود در رابطه با اثر انجماد در فاز بخار بر آکروزوم و اهمیت آن برای زوج‌های نابارور، هدف این مطالعه، بررسی میزان آسیب آکروزومی در خلال انجماد در فاز بخار در مردان بارور و نابارور می‌باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه نمونه‌های مایع منی از ۲۰ مرد نابارور الیگواسپرم و ۱۰ مرد بارور بعد از ۴۸ ساعت خودداری از مقاربت، جمع‌آوری شد. بعد از آنالیز نمونه‌ها براساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO)، توسط دستگاه آنالیزر مایع منی از نظر حجم، تعداد، حرکت و مورفولوژی، نمونه‌ها به دو بخش با حجم $100 \mu l$ تقسیم شدند. بخش اول نمونه‌ها در هر دو گروه برای نشان دادن آکروزوم، با روش رنگ‌آمیزی سه‌گانه رنگ شدند و بخش دوم نمونه‌ها بعد از دو هفته انجماد و ذوب از نظر آکروزوم مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از شمارش اسپرم‌ها قبل و بعد از انجماد در فاز بخار بعد از رنگ‌آمیزی سه‌گانه در هر دو گروه توسط Paired t-test آنالیز شد.

نتایج: در شرایط قبل از انجماد، درصد میانگین اسپرم‌های زنده با آکروزوم دست‌نخورده در افراد نابارور الیگواسپرم $26 \pm 3/64$ و در افراد بارور $33/37 \pm 4/07$ بود که پس از انجماد در فاز بخار در افراد نابارور به $11/6 \pm 1/82$ و در افراد بارور به $9/87 \pm 2/97$ کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه انجماد در فاز بخار به ساختمان آکروزوم صدمه زده و باعث پارگی آکروزوم و خروج محتویات آنزیمی آکروزوم در غیاب اووسیت می‌گردد و به این طریق باعث کاهش باروری اسپرم در افراد نابارور و بارور خواهد شد.

کل واژگان: آکروزوم، انجماد در فاز بخار، اسپرم، باروری، ناباروری، و روش‌های کمک باروری.

آدرس مکاتبه: دکتر معرفت غفاری نوین، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی تولید مثل و نازایی، پژوهشکده ابن‌سینا، اوین، صندوق پستی: ۱۷۷-۱۹۸۳۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: mghaffarin@yahoo.com

مقدمه

آکروزوم^۱ اسپرم ساختمانی مشتق از دستگاه گلژی است که مانند یک کلاهک ناحیه قدامی هسته را می پوشاند و محتوی آنزیم‌های هیدرولیتیک متعددی است (۱).

آکروزوم از دو بخش قدامی و خلفی به نام سگمان استوایی^۲ تشکیل شده است (۲). پس از ظرفیت‌گیری^۳، اسپرم توانایی اتصال به زوناپلوسیدا^۴ را به دست می آورد و به گیرنده‌های زوناپلوسیدا متصل می‌گردد (۲). اتصال اسپرم به گیرنده‌های زوناپلوسیدا باعث آغاز واکنش آکروزومی^۵ می‌شود که گام مهمی در عمل لقاح^۶ است (۳، ۲). واکنش آکروزومی شامل فیوژن^۷ و زیکوله شدن^۸، از دست دادن غشای آکروزومی خارجی و غشای پلاسمایی اسپرم روی آکروزوم، آزادسازی آنزیم‌های آکروزومی است (۲، ۴، ۵).

واکنش آکروزومی روند آگروسیتوزی وابسته به کلسیم است که با فیوژن غشای آکروزومی و غشای پلاسمایی اسپرم و آزادسازی محتویات آکروزوم مشخص می‌گردد و در این روند زیکول‌های غشایی هیبرید تشکیل می‌شوند (۶). فیوژن غشا و زیکوله شدن برای نفوذ به زوناپلوسیدای اطراف تخمک لازم است (۷). روند آگروسیتوز، ناحیه قدامی سراسپرم را درگیر می‌کند و به طرف سگمان استوایی گسترش می‌یابد (۸). در طی سرد نمودن اسپرم از دمای C° به صفر درجه سانتیگراد، غلظت یون کلسیم در داخل سلول افزایش می‌یابد. از طرف دیگر فسفولیپیدهای غشایی در غشا اسپرم منجمد شده افزایش می‌یابد.

افزایش فسفولیپید می‌تواند باعث شروع واکنش آکروزومی در اسپرم شود (۲۹).

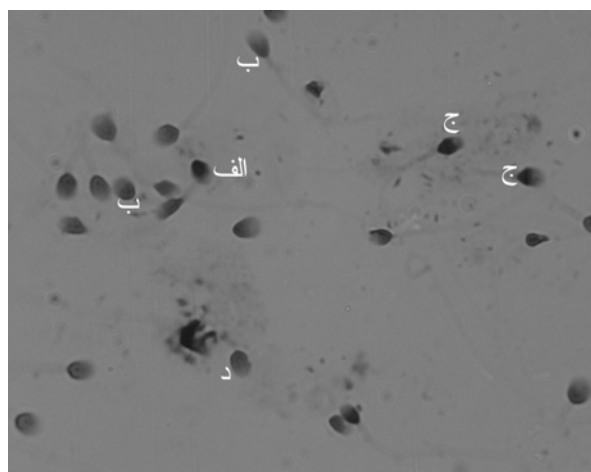
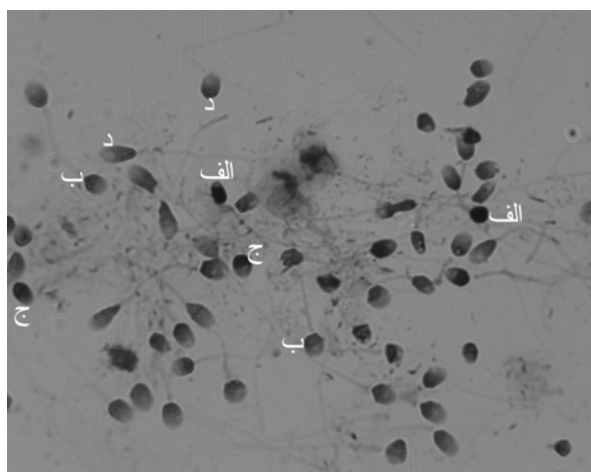
اعتقاد بر این است که فرآیند انجماد-ذوب به غشای پلاسمایی روی قسمت قدامی سر اسپرم و غشای آکروزومی زیرین آسیب می‌رساند و منجر به پارگی آکروزوم و کاهش ماتریکس آکروزومی می‌شود و در نتیجه باعث کاهش تعداد اسپرم‌های عملکردی در دسترس برای تکنیک‌های باروری کمک شده (ART)^۹-به استثنای روش میکرواینجکشن (ICSI)^{۱۰}- می‌گردد (۹، ۱۰). هدف این مطالعه، بررسی میزان آسیب آکروزومی در خلال انجماد در فاز بخار^{۱۱} می‌باشد.

مواد و روشها

در این بررسی تجربی-مداخله‌ای، از ۲۰ مرد نابارور الیگواسپرم با تراکم اسپرم کمتر از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر و ۱۰ مرد بارور با تراکم اسپرم بیش از ۱۰۰ میلیون در میلی‌لیتر بعد از ۴۸ ساعت خودداری از مقاربت، نمونه منی دریافت شد. نمونه‌ها به طریق استمنا در داخل ظرف پلاستیکی دهان گشاد در بیمارستان الزهرا دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری از مهرماه تا دی ماه سال ۱۳۸۲ انجام شد. افراد الیگواسپرم برای درمان و افراد بارور (افراد دارای حداقل یک فرزند و دارای اسپرموگرام طبیعی براساس معیارهای WHO) به صورت داوطلبانه (پیرو درخواست محققین، با اعلام رضایت جهت همکاری در طرح) به آن مرکز مراجعه نمودند. به منظور مایع شدن^{۱۲}، نمونه‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در انکوباتور ($C^{\circ} 37$) (Memmert, Germany) نگهداری شدند. پس از تبدیل مایع سیمین به حالت مایع، نمونه‌ها براساس معیارهای

- 1- Acrosome
- 2- Equatorial Segment
- 3- Capacitation
- 4- Zona Pellucida
- 5- Acrosome Reaction
- 6- Fertilization
- 7- Fusion
- 8- Vesiculation

- 9- Assisted Reproductive Technology
- 10- Intra Cytoplasmic Sperm Injection
- 11- Vapor Phase Cryopreservation
- 12- Liquifaction



شکل ۱- اسپرم مرده بدون آکروزوم که ناحیه آکروزومال بی‌رنگ و هسته آبی تیره می‌باشد (الف)، اسپرم زنده بدون آکروزوم که ناحیه آکروزومال بی‌رنگ و هسته زرد رنگ می‌باشد (ب)، اسپرم مرده با آکروزوم دست نخورده، ناحیه آکروزومال صورتی روشن و هسته آبی تیره دیده می‌شود (ج)، اسپرم زنده با آکروزوم دست نخورده ناحیه آکروزومال صورتی و هسته زرد رنگ دیده می‌شود (د). رنگ‌آمیزی سه گانه، بزرگنمایی ۱۶۵۰ برابر.

پس از مخلوط نمودن، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور 37°C حاوی CO_2 (LEEC, UK) قرار داده شد. بعد از طی این مدت لوله از انکوباتور خارج و 0.5ml محیط کشت Ham's F10 (Seromed, Germany) به محلول داخل لوله اضافه شد و دو بار با دور ۲۵۰۰ و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (Hettich EBA 3S, Germany) گردید. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی دور ریخته شد و از رسوب ته لوله نمونه برداشته شد و روی دو لام اسمیر تهیه گردید. لامها بعد از خشک شدن در مجاورت هوا، با گلو تار آل‌دیید ۳٪ به مدت ۳۰ دقیقه ثابت^۶ شدند. سپس لامها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 40°C با رنگ بیسمارک براون^۷ ۰.۲٪ (Merck, Germany) انکوبه و بعد از شستشوی کامل با آب دیونیزه مجدداً خشک شدند. در مرحله بعد لامها به مدت ۲۵ دقیقه با محلول رز بنگال^۸ ۱٪ (Sigma-Aldrich, Germany) رنگ‌آمیزی و سپس با آب دیونیزه کاملاً شستشو شدند تا مانع از رسوب

سازمان بهداشت جهانی (۱۹۹۹) از نظر حجم، تعداد اسپرم، تحرک و مورفولوژی توسط دستگاه سیمین آنالیزر^۱ (Medical Electronics System, USA) (۱۱) آنالیز و باقیمانده هر نمونه به دو قسمت با حجم $100\ \mu\text{l}$ تقسیم شدند.

قسمت اول نمونه‌های افراد الیگواسپرم و بارور از نظر وضعیت آکروزوم به کمک رنگ‌آمیزی سه گانه^۲ (۱۲) بررسی شدند و قسمت دوم نمونه‌ها در هر دو گروه جهت انجام انجماد در فاز بخار^۳ (۱۳) در محیط نگهداری اسپرم انسان (HSPM) (Fertipro, Belgium)^۴ آماده و منجمد گردید. پس از طی دو هفته نمونه‌ها مجدداً ذوب و از نظر وضعیت آکروزوم مورد بررسی قرار گرفتند.

برای انجام رنگ‌آمیزی سه گانه $100\ \mu\text{l}$ از مایع سیمین مایع شده برداشت و سپس $100\ \mu\text{l}$ محلول تریپان بلو^۵ ۱٪ (Merck, Germany) به آن افزوده شد.

6- Fixed
7- Bismark Brown
8- Rose Bangal

1- Semen Quality Analyzer
2- Triple Staining
3- Vitrification
4- Human Sperm Preservation Medium
5- Trypan Blue

برای ذوب نمودن نمونه‌ها، کرایوتیوب‌ها از داخل تانک ازت مایع خارج و به داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع منتقل گردید و بعد از ۲۰ ثانیه از ظرف ازت مایع خارج شد و به مدت ۵ دقیقه در ظرف آب گرم با دمای $37^{\circ}C$ قرار گرفت تا نمونه‌ها به صورت مایع درآیند. سپس تمامی مراحل رنگ‌آمیزی مشابه مرحله قبل از انجماد برای تمامی نمونه‌های دو گروه انجام شد.

نتایج

در این مطالعه اثرات انجماد در فاز بخار- ذوب بر حیات و وضعیت آکروزوم در اسپرم افراد بارور و نابارور الیگواسپرم مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به دست آمده به شرح زیر می‌باشد.

نتایج حاصل از آنالیز سیمن در مردان الیگواسپرم و بارور و ارزیابی آکروزوم در جداول شماره ۱ و ۲ خلاصه شده است. براساس این نتایج در شرایط قبل از انجماد در فاز بخار، میانگین درصد اسپرم‌های زنده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم $26 \pm 3/64$ و در افراد بارور $33/37 \pm 4/07$ بود که پس از انجماد- ذوب در افراد الیگواسپرم به $11/6 \pm 1/82$ و در افراد بارور به $9/87 \pm 2/97$ کاهش یافت. کاهش درصد اسپرم‌های زنده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم و بارور قبل و بعد از انجماد در فاز بخار از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/05$). ضمناً میانگین درصد اسپرم‌های زنده بدون آکروزوم در افراد الیگواسپرم قبل از انجماد در فاز بخار $24/94 \pm 3/56$ و در افراد بارور $42/12 \pm 4/59$ بود که پس از انجماد و نگهداری به مدت دو هفته به $17/33 \pm 2/16$ و در افراد الیگواسپرم و به $14/75 \pm 2/43$ در افراد بارور کاهش یافت. کاهش درصد اسپرم‌های زنده بدون آکروزوم در افراد الیگواسپرم و بارور قبل و بعد از انجماد در فاز بخار از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/05$). از طرفی در شرایط قبل از انجماد در فاز بخار،

رنگ اضافی روی لام گردد. بعد از خشک شدن در مجاورت هوا، در هر لام توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BH2, Japan) با بزرگنمایی $\times 1000$ تعداد ۱۰۰ اسپرم شمارش شد.

اسپرم‌های مشاهده شده بر اساس رنگ آکروزوم و سیتوپلاسم به چهار گروه دسته‌بندی شدند: زنده با آکروزوم دست نخورده، زنده بدون آکروزوم، مرده با آکروزوم دست‌نخورده، مرده بدون آکروزوم. در اسپرم‌های مرده، نیمه تحتانی سر اسپرم با تریپان بلو رنگ گرفت و به رنگ آبی تیره دیده شد (شکل ۱، الف و ج). در صورتیکه در اسپرم‌های زنده، ناحیه فوق با بیسمارک براون رنگ گرفت و به رنگ زرد دیده می‌شد (شکل ۱، ب و د). اگر آکروزوم دست نخورده باقیمانده بود ناحیه آکروزومی در اسپرم‌های مرده یا زنده به رنگ صورتی روشن (شکل ۱، ج و د) و اگر آکروزوم پاره شده بود ناحیه قدامی اسپرم بی‌رنگ دیده شد (شکل ۱، الف و ب). نتایج حاصل از شمارش اسپرم‌ها قبل و بعد از انجماد در هر گروه با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه 11.5 تحت محیط Windows با آزمون Paired t-test آنالیز گردید. سطح معنی‌داری ۹۵٪ و درصد خطا ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای انجماد سریع $500 \mu l$ مایع سیمن مایع شده در داخل کرایوتیوب^۱ با حجم $1/8 \mu l$ ریخته شد که در پشت آن مشخصات مریض نوشته شده بود. سپس $350 \mu l$ محیط نگهداری اسپرم انسان (HSPM) با ترکیب گلیسرول، $4/0\%$ HSA^۲ و HEPES به آرامی اضافه و مخلوط شد. سپس کرایوتیوب به مدت ۳۰ دقیقه در فاصله 20 cm بخار ازت مایع قرار داده شد. در مرحله آخر کرایوتیوب به داخل تانک ازت مایع منتقل شد. بعد از گذشت دو هفته نمونه‌ها ذوب^۳ گردیدند.

- 1- Cryotube
- 2- Human Serum Albumin
- 3- Thawing

جدول ۱- پارامترهای آنالیز مایع منی در افراد بارور (n=۱۰) و افراد الیگواسپرم (n=۲۰) در شرایط قبل از انجماد سریع در مراجعین به بیمارستان الزهرا تبریز، ۱۳۸۲

مقادیر تعیین شده توسط WHO (1998)	افراد الیگواسپرم (n=۲۰)		افراد بارور (n=۱۰)		میانگین و دامنه
	دامنه	میانگین (M±SE)	دامنه **	میانگین (M±SE*)	متغیرهای مورد مطالعه
≥ ۲	۱/۵-۷	۳/۹±۱/۲۵	۱/۵-۴	۲/۳۷±۰/۸۷	حجم (ml)
≥ ۲۰	۱-۱۹	۱۳/۷±۶/۷۰	۱۰۰-۱۸۰	۱۲۳/۷±۲۵/۵۹	تعداد اسپرم (۱۰ ^۶ /ml)
≥ ۵۰	۱۰-۷۰	%۲۲/۴±۱۵/۵۵	۵۰-۸۰	%۷۵±۹/۲۵	حرکت (a+b)
≥ ۱۵	۱۰-۴۰	%۲۵/۵±۸/۷۲	۴۰-۷۰	%۴۳/۷±۱۰/۶	مورفولوژی طبیعی
≥ ۷۵	۲۰-۹۰	%۵۰/۹±۲۱/۵۶	۶۰-۹۰	%۷۵±۹/۳۵	قابلیت حیات (تست ائوزین)

* انحراف استاندارد از میانگین (Standard Error of Mean)

** Range

و نوب آنها، میانگین درصد اسپرم‌های زنده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم به ۱۱/۱۶±۱/۸۲٪ و در افراد بارور به ۲۹/۹۷±۹/۸۷٪ تقلیل یافت. اختلاف میانگین بین دو گروه افراد الیگواسپرم و بارور از نظر آماری معنی‌دار نیست. ضمناً میانگین درصد اسپرم‌های زنده بدون آکروزوم قبل از انجماد در افراد الیگواسپرم ۲۴/۹۴±۳/۵۶ و در افراد بارور ۴۲/۱۲±۴/۵۹ بود که از نظر آماری اختلاف میانگین بین دو گروه معنی‌دار نبود. بعد از انجماد و نوب مجدد آنها، میانگین درصد اسپرم‌های زنده بدون آکروزوم در افراد الیگواسپرم به ۱۷/۳۳±۲/۱۶ و در افراد بارور به ۱۴/۷۵±۲/۳۴ تقلیل یافت که اختلاف میانگین بین دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین درصد اسپرم‌های مرده با آکروزوم دست نخورده قبل از انجماد در افراد الیگواسپرم ۲۶/۸۳±۴/۲۴ و در افراد بارور ۱۳/۶۲±۱/۸۷ بود که از نظر آماری اختلاف میانگین بین دو گروه معنی‌دار می‌باشد (P < ۰/۰۵). بعد از انجماد و نوب مجدد آنها، میانگین درصد اسپرم‌های مرده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم به ۳۷/۳۸ ± ۴/۳۲ و در افراد بارور به ۲۸/۵±۲/۳۴ افزایش یافت. اختلاف میانگین بین دو گروه از نظر آماری

میانگین درصد اسپرم‌های مرده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم ۲۶/۸۳±۴/۲۴ و در افراد بارور ۱۳/۶۲±۱/۸۷ بود که پس از انجماد و نوب مجدد آن، به ۳۷/۳۸±۴/۳۲ در افراد الیگواسپرم و به ۲۸/۵±۲/۳۴ در افراد بارور افزایش یافت. افزایش درصد اسپرم‌های مرده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم و بارور قبل و بعد از انجماد از نظر آماری معنی‌دار بود (P < ۰/۰۵). همچنین میانگین درصد اسپرم‌های مرده بدون آکروزوم در افراد الیگواسپرم قبل از انجماد در فاز بخار ۲۲/۶±۲/۹۴ و در افراد بارور ۱۰/۸۷±۲/۳۴ بود که پس از انجماد و نوب مجدد آن، آنالیز مایع سیمن نشان داد که در افراد الیگواسپرم به ۳۴/۱۶±۳/۹۸ و در افراد بارور به ۴۶/۸۷±۳/۴۹ افزایش یافت. افزایش درصد اسپرم‌های مرده بدون آکروزوم در افراد الیگواسپرم و بارور قبل و بعد از انجماد از نظر آماری معنی‌دار بود (p < ۰/۰۵). میانگین درصد اسپرم‌های زنده با آکروزوم دست نخورده قبل از انجماد در افراد الیگواسپرم ۲۶±۳/۶۴ و در افراد بارور ۳۳/۳۷±۴/۰۷ بود که از نظر آماری اختلاف میانگین بین دو گروه افراد الیگواسپرم و بارور معنی‌دار نبود. بعد از انجماد نمونه‌ها و نگهداری به مدت دو هفته

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار آنالیز مایع منی در افراد الیگواسپرم و بارور قبل و بعد از انجماد براساس درصد اسپرم های مرده و زنده با آکروزوم دست نخورده و پاره شده در مراجعین به بیمارستان الزهرا تبریز، ۱۳۸۲

مرده بدون آکروزوم (M±SE)	مرده با آکروزوم دست نخورده (M±SE)	زنده بدون آکروزوم (M±SE)	زنده با آکروزوم دست نخورده (M±SE)	وضعیت حیات و اکروزوم اسپرم	
				قبل از انجماد	بعد از انجماد
۲۲/۱۶±۲/۹۴	۲۶/۸۳±۴/۲۴	۲۴/۹۴±۳/۵۶	۲۶±۳/۶۴*	افراد الیگواسپرم (n=۲۰)	
۳۴/۱۶±۳/۹۸	۳۷/۳۸±۴/۳۲	۱۷/۳۳±۲/۱۶	۱۱/۱۶±۱/۸۲	P- value	
۰/۰۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱	P- value	
۱۰/۸۷±۲/۳۴	۱۳/۶۲±۱/۸۷	۴۲/۱۲±۴/۵۹	۳۳/۳۷±۴/۰۷	افراد بارور (n=۱۰)	
۴۶/۸۷±۳/۴۹	۲۸/۵±۲/۳۴	۱۴/۷۵±۲/۳۴	۹/۸۷±۲/۹۷	P- value	
۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	P- value	

* تعداد اسپرم بر حسب میلیون در میلی لیتر است.

فراوانی برخوردار می باشد. مطالعه حاضر در همین راستا و برای بررسی اثرات انجماد بر آکروزوم و به تبع آن واکنش آکروزومی انجام گرفت.

از آنجا که تعداد زیادی از افراد ناباروری که از روش های کمک باروری (ART) استفاده می کنند الیگواسپرم می باشند در بررسی حاضر وضعیت مایع منی در افراد بارور و الیگواسپرم و اثرات انجماد بر پارامترهای فوق در افراد بارور و الیگواسپرم مطالعه و با یکدیگر مقایسه گردید.

این یافته ها بیانگر اثرات تخریبی انجماد بر کیفیت و کمیت اسپرم ها می باشد و نشان می دهد که اسپرم های زنده با آکروزوم دست نخورده و بدون آکروزوم هر دو به اثرات انجماد در فاز بخار، آسیب پذیر می باشند. از این نظر افراد بارور و الیگواسپرم مشابه هم می باشند و بنابراین می توان گفت اسپرم های افراد الیگواسپرم نسبت به انجماد حساس تر از افراد گروه بارور نمی باشد. از طرف دیگر، افزایش تعداد اسپرم های مرده با آکروزوم دست نخورده و بدون آکروزوم پس از انجماد و ذوب دقیقاً با کاهش تعداد اسپرم های زنده مطابقت می نماید و بیانگر این واقعیت است که انجماد

معنی دار بود ($P < 0.05$). همچنین میانگین درصد اسپرم های مرده بدون آکروزوم قبل از انجماد در افراد الیگواسپرم $22/16 \pm 2/94$ و در افراد بارور $34/16 \pm 3/98$ بود که از نظر آماری اختلاف میانگین بین دو گروه معنی دار نبود. بعد از انجماد در فاز بخار به مدت دو هفته و ذوب آنها، میانگین درصد اسپرم های مرده بدون آکروزوم در افراد الیگواسپرم به $26/83 \pm 4/24$ و در افراد بارور به $37/38 \pm 4/32$ افزایش یافت. بین میانگین دو گروه از نظر آماری اختلاف معنی دار مشاهده نشد.

بحث

امروزه علیرغم استفاده از پروتکل های مدرن برای انجماد مایع منی انسان بعد از ذوب، پارامترهای کمی و کیفی اسپرم های زنده در مقایسه با نمونه قبل از انجماد رضایت بخش نیست و میزان باروری حاصل از اسپرم های نمونه منجمد شده در مقایسه با نمونه تازه کمتر است (۱۶-۱۴). بنابراین بررسی پروتکل های مختلف انجماد و اثرات و عوارض جانبی آنها برای پی بردن به علل کاهش باروری پس از انجماد از اهمیت

در فاز بخار و ذوب نه تنها باعث مرگ اسپرم بلکه باعث آسیب آکروزوم نیز می‌گردد. اثرات انجماد در فاز بخار و ذوب بر اسپرم‌ها از این لحاظ نیز در افراد بارور و الیگواسپرم کاملاً مشابه می‌باشد. بر این اساس می‌توان گفت کیفیت اسپرم‌ها در افراد الیگواسپرم در مقایسه با افراد بارور متفاوت نمی‌باشد. این نتایج با یافته‌های Cross و همکاران (۱۷) و Hammadeh و همکاران (۱۳) مطابقت دارد. آنها نیز نشان دادند که روند انجماد- ذوب باعث کاهش معنی‌دار در اسپرم‌های با آکروزوم دست نخورده می‌گردد و درصد اسپرم‌های با آکروزوم آسیب دیده نیز بعد از انجماد افزایش می‌یابد. همچنین در تأیید یافته‌های مطالعه حاضر نشان داده شده است که انجماد اسپرم به ساختمان آکروزوم آسیب می‌رساند (۱۸).

Hammerstedt و همکاران (۱۹) و Alvarez & Storey (۲۰) نشان دادند که روند انجماد و ذوب باعث کاهش متابولیسم اسپرم می‌گردد و به غشای پلاسمایی اسپرم صدمه می‌زند که منجر به کاهش اسپرم‌های عملکردی مورد نیاز برای ART می‌شود. Drobnis و همکاران (۲۱) نشان دادند که انجماد باعث افزایش ناپایداری آکروزوم اسپرم در دستگاه تولید مثل ماده می‌گردد. محققان دیگر بیشتر روی تغییرات مورفولوژی اسپرم همانند دم پیچ خورده، غشاهای صدمه دیده و آکروزوم‌های آسیب دیده تاکید دارند (۲۲). فرض آنها بر این است که اسپرم‌های صدمه دیده طی انجماد باعث افزایش تولید ROS^۱ می‌گردد که می‌تواند به اسپرم‌های نرمال موجود در همان نمونه آسیب بزند (۲۲).

بر اساس نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری نمود که وجود مواد محافظ در محیط انجمادی به علت اختلاف فشار اسموتیک به غشای پلاسمایی اسپرم آسیب

می‌رساند و از طرفی سرد نمودن شدید اسپرم در هنگام انجماد، آسیب زیادی به غشای پلاسمایی روی قسمت قدامی سر اسپرم و غشای آکروزومی زیرین ایجاد می‌نماید که منجر به پارگی آکروزوم و کاهش ماتریکس آکروزومی می‌گردد. آکروزوم برای قابلیت لقاح اسپرم ضروری است. چون که آنزیم‌های آکروزومی برای رسیدن اسپرم‌ها به غشای پلاسمایی اووسیت ضروری است و آسیب آکروزوم با کاهش قدرت لقاح همراه است، بنابراین باید درصد مواد تشکیل‌دهنده محیط انجماد اسپرم به نحوی اصلاح گردد که اسپرم حداقل آسیب را متحمل شود. این امر به خصوص در افراد الیگواسپرم که تعداد اسپرم‌های زنده و متحرک آنها محدود است اهمیت زیادی دارد.

در ارتباط با اثرات انجماد و ذوب بر اسپرم کلی بر این است که روند انجماد - ذوب اسپرم انسان منجر به کاهش سرعت حرکت اسپرم، تغییر الگوی نفوذ در موکوس سرویکس، تغییر ساختمان آکروزوم و غشای پلاسمایی در کنار کاهش فعالیت پروتئاز آکروزومی (آکروزین) می‌گردد (۱۶، ۱۵).

فاکتور عمده در تغییر ساختمان غشاء پلاسمای اثرات اسموتیک روند انجماد- ذوب بوده که به تغییر قابلیت نفوذ غشاء و در نهایت به مرگ سلولی منتهی می‌گردد. علاوه بر کاهش فعالیت آنزیمی، سایر آسیب‌های کشنده مانند دهیدراتاسیون و ریدراتاسیون سلولی فعالیت آبشار پراکسیداسیون لیپیدی، تولید ROS و آسیب اکسیداتیو ناشی از آن باعث کاهش کیفیت اسپرم طی روند انجماد می‌گردد (۲۳، ۱۶). آسیب سلولی در هنگام انجماد معمولاً از پارگی غشا به علت تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی طی انجماد آهسته و یا به علت تغییر فاز مایع و افزایش پراکسیداسیون لیپید ناشی می‌گردد (۲۶-۱۵، ۲۴). در طی انجماد سیالیت غشا کاهش و هنگام ذوب افزایش می‌یابد. این کاهش و افزایش با تغییر ترکیب فسفولیپیدهای غشایی همراه

1- Reactive Oxygen Species

میزان انجام لقاح در IUI و IVF و در نتیجه میزان باروری موثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تبریز که بدون حمایت مالی آن معاونت انجام این بررسی امکان‌پذیر نمی‌گردید، همچنین از پژوهشکده ابن‌سینا به لحاظ همکاری در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

است (۲۷). ناپایداری غشا یک گام ضروری در روند فیوژن دو غشاء طی روند انجام واکنش آکروزومی است (۲۸).

در مطالعه حاضر اثرات انجماد در فاز بخار بر روی آکروزوم در اسپرم‌های افراد بارور و نابارور (الیگواسپرم) بررسی شده است. نتایج بدست آمده از بررسی حاضر نشان می‌دهد که انجماد بدون توجه به کیفیت اسپرم‌ها (در افراد بارور و نابارور) موجب افزایش پارگی آکروزوم و واکنش آکروزومی خودبه خودی (در غیاب اووسیت) می‌گردد. این امر می‌تواند در

References

- 1-Baldi E., Luconi M., Bonaccorsi L., et al. Human sperm activation during capacitation and Acrosome Reaction. *Bioscience*.1996;1:189-205.
- 2- Purohit B.S., Laloraya M., Kumar P.G. Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. *Asian J Androl*.1999;3: 95-107.
- 3- Fenichel P., Donzeau M., Farahifar D. Dynamics of human sperm acrosome reaction, relation with in vitro fertilization. *Fertil Steril*.1991;55: 994-9.
- 4- Michaut M., Tomes C.N., De Blas G., Yunes R., Mayorga L.S. Calciumtriggered acrosomal exocytosis in human spermatozoa requires the coordinated activation of Rab3A and N ethylmaleimidesensitive factor. *Natl Acad Sci*.2000;97: 9996-10001.
- 5- Rossato M., Virgilio F., Rizzuto R., Galeazzi C., Foresta C. Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction inhuman spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod*.2001;7:119-28.
- 6- Michaut M., De Blas G., Tomes C.N., Yunes R., Fukuda M., Mayorga S: Synaptotagmin VI participates in the acrosome reaction of human spermatozoa. *Dev Biol*.2001;235:521-9.
- 7- De Jonge C.J., Rawlins R.G., Zaneveld L.J. Induction of the human sperm acrosome reaction by human oocytes. *Fertil Steril*.1988;50: 949-951.
- 8- Milligan S.R. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. In *Oxford Review of Reproduction Biology*. Oxford University Press, Oxford.1989;pp:339-88.
- 9- Foresta C., Rossato M., Virgilio F. Extracellular ATP is a trigger for the acrosome reaction in human spermatozoa. *J Biol Chem*.1992;267: 19443-7.
- 10- Tomiyama T., Ohashi K., Tsutsui T., Saji F., Tanizawa O. Acrosome reaction induced in a limited population of human spermatozoa by progesterone (Ca^{2+} -dependent) and ATP (Ca^{2+} -independent). *Hum Reprod*.1995;10:2052-5.
- 11- World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination of human semen and semenservical mucus interaction, 4th Edition, Cambridge University Press, Cambridge.1999; pp:6-23.
- 12- Talbot P., Chacon R.S. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool*.1981;215:20-8.
- 13- Hammadeh M., George T., Baum R. Schmidt W. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. *Andrology*.2001;33: 331-6.
- 14- Vayena E., Rowe P., Griffin P. Current practices and controversies in Assisted Reproduction. WHO, Geneva.2002;152-65.
- 15- Donnelly E.T., Steele E.K., McClure N., Lewis S.E. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod*.2001;16:1191-9.

- 16- Esteves S.C., Spaine D.M., Cedenho A.P., Srougi M. Effects of the technique of cryopreservation and dilution/centrifugation after thawing on the motility and vitality of spermatozoa of oligoasthenozoospermic men. *Int Braz J Urol.*2003;29:133-40.
- 17- Cross N.L., Hanks S.E. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum Reprod.*1991;6:1279-83.
- 18- Check M.L., Check J.H., Long R. Detrimental effects of cryopreservation on structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch Androl.*1991;27:155-60.
- 19-Hammerstedt R.H., Graham J.K., Nolan J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.*1990;11(1):73-88.
- 20-Alvarez J.G., Storey B.T. Evidence of increased lipid peroxidase damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.*1992;13(3):232-41.
- 21- Drobnis E.Z., Clisham P.R., Brazil C.K., Wisner L.W., Zhong C.Q., Overstreet J.W. Detection of altered acrosomal physiology of cryopreserved human spermatozoa after sperm residence in the female reproductive tract. *J Reprod Fertil.*1993;99(1):159-65.
- 22-Hammadeh M., Askari A., Georg T., Rosenbaum P., Schmidt W. Effect of freezethawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *J Androl.* 1999;22(3):155-62.
- 23-Kotwicka M., Jendraszak M., Warchol J. Changes in actin localization after acrosome reaction in human spermatozoa. *Cell Mol Biol.* 2002;7:290.
- 24- Stanic P., Tandare M., Sonicki Z., Simunic V., Radakovic B., Suchanek E., Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*2000;91(1):65-70.
- 25- Hammadeh M., Greiner S., Rosenbaum P., Schmidt W. Comparison between human sperm preservation medium and TESEYolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freezethawing procedure. *J Androl.* 2001; 22(6):1012-8.
- 26- Donnelly E.T., McClure N., Lewis S.E. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril.*2001;76(5):892-900.
- 27- Buhr M.M., Curtis E.F., Somnpan Kakuda N. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiol.*1994;31(3):224-38.
- 28- Nolan J.P., Hammerstedt R.H. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.*1997;11(8):670-83.
- 29- Okada A., Igarashi H., Kuroda M., Terao K., Yoshikawa Y., Sankai T. Cryopreservation induced acrosomal vesiculation in live spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca Fascicularis*), *Hum Reprod.*2001;16(10):2139-47.