**مقدمه**

آکروزوم[1] اسپرم ساختمانی مشتق از دستگاه گلژی است که مانند یک کلاهک ناحیه قدامی هسته را می‌پوشاند و محتوی آنزیم‌های هیدرولیتیک متعددی است(۱).

آکروزوم از دو بخش قدامی و خلفی به نام سگمان استوایی[2] تشکیل شده است(۲). پس از ظرفیت‌گیری[3]، اسپرم توانایی اتصال به زوناپلوسیدا[4] را به دست می‌آورد و به گیرنده‌های زوناپلوسیدا متصل می‌گردد (۲). اتصال اسپرم به گیرنده‌های زوناپلوسیدا باعث آغاز واکنش آکروزومی[5] می‌شود که گام مهمی در عمل لقاح[6] است (۳،۲). واکنش آکروزومی شامل فیوژن[7]، وزیکوله شدن[8]، از دست دادن غشای آکروزومی خارجی و غشای پلاسمایی اسپرم روی آکروزوم، آزادسازی آنزیم‌های آکروزومی است(۵،٤،۲).

واکنش آکروزومی روند اگزوسیتوزی وابسته به کلسیم است که با فیوژن غشای آکروزومی و غشای پلاسمایی اسپرم و آزادسازی محتویات آکروزوم مشخص می‌گردد و در این روند وزیکول‌های غشایی هیبرید تشکیل می‌شوند(٦). فیوژن غشا و وزیکوله‌شدن برای نفوذ به زوناپلوسیدای اطراف تخمک لازم است(۷). روند اگزوسیتوز، ناحیه قدامی سراسپرم را درگیر می‌کند و به طرف سگمان استوایی گسترش می‌یابد(۸). در طی سرد نمودن اسپرم از دمای $4\ ^{\circ}C$ به صفر درجه سانتیگراد، غلظت یون کلسیم در داخل سلول افزایش می‌یابد. ازطرف دیگر فسفولیپیدهای غشایی در غشا اسپرم منجمدشده افزایش می‌یابد.

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

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)[9] -به استثنای روش میکرواینجکشن (ICSI)[10]- می‌گردد (۹،۱۰). هدف این مطالعه، بررسی میزان آسیب آکروزومی در خلال انجماد در فاز بخار[11] می‌باشد.

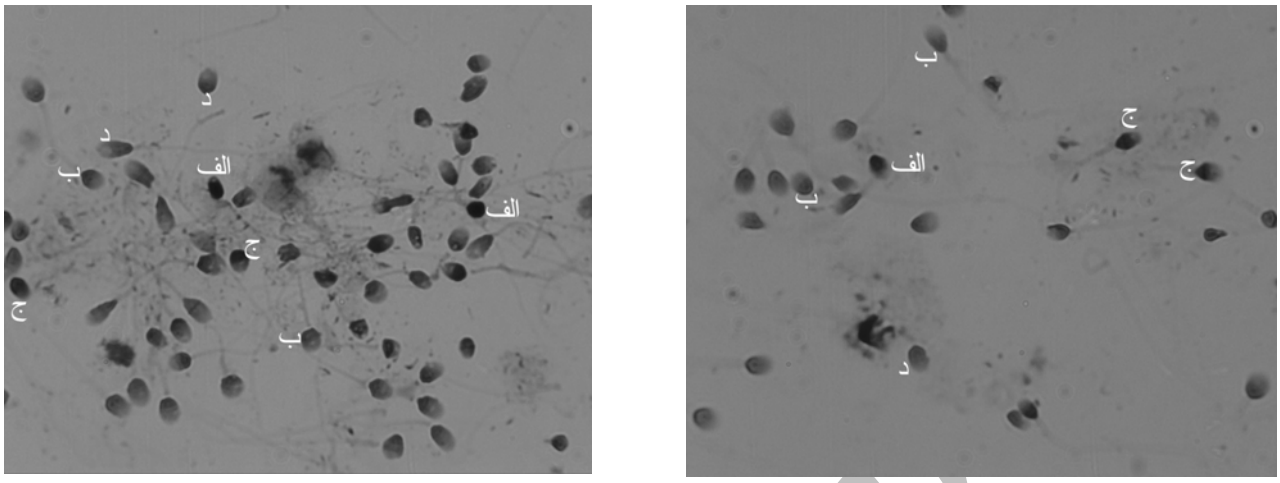
## مواد و روشها

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 ۱۰۰میلیون در میلی‌لیتر بعد از ٤۸ 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) به‌صورت داوطلبانه (پیرو درخواست محققین، با اعلام رضایت جهت همکاری در طرح) به آن مرکز مراجعه نمودند. به منظور مایع شدن[12]، نمونه‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در انکوباتور ($37\ ^{\circ}C$) (Memmert, Germany) نگهداری شدند. پس از تبدیل مایع سیمن به حالت مایع، نمونه‌ها براساس معیارهای

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



Archive of SID
www.SID.ir




**شکل ۱- اسپرم مرده بدون آکروزوم که ناحیه اکروزومال بی‌رنگ و هسته آبی تیره می‌باشد (الف)، اسپرم زنده بدون آکروزوم که ناحیه اکروزومال بی رنگ و هسته زرد رنگ می‌باشد(ب)، اسپرم مرده با آکروزوم دست نخورده، ناحیه اکروزومال 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.**

سازمان بهداشت جهانی (۱۹۹۹) از نظر حجم، تعداد اسپرم، تحرک و مورفولوژی توسط دستگاه سیمن آنالیزر[1] (Medical Electronics System, USA) (۱۱) آنالیز و باقیماندهٔ هر نمونه به دو قسمت با حجم ۱۰۰ $\mu l$ تقسیم شدند.

قسمت اول نمونه‌های افراد الیگواسپرم و بارور از نظر وضعیت آکروزوم به کمک رنگ‌آمیزی سه گانه[2] (۱۲) بررسی‌شدند و قسمت دوم نمونه‌ها در هر دو گروه جهت انجام انجماد در فار بخار[3] (۱۳) در محیط نگهداری اسپرم انسان (HSPM)[4] (Fertipro, Belgium) 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 ۱۰۰ $\mu l$ از مایع سیمن مایع شده برداشت و سپس ۱۰۰$\mu l$ محلول تریپان بلو[5] ۱٪ (Merck,Germany ) به آن افزوده شد.

پس از مخلوط نمودن، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷$^{\circ}C$ حاوی $CO_2$ (LEEC, UK) قرار داده شد. بعد از طی این مدت لوله از انکوباتور خارج و ۰/۵$ml$ 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 بعداز خشک شدن در مجاورت هوا، با گلوتارآلدیید ۳٪ به‌مدت ۳۰ دقیقه ثابت[6] شدند. سپس لامها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰$^{\circ}C$ با رنگ بیسمارک براون[7] 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[8] ۱٪ (Sigma-Aldrich,Germany) رنگ‌آمیزی و سپس با آب دیونیزه کاملاً شستشو شدند تا مانع از رسوب

1- Semen Quality Analyzer
2- Triple Staining
3- Vitrification
4- Human Sperm Preservation Medium
5- Trypan Blue
6- Fixed
7- Bismark Brown
8- Rose Bangal



Archive of SID
www.SID.ir

رنگ اضافی روی لام گردد. بعد از خشک شدن در مجاورت هوا، در هر لام توسط میکروسکوپ نوری(Olympus BH2,Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰۰× 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). درصورتیکه 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 ود) 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 $\mu l$ ۵۰۰ مایع سیمن مایع شده در داخل کرایوتیوب[1] با حجم $\mu l$ ۱/۸ ریخته شد که در پشت آن مشخصات مریض نوشته شده بود. سپس $\mu l$ ۳۵۰ محیط نگهداری اسپرم انسان (HSPM) با ترکیب گلیسرول، ۰/۴٪ HSA[2] و Hepes به آرامی اضافه و مخلوط شد. سپس کرایوتیوب به مدت ۳۰ دقیقه در فاصله $cm$ ۲۰ بخار ازت مایع قرار داده شد. در مرحله آخر کرایوتیوب به داخل تانک ازت مایع منتقل شد. بعد از گذشت دو هفته نمونه‌ها ذوب[3] گردیدند.

برای ذوب نمودن نمونه‌ها، کرایوتیوب‌ها از داخل تانک ازت مایع خارج و به داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع منتقل گردید و بعد از ۳۰ 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 مرحلهٔ 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 به‌دست آمده به شرح زیر می‌باشد.

نتایج حاصل از آنالیز سیمن در مردان الیگواسپرم و بارور و ارزیابی آکروزوم در جداول شمارهٔ ۱و۲ 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 ۲۶±۳/۶۴ و در افراد بارور ۴/۰۷ ±۳۳/۳۷ بود که پس از انجماد- ذوب در افراد الیگواسپرم به ۱/۸۲±۱۱/۶ و در افراد بارور به ۲/۹۷± ۹/۸۷ 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($P < ۰/۰۵$). ضمناً میانگین درصد اسپرم‌های زنده بدون آکروزوم درافراد الیگواسپرم قبل از انجماد در فاز بخار ۳/۵۶±۲۴/۹۴ و در افراد بارور ۴/۵۹ ± ۴۲/۱۲ بود که پس از انجماد و نگهداری به مدت دو هفته به ۲/۱۶±۱۷/۳۳ و در افراد الیگواسپرم و به ۲/۴۳±۱۴/۷۵ 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($p < ۰/۰۵$). از طرفی در شرایط قبل از انجماد در فاز بخار،

1- Cryotube
2- Human Serum Albumin
3- Thawing



Archive of SID
www.SID.ir

**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**

| میانگین و دامنه / متغیرهای مورد مطالعه | افراد بارور (n=۱۰) | | افراد الیگواسپرم (n=۲۰) | | مقادیر تعیین شده توسط WHO (1998) |
|---|---|---|---|---|---|
| | میانگین (M±SE*) | دامنه** | میانگین (M±SE) | دامنه | |
| حجم (*ml*) | ۲/۳۷±۰/۸۷ | ۱/۵-٤ | ۳/۹±۱/۲۵ | ۱/۵-۷ | ≥ ۲ |
| تعداد اسپرم ($۱۰^۶$/*ml*) | ۱۲۳/۷±۲۵/۵۹ | ۱۰۰-۱۸۰ | ۱۳/۷±٦/۷۰ | ۱-۱۹ | ≥۲۰ |
| حرکت (a+b) | ٪۷۵±۹/۲۵ | ۵۰-۸۰ | ٪۲۲/٤±۱۵/۵۵ | ۱۰-۷۰ | ≥۵۰ |
| مورفولوژی طبیعی | ٪٤۳/۷±۱۰/٦ | ٤۰-۷۰ | ٪۲۵/۵±۸/۷۲ | ۱۰-٤۰ | ≥۱۵ |
| قابلیت حیات(تست ائوزین) | ٪۷۵±۹/۳۵ | ٦۰-۹۰ | ٪۵۰/۹±۲۱/۵٦ | ۲۰-۹۰ | ≥۷۵ |

* انحراف استاندارد از میانگین (Standard Error of Mean)

** Range

میانگین درصد اسپرم‌های مرده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم ٤/۲٤±۲٦/۸۳ و در افراد بارور ۱/۸۷±۱۳/٦۲ بود که پس از انجماد و ذوب مجدد آن، به ٤/۳۲±۳۷/۳۸ در افراد الیگواسپرم و به ۲/۳٤±۲۸/۵ در افراد بارور افزایش یافت. افزایش درصد اسپرم‌های مرده با آکروزوم دست‌نخورده 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 بخار۲/۹٤±۲۲/٦ و در افراد بارور ۲/۳٤ ± ۱۰/۸۷ بود که پس از انجماد و ذوب مجدد آن، آنالیز مایع سیمن نشان داد که در افراد الیگواسپرم به ۳/۹۸ ± ۳٤/۱٦ و در افراد بارور به ۳/٤۹ ± ٤٦/۸۷ 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 ۳/٦٤ ± ۲٦ و در افراد بارور ٤/۰۷±۳۳/۳۷ 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 و ذوب آنها، میانگین درصد اسپرم‌های زنده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم به ۱/۸۲±۱۱/۱٦٪ و در افراد بارور به ۲/۹۷±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 ۳/۵٦±۲٤/۹٤ و در افراد بارور ٤/۵۹±٤۲/۱۲ بود که از نظر آماری اختلاف میانگین بین دو گروه معنی‌دار نبود. بعد از انجماد و ذوب مجدد آنها، میانگین درصد اسپرم‌های زنده بدون آکروزوم در افراد الیگواسپرم به ۲/۱٦±۱۷/۳۳ و در افراد بارور به ۲/۳٤±۱٤/۷۵ 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 ٤/۲٤±۲٦/۸۳ و در افراد بارور ۱/۸۷±۱۳/٦۲ بود که از نظر آماری اختلاف میانگین بین دو گروه معنی‌دار می‌باشد ($P <$ ۰/۰۵). بعد از انجماد و ذوب مجدد آنها، میانگین درصد اسپرم‌های مرده با آکروزوم دست نخورده در افراد الیگواسپرم به ٤/۳۲ ± ۳۷/۳۸ و در افراد بارور به ۲/۳٤±۲۸/۵ افزایش یافت. اختلاف میانگین بین دو گروه از نظر آماری



Archive of SID
www.SID.ir

**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**

| وضعیت حیات و اکروزوم اسپرم / وضعیت حیات و اکروزوم اسپرم | | زنده با آکروزوم دست نخورده (M±SE) | زنده بدون آکروزوم (M±SE) | مرده با آکروزوم دست نخورده (M±SE) | مرده بدون آکروزوم (M±SE) |
|---|---|---|---|---|---|
| افراد الیگواسپرم (n=۲۰) | قبل از انجماد | ۲۶±۳/۶۴* | ۲۴/۹۴±۳/۵۶ | ۲۶/۸۳±۴/۲۴ | ۲۲/۱۶±۲/۹۴ |
| | بعد از انجماد | ۱۱/۱۶±۱/۸۲ | ۱۷/۳۳±۲/۱۶ | ۳۷/۳۸±۴/۳۲ | ۳۴/۱۶±۳/۹۸ |
| | P- value | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۳ | ۰/ ۰۰۷ | ۰/ ۰۰۹ |
| افراد بارور(n=۱۰) | قبل از انجماد | ۳۳/۳۷±۴/۰۷ | ۴۲/۱۲±۴/۵۹ | ۱۳/۶۲±۱/۸۷ | ۱۰/۸۷±۲/۳۴ |
| | بعد از انجماد | ۹/۸۷±۲/۹۷ | ۱۴/۷۵±۲/۳۴ | ۲۸/۵±۲/۳۴ | ۴۶/۸۷±۳/۴۹ |
| | P- value | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۲ | ۰/۰۰۱ |

* تعداد اسپرم بر حسب میلیون در میلی‌لیتر است.

معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). همچنین میانگین درصد اسپرم های مرده بدون آکروزوم قبل از انجماد در افراد الیگواسپرم ۲/۹۴ ± ۲۲/۱۶ و در افراد بارور ۲/۳۴± ۱۰/۸۷ 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 ۳/۹۸ ±۳۴/۱۶ و در افراد بارور به ۴۶/۸۷±۳/۴۹ افزایش یافت. بین میانگین دو گروه از نظر آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.

## بحث

امروزه علیرغم استفاده از پروتکل‌های مدرن برای انجماد مایع منی انسان بعد از ذوب، پارامترهای کمی و کیفی اسپرم‌های زنده در مقایسه با نمونه قبل از انجماد رضایت بخش نیست و میزان باروری حاصل از اسپرم‌های نمونه منجمد شده در مقایسه با نمونه تازه کمتر است (۱۶-۱۴). بنابراین بررسی پروتکل‌های مختلف انجماد و اثرات و عوارض جانبی آنها برای پی‌بردن به علل کاهش باروری پس از انجماد از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشد. 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 نابارووری که از روش‌های کمک باروری (ART) استفاده می‌کنند الیگواسپرم می‌باشند 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 یافته‌ها بیانگر اثرات تخریبی انجماد بر کیفیت و کمیت اسپرم‌ها می‌باشد و نشان می‌دهد که اسپرم‌های زنده با آکروزوم دست نخورده و بدون آکروزوم هردو به اثرات انجماد در فاز بخار، آسیب‌پذیر می‌باشند. از این نظر افراد بارور و الیگواسپرم مشابه هم می‌باشند و بنابراین می‌توان گفت اسپرم‌های افراد الیگواسپرم نسبت به انجماد حساس‌تر از افراد گروه بارور نمی‌باشد. از طرف دیگر، افزایش تعداد اسپرم‌های مرده با آکروزوم دست نخورده و بدون آکروزوم پس از انجماد و ذوب دقیقاً با کاهش تعداد اسپرم‌های زنده مطابقت می‌نماید و بیانگر این واقعیت است که انجماد



Archive of SID
www.SID.ir

در فاز بخارو ذوب نه تنها باعث مرگ اسپرم بلکه باعث آسیب آکروزوم نیز می‌گردد. اثرات انجماد در فاز بخارو 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 افزایش‌می‌یابد. همچنین در تأیید یافته‌های مطالعه حاضر نشان داده شده است که انجماد اسپرم به ساختمان آکروزوم آسیب می‌رساند(۱۸).

Hammerstedt و همکاران (۱۹) وAlvarez & 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 [1] می‌گردد که می‌تواند به اسپرم‌های نرمال موجود در همان نمونه آسیب بزند(۲۲).

براساس 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. چون‌که 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 عقیده 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 پلاسما، 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 رهیدراتاسیون 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



Archive of SID
www.SID.ir

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

در مطالعه حاضر اثرات انجماد در فاز بخاربر 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 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.

## *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 capacition 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., Mayorgal 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 interacttion 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 Zoll.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.

Archive of SID



www.SID.ir

16- Esteves S.C., Spaine D.M., Cedenho A.P., Srougi M. Effects of the technique of cryopreservation and dilution/centrifugation after thathawing 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.

Archive of SID



www.SID.ir