ارزیابی و مقایسه محیطها و روشهای مختلف انجماد و نگهداری اسپرم (بانک اسپرم)

اصغر طالبیان (M.Sc.)[1]، محمدرضا صادقی (Ph.D.)[2]، هومن صدری اردکانی (M.D.)[3]، معصومه بلورزاده (A.D.)[4]، محمدمهدی آخوندی (Ph.D.)[2].

۱- مربی، گروه غدد تولیدمثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۳- مربی، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

٤- تکنسین آزمایشگاه، مرکز درمان ناباروری ابن‌سینا، پژوهشکده فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: انجماد شاخه‌ای از علم کرایوبیولوژی است که به حفظ و نگهداری طولانی مدت سلول در دمای بسیار پایین می‌پردازد. انجماد اسپرم به طور معمول در مراکز درمان ناباروری و بانک‌های نگهداری اسپرم و صنعت دامپروری انجام می‌شود. روند انجماد همواره سبب کاهش عملکرد و ظرفیت باروری اسپرمها می‌گردد؛ چند سالی است که تأثیر روشها و محیط‌های مختلف انجماد در تحرک اسپرم مورد ارزیابی قرار گرفته است. با این وجود هرگز بهترین محیط انجماد اسپرم معرفی نشده است و بنابراین روش استاندارد انجماد اسپرم نیز وجود ندارد؛ لذا معرفی تکنیک مناسب انجماد و نیز محیط مناسب انجماد بر اساس یافته‌های تجربی بسیار ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف اصلی این مطالعه بررسی میزان بقا و تحرک اسپرم طی روند انجماد به کمک سه محیط مختلف انجماد شامل HSPM، TYBG و GEYC با دو روش انجماد آهسته به کمک دستگاه (برنامه‌ریزی شده) و روش غیردستگاهی (انجماد در فاز بخار ازت مایع) می‌باشد.

روش بررسی: تعداد۲۲ نمونه مایع سمینال از افراد طبیعی، در ظروف یکبار مصرف استریل جمع‌آوری شد. آنالیز مایع سمینال مطابق استاندارد WHO انجام گردید. برنامه انجماد آهسته با دستگاه (روش برنامه‌ریزی شده) و انجماد در فاز بخار ازت مایع (روش غیردستگاهی) مطابق پروتکل موجود انجام شد. غلظت اسپرم قبل از انجماد و درصد تحرک بر روی نمونه‌های تازه و نیز ذوب شده پس از یک هفته ارزیابی گردید. درصد بازیافت اسپرم متحرک تحت عنوان فاکتور بقاء (CSF) تعریف شد. هر نمونه سیمن به ۳ قسمت تقسیم و هر قسمت با یکی از محیطها مخلوط گردید. مخلوط نمونه با هر یک از محیطها به دو بخش تقسیم شدند. بخشی از نمونه با هر یک از سه محیط مختلف به روش فاز بخار ازت مایع و بخش دیگر توسط دستگاه به روش آهسته منجمد گردیدند. آنالیز آماری با استفاده از برنامه SPSS ویرایش۱۱، آزمون t- test جهت مقایسه تحرک اسپرمها قبل از انجماد و بعد از ذوب کردن با دو روش مختلف انجماد وآنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تقریبی LSD جهت مقایسه تحرک قبل و بعد از انجماد با سه محیط مختلف انجام شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: براساس نتایج، میانگین درصد تحرک اسپرم قبل از فریز کردن ۸/۲۹±٤٦/۱۳٪ بوده، اما پس از ذوب طی روش انجماد آهسته با دستگاه، با محیطهای HSPM (۱٦/۹±٥٪)، محیط GEYC (٤/٥٧±۱٦/۳۱٪) و محیط TYBG (٤/۷٥±۱٦/۰٤٪) و همچنین طی روش انجماد در فاز بخار ازت با محیطهای HSPM (٤/٥٥±۱٦/۹٥٪)، محیط GEYC (٥/۱٤±۱٤/۱۳٪) و محیط TYBG (٤/٤۷±۱٤/۱۸٪) کاهش چشمگیری نشان داد. تفاوت معنی‌داری بین روش دستگاهی و روش فاز بخار ازت با هر یک از دو محیط GEYC (p=۰/۰۰۱) و TYBG (p=۰/۰۰۷) مشاهده گردید. همچنین تفاوت معنی‌داری بین محیط HSPM و دو محیط GEYC (p=۰/۰٥) و محیط TYBG (p=۰/۰٥) وجود داشت.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این مطالعه پس از ذوب کردن اسپرم به دنبال روش انجماد آهسته با دستگاه و روش استفاده از فاز بخار ازت مایع با هریک از سه محیط HSPM، GEYC و TYBG کاهش چشمگیری در تحرک اسپرم نسبت به قبل از انجماد ملاحظه می‌گردد. ولی بهترین بازده تحرک و میزان بقا اسپرم پس از ذوب طی روش انجماد آهسته توسط دستگاه بدست آمد و در مقایسهٔ محیط‌های انجماد، در محیط HSPM به صورت معنی‌داری میزان بقاء اسپرمها پس از ذوب نسبت به محیط‌های TYBG وGEYC (P-value=۰/۰٥) بالاتر بود؛ ولی با توجه به عدم امکان دسترسی به دستگاه انجماد در تمامی مراکز، استفاده از محیط انجماد HSPM و روش انجماد در فاز بخار برای نمونه‌های سیمن نرمال توصیه می‌گردد.

کلید واژگان: بانک اسپرم، انجماد، محیط انجماد، HSPM، GEYC، TYBG ، روش انجماد در فاز بخار، و روش انجماد آهسته.

مسئول مکاتبه: دکترمحمدمهدی آخوندی، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، پژوهشکده فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، صندوق پستی ۱۷۷- ۱۹۸۳٥، اوین، تهران، ایران.

پست الکترونیک: akhondi@avesina.ac.ir

www.SID.ir

زمینه و هدف

انجماد[1] شاخه‌ای از علم کرایوبیولوژی[2] است که به حفظ و نگهداری طولانی مدت سلول در دمای بسیار پایین می‌پردازد (۱). مکانیسم انجماد بر این پایه استوار است که هرگاه آب موجود در سلول در اثر کاهش مناسب حرارت به یخ تبدیل گردد، به گونه‌ای که بدون آسیب به سلول، به طور مؤثر حرکات مولکولی را متوقف کند، فرآیندهای بیوشیمیایی سلول به تعویق افتاده و یا متوقف می‌شود و در نتیجه بقا سلول افزایش می‌یابد (۱). مهمترین اصل در فرآیند انجماد، کاهش آسیب در اثر تشکیل بلورهای یخ[3] داخل سلولی و نمک‌های سمی موجود در سلول است که با سرد کردن آهسته و خروج آب داخل سلولی تا حد مناسب[4]، قبل از سردکردن یا طی آن، به همراه یک جایگزین مناسب انجام می‌شود (۲). تاریخچه انجماد اسپرم به حدود ۲۰۰ سال قبل برمی‌گردد. در سال ۱۷۷۶، Spellazani گزارش کرد که مایع سمینال یخ‌زده حیوان در برف، پس از دوباره رساندن به حرارت محیط (ذوب)[5] تحرک اسپرم خود را بدست آورده است. در سال ۱۸۶۶، Metegazza متوجه شد که تعداد کمی از اسپرم‌های مایع منی که به مدت طولانی در حرارت $-۱۵^{\circ}C$ ذخیره شده بود پس از ذوب دوباره تحرک خود را بدست آورده‌اند (۵-۳). بعدها بانک اسپرم برای نگهداری اسپرم‌های حیوانات انسان پیشنهاد گردید (۳). درسال ۱۹۳۷، Jahnel به طور اتفاقی مشاهده کرد که بخشی از اسپرماتوزوئیدهای انسان با ذخیره‌سازی در حرارت‌های $-۷۹^{\circ}C$، $-۱۹۶^{\circ}C$ و $-۲۶۹^{\circ}C$ زنده می‌مانند (۶). آزمایشات اولیه با مایع سیمن یخ زده انسان، بازده تحرک پس از ذوب را در حدود ۱۰٪ گزارش نمودند (۳). به هرحال بازده تحرک و بقا اسپرمها در غیاب محیط‌های نگهدارنده بسیار محدود است (۵) و پیشرفت روند انجماد با کشف اتفاقی گلیسرول به عنوان نگهدارنده مناسب برای اسپرم‌های گاو توسط Polge و همکاران در سال ۱۹۴۹ آغاز گردید (۷). اولین نوزاد حاصل از اسپرم منجمد شده انسان در سال ۱۹۵۳ متولد شد (۸). محیط GEYC[6] که امروزه جهت انجماد اسپرم انسان استفاده می‌شود؛ در ابتدا توسط Ackerman در اواخر دهه ۱۹۶۰ معرفی گردید (۱). طی ۳۰ سال گذشته پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه تشکیل بانک اسپرم، استفاده از روش‌های مختلف انجماد و محیط‌های مختلف رخداده است. انجماد اسپرم برنامه‌ای روتین جهت سهولت دسترسی به مایع سمینال اهداءکنندگان، جهت تلقیح در موارد وازکتومی یا شیمی درمانی و نیز در سال‌های اخیر در بیماری ایدز، می‌باشد. از این رو بهینه نمودن میزان بقاء اسپرم در برنامه‌های انجماد بسیار ضروری به نظر می‌رسد. یکی از عوامل اساسی مؤثر در میزان بقاء اسپرم طی انجماد، محیط و روش مورد استفاده جهت حفظ و نگهداری اسپرم می‌باشد (۹). امروزه استفاده از اسپرم اهداء کننده (AID)[7] جهت تلقیح مصنوعی و تلقیح توسط اسپرم شوهر (AIH)[8] به طور روتین انجام می‌گردد (۱۰) و انجماد اسپرم- تخمک و جنین انسان طی مراحل مختلف اولیه تا بلاستوسیست یکی از اهداف اصلی برنامه IVF می‌باشد. سه محیط متداول که بیشتر در انجماد اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل محیط HSPM[9]، GEYC و محیط TYBG[10] می‌باشند (۱۱، ۳). با توجه به اینکه روند انجماد، سبب کاهش ظرفیت باروری اسپرمها از طریق آسیب به غشاء سلولی و نیز آسیب به تحرک اسپرمها و تغییر در مورفولوژی و آسیب آکروزومی، آسیب به DNA و

1-Cryopreservation
2-Cryobiology
3- Ice formation
4- Dehydratation
5-Thawing

6- Glycerol Egg Yolk Citrate
7-Artificial Insemination by Donor
8- Artificial Insemination by Husband
9- Human Sperm Preservation Medium
10- Test Yolk Buffer- Glycerol

Archive of SID
www.SID.ir

درستی ساختمان و عملکرد اسپرم می‌گردد؛ چند سالی است که ارزیابی روش‌های مختلف انجماد جهت بررسی تأثیر آنها در تحرک اسپرم انجام گرفته است. از طرف دیگر، محیط‌های نگهدارنده مختلف اسپرمها را از اثرات منفی در روند انجماد حفاظت می‌کنند. بسیاری از مراکز از بافرهای TES-Tris حاوی زرده تخم‌مرغ (محیط TYBG) و HSPM و نیز برخی از مراکز از محیط‌های دیگری همچون GEYC استفاده می‌کنند. اگرچه تمامی محیط‌های نگهدارنده، اسپرم را از نظر کیفیت تاحدودی حفظ می‌کنند؛ ولی هرگز بهترین محیط جهت انجماد اسپرم شناخته نشده و هیچ روش استاندارد انجماد اسپرم معرفی نشده است (۱۲، ۹) و لذا ارائه روش مناسب انجماد و نیز استفاده از محیط مناسب بر اساس یافته‌های تجربی ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف اصلی این مطالعه بررسی میزان بقا و تحرک اسپرم در سه محیط مختلف شامل HSPM، TYBG و GEYC با دو روش مختلف انجماد شامل روش انجماد آهسته با دستگاه (روش دستگاهی) و روش انجماد در فاز بخار ازت مایع (روش غیردستگاهی) می‌باشد که هر دو جزء فرآیند انجماد به روش سرد کردن آهسته است. این مطالعه اثرات محیطهای فوق و روش انجماد روی تحرک اسپرم و بقاء اسپرم را مورد ارزیابی قرار می‌دهد.

روش بررسی

مواد و وسایل مورد نیاز شامل نی[1]، ضامن[2]، ویزوتیوب[3]، گابلت[4]، کین[5] و کین‌استر[6] (CryoBio System, France)، تانک نگهداری[7] و دستگاه فریز (Cryo440-1.7, Mode Kryo 10) هر دو ساخت شرکت Planer انگلستان، بافر TES (T-1030)، دکستروز (D-9434)، پنی‌سیلین- G، استرپتومایسین (S-0890)، سیترات سدیم[8] (S-4641)، گلوکز (G-6152)، گلایسین (G-8898) تهیه شده از شرکت Sigma (USA)، بافر Tris (108382)، فروکتوز (105323)، گلیسرول (104093، تهیه شده از شرکت Merck (Germany)، محیط آماده HSPM (Fertipro Sperm Freeze^{TM}, France) تهیه‌گردید.

۱- *تهیه نمونه‌های مایع سمینال:* تعداد ۲۲ نمونه مایع سمینال از افراد طبیعی بعد از ۵-۲ روز خودداری از نزدیکی، در ظروف یکبار مصرف استریل جمع‌آوری‌گردید. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $37^{\circ}C$ قرار داده شدند تا از حالت لخته خارج شوند. آنالیز مایع سمینال مطابق استاندارد WHO انجام گرفت (۱۳). غلظت اسپرم (تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر) قبل از انجماد و میزان تحرک (درصد اسپرم‌های متحرک به کل اسپرمها) بر روی نمونه‌های تازه و نیز بعد از ذوب ارزیابی گردید. میزان بازیافت اسپرم متحرک تحت عنوان فاکتور بقاء (CSF)[9] به صورت زیر تعریف شد:

$$CSF=\frac{\text{درصد تحرک اسپرمها پس از ذوب کردن}}{\text{درصد تحرک اسپرمها قبل از انجماد}}\times ۱۰۰$$

هر نمونه سیمن به ۳ قسمت تقسیم گردید و هر قسمت با یک محیط تهیه شده به روش زیر، مخلوط گردید. مخلوط نمونه با هر یک از محیطها به دو بخش تقسیم گردیدند. بخشی از نمونه با هر یک از سه محیط مختلف به روش انجماد در فاز بخار ازت مایع و بخش دیگر به روش انجماد آهسته توسط دستگاه منجمد گردید.

۲- *طرز تهیه محیطها:*

- ***محیط HSPM:*** این محیط که حاوی آلبومین سرم انسانی به غلظت ٤/٩ *g/l* و گلیسرول ۲۰٪ (*v/v*) می‌باشد به صورت تجاری وآماده مصرف، استفاده گردید که

1- Straw
2- Rods
3- Visotube
4- Goblet
5- Cane
6- Canister
7- Dewar
8- Trisodium citrate
9- Cryo Survival Factor

Archive of SID
www.SID.ir

به صورت ۰/۷ : ۱ (۰/۷*ml* محیط نگهدارنده +۱*ml* مایع سمینال) با نمونه سیمن مخلوط گردید (۱٤، ۱۱-۱،۹).

- ***محیط TYBG:*** این محیط که حاوی زرده تخم مرغ و گلیسرول می‌باشد، برای حجم ۱۰۰*ml* به صورت زیر تهیه می‌شود: بافر TES با غلظت ۱۷٦ *mM*، بافر Tris با غلظت ۸۰ *mM* و دکستروز با غلظت ۹*mM* . مقدار احتساب شده برای ۱۰۰*ml* از مواد فوق در حدود ۵۰*ml* آب مقطر حل شد و سپس به غلظت ۸٪ (*v/v*) گلیسرول، ۱۰۰۰*U/ml* پنی‌سیلین G و ۱۰۰۰ *µg/ml* استرپتومایسین سولفات اضافه گردید. پس از تنظیم pH=۷/٤ به حجم ۱۰۰*ml* رسانده شد. محلول نهایی با استفاده از فیلتر ۰/۲۲*µm* صاف و به حجم‌های کوچک ۸*ml* منجمد گردید. موقع استفاده به غلظت ۲۰٪ (*v/v*) زرده تخم‌مرغ تازه اضافه شد (به ۸*ml* از محیط ۲*ml* زرده تخم مرغ) و نمونه‌های سیمن به صورت ۱:۱ با این محیط مخلوط گردید (۱٤،۱۱،۹،۱).

- ***محیط GEYC:*** این محیط نیز که حاوی زرده تخم‌مرغ و گلیسرول می‌باشد، برای حجم کلی ۱۰۰*ml* به صورت زیر تهیه شد: ۲*g* سدیم تری‌سیترات، ۰/۸ *gr* گلوکز، ۰/۸*gr* فروکتوز و ۰/۲*gr* گلایسین در حدود ۵۰*ml* آب مقطر حل گردید و ۲۱/۳*ml* گلیسرول به آن اضافه و پس از تنظیم pH=۷/٤ با آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰*ml* رسانده شد. این محیط پس از تقسیم به حجم‌های کوچک ۹*ml* در ۷۰ *°C*- تا یک سال پایدار می‌باشد. موقع استفاده به غلظت ۲۵٪ (*v/v*) زرده تخم‌مرغ (به ۹ *ml* از این بافر ۳ *ml* زرده تخم‌مرغ تازه) اضافه گردید با این محیط نیز نمونه‌های سیمن به صورت ۱:۱ مخلوط شدند (۱۰-۹، ۳، ۱).

۳- ***روش انجماد:*** روش کلی کار با هر یک از سه محیط بدین ترتیب بود که پس از رساندن محیط‌ها به دمای آزمایشگاه، بر روی یک حجم از مایع سیمنال، حجم مورد نیاز از محیط نگهدارنده، قطره قطره و به آرامی (با سرعت حدود ۰/۸ *ml/min*) به نمونه مایع سمینال اضافه و خوب مخلوط گردید. نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد؛ سپس مخلوط محیط و نمونه را به داخل نی‌های ۰/۲۵ میلی‌لیتری کشیده شد، با باقی گذاشتن حدود ۱*cm* هوا در دو طرف نی‌ها، دهانهٔ نی توسط ضامن بسته شد. کار به صورت دوتایی انجام گردید یعنی برای هر نمونه با هر یک از سه محیط نگهدارنده مختلف و هر یک از روش‌های غیردستگاهی یا دستگاهی، دو عدد نی منجمد گردید. در روش انجماد در فاز بخار از یک فلاسک دو جداره جهت فریز کردن استفاده شد و جهت نگهداری نی‌ها بر روی بخار نیز از سینی شبکه‌ای مکعب مستطیل در ابعاد مناسب استفاده گردید. دو عدد نی از هر نمونه و از هریک از سه محیط مختلف به مدت ۳۰ دقیقه روی بخار ازت مایع به فاصله حدود ۲۵ *cm* از مایع ازت به حالت افقی قرار داده شدند (کاهش حرارت از حرارت اتاق به حرارت ۸۰ *° C*- و با سرعت انجماد ۱۰ *° C /min*-)، سپس کل نی‌ها در داخل ازت مایع فرو برده شد و در تانک ازت مناسب ذخیره گردید (۱۹٦ *° C*-). دو عدد نی دیگر از هر نمونه و با هر یک از سه محیط مختلف توسط دستگاه انجماد به صورت زیر منجمد گردید:

۱) کاهش درجه حرارت از ۲۵ *° C*+ تا ٦ *° C*- با سرعت سردکردن ۲ *° C /min*

۲) نگه‌داشتن در درجه حرارت ٦ *° C*- برای مدت ۱۰ دقیقه

۳) کاهش حرارت از ٦ *° C*- تا حرارت ۳۰ *° C*- با سرعت انجماد۰/۳ *° C/min*

٤) کاهش حرارت از ۳۰ *°C*- تا حرارت ۱۹٦ *°C*- با سرعت انجماد ٤۰ *°C /min*-

۵) قرار دادن نی‌ها در نیتروژن مایع.

۴- ***ذوب مجدد اسپرم:*** نمونه‌ها پس از یک هفته بعد از مرحله انجماد، ذوب گردید. جهت ذوب، نی‌های مورد نیاز از نیتروژن مایع خارج و پس از تاخیر ۱۰ ثانیه‌ای در محیط آزمایشگاه، برای مدت ۵ دقیقه در بن ماری

Archive of SID
www.SID.ir

C° ۳۷ قرار داده شدند. سپس ضامن نی‌ها برداشته شد و با بریدن انتهای دیگر نی نمونه سیمن خارج و مورد ارزیابی و آنالیز قرار گرفت.

۵- آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از برنامه SPSS ویرایش ۱۱، آزمون t-test جهت مقایسه تحرک اسپرمها قبل از انجماد و بعد از ذوب با دو روش مختلف انجماد و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD جهت مقایسه تحرک اسپرمها قبل از انجماد و بعد از ذوب با سه محیط مختلف انجام گرفت. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و میزان CSF نمونه‌ها قبل از انجماد و بعد از ذوب طی دو روش مختلف و با سه محیط مقایسه گردید.

نتایج

در این مطالعه سه محیط HSPM، TYBG، GEYC، طی دو روش مختلف انجماد مورد ارزیابی قرار گرفتند. تحرک اولیه در ۲۲ نمونه مایع سمینال قبل از انجماد و بعد از ذوب در جدول و نمودار شمارهٔ ۱ آورده شده است.

براساس این نتایج میانگین درصد تحرک اسپرم قبل از فریز کردن ۸/۲۹±٤٦/۱۳٪ بود؛ اما این میانگین پس از ذوب طی روش انجماد آهسته با دستگاه با محیط‌های HSPM (۵±۱٦/۹٪)، محیط GEYC (٤/۵۷±۱٦/۳۱٪) و محیط TYBG (٤/۷۵±۱٦/۰٤٪) و نیز طی روش انجماد در فاز بخار ازت با محیط‌های HSPM (٤/۵۵±۱٦/۹۵٪)، محیط GEYC (۵/۱٤±۱٤/۱۳٪) و محیط TYBG (٤/٤۷±۱٤/۱۸٪) کاهش چشمگیری نشان می‌دهد.

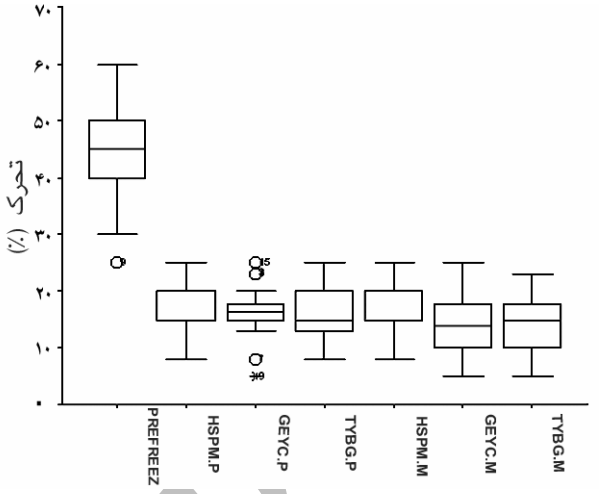
بهترین تحرک اسپرم پس از ذوب در روش انجماد آهسته با دستگاه (روش برنامه‌ریزی شده) حاصل شد. همانطوریکه جدول شمارهٔ ۱ نشان می‌دهد؛ اگرچه تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میانگین درصد تحرک اسپرم در محیط HSPM بین دو روش دستگاهی (۵±۱٦/۹٪) و فاز بخار ازت (٤/۵۵±۱٦/۹۵٪)؛ وجود ندارد؛ اما میانگین درصد تحرک اسپرم پس از ذوب با دو محیط GEYC و TYBG طی روش انجماد در فاز بخار ازت نسبت به روش دستگاهی کاهش داشت (به ترتیب ۵/۱٤±۱٤/۱۳٪

جدول ۱- پارامترهای توزیع تحرک مایع سمینال به تفکیک محیط TYBG, GEYC, HSPY و روش انجماد

روشها و محیطها / پارامترها	قبل از انجماد (٪)	انجماد به روش دستگاهی (٪)			انجماد به روش غیردستگاهی (٪)		
		انجماد در محیط HSPM	انجماد در محیط GEYC	انجماد در محیطTYBG	انجماد در محیط HSPM	انجماد در محیط GEYC	انجماد در محیط TYBG
میانگین تحرک (M±SD)	٤٦/۱٤	۱٦/۹۱	۱٦/۳۲	۱٦/۰٤	۱٦/۹۵	۱٤/۱٤	۱٤/۱۸
انحراف معیار تحرک	۸/۳	۵	٤/۵۷	٤/۷۵	٤/۵۵	۵/۱۵	٤/٤۸
کمترین تحرک	۲۵	۸	۵	۸	۸	۵	۵
بیشترین تحرک	٦۰	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۳
دامنه بین چارکی*	۱۱/۲۵	٦/۲٦	۳/۵	۷	٦/۲۵	۸	۸
میانگین CSF پس از ذوب (n=۲۲)	۱۰۰	۳۵/۸۹±۵/۷۲	۳٤/۲±٦/٤۳	۳٤/۱۸±٦/۱۱	۳٦/۲٦±۵/٦٤	۲۹/۱٤±٦/٦٦	۳۰/۱۱±٦/۲٦
میانگین تحرک در نمونه‌های با تحرک <۵۰٪ (n=۵)	۵٦	۲٤/۲	۲۰/۲	۲۱/۸	۲۲/۸	۲۰/٦	۱۹/۲
میانگین CSF در نمونه‌های با تحرک <۵۰٪ (n=۵)	۱۰۰	٤۳/۲۲±۱/۹۹	۳۵/۹۸±٦/۱۸	۳۸/۹۲±٤/۸۹	٤۰/۷٤±۳/٤۹	۳٦/۷۲±۵/۹	۳٤/۳±۵/۳۲
میانگین تحرک در نمونه‌های با تحرک >۵۰٪ (n=۱۷)	٤۳/۲٤	۱٤/۷٦	۱۵/۱۸	۱٤/۳۵	۱۵/۲٤	۱۲/۲٤	۱۲/۷
میانگین CSF در نمونه‌های با تحرک >۵۰٪ (n=۱۷)	۱۰۰	۳۳/۷۳±٤/٤۹	۳۳/٦۸±٦/۵۹	۳۲/۷۹±۵/۸۳	۳٤/۹۵±۵/۳٤	۲٦/۹۱±۵/۱۳	۲۸/۸۸±٦/۱۱

* Inter quartile range

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۱- مقایسه درصد تحرک قبل و بعد از انجماد به تفکیک محیط و روش انجماد، مقادیر خارج از محدوده (Outliers) مربوط به نمونه‌های مایع سمینال شماره ۹،۳،۷،۱۵، مقدار پرت (Extremes) مایع سمینال شماره ۹).

با محیط GEYC در روش فاز بخار ازت در مقابل ۱۶/۳۱±٤/٥٧٪ با همین محیط در روش دستگاهی و نیز ٤/٤٧ ±١٤/١٨٪ با محیط TYBG در روش فاز بخار ازت در مقابل ٤/٧٥ ±١٦/٠٤٪ با همین محیط در روش دستگاهی) و تفاوت معنی‌داری بین روش دستگاهی و فاز بخار ازت با هر یک از دو محیط GEYC (P=۰/۰۰۱) و TYBG (P=۰/۰۰۷) وجود دارد. بنابراین روش دستگاهی به عنوان انتخاب اول جهت انجماد، پیشنهاد می‌شود.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که اگرچه تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین میانگین درصد تحرک اسپرم پس از ذوب و مقایسه دو به دوی محیطها طی روش دستگاهی وجود ندارد (به ترتیب ۵±۱۶/۹٪=HSPM، ۱۶/۳۱±٤/٥٧٪=GEYC و ٤/٧٥±١٦/٠٤٪=TYBG)؛ اما در روش فاز بخار ازت میانگین درصد تحرک پس از تاوینگ در محیط HSPM (١٦/٩٥±٤/٥٥٪) به عنوان یک محیط نگهدارنده بیشتر از دو محیط GEYC (١٤/١٣±٥/١٤٪) و TYBG (١٤/١٨±٤/٤٧٪) بوده و تفاوت معنی‌داری (آنالیز واریانس یکطرفه) بین محیط HSPM و دو محیط GEYC (P=۰/۰۵) و محیط TYBG (P=۰/۰۵) وجود دارد.

مقایسه میانگین درصد تحرک پس از ذوب اسپرم‌های منجمد شده در محیط GEYC و TYBG به عنوان محیط‌های نگهدارنده، طی روش فاز بخار ازت نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین میانگین‌های درصد تحرک دردو محیط GEYC (١٤/١٣±٥/١٤٪) و محیط TYBG (١٤/١٨±٤/٤٧٪) در روش فاز بخار ازت وجود ندارد. بهرحال میانگین درصد تحرک اسپرم‌های منجمد شده در محیط HSPM به عنوان یک محیط نگهدارنده، اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با میانگین درصد تحرک اسپرم پس از ذوب در دو محیط دیگر نشان می‌دهد، بنابراین محیط HSPM، محیط مناسبتری جهت انجماد اسپرم نسبت به دو محیط GEYC و TYBG می‌باشد.

همچنین زمانیکه تعداد نمونه‌های مایع سمینال به دو گروه با درصد تحرک بالای ۵۰٪ و زیر ۵۰٪ تقسیم گردید. میانگین درصد تحرک اسپرمها برای ٥ نمونه با تحرک بالای ۵۰٪ قبل از انجماد ٥٦٪ بود؛ ولی میانگین درصد تحرک و میانگین بازده تحرک (یا میزان بقا) پس از ذوب طی روش دستگاهی با محیط‌های HSPM، GEYC و TYBG (به ترتیب برابربا ٢٤/٢٪ با میانگین بازده تحرک ١/٩٩±٤٣/٢٢ در محیط HSPM، ٢٠/٢٪ با میانگین بازده تحرک ٦/١٨ ± ٣٥/٩٨ در محیط GEYC و ٢١/٨٪ با میانگین بازده تحرک ٤/٨٩±٣٨/٩٢ در محیط TYBG) و نیز طی روش فاز بخار ازت با محیط‌های HSPM ، GEYC و TYBG (به ترتیب برابر با ٢٢/٨٪ با میانگین بازده تحرک٣/٤٩±٤٠/٧٤ در محیط HSPM، ٢٠/٦٪ با میانگین بازده تحرک ٥/٩±٣٦/٧٢ در محیط GEYC و١٩/٢٪ با میانگین بازده تحرک ٥/٣٢±٣٤/٣ در محیط TYBG) افزایش چشمگیری نسبت به ١٧ نمونه با میانگین درصد تحرک زیر ۵۰٪ نشان می‌دهد؛ بطوریکه در ١٧ نمونه با میانگین درصد تحرک زیر ۵۰٪، میانگین درصد تحرک قبل از انجماد

Archive of SID
www.SID.ir

٤٣/٢٤٪ (P=٠/٠٣) بود و نیز میانگین درصد تحرک و میانگین بازده تحرک پس از ذوب طی روش دستگاهی با محیط‌های HSPM (١٤/٧٦٪ با میانگین بازده تحرک ٣٣/٧٣±٤/٤٩، P=٠/٠١)، محیط GEYC (١٥/١٨ با میانگین بازده تحرک ٣٣/٦٨±٦/٥٩، P =٠/٠٥) و محیط TYBG (١٤/٣٥٪ با میانگین بازده تحرک ٣٢/٧٩±٥/٨٣، P =٠/٠١) و نیز طی روش غیردستگاهی با محیط‌های مذکور به ترتیب HSPM (١٥/٢٤٪ با میانگین بازده تحرک ٣٤/٩٥±٥/٣٤، P=٠/٠١)، محیط GEYC (١٢/٢٤٪ با میانگین بازده تحرک ٢٦/٩١±٥/١٣، P=٠/٠٠٤) و محیط TYBG (١٢/٧٪ با میانگین بازده تحرک ٢٨/٨٨±٦/١١، P=٠/٠٢) می‌باشد.

بحث

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که روند انجماد و ذوب مجدد نمونه مایع سمینال سبب کاهش فعالیت متابولیک اسپرمها و آسیب به غشای پلاسمایی آنها و در نتیجه کاهش اسپرم‌های دارای عملکرد طبیعی جهت استفاده در روش‌های لقاح خارج رحمی می‌گردد (١٥، ١٤). بنابراین، استفاده از نگهدارنده‌های مناسب و روش صحیح انجماد در حفظ و سلامت اسپرم بسیار مهم تلقی می‌گردد (١٤).

برخی محققین نشان داده‌اند که روش‌های انجماد دستگاهی، کیفیت اسپرم را بهتر از انجماد با استفاده از فاز بخار حفظ می‌کند (١٧، ١٦). اما برخی دیگر هیچ اثر مثبتی، حداقل برای اسپرم‌های انسان یافت نکرده‌اند (١٨). در مطالعه حاضر نشان داده شد که انجماد به روش برنامه‌ریزی شده آهسته (دستگاهی)، بهتر از انجماد در فاز بخار ازت مایع (غیردستگاهی) می‌تواند به عنوان روشی جهت انجماد اسپرم به کار رود. همانطوریکه داده‌ها نشان می‌دهند بهترین تحرک اسپرم پس از ذوب در روش انجماد دستگاهی و برنامه‌ریزی شده بدست می‌آید؛ بنابراین روش دستگاهی به عنوان انتخاب بهتر جهت انجماد اسپرم انسان پیشنهاد می‌گردد. مشکل دیگر در روند انجماد مایع سمینال این است که هنوز محیطی که از آسیب اسپرمها طی روند انجماد جلوگیری کند، وجود ندارد. آسیب به اسپرم‌های انسان را می‌توان بلافاصله با کاهش تحرک پس از ذوب تشخیص داد. افزودن ترکیبات نگهدارنده قبل از انجماد جهت بقا بهتر اسپرمها ضروری است. بیشتر کاهش تحرک اسپرم طی انجماد و ذوب مجدد به خاطر تماس اسپرم با نگهدارنده‌های محیط می‌باشد (١٩).

گلیسرول اولین و شایع‌ترین ترکیبی است که به عنوان نگهدارنده محیط انجماد[1] با کسب نتایج مختلف برای انجماد مایع سمینال استفاده می‌شود. گزارشات ابتدایی ثابت کرده‌اند که بدون گلیسرول بقا اسپرمها پس از انجماد کاهش می‌یابد یا به صفر می‌رسد و مطالعات مختلف ضرورت و کارآیی آن را در فرآیند انجماد آشکار کرده‌اند (٢١-١٩،٩،٣). عموماً دامنه غلظت ٥٪ تا ١٠٪ گلیسرول استفاده می‌گردد و غلظت نهایی حدود ٧/٥٪ (*v/v*) مطلوب به نظر می‌رسد (١). غلظت نهایی گلیسرول ممکن است در میزان بقا سلول‌های منجمد تأثیر بگذارد و اثرات سمی گلیسرول حتی در غلظت کمتر از ٢٪ نیز گزارش گردیده است (٢٢). همچنانکه غلظت گلیسرول افزایش می‌یابد، تحرک اسپرم کاهش می‌یابد. به هرحال اثرات سمی محدود گلیسرول روی اسپرمها به صورت آسیب‌های هایپراسموتیک در روند انجماد مشخص شده است (٢٥-٢٣، ١٩، ١١). در این مطالعه نیز از گلیسرول در هر سه محیط HSPM، GEYC و TYBG استفاده شده است. همانطوریکه میانگین درصد تحرک نشان می‌دهند، این میزان در هر سه محیط نسبت به قبل از انجماد کاهش معنی‌داری دارد (تا حدود ٣٠٪). غلظت گلیسرول مورد استفاده تأثیر مستقیمی در میزان سمیت گلیسرول دارد (٢٦). اکثر

1- Cryoprotectant

Archive of SID
www.SID.ir

محققین غلظت اپتی مم گلیسرول را جهت کسب نتایج بهتر بقاء اسپرم‌های انسان ۱۰-۵٪ پیشنهاد کرده‌اند (۳۱-۲۷، ۱۰، ۳). غلظت نهایی گلیسرول در محیط GEYC به میزان ۱۰/٦٪ و در محیط TYBG به میزان ٤٪ بود ولی در محیط HSPM به میزان ۷/۵٪ می‌باشد؛ لذا احتمالاً یکی از دلایل بهتر بودن محیط HSPM نسبت به دو محیط دیگر در این مطالعه، میزان غلظت کمتر گلیسرول مورد استفاده باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که حداکثر تا میزان ۱۰٪ غلظت گلیسرول در تهیه محیط انجماد استفاده گردد.

مطالعات فراوانی انجام گرفته است تا تأثیر نگهدارنده‌های مختلف محیط‌های انجماد نظیر زرده تخم‌مرغ، شیر، بافرهای دویونی (دارای یون‌های مثبت و منفی)[1] ، سیترات، فروکتوز، بافر تریس، گلوکز، دکستروز، گلایسین را روی اسپرم مورد ارزیابی قرار دهند (۲٦). قندها، عمومی‌ترین ترکیبات مورد استفاده در محیط‌های انجماد سیمن جهت روند انجماد هستند (۳۲، ۲٤). اثرات مفید قندها احتمالاً بخاطر حفظ فشار اسمزی مایع خارج سلولی در حرارت مختلف طی انجماد و یا به عنوان منبع انرژی جهت متابولیسم اسپرمها می‌باشد. به هرحال به دلیل اینکه مایع سمینال انسان بلافاصله پس از جمع‌آوری رقیق و منجمد شده و پس از ذوب سریعاً مواد نگهدارندهٔ آن شستشو می‌گردد، احتمال نقش قندها به عنوان منبع انرژی برای متابولیسم اسپرمها بسیار ضعیف می‌باشد. احتمالاً حفظ فشار اسمزی خارج سلولی توضیحی جهت توانایی رافینوز، گلوکز و سوکروز به عنوان مکمل‌های محیط برای اسپرم‌های انسان باشد (۱۰). از ترکیبات حفظ‌کننده فشار اسمزی خارج سلولی در محیط TYBG تنها از دکستروز استفاده شده است؛ ولی در محیط GEYC از گلوکز، فروکتوز وگلایسین و در محیط HSPM نیز از گلوکز، سوکروز و گلایسین استفاده گردیده است. بنابراین بنظر می‌رسد که محیط GEYC و HSPM نسبت به محیط TYBG از نظر حفظ فشار اسمزی خارج سلولی دارای نگهدارنده‌های بهتری باشند. از آنجاییکه قند فروکتوز منبع انرژی بهتری برای اسپرمها می‌باشد، پیشنهاد می‌گردد جهت فشار اسمزی خارج سلولی و نیز به درجاتی ضعیفتر جهت حفظ انرژی برای اسپرمها از مجموعه‌های ترکیبات گلوکز، سوکروز، فروکتوز و گلایسین استفاده گردد که درمطالعه آینده ما در تهیه نگهدارنده محیط انجماد مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. آنچه که به طور عمومی پذیرفته شده است این است که رقیق‌کننده‌های هایپرتونیک بهتر از رقیق کننده‌های هایپوتونیک هستند (۳۲). تأثیر دهیدراتاسیون رقیق‌کننده‌های هایپرتونیک ممکن است شانس تشکیل کریستال‌های یخ داخل سلولی را کاهش دهد (۲٤). مطالعات Mahadevan و همکاران (۱۹۸۳) نشان داد که افزودن سوکروز و گلایسین، در مقایسه با محیط ایزوتونیک MTM [2] سبب بهبود بقا اسپرم‌های انسان گردید (۱۰).

بافر بودن محیط‌های انجماد اسپرم جهت اجتناب از آسیب به اسپرم ضروری می‌باشد (۱). زرده تخم‌مرغ به عنوان ترکیبی از فسفولیپید، لیپوپروتئین، کلسترول و تعداد متنوعی از ترکیبات دیگر به همراه بافر سیترات و بافر دو یونی TES-Tris که در محیط GEYC و TYBG به کار رفته‌اند، برای انجماد استفاده می‌شوند. بافرهای دو یونی حاوی زرده تخم‌مرغ، گلوکز و گلیسرول به صورت وسیع برای تهیه محیط‌های انجماد اسپرم در گونه‌های مختلف پستانداران متداول شدند (۳٤). در محیط GEYC حاوی زرده تخم مرغ بافر بودن محیط توسط سیترات و گلایسین تأمین می‌گردد. اما اخیراً ترکیبی از بافرهای دویونی TES وTris به همراه زرده تخم‌مرغ (محیط TYBG) و معمولاً به همراه گلیسرول استفاده می‌گردد (۱). بافر دو یونی دیگر Hepes

1- Switzerionic

2- Modified Tyrode's Media

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد که به همراه آلبومین انسانی در محیط HSPM کاربرد دارد. چندین سال است که تأثیر زرده تخم‌مرغ در حفظ اسپرم در حرارت پایین شناخته شده است، ولی مکانیسمی که توسط آن، زرده تخم‌مرغ اسپرمها را از شوک سرما حفاظت می‌کند، هنوز به وضوح شناخته نشده است. زرده تخم‌مرغ اسپرمها را از اثرات تخریب کننده دمای پایین حفظ می‌کند و می‌تواند تغییرات ارگان‌های مهم در تحرک و متابولیسم اسپرم را کاهش دهد. پیشنهاد شده است که پایدار کردن غشاء اسپرم و یا حفظ فشار کلوئیدی محیط خارج سلولی ممکن است توسط محیط حاوی زرده تخم‌مرغ مورد تأثیر قرار گیرد. وجود ترکیبات لیپوپروتئینی با دانسیته پایین را نیز می‌توان به عنوان یک حمایت کننده در برابر شوک سرما به هنگام انجماد و ذخیره‌سازی در سرما، در نظر گرفت. احتمال می‌رود که بخش فسفولیپیدی، با دانسیته پایین موجود در زرده تخم‌مرغ سبب حفاظت اسپرمها طی تماس با حرارت پایین شوند و احتمال می‌رود که یک تعویض لیپیدی بین اسپرمها و زرده تخم‌مرغ و یا تأثیر محیط اشباع از اسید چرب، رخ داده باشد (۱٤). زرده تخم‌مرغ که اغلب در محیط‌های نگهدارندهٔ انجماد جهت اسپرم‌های انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد، علاوه بر اینکه یک محیط نگهدارندهٔ انجماد به شمار می‌رود؛ بلکه سبب حفظ و انسجام بهتر غشای پلاسمایی اسپرم می‌گردد. در واقع برخی از محققین گزارش کرده‌اند که با استفاده از زرده تخم‌مرغ در غیاب گلیسرول می‌توان طول عمر و بقا مناسبی را به دست آورد (۳۵). Emmens، Blockshaw و Sawada نشان دادند که اضافه کردن زرده تخم‌مرغ، مایع فولیکولی انسان، سرم خون انسان، شیر انسان یا گاو به مایع سیمن حاوی گلیسرول باعث افزایش بقاء اسپرمها می‌گردد (۳٦، ۲۹). مطالعات Mahadevan و همکاران نشان می‌دهد که بعضی ترکیبات در مایعات بیولوژیکی (احتمالاً آلبومین) اثرات مفیدی در طول عمر اسپرمها طی انجماد و ذوب مجدد در حضور گلیسرول دارد (۱۰). برخی شواهد وجود دارند که نقش حفاظتی آلبومین را نشان می‌دهند (۳۸، ۳۷) و لذا مشخص می‌شود که حضور آلبومین سرم انسان و سوکروز (در محیط HSPM) نقش حفاظتی مشابه یا بهتری در مقایسه با محیط حاوی زرده تخم‌مرغ در حضور گلیسرول (مثل GEYC) برای اسپرم‌های انسان دارد (۱۰). مطالعه حاضر نیز این گفته را تایید می‌کند و نشان می‌دهد که محیط HSPM حاوی آلبومین سرم انسانی به عنوان منبع پروتئین، نقش حفاظتی بهتری نسبت به دو محیط دیگر حاوی زرده تخم مرغ دارد.

استفاده از سیترات در تهیه بافرهای محیط انجماد به این دلیل است که مایع سیمن یک بافر بی‌کربنات-فسفات شبیه سرم خون نیست بلکه یک بافر بی‌کربنات-سیترات است (۹). امروزه محیط‌های انجماد اسپرم از خاصیت بافری ترکیبات مایع منی تقلید نمی‌کنند؛ زیرا سیترات در pH بین ۷/٤-۷/۲ بافر ضعیفی بوده و بی‌کربنات نیز در مدت کوتاهی به صورت گاز وارد اتمسفر می‌شود. در عوض بیشتر محیط‌های کشت بافت هنوز هم به تقلید از سرم خون، حاوی بی‌کربنات هستند. مطالعات Brotherton و همکاران نشان می‌دهد که می‌توان بافر Hepes را به عنوان بافری پایدار جایگزین بی‌کربنات پیشنهاد کرد. استفاده از محیط‌های بافت حاوی بافر فسفات استاندارد که حاوی معرف فنل‌رد به عنوان نشانگر pH هستند، راه خوبی جهت مطمئن بودن از pH خنثی نمونه‌های سیمن می‌باشد. خروج یون‌های بی‌کربنات اسیدی به آتمسفر سبب می‌گردد تا pH به بالای ۸ رسیده و رنگ محیط خصوصیت ارغوانی پیدا کند (۳). در این مطالعه مایع سیمن در همان بافری که جهت کشت تخمک استفاده می‌شود (یعنی بافر Hepes)، با اضافه کردن گلیسرول، به همراه آلبومین سرم بعنوان منبع پروتئین و بدون زرده تخم‌مرغ، منجمد گردید و نتایج موفقیت آمیزی در IVF به دست آمد. این

Archive of SID
www.SID.ir

محیط، محیطی است که امروزه ترجیح داده می‌شود (۳). اما نتایج حاضر از بهتر بودن محیط HSPM نسبت به محیط TYBG مخالف دسته دیگر از مطالعاتی است که در مقایسه این دو محیط انجام شده است. مطالعات Prins و همکاران نشان می‌دهند که از میان سیستم‌های بافری تست شده، TYB-G دارای گلیسرول دارای بهترین بازده تحرک اسپرم انسان پس از ذوب می‌باشد. به نظر می‌رسد که نسبت یک ترکیب اختصاصی در هر محیط دارای اهمیت حیاتی باشد؛ زیرا استفاده از محیط TYB-G علی‌رغم تفاوت در نسبت ترکیبات محیط مثل گلیسرول یا زرده تخم‌مرغ، نتایج مشابهی را نشان می‌دهند. اختلاف اساسی بین محیط TYB باگلیسرول و بدون گلیسرول نشان می‌داد که وجود گلیسرول به عنوان یک ماده نگهدارندهٔ در انجماد در این محیط جهت بقاء مناسب پس از انجماد حیاتی و ضروری می‌باشد. بازده بهتر اسپرمها زمانی مشاهده شد که از بافر TEST استفاده شد که احتمالاً بخاطر ظرفیت این بافر در برداشتن یون‌های هیدروژن در محیط اطراف و لذا کمک به روند دهیدراتاسیون باشد. بافر دیگر تست شده در این مطالعه بافر Hepes دارای گلیسرول بوده که افزایش بقاء اسپرمها را نشان داد؛ اگرچه بازده آن برای اسپرم‌های انسان بخوبی سیستم بافری حاوی گلیسرول نبوده است. بهرحال در مقایسه مستقیم با سیستم بافریTEST، دو سیستم بافری در محیط‌های HSPM حاوی ۱۵ ٪ (*v/v*) گلیسرول که به نسبت ۱:۱ با نمونه مایع سمینال مخلوط گردیده و محیط GEYC دارای بازده اسپرم کمتری بوده‌اند (۹). مطالعات McGonagle و همکاران نیز نشان می‌دهد که محیط TYB-G بهتر از محیط GEYC جهت حفظ تحرک و حیات اسپرم می‌باشد (۳٤). در ضمن نشان داده شده است که محیط TYB-G تاثیر مثبتی روی کیفیت اسپرم از نظر تحرک و ظرفیت باروری دارد (٤۰، ۳۹) و مطالعات Prins و همکاران نشان می‌دهد که محیط TYB محیط نگهدارنده بهتری نسبت به HSPM می‌باشد(۹). همچنین مطالعات McCoshen و همکاران نشان داد که استفاده از اسپرم‌های منجمد شده در محیط TYB-G، با توجه به نتایج حاملگی مشابه مایع سیمن تازه می‌باشد (٤۱) که ممکن است بخاطر طول عمر مناسب اسپرمها در محیطهای مورد استفاده باشد (۹).

مطالعه دیگری نشان داد که باروری مایع منی منجمد شده در محیط HSPM و یا GEYC تفاوت معنی‌داری نداشت؛ ولی درصد سیکل منتج به حاملگی برای نمونه‌های منجمدشده در محیط HSPM در مقایسه با محیط GEYC بالاتر بود (۱۰) و لذا پیشنهاد شده است که از این محیط به عنوان رقیق‌کننده نسبت به GEYC استفاده گردد. منافع HSPM شامل اینکه، برخلاف GEYC و TYBG، محیط HSPM استریل بوده، از نظر شیمیایی محیط تعریف شده‌ای بود و محتوی زرده تخم‌مرغ و یا هرگونه پروتئین‌های غیرانسانی نمی‌باشد و این به معنی اجتناب از آنتی‌بادی‌های احتمالی در پاسخ به تلقیح داخل رحمی اسپرم حاوی این پروتئین‌هاست. جالب است که یادآوری شود که Griffin و همکاران گزارش کرده‌اند که آنتی‌بادی علیه پروتئین‌های زرده تخم‌مرغ به دنبال تلقیح مکرر در گاوها مشاهده شده است (٤۲). به هرحال Park وHunter گزارش کرده‌اند که نه تولید آنتی‌بادی و نه باروری هیچ کدام با تلقیح گاو توسط تنها زرده تخم‌مرغ به عنوان رقیق‌کننده تحت تأثیر قرار نگرفته بودند (٤۳). برخلاف GEYC، نیاز به آماده‌سازی HSPM به صورت تازه و به طور هفتگی و یا در فاصله‌های زمانی کوتاه نیست. HSPM را می‌توان در ۲۰- ℃ برای حداقل ۳ ماه نگهداری کرد؛ اگرچه Jondet گزارش کرده است که محیط GEYC را نیز می‌توان برای چند ماه به صورت یخ زده ذخیره نمود (٤٤). تولید تجاری HSPM و یا در فاصله‌های زمانی کوتاه عملی است. تعیین درصد تحرک اسپرم منجمد شده بعد از روند انجماد در

Archive of SID
www.SID.ir

محیط HSPM بدلیل دانسیته پایین‌تر آسانتر از محیط GEYC می‌باشد (۱۰).

محیط HSPM مورد استفاده در این مطالعه دارای pH=٦/٥ می‌باشد که کمتر از دو محیط دیگر (pH= ٧/٤) می‌باشد. اگرچه اکثر محققین استفاده از محیط‌های انجماد با pH=٧ تا pH=٧/٤ را پیشنهاد کرده‌اند؛ اما گزارشی از تأثیر pH=٧-٧/٤ روی بقاء اسپرم‌های انسان گزارش نگردیده است (۱۰). با این وجود pH اپتی‌مم محیط HSPM در حدود ٧-٦/٥ بود و Foote و همکاران گزارش کرده‌اند که pH=٦/٥ در بافر رقیق‌کننده محتوی Tris سبب افزایش باروری با مایع سیمن منجمد شده گاو شده است (٤٥). اگرچه دلیل این امر شناخته شده نیست اما ممکن است مربوط به تغییرات واضح pH در طی روند انجماد باشد (٤٦) و لذا کمتر بودن pH مورد نظر در محیط HSPM احتمالا بتواند دلیل دیگری برای بهتر بودن این محیط نسبت به محیط‌های GEYC و TYBG جهت انجماد اسپرم باشد.

نتایج Stanic و همکاران ثابت می‌کند که در صورتیکه افرادی با معیارهای اسپرموگرام استاندارد اهداء کننده باشند، استفاده از مایع منی منجمد شده برای تلقیح مصنوعی می‌تواند نتایج بهتری را به همراه داشته باشد؛ زیرا بهبود تحرک در مایع منی منجمد شده ممکن است کارایی و بازده باروری را افزایش دهد(۱۱). در این مطالعه نیز جهت بررسی تاثیر تحرک اولیه اسپرم در بازده تحرک (میزان بقاء) پس از انجماد، نمونه‌های مایع سمینال در دو گروه با درصد تحرک بالاتر از ۵۰٪ و مساوی یا کمتر از ۵۰٪ بصورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفته است. بررسی نتایج ما نیز مطالب مذکور را تایید می‌کند و نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین میانگین بازده تحرک با میزان بقا نمونه‌های با بیش از ۵۰٪ تحرک اولیه و نمونه‌های با درصد تحرک اولیه مساوی یا کمتر از ۵۰٪ قبل از انجماد و بعد از انجماد با استفاده از هر یک از محیطها و روش‌های انجماد وجود دارد (P<۰/۰۵). پس اگر از مایع سمینال تازه با بیش از ۵۰٪ تحرک اولیه جهت انجماد استفاده گردد، بازده بالاتری را پس از انجماد و ذوب مجدد نشان خواهد داد. گزارشات Brotherton و همکاران نیز نشان می‌دهد که تحرک اسپرماتوزوئید انسان چه درصد تحرک و چه سرعت آن، در مایع انزالی تازه بستگی به شمارش اسپرم و درصد مورفولوژی طبیعی دارد. به جز در تعدادی موارد غیرطبیعی، زمانیکه شمارش اسپرم بالا باشد، درصد تحرک نیز بالا می‌باشد. همچنانکه نمونه‌های مایع سمینال بتدریج ضعیف‌تر می‌شوند، شمارش اسپرم، تحرک و مرفولوژی همگی کاهش می‌یابند؛ چرا که اینها پارامترهای جداگانه‌ای نیستند و همگی با همدیگر منعکس‌کننده کیفیت مایع انزال هستند.

نتیجه‌گیری

با توجه به بحث مذکور می‌توان نتیجه‌گیری کرد که روش برنامه‌ریزی شده آهسته (دستگاهی) بهتر از انجماد در فاز بخار ازت مایع (غیردستگاهی) جهت انجماد اسپرم بوده و همچنین محیط HSPM به دلیل غلظت کمتر گلیسرول، حفظ فشار اسمزی مناسب، استفاده از بافر دوینی مناسب، استفاده از آلبومین سرم انسانی به عنوان منبع پروتئین و استفاده از محیط نگهدارنده مناسب، بهتر از دو محیط GEYC و TYBG جهت انجماد اسپرم می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران محترم پژوهشکده ابن‌سینا و مرکز درمان ناباروری ابن‌سینا که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند قدردانی می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1- Mortimer D. Practical Laboratory Andrology. Oxford University Press incorporated. Chapt. 14, Semen cryopreservation.1994;pp:301-323.

2- Shaw J.M., Oranratnachai A., Trounson A.O. Cryopreservation of oocytes and embryos. Chapter 16. In: Handbook of Invitro Fertilization Second Edition. Edited by Alan O. Trounson and David K. Gardner. CRC press Inc.2000.

3- Brotherton J. Cryopreservation of human semen. Arch of Androl.1990;25:181-195.

4- Mahony M.C., Morshedi M., Scott R.T., De Villiers A. Erasmus E. Role of spermatozoa cryopreservation in assisted reproduction. In: human spermatozoa in assisted reproduction. Edited by Acosta A.A., Swanson R. J., Ackerman S.B., kruger T.A.F., Van Zyl J.A., and Menkveld R. Baltimore: Williams & wilkins Co., Chapt. 10, pp:100,1990.

5-Anger J.T., Gilbert B.R. Goldstein M. Cryopreservation of sperm: Indications, Methods and Results. J Urol. 2003;170:1079-1084.

6- Jahnel F. Uber die wiederstandsfahigkeit von menschlichen spermatozoan gegenuber starke kalte. Klin Wschr.1937;17:1273-1275.

7- Polge G., Smith A.U., Parkes A.S. Retrival of (bovine) spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature.1949; 164:666-669.

8- Bunge R.G., Sherman J.K. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature.1953;172: 767.

9- Prins G.S., Weidel L. A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. Fertil Steril.1986;46(1):147-149.

10- Mahadevan M., Trounson A.O. Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. Andrologia.1983;15(4):355-366.

11- Stanic P., Tandara 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: 65-70.

12- Nallella K.P., Sharma R.K., Allamaneni S.S.R., Aziz N., Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and there cryoprotectants. Fertil Steril.2004;82(4):913-918.

13- Gardner D.K., Weissman A., Howles C.M., Shoham Z. Assisted Reproductive Techniques. Chapt. 5: Evaluation of sperm.2001;P:61-76.

14- Hammadeh M.E., Georg T., Rosenbaum P., Schmidt W. Association between freezing agent and acrosome damage of human sepermatozoa from subnormal and normal semen. Andrologia. 2001;33:331-336.

15- Baratz S.L., Rothschild E., Grach B., Koifman M., Shiloh H., Ishai D. Dirnfeld M. The value of sperm pooling and cryopresenvation in patients with transient azoospermia or sever oligoasthenoteratozoospermia. Hum Reprod.2002;17(1):157-160.

16- McLaughlin E.A., Ford W.C.L., Hull M.G.R. A comparison of the freezing of human semen in the uncirculated vapour above liquid nitrogen and in a comercial semi programmable freezer. Hum Reprod.1990; 5:724-8.

17- Ragni G., Caccamo A.M., Dalla Serra A., Guercilena S. Computerized slow staged freezing of semen from men with testicular tumors or Hodgkin's disease preserves sperm better than standard vapor freezing. Fertil Steril.1990;53: 1072-5.

18- Thachill J.V., Jewett M.A.S. Preservation techniques for human semen. Fertil Steril.1981; 35:546-8.

19- Critser J.K., Kuse Benda A.R., Aaker D.V., Arneson B.W., Ball G.D. Cryopreservation of human spermatozoa III. The effect of cryoprotectants on motility. Fertil Steril.1988;50:314-20.

20- Serafini P., Mars R.P. Computerized stage-freezing technique improves sperm survival and preserve penetration of zona-free hamster ova. Fertil Steril.1986;45: 854-858.

21- Critser J.K., Arenson B.W., Aaker D.V., Huse-Benda A.R., Ball G.D. Cryopreservation of human spermatozoa II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. Fertil Steril.1987;47:980-984.

22- Tulandi T., McInnes R.A. Vaginal Lubricant: effect of glycerol and egg white on human sperm motility and progression in vitro. Fertil Steril 1984;41:151-153.

23- Weidel L., Prins G.S. Cryopreservation of human spermatozoa frozen in eight different buffer system. J Androl.1987;8:41-47.

24- Watson P.F. The preservation of semen in mammals. In: Oxford reviews of reproductive biology. Finn CA (Eds) Oxford University Press, Oxford.1979;pp:283-350.

25- Gao D.Y.,Ashworth E.,Watson P.F.Hypersmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermiolysis. Biol Reprod.1993;49:112-113.

26- Jezek D., Schulze W., Kalanj-Bognar S., Vukelic Z., Milavec-Puretic V., krhen I. Effects of various cryo preservation media and freezing thawing on the morphology of rat testicular biopsies. Andrologia.2001; 33:368-378.

Archive of SID
www.SID.ir

27- Sawada Y. preservation of human semen by deep freezing. Int J Fert.1964;9:525-532.

28- Sawada Y., Ackerman D.R. Use of frozen semen. In: S.J. Behrman and R.W. kistner (Editors) progress in infertility. Boston: little Brown.1968;pp:731-748.

29- Jeyendran R.S., Graham E.F. An evaluation of cryo-protective compounds on bovine spermatozoa. Cryo-biology.1980;17:458-464.

30- Polge C. Freezing of spermatozoa. In: Ashwood Smith and J. Farrant (Eds): Low temperature presser-vation in medicine and biology. Bath: Pitman.1980; pp:45-64.

31- Richardson D.W. Techniques of sperm storage. In: Artificial insemination. R.C.O.G., London.1976;pp: 97-125.

32- Mann T. Biochemistry of semen and of the male reproductive tract.London.Methuen. (2nd Edition).1964.

33- Graham E.F., Crabo B.E., Brown K.L. Effect of some zwitterions buffers on the freezing and storage of sper-matozoa. J Dairy Sci.1972;55:372-8.

34- Mc Gonagle L.S., Goldstein M., Feld schuh J. Foote R.H. The influence of cryprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen thawed human sperm. Asian J Androl.2002; 4:137-141.

35- Sherman J.K. Cryopreservation of human semen. In: Keel B.A., Webster B.W. (Editors); CRC Handbook of the laboratory Diagnosis and Treatment of infertility CRC press. Boca Raton, FL.1990.

36- Emmens. C.W., Blackshaw A.W. Artificial insemina-tion. Physiol Rev.1971;36: 227-306.

37- Luyet B., Masat R. On the cryoprotective action of albumin on erythocytes. Cryobiology. 1967;3:370.

38- Glaub J.C., Milis R.N., Katz D.F. Improved motility recovery of human spermatozoa after freeze preserva-tion via a new approach. Fertil Steril.1976;27:1283-1291.

39- Katayama K.S., Stehlik E., Roesler M., Jeyedran R.S., Holmgren W.J., Zaneveld L.J. Treatment of human spermatozoa with an egg yolk medium can enhance the outcome of in vitro fertilization. Fertil Steril.1989; 52:1077-1079.

40- Barak Y., Amit A., Lessing J., Paz G., Homonnai Z., Yogev L. Improved fertilization rate in an in vitro fertilization program by egg yolk-treated sperm. Fertil Steril.1992;58:197-198.

41-McCoshenJ.A., Wodzicki A., Tyson J.E. Effectiveness of human semen frozen in TESE-yolk- buffered medium on AID outcome. Fertil Steril.1984;42:164.

42- Griffin J.E.T., Nunn W.R., Hartigen P.J. An immune response to egg yolk semen diluent in dairy cows. J Reprod Fert.1971;25:193-199.

43-ParkY.W,HunterA.G. Effect of repeated inseminations with egg yolk semen extender on fertility in cattle. J. Dairy. Sci.1977;60:1645-1649.

44- Jondet M. Congelation du sperme humain. Bull Acad Vet.1976;49:373-384.

45- Foote R.H. Fertility of bull semen at high extension rates in Tris buffered extenders. In: Reproduzione animale e fecondazione artificiale. Bologna: Edizione Agricole. 1972;pp:99-105.

46- Van den Berg L., Rose D. Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosph-ate solution: the reciprocal system KH_2PO_4- Na_2HPO_4-H_2O. Arch Biochem Biophys.1959;81:319-329.

Archive of SID

www.SID.ir