

اثر هیالورونان قبل از انجماد و پس از ذوب بر مورفولوژی، تحرک و زنده ماندن اسپرم‌های موش سوری

میترا بختیاری^۱؛ دکتر علیقلی سبحانی*^۲؛ دکتر محمد اکبری^۳؛ اکبر شعبانی^۴؛ دکتر محمد بربرستانی^۵؛
دکتر پریچهر پاسبخش^۴؛ عظیم هدایت‌پور^۵

چکیده

مقدمه: منجمدسازی اسپرم به‌طور گسترده‌ای در برنامه‌های تلقیح مصنوعی و باروری آزمایشگاهی برای نگاه‌داری گامت نر و فراهم آوردن شانس برای باروری‌های بعدی به کار می‌رود. علی‌رغم پیشرفت‌هایی که در انجماد اسپرم صورت گرفته است، میزان تحرک اسپرم‌ها پس از انجماد و ذوب به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد. با توجه به این‌که هیالورونیک اسید، میزان تحرک اسپرم را پس از انجماد و ذوب بهبود بخشیده و قدرت زنده ماندن اسپرم را افزایش می‌دهد و موجب حضور اسپرم در طی عمل متقابل اسپرم - اووسیت در بدن موجود زنده می‌شود، بنابراین استفاده از هیالورونیک اسید به‌عنوان یک راه‌کار کاربردی آماده، به‌منظور بهبود کیفیت اسپرم در طی انجماد و ذوب توصیه می‌شود. لذا در تحقیق حاضر اثر هیالورونان روی عوامل مورفولوژی، میزان تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌های موش سوری قبل از انجماد و پس از ذوب بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۶ سر موش نر سوری به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌های سیمین به‌دست آمده از هر حیوان نر به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول کنترل بدون انجماد، گروه دوم کنترل منجمدشده، گروه سوم قبل از انجماد هیالورونان افزوده شد و گروه چهارم پس از ذوب هیالورونان اضافه شد. انجماد اسپرم‌ها در کرایوتیوب ۱/۸ میلی‌لیتری و با استفاده از ضد یخ ۱۸ درصد رافینوز و ۳ درصد skim milk انجام شد. مورفولوژی اسپرم‌ها توسط رنگ آمیزی پانیکولا و قابلیت زنده ماندن آن‌ها با رنگ آمیزی فوق حیاتی اتوزین B مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان تحرک اسپرم‌ها با مشاهده میکروسکوپی بررسی گردید. در این مطالعه برای مقایسه گروه‌های آزمون با گروه کنترل از آزمون آماری تی‌تست استفاده شد. **یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن هیالورونان پس از ذوب به نمونه‌ها به‌طور معنادار تأثیر مثبت روی میزان تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها دارد ($P < 0/001$). اضافه کردن همین دوز قبل از انجماد در روی عوامل مذکور بی‌تأثیر بود و هیچ تأثیری از دوز مذکور هیالورونان قبل از انجماد و پس از ذوب روی مورفولوژی اسپرم‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این مطالعه به‌نظر می‌رسد که افزودن هیالورونان به سیمین منجمدشده پس از ذوب موجب افزایش تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها می‌شود. «دریافت: ۱۳۸۴/۹/۹ پذیرش: ۱۳۸۷/۶/۶»

کلیدواژه‌ها: هیالورونان، انجماد اسپرم، مورفولوژی، میزان تحرک، قابلیت زنده ماندن.

۱. دانشجوی دکتری گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ۲. دانشیار گروه آناتومی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. استاد گروه آناتومی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۴. محقق آمار و عضو هیأت علمی سازمان تات
۵. مربی گروه آناتومی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران

* عهده‌دار مکاتبات: تهران، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، تلفن: ۰۹۱۲۳۲۶۶۶۳۸

مقدمه

تلاش برای حفظ قابلیت باروری اسپرم پستانداران از حدود ۱۳۵ سال پیش شروع شده است. سیمن فریز شده در پستانداران نر می‌تواند برای انتقال راحت اختصاصات ژنتیکی مورد نظر در بعد مسافتی طولانی استفاده شود (۱). از سوی دیگر تولید حیوانات Transgenic و نگهداری آنها مستلزم وقت و هزینه زیادی است، لذا در حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش، یک روش بالقوه برای حفظ گونه‌های Transgenic، منجمد کردن و نگهداری اسپرم آنها است (۲).

منجمدسازی اسپرم انسانی به‌طور گسترده‌ای در برنامه‌های تلقیح مصنوعی و باروری آزمایشگاهی برای نگهداری گامت‌نر و فراهم آوردن شانس برای باروری‌های بعدی به‌کار می‌رود. به‌طور مثال در درمان بدخیمی (۳) شیمی درمانی سیتوتوکسیک، رادیوتراپی و بعضی از انواع درمان‌های جراحی که ممکن است منجر به یک نقص تستیکولار یا اختلال در عملکرد سیستم انزالی شود، فریز کردن اسپرم‌ها قبل از شروع درمان امیدی برای باروری بعدی بیماران را فراهم می‌کند (۴). در افراد اهداءکننده اسپرم، استفاده از سیمن فریز شده اجازه بررسی جزئیات افراد اهداءکننده از نظر وجود عفونت‌هایی از قبیل HIV و HBS را به‌وجود می‌آورد (۵). همچنین برای تکرار اعمال جراحی از قبیل MESA^۱ و TESE^۲ که به‌عنوان اعمال جراحی درمانی در آروسپرمی استفاده می‌شود، می‌توان از منجمد کردن اسپرم استفاده نمود (۶).

علی‌رغم پیشرفت‌های متنوعی که در روش منجمدسازی اسپرم صورت گرفته است عمل کردن و میزان تحرک اسپرم‌ها پس از انجماد و ذوب به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد (۴).

یک راه‌کار مناسب برای بهبود کیفیت اسپرم منجمدشده، استفاده از مواد افزودنی مختلف از جمله هیالورنیک اسید می‌باشد (۷).

هیالورونان که یکی از اجزاء موکوس سرویکال، مایع فولیکولار و مایع سمینال است (۸). یک جزء مهم ماتریکس خارج سلولی بوده و نقش مهمی در تنظیم پروسه‌های سلولی مختلف مانند حرکت، اثر متقابل سلول به سلول در طی مورفوژنز و تمایز انجام می‌دهد (۹).

چهارده سال پیش با کشف دو گیرنده هیالورونان در سطح سلول یعنی CD44 (۱۰) و RHAMM 1 (۱۱) برای اولین بار نقش این ماده در تنظیم مستقیم میزان تحرک، مهاجرت و نفوذپذیری سلول مشخص شد (۱۲).

بنابراین از آنجایی که هیالورونیک اسید، میزان تحرک اسپرم را پس از انجماد و ذوب بهبود بخشیده و قدرت زنده ماندن اسپرم را افزایش می‌دهد و موجب حضور اسپرم در طی عمل متقابل اسپرم-اووسیت در بدن موجود زنده می‌شود (۸، ۱۳ و ۱۴)، لذا استفاده از هیالورونیک اسید به‌عنوان یک راه‌کار کاربردی، به‌منظور بهبود کیفیت اسپرم در طی انجماد و ذوب توصیه می‌شود.

باتوجه به نتایج حاصل از مطالعه دیگری که توسط همین گروه تحقیق در آزمایشگاه جنین‌شناسی دانشگاه

1. Microsurgical epididymal sperm aspiration

2. Testicular sperm extraction

علوم پزشکی تهران انجام شد اثر سه دوز ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیالورونیک اسید در روی اسپرم‌های موش سوری پس از انجماد و ذوب در محیط کشت بررسی گردید و طبق نتایج به‌دست‌آمده دوز ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را بر بهبود پارامترهای اسپرم داشت. با توجه به مورد مذکور و گزارشات متناقضی که در مورد زمان افزودن هیالورونان در پروسه انجمادی در گونه‌های مختلف به‌دست‌آمده است، لذا در تحقیق حاضر اثر دوز ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیالورونان را در دو مرحله قبل از انجماد و پس از ذوب در روی سیمن موش سوری مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

ضدبیخ بر اساس روش Nakagata تهیه گردید (۱۵). به این ترتیب که ابتدا ۱/۸ mg رافینوز پنتاهیدرات (Merk) (۱۸٪ W/V) را در ۹ ml آب مقطر دو بار تقطیر در حالی که در حمام آب C ۶۰° شناور می‌باشد حل شد. سپس ۰/۳ mg شیرخشک (sigma, Non fat skim milk) (۳٪ W/V) را نیز در آن به‌طور کامل حل کرده و محلول به‌دست‌آمده را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰rpm در دستگاه سانتریفیوژ قرار دادیم. در صورت کدر بودن محلول رویی سانتریفیوژ تا شفاف شدن کامل محلول چندین بار تکرار گردید. سپس محلول رویی را جدا کرده و با فیلتر ۰/۴۵ μm آن را فیلتر نمودیم. به این ترتیب محلول ضد بیخ آماده شده را در لوله‌های استریل ۱/۵ ml با حجم ۱ ml تقسیم نموده و در دمای ۲۰- درجه

سانتی‌گراد نگهداری کردیم.

سپس یک ظرف پلی‌استر تهیه کردیم و یک توری فلزی را طوری روی ظرف قرار دادیم که بتوان کرایوتیوب‌ها را روی آن قرار داد تا در معرض بخار نیتروژن قرار بگیرند. در مرحله بعد کرایوتیوب‌ها داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند.

قبل از تهیه اسپرم یکی از لوله‌های حاوی ضد بیخ را از دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج نموده و در انکوباتور قرار دادیم، پس از ذوب شدن محلول ضدبیخ آن را داخل یک پتری‌دیش کوچک تخلیه نمودیم.

برای تهیه اسپرم تعداد ۶ سر موش بالغ نر از نژاد سوری (گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران) با سن بین ۸-۶ هفته مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها پس از ورود به حیوان‌خانه به‌مدت حداقل یک‌هفته نگهداری شدند تا با شرایط آن‌جا وفق پیدا کنند، حیوانات تحت شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور و دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تهیه اسپرم موش نر را به طریق کشیدن و جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته و سپس پوست را از ناحیه شکم از دو طرف سری و دم با دو انگشت شست و سبابه گرفته و به طرفین کشیدیم، به این ترتیب پوست جدا شده و بیضه‌ها در ناحیه شکم نمایان شدند. فاسیای روی بیضه‌ها را با قیچی استریل پاره کردیم و پس از مشخص شدن اپیدیدیم که مانند عصا در روی بیضه قرار داشت، دم اپیدیدیم را جدا نموده و هر اپیدیدیم را به دو قسمت تقسیم نمودیم. سپس یک بخش از یک اپیدیدیم را در محیط کشت HamsF10 قرار دادیم (برای گروه کنترل

سپس نمونه‌های اسپرم تهیه‌شده از هر موش نر به ۴ گروه به شرح ذیل تقسیم‌بندی شد: گروه ۱ (کنترل تازه): نمونه‌هایی بودند که بدون انجماد تنها در معرض محیط HamsF10 قرار گرفتند و هیچ دوزی از هیالورونان (شرکت ژرف خرد sigma) به این محیط اضافه نشد، گروه ۲ (کنترل انجمادی): نمونه‌های این گروه در مراحل انجماد و پس از ذوب هیالورونان دریافت نکردند، گروه ۳: به این گروه قبل از انجماد $750 \mu\text{g/ml}$ هیالورونان افزوده شد و گروه ۴: این نمونه‌ها قبل از انجماد هیالورونان دریافت نکرده ولی پس از ذوب به آن‌ها $750 \mu\text{g/ml}$ هیالورونان افزوده شد.

در تمام گروه‌ها پس از ۲ ساعت انکوباسیون آنالیز اسپرم انجام شد. سپس تعداد (غلظت) اسپرم‌ها در هر گروه با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. برای تعیین موتیلیتی، اسپرم‌ها را در چند میدان میکروسکوپی مشاهده نموده و سرعت آن‌ها را با استفاده از درجات قراردادی WHO که سرعت حرکت اسپرم‌ها را در چهار گروه به شرح ذیل طبقه‌بندی می‌کند به دست آورده شد:

- ۱- اسپرم‌های فاقد حرکت، ۲- اسپرم‌هایی که دم‌هایشان تکان می‌خورد ولی حرکت رو به جلو ندارند،
- ۳- اسپرم‌هایی که به طرف جلو حرکت می‌کنند اما در مسیری منحنی و پیچ‌دار یا با سرعت آهسته در مسیری مستقیم و ۴- اسپرم‌هایی که به طور سریع در مسیر مستقیم به طرف جلو شنا می‌کنند. با توجه به این‌که اسپرم‌های با موتیلیتی درجه ۳ و ۴ در فرایند لقاح مؤثر هستند، لذا در تحقیق حاضر میانگین مجموع موتیلیتی درجه ۳ و ۴ اسپرم‌ها به عنوان موتیلیتی کل در هر

با اسپرم تازه)، سپس بقیه قسمت‌ها را در پتری‌دیش حاوی ضدیخ گذاشته پس از ۳۰ ثانیه حرکت دادن ظرف برای کمک به آزاد شدن اسپرم‌ها، آن‌ها را با قیچی استریل قطعه‌قطعه کرده، پتری‌دیش را درحالی‌که درب آن را به حالت وارونه داخل انکوباتور قرار داده‌ایم با زاویه ۴۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه روی آن گذاشتیم. پس از زمان مقرر، پتری‌دیش را با همان زاویه از انکوباتور خارج کرده و در زیر هود لامینار کار را ادامه دادیم، ابتدا بقایای نسوج را از داخل پتری‌دیش برداشتیم، از محلول حاوی اسپرم‌ها و ضدیخ حجمی معادل $100 \mu\text{lit}$ برداشته و داخل کرایوتیوپ‌های $1/8 \text{ml}$ ریخته شد. سپس بلافاصله کرایوتیوپ‌ها را روی توری تعبیه شده در سیستم انجمادی چیدیم به طوری که همه نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض بخار نیتروژن قرار بگیرند (-90°C). پس از ۱۰ دقیقه کرایوتیوپ‌ها را سریعاً در داخل نیتروژن مایع (-196°C) غوطه‌ور نمودیم.

برای ذوب نمونه‌ها کرایوتیوپ‌ها را در داخل آب 37°C ، به مدت ۲ دقیقه شناور کردیم. سپس حدود $200 \mu\text{l}$ مدیوم HamsF10 روی آن ریخته و بعد از سانتریفیوژ (۵ دقیقه با 5000g) محلول رویی آن را دور ریخته و دوبار تکرار نمودیم. پس از دور ریختن محلول رویی (برای جدا کردن کامل ضدیخ) $100 \mu\text{l}$ ، محیط کشت HamsF10 به آن افزودیم. محلول به دست آمده، حاوی اسپرم‌های منجمد و ذوب شده‌ای است که برای آنالیز آن‌ها کافی است، $200-100 \mu\text{lit}$ از آن را به قطرات محیط کشت افزوده و پس از دو ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار داد.

ارایه شده است، اما باتوجه به این که هنوز هم در آزمایشگاه های جنین شناسی به طور معمول از این روش استفاده می شود، لذا در تحقیق حاضر هم از رنگ آمیزی مذکور استفاده شد.

ابنورمالی های زیادی برای اسپرم ذکر شده است اما ابنورمالی هایی که در این تحقیق بررسی شده اند شامل: Coild tail, Stumped tail, Cytoplasmic Droplet و Remanent می باشند.

برای تهیه اسمیر، یک قطره از محیط کشت حاوی اسپرم بر روی لام قرار داده شد و با استفاده از لامل به روی لام پخش گردید. اسمیر به دست آمده در هوای آزمایشگاه قرار داده شد تا قدری خشک شود، باید توجه داشت که ماندن به مدت زیاد در هوای آزمایشگاه موجب خشک شدن اسپرم ها و بدشکل شدن آنها می شود، سپس رنگ آمیزی پاپانیکولا انجام شد. در این رنگ آمیزی هسته اسپرم به رنگ آبی، آکروزوم و دم اسپرم به رنگ صورتی و ناحیه پشتی آکروزوم به رنگ آبی تیره در می آید. در این تحقیق مورفولوژی سلول های اسپرم از نظر Stumped tail (S.T)، Coild tail (C.T)، Cytoplasmic Droplet (C.D) و (RE) در هر لام رنگ آمیزی شده با روش مذکور، در تعداد ۱۰۰ عدد اسپرم تعداد موارد مشاهده شده از چهار عامل تحت بررسی به طور مجزا یادداشت شد و این کار برای هر نمونه ۳ بار تکرار گردید. میانگین به دست آمده از ۳ بار شمارش به عنوان نتیجه نهایی به صورت جدول ثبت شد. در مطالعه حاضر برای مقایسه گروه های آزمون با گروه کنترل از آزمون آماری تی تست استفاده شد.

دو گروه کنترل و گروه های آزمون در نظر گرفته شد. محاسبه میزان تحرک اسپرم ها نیز برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد. سپس میانگین به دست آمده به عنوان نتیجه نهایی ثبت شد.

برای شناسایی اسپرم های زنده متحرک و غیرمتحرک از اسپرم های مرده می توان از رنگ آمیزی فوق حیاتی استفاده نمود. ترکیبات مختلفی برای رنگ آمیزی وجود دارند که اغلب آنها مخلوط آئوزین و یک رنگ متضاد آن می باشند. در این تحقیق از رنگ آمیزی فوق حیاتی آئوزین B استفاده گردید.

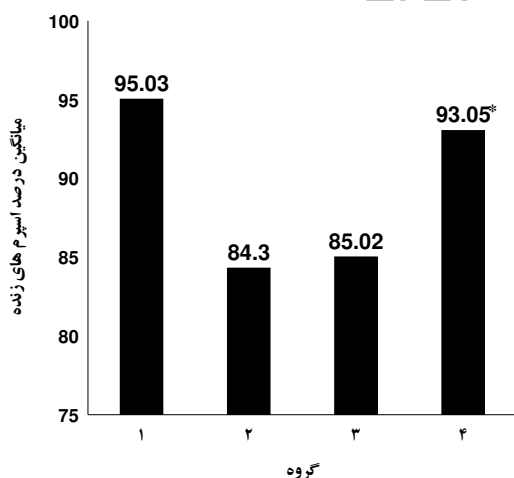
مواد مورد استفاده در این رنگ آمیزی شامل: آئوزین و محلول نرمال سالین می باشند. برای این کار ۴۰ μlit از نمونه اسپرم را با ۱۰ μlit آئوزین B (۵٪ در سالین) مخلوط نموده و سپس بلافاصله لامل را روی قطره قرار داده و آن را با بزرگ نمایی ۴۰۰x مطالعه نمودیم. اگر اسپرم در زمان رنگ آمیزی زنده باشد رنگ آئوزین را به خود نمی گیرد در نتیجه قسمت سر و تنه آن رنگ و حالت روشن دارد. درحالی که اسپرم های مرده به دلیل نقص در غشای پلاسمایی خود رنگ آئوزین را به خود گرفته و سر آنها به رنگ قرمز در می آید. با محاسبه تعداد اسپرم های رنگ نگر گرفته به کل تعداد اسپرم های موجود درصد اسپرم های زنده به دست آمد. این کار ۳ بار تکرار شد، سپس میانگین نتایج به صورت جدول ثبت گردید.

بهترین روش برای تشخیص مورفولوژی طبیعی از غیرطبیعی اسپرم استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولا بوده است که اخیراً در این رابطه نظرات ضد و نقیضی

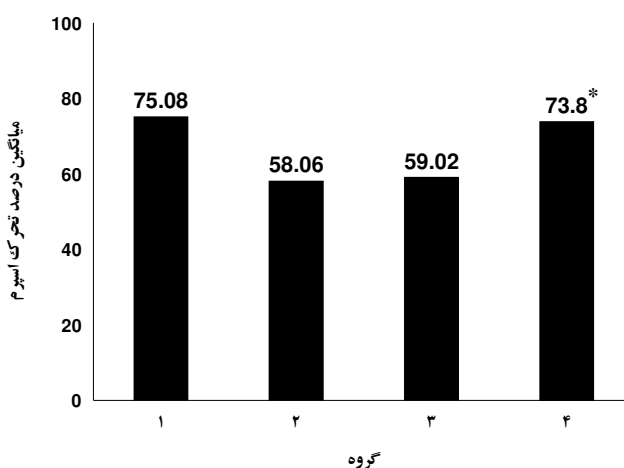
یافته‌ها

۱- مقایسه موتیلیتی اسپرم‌ها در گروه کنترل با گروه‌های آزمون: میانگین موتیلیتی در گروه ۱ کنترل با اسپرم تازه ۷۵/۰۸ درصد و در گروه ۲ کنترل با اسپرم فریز شده ۵۸/۰۶ درصد، در گروه ۳ افزودن هیالورونان قبل از انجماد ۵۹/۰۲ درصد و در گروه ۴ افزودن هیالورونان پس از ذوب ۷۳/۸۰ درصد بود. آنالیز Post hoc نشان داد که این تفاوت بین گروه کنترل ۲ و آزمون ۴ (دوز ۷۵۰ μg/ml پس از ذوب) معنادار است ($P < ۰/۰۰۱$). در واقع افزودن دوز مورد نظر هیالورونان به نمونه‌ها پس از ذوب، موجب افزایش میزان تحرک اسپرم‌ها گردید. ولی تفاوت بین گروه کنترل ۲ و آزمون ۳ (دوز ۷۵۰ μg/ml قبل از انجماد) معنادار نبود. بنابراین افزودن دوز مذکور هیالورونان قبل از انجماد به نمونه‌ها، بر میزان تحرک اسپرم‌ها تأثیری نداشت (نمودار ۱).

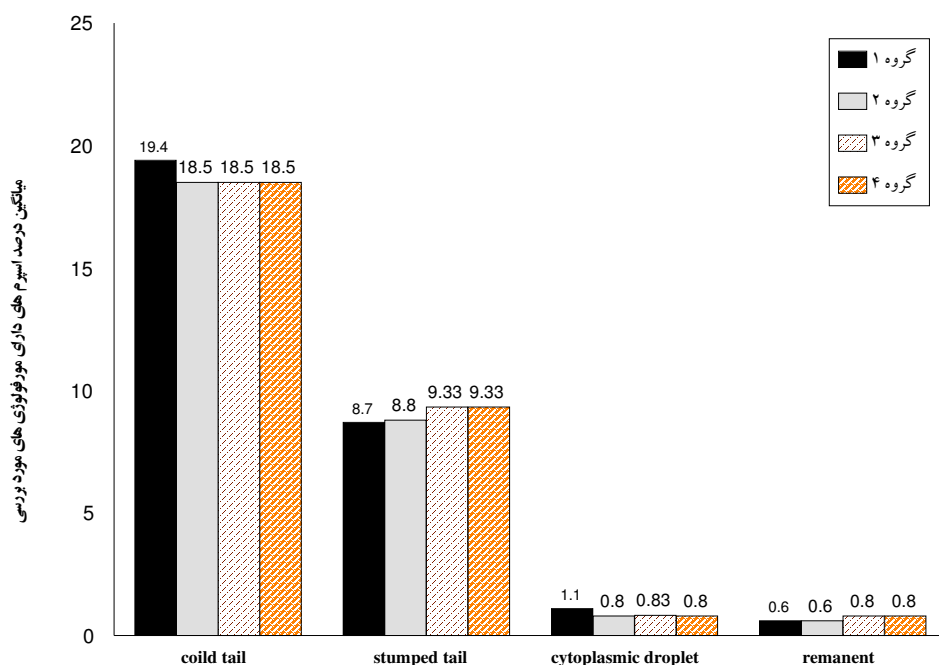
۲- مقایسه Vitality اسپرم‌ها در گروه کنترل با گروه‌های آزمون: میانگین ویتالیته در گروه ۱ کنترل با اسپرم تازه ۹۵/۰۳ درصد و در گروه ۲ کنترل با اسپرم فریز شده ۸۴/۳۰ درصد، در گروه ۳ افزودن هیالورونان قبل از انجماد ۸۵/۰۲ درصد و در گروه ۴ افزودن هیالورونان پس از ذوب ۹۳/۰۵ درصد بود. آنالیز Post hoc نشان داد که این تفاوت بین گروه کنترل ۲ و آزمون ۴ (دوز ۷۵۰ μg/ml پس از ذوب) معنادار است ($P < ۰/۰۰۱$). در واقع افزودن دوز مورد نظر هیالورونان به نمونه‌ها پس از ذوب، موجب افزایش قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها گردید. ولی تفاوت بین گروه کنترل ۲ و آزمون ۳ (دوز ۷۵۰ μg/ml قبل از انجماد) معنادار نبود. بنابراین افزودن دوز مذکور هیالورونان قبل از انجماد به نمونه‌ها، بر قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها تأثیری نداشت. (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد اسپرم‌های زنده بین گروه‌های مورد مطالعه [$P < ۰/۰۰۱$] * نسبت به گروه کنترل ۲ اسپرم منجمد بدون هیالورونان نشان داده شده است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه [$P < ۰/۰۰۱$] * نسبت به گروه کنترل ۲ اسپرم منجمد بدون هیالورونان نشان داده شده است.



نمودار ۳- مقایسه مورفولوژی اسپرم‌های موش سوری گروه کنترل و گروه‌های آزمون

است. اسپرم برای نفوذ به موکوس گردن رحم و مهاجرت به سمت دستگاه تناسلی جنس مؤنث تا محل لقاح حرکت می‌کند. همچنین تحرک اسپرم برای نفوذ به منطقه شفاف اووسیت لازم و ضروری است (۱۶). هیالورونان در روی اعمال فیزیولوژیکی مهم اسپرما توزوا، مانند نفوذپذیری و میزان تحرک آن تأثیر فراوانی دارد (۱۷).

در تحقیق حاضر مشاهده شد که افزودن دوز ۷۵۰ μg/ml هیالورونان پس از ذوب روی میزان تحرک اسپرم تأثیر مثبتی داشته و موجب افزایش آن در حد بالایی می‌گردد، همچنین طبق مطالعات آماری انجام شده، افزودن دوز ۷۵۰ μg/ml هیالورونیک اسید به نمونه‌ها قبل از انجماد، هیچ‌گونه تأثیری روی میزان تحرک اسپرم‌ها نداشته و نتایج به دست آمده با گروه کنترل تفاوت معناداری ندارد. بنابراین نتایج به دست آمده نشان می‌دهد

۳- مقایسه مورفولوژی اسپرم‌ها در گروه کنترل با گروه‌های آزمون: در مقایسه میانگین عوامل مورفولوژی (Coild tail، Stumped tail، Cytoplasmic Droplet و Remanent) بررسی‌های آماری نشان داد که به‌طور کلی بین گروه‌های مورد مطالعه هیچ‌گونه اختلاف معناداری وجود ندارد ($P > 0.05$).

در کل می‌توان نتیجه گرفت که افزودن هیالورونان در زمان‌های قبل از انجماد و پس از ذوب، تأثیری بر عوامل مورد بررسی مربوط به مورفولوژی اسپرم‌ها نداشت (نمودار ۳).

بحث

حال و همکارانش عقیده داشتند که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تعیین‌کننده ناباوری اسپرم، میزان تحرک آن

دوز ذکر شده در این مطالعه، روی دوز $1250 \mu\text{g/ml}$ نیز مطالعه شده و مشاهده شد که دوز اخیر نه تنها تأثیر مثبتی روی تحرک اسپرم‌ها ندارد بلکه تأثیر معکوس روی عامل مذکور دارد. همچنین هیچ کدام از سه دوز مذکور تأثیری بر روی مورفولوژی نداشتند (۱۸ و ۱۹). با توجه به موارد مذکور و گزارش‌های متناقضی که در مورد زمان اضافه کردن هیالورونان در پروسه انجماد وجود داشت دوز $750 \mu\text{g/ml}$ هیالورونان را در دو مرحله قبل از انجماد و پس از ذوب بررسی کردیم.

آروفو و همکارانش در سال ۱۹۹۵ با کشف دو گیرنده هیالورونان سطح سلولی یعنی CD_{44} و RHAMM نقش هیالورونان را در تنظیم مستقیم تحرک، تهاجم و نفوذپذیری سلول‌ها نشان دادند (۱۰). همچنین اسپراسیا و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۷ ثابت کردند که هیالورونان تحرک اسپرم را بعد از اعمال انجماد و ذوب شدن افزایش می‌دهد (۲۰). تمام مطالعات مذکور به همراه مطالعه حاضر مؤید این مطلب است که هیالورونان تأثیر به‌سزایی روی افزایش تحرک اسپرم‌ها دارد. مکانیسم اثر آن بر روی عامل مذکور به این صورت است که در سطح سلول دو گیرنده هیالورونان به نام‌های CD_{44} و RHAMM (Receptor for hgaluronan Mediated Motility) وجود دارد (۲۱ و ۲۲). هیالورونان با عمل متقابل خود با این گیرنده‌ها و افزایش فسفوریلاسیون پروتئین‌های اتصالی هیالورونان تحرک اسپرم را میانجی‌گری می‌کند. افزایش فسفوریلاسیون پروتئین‌های اتصالی هیالورونان ابتدا در دم اسپرم اتفاق می‌افتد (۲۳) و در نهایت موجب افزایش Ca^{+2} داخل سلولی می‌گردد. هیالورونان عمل افزایش

که علی‌رغم اثر افزایش‌دهنده هیالورونان در روی تحرک اسپرم، هنگامی که این ماده قبل از انجماد افزوده شود تأثیر مثبت خود را از دست می‌دهد. احتمال دارد که پروسه انجماد موجب برهم ریختن ساختمان هیالورونیک اسید شود و در نتیجه پس از ذوب دیگر عملکرد آن را مشاهده نمی‌کنیم.

در این زمینه پینا و همکارانش در سال ۲۰۰۴ تأثیر دو دوز متفاوت 500 و $1000 \mu\text{g/ml}$ هیالورونان را روی میزان تحرک اسپرم خوک بعد از انجماد و ذوب کردن مجدد آن مطالعه کرده و گزارش نمودند که دوز $500 \mu\text{g/ml}$ تحرک اسپرم‌ها را $9/4$ درصد و دوز 1000 موتیلیتی اسپرم‌ها را 30 درصد افزایش می‌دهد (۱۴). که نتیجه حاصل از مطالعه محققین مذکور روی تأثیر دوز $1000 \mu\text{g/ml}$ با نتیجه حاصل از مطالعه حاضر تا اندازه‌ای روی دوز مذکور مطابقت دارد. در روی تأثیر دوز کم‌تر از $1000 \mu\text{g/ml}$ پینا و همکارانش روی تأثیر دوز $500 \mu\text{g/ml}$ هیالورونان مطالعه کرده، تأثیر آن را کم‌تر از دوز $1000 \mu\text{g/m}$ گزارش نمودند. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه دیگری که توسط همین گروه تحقیق در آزمایشگاه جنین‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد اثر سه دوز 750 ، 1000 و $1250 \mu\text{g/ml}$ هیالورونیک اسید بر روی اسپرم‌های موش سوری پس از انجماد و ذوب در محیط کشت بررسی گردید و طبق نتایج حاصله دوزهای 750 و $1000 \mu\text{g/ml}$ موجب بهبود موتیلیتی ویتالیتی و میزان باروری نمونه‌ها شدند، ضمن این‌که دوز $750 \mu\text{g/ml}$ هیالورونان بیشتر از دوز $1000 \mu\text{g/ml}$ موجب بهبود عوامل مذکور شد. علاوه بر دو

بنابراین نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که علی‌رغم اثر افزایش‌دهنده هیالورونان در روی زنده ماندن اسپرم، هنگامی که این ماده قبل از انجماد افزوده شود تأثیر مثبت خود را از دست می‌دهد و این نتیجه مشابه اثر آن در روی عامل تحرک می‌باشد. نتایج به دست آمده مشابه تحقیقی است که در این زمینه پینا و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام داده‌اند و گزارش کردند که هیالورونان، اسپرم‌های ذوب شده را در طی تکامل *In vitro* محافظت کرده و موجب پایداری و استحکام غشای آن‌ها حتی بعد از انجام عمل انجماد و ذوب مجدد می‌شود (۱۴).

طبق مطالعات انجام شده مورفولوژی اسپرم عامل مؤثری در عمل باروری به خصوص به صورت IVF می‌باشد، اما هیچ مطالعه‌ای در این زمینه که آیا هیالورونان روی مورفولوژی اسپرم تأثیرگذار است یا نه صورت نگرفته است. لذا در این تحقیق اثر دوزهای ذکر شده روی عوامل مورفولوژی (Coiled tail, Stumped tail, Cytoplasmic Druplet و Remanent) مطالعه شد و هیچ تأثیری از آن‌ها روی عوامل مذکور مشاهده نشد، ضمن این که زمان افزودن هیالورونان قبل از انجماد و پس از ذوب نیز نتایج یکسانی داشت. علت احتمالی آن ممکن است از این واقعیت نشأت گرفته باشد که مورفولوژی اسپرم‌ها متأثر از عوامل متفاوتی در طی اسپرمیونیز می‌باشد. از جمله این عوامل بلوغ آکروزوم و سازمان‌بندی کروماتین اسپرم می‌باشد. در مورد هر دو عامل مذکور به نظر نمی‌رسد که هیالورونان بتواند آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد و یافته‌های تحقیق حاضر این امر را ثابت می‌کند.

Ca^{+2} داخل سلولی را در اسپرم به واسطه تأثیر متقابل با گیرنده غشاء پلاسمایی PH-20 انجام می‌دهد، بدین طریق که هیالورونان متصل به گیرنده PH-20 موجب تجمع رسپتورهایی که در انتقال سیگنال‌های داخل سلولی نقش دارند می‌شود. در نتیجه اسپرم سطح بالایی از Ca^{+2} در داخل سلول و رسپتورهای زیادی در سطح نشان می‌دهد که موجب افزایش عمل آکروزم بعد از اتصال به زونا پلاسیدا می‌شوند (۲۴).

هال و همکارانش طی مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۶ روی گیرنده‌های هیالورونان انجام دادند گزارش نمودند که گیرنده‌های هیالورونان در ورود هیالورونان به داخل سلول مؤثر هستند و این گیرنده‌ها محدود بوده و با اضافه نمودن سطح بالایی از هیالورونان از خارج، افزایشی در آن‌ها دیده نمی‌شود (۱۶). لذا از نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات قبلی چنین استنباط می‌شود که یک مقدار دوز مناسب از هیالورونان برای افزایش تحرک سلول لازم است که در این مطالعه دوز $750 \mu\text{g/ml}$ بیشترین اثر را روی عامل مذکور نشان داد.

علاوه بر این در تحقیق حاضر تأثیر هیالورونان ($750 \mu\text{g/ml}$) روی عامل قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها نیز مطالعه شد و مشاهده گردید که افزودن دوز $750 \mu\text{g/ml}$ هیالورونان پس از ذوب روی قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها تأثیر مثبتی داشته و موجب افزایش آن می‌گردد. همچنین طبق مطالعات آماری انجام شده، افزودن دوز $750 \mu\text{g/ml}$ هیالورونیک اسید به نمونه‌ها قبل از انجماد، هیچ‌گونه تأثیری روی قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها نداشته و نتایج به دست آمده با گروه کنترل تفاوت معناداری ندارد.

انجماد موجب برهم ریختن ساختمان هیالورونان شده و مانع اثرگذاری آن در روی عوامل مذکور می‌شود.

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج حاصل از این تحقیق توصیه می‌شود در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی از دوز $750 \mu\text{g/ml}$ هیالورونیک اسید پس از ذوب اسپرم‌های منجمدشده موش سوری برای افزایش قابلیت باروری آنها استفاده شود. ضمن این‌که با تکرار این آزمایش در روی اسپرم انسانی و تأیید آن می‌توان از نتایج آن در کلینیک‌های IVF بهره‌مند گردید.

در پایان نتیجه‌گیری می‌شود که دوز $750 \mu\text{g/ml}$ هیالورونان موجب افزایش تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم موش پس از انجماد در محیط کشت می‌شود. طبق نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق افزودن هیالورونان پس از ذوب بیشترین تأثیر را در افزایش تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها پس از ذوب داشت. از طرفی با توجه به گزارش‌های متناقضی که در مورد زمان اضافه کردن هیالورونان در پروسه انجماد وجود داشت، دوز تحت آزمایش در دو مرحله قبل از انجماد و پس از ذوب با هم مقایسه شد. نتایج مطالعه نشان داد که احتمالاً

Archive of SID

Abstract

The Effect of Hyaluronan on Morphology, Motility and Vitality of Mouse Sperm before Cryopreservation and After the Thawing

*Bakhtiari, M.¹; Sobhani, A.²; Akbari, M.³; Shabani, A.²; Barbarestani, M.²; Pasbakhsh, P.⁴;
Hedayatpoor, A.⁵*

1. Ph. D student of Anatomy, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences

2. Associate Professor in Anatomy, Department of Anatomy, Tehran University of Medical Sciences

3. Professor in Anatomy, Tehran University of Medical Sciences

4. Statistician, TAT Organization

5. MSc in Anatomy, Department of Anatomy, Tehran University of Medical Sciences

Introduction: Sperm Cryopreservation is widely used as a way of preserving the male sperm used in future artificial insemination and fertilization. Despite all the recent advances in Cryopreservation technology, sperm motility is negatively affected by freezing and the thawing afterwards. Yet hyaluronic acid is believed to improve the vitality and motility of the sperm, enhancing the physiological functions of spermatozoa for the conception. This study investigates the effects of hyaluronan (HA) supplementation on characteristics of morphology, motility and vitality of mice sperm before the freezing and after the thawing.

Materials and Methods: 6 male mice were randomly selected for the purpose of this study. Semen samples were removed from the animals and then were divided into four groups. The first was control group without freezing. The second was the frozen control group. For the third, hyaluronan was added before the freezing, while it was used after the thawing for the last one. Semen was frozen in 1.8 ml cryotubes with %18 raffinose and % 3 skim milk. Sperm morphology was examined through Papa Nicolao staining. Eosin B was used to analyses viability. Motility parameters were assessed through observation under inverted microscope. Data were analyzed using the T- test.

Results: Based on the results of the study, HA supplementation (750 µg/ml) improved the motility and vitality parameters ($P < 0.05$) when it was added after the thawing, while no effect was observed when it was added before the freezing. HA did not change the sperm morphology when it was added either before the freezing or after the thawing.

Conclusion: Based on the results of the study, HA supplementation (750 µg/ml) after the thawing of the frozen sperm improves the motility and the vitality of the sperms.

Key words: Hyaluronan (HA), Cryopreservation, Morphology, Motility, Vitality.

منابع

1. Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat Packs and Maxi-Straws. *Anim Reproduct Sci* 2000; 63:205-20
2. Koshimato C, Mazur P. The effect of osmolality of sugar-containing media on the survival of frozen-thawed mouse sperm. *Cryobiol* 2002; 45:80-90
3. Sanger WG, Olson JH, Shermman JK. Semen cryobanking for men with cancer criteria change. *Fertil Stril* 1992; 58:1024-27
4. Glander HJ, Schaller J. Hidden effects of cryopreservation on quality of human spermatozoa. *Cell Tissue Bank* 2000; 1(2):133-42
5. Sherman JK. Frozen semen- efficiency in artificial insemination and advantage in testing for acquired immune deficiency syndrome. *Fertil Stril* 1987; 47:19-24
6. Hsieh, et al. Cryopreservation of human sperm within mouse empty zona pellucida. *Fertil Strel* 2000; 79:694-702
7. Sztejn JM, Farley JS, Mobraaten LE. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. *Biol Reprod* 2001; 63:1774-80
8. Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid improves retention of sperm motility and velocity in normospemic and oligospermic specimen. *Fertil Steril* 1990; 54:1127-33
9. Ranganathan S, Bharadwaj A, Datta K. Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylation of proteins including hyaluronan binding protein. *Cell Mol Res* 1995; 41(5):467-76
10. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61:1303-13
11. Hammond J. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa from the vagina. *J Experiment Biol* 1990; 7:175-91
12. Lokeshwar VB, Selzer M G. Hyaluronan activates cell motility of V-Src-Transformed Cells via Ras-Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphoinositide 3-Kinase-Akt in a tumor-specific manner. *J Biol Chem* 2001; 275:27641-49

13. Ilora G, Archana B, Kasturi D. Reduction in the level of hyaluronan binding protein 1(HABP1) is associated with loss of sperm motility. *J Reproduct Immunol* 2002; 53:45-54
14. Pena FJA, Johannisson M, Wallgren H. Rodriguez M. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. *Therogenol* 2004; 61:63-70
15. Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mammalian Genome* 2000; 11:572-76
16. Hall CL, Collis L, Bo AJ, Lange L, McNicol A, Gerrard JM, Turley EA. Fibroblasts require protein kinase C activation to respond to hyaluronan with increased locomotion. *Matrix Biol* 2001; 20:183-92
17. Kornovski BS, McCshen J, Kredentser J Turly E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril* 1994; 58:599-602
18. Bakhtiari M, Sobhani A, Akbari M, Barbarestani M, Pasbakhsh P, Hedayatpur A. The effect of hyaluronic acid on motility, vitality and fertilization capability of mouse sperms after cryopreservation. *Iran J Reproduct Med* 2007; 5(2):45-50
۱۹. بختیاری میترا، سبحانی علیقلی، اکبری محمد، بربرستانی محمد، پاسبخش پریچهر، هدایت پور عظیم. بررسی اثر هیالورونان روی میزان لقاح اسپرم های موش سوری قبل از انجماد و پس از ذوب. *مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران*، آذر ۱۳۸۵؛ دوره ۶۴، شماره ۹، صفحات: ۱۹-۲۵
20. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 1(9):1949-54
21. Meyer MF, Kreil G. Cells expressing the DG42 gene from early xenopus embryossynthesize hyaluronan. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93:4543-47
22. Fraser JR, Laurent TC, and Laurent UB. Hyaluronan its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* 1997; 242:27-33
23. Gmachl M, Kreil G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 90:3569-73
24. Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki Y. Mammalian fertilization a carbohydrate-mediated event. *Biol Reprod* 2002; 57(3):487-94