Archive of SID

اثرات انجماد بروش شیشه ای شدن بر تحرک، میزان قابلیت بقاء و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم انسان

حمید درویش نیا[۱،۲]، مریم شمس‌لاهیجانی[۲]، محمد مهدی آخوندی[۳]، مرضیه مبارکی[۳] و محمدرضا صادقی[*۳]

[۱] ایلام، دانشگاه پیام نور مرکز ایلام، گروه زیست شناسی

[۲] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

[۳] تهران، پژوهشکده فن‌آوریهای نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل

تاریخ دریافت: ۸۵/۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸٦/۱۰/۱۱

چکیده

امروزه، انجماد اسپرم انسان جهت پیشبرد روشهای کمک باروری، در مراکز درمان ناباروری انجام می شود. در طول فرآیند انجماد، اثرات هیپواسموتیکی انجماد- ذوب مجدد، از تحرک، قابلیت حیات و بدنبال آن توان باروری اسپرم می‌کاهد؛ افزون بر این، محیطهای منجمد کننده متنوعی برای حفظ اسپرم از اثرات منفی فرآیند انجماد وجود دارد. هدف این مطالعه، مقایسه اثر انجماد شیشه ای شدن، در حضور و عدم حضورمحیط منجمد کننده بر کیفیت اسپرم انسان است. نمونه های منی ۲۹ مرد مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری ابن سینا با پارامترهای طبیعی (بر طبق استاندارد WHO)، بروش خود تحریکی جمع آوری، و آنالیز مایع منی انجام گرفت. سپس، جهت انجماد در حضور (محیطHuman Sperm Preservation Medium) و عدم حضور محیط منجمد کننده (یعنی در حضور پلاسمای سمینال)، نمونه ها به دو بخش مساوی تقسیم شد. محیط منجمد کننده و نمونه منی، با یکدیگر مخلوط شده، درون نی مخصوص انجماد تقسیم گردید. نی حاوی مخلوط منی و محیط منجمد کننده، و همچنین سریعاً و بدون محیط بطور مستقیم وارد تانک ازت مایع شده (انجماد شیشه ای شدن)، و حداقل بمدت یک هفته در ازت مایع نگهداری و سپس، مجدداً ذوب و درصد تحرک با استفاده از میکروسکوپ نوری و قابلیت حیات و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم، با رنگ آمیزی سه گانه هر دو نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین درصد تحرک، قابلیت بقاء و واکنش آکروزومی خودبخودی، در نمونه های پس از ذوب، در مقایسه با قبل از انجماد، کاهش معنی داری را نشان داد($P<۰/۰۰۱$). اما بیشترین میزان تحرک، در نمونه های منجمد شده، بدون محیط منجمد کننده و فقط در حضور پلاسمای سمینال بدست آمد. همچنین، تفاوت در قابلیت حیات و واکنش آکروزومی خودبخودی نمونه ها، در قبل و بعد از انجماد، کاملاً معنی دار بود ($P<۰/۰۰۱$)، ولی حضور، یا عدم حضور محیط منجمد کننده، اثری معنی داری بر قابلیت حیات و واکنش آکروزومی خودبخودی نداشت ($p>۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان داد که ذخیره طولانی مدت در ازت مایع (۱۹٦- درجه سانتی گراد) ، از کیفیت پارامتر های اسپرم پس از ذوب مجدد می‌کاهد. از سوی دیگر، ارزیابی تحرک، قابلیت حیات و واکنش آکروزومی در اسپرم، قبل و بعد از انجماد نمایانگر این است که روش شیشه ای شدن بدون حضور محیط انجمادی و فقط با حضور پلاسمای سمینال، در مقایسه با محیط HSPM، کاهش کمتری در میزان تحرک، قابلیت حیات و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم انسان ایجاد می کند.

واژه‌های کلیدی: اسپرم، شیشه ای شدن، تحرک، واکنش آکروزومی، HSPM

* نویسنده مسئول تلفن: ۰۲۱-۲۲٤۳۲۰۲۰، پست الکترونیک: sadeghi@avicenna.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

انجماد، شاخه‌ای از علم کرایوبیولوژی است که حفظ و نگهداری طولانی مدت سلولها و بافتها، را در حرارت بسیار پایین در بر می‌گیرد (۲۱). در سال ۱۷۷٦ برای اولین بار تأثیر انجماد بر اسپرم توسط Spallanzani گزارش شد وی اظهار داشت: در منی یخزده حیوان در برف، پس از ذوب مجدد و رساندن به حرارت محیط، تعدادی از اسپرمها تحرک خود را بدست می آورند. در سال ۱۸٦٦، Montegazza متوجه شد که تعداد کمی از اسپرمها پس از ذوب مجدد منی که مدت زیادی در درجه حرارت ۱۵- درجه سانتی گراد ذخیره شده بود، دوباره تحرک خود را بدست آورده اند و پیشنهاد کرد که بانک اسپرم منجمد شده انسان می تواند باعث بقای نسل وی بعد از مرگ پدر گردد. Jhanel درسال۱۹۳۷، اسپرماتوزوئیدهای انسانی را بمدت ٤۰ روز در دمای ۷۹- درجه سانتی گراد ذخیره نمود و پس از ذوب آنها مشاهده کرد که تعدادی از اسپرمها دارای تحرک می‌باشند (۳). از اواخر دهه۱۹٤۰ به بعد، امکان انجماد اسپرم چند گونه پستاندار (خصوصا گاو و انسان)، مهیا گشت (۲٤) که بعنوان روشی کارا و مفید، جهت سهولت در دسترسی به مایع منی اهداءکنندگان، در بسیاری از روشهای کمک باروری (Assisted Reproductive Techniques)، و نیز حفظ توان باروری مردان، پیش از رادیوتراپی، شیمی درمانی و جراحیهای خاص آسیب رسان به بیضه، انجام می‌گیرد (۱ و ۲٦).

در طول روند انجماد، اثرات شوک اسموتیکی انجماد/ ذوب مجدد، با آسیب به غشاء سلول، سبب نقص و کاهش تحرک اسپرم، تغییرات مورفولوژیکی و آسیبهای ساختاری و عملکردی به آکروزوم اسپرم شده و در نتیجه باعث کاهش توان باروری اسپرم می‌شود(۱۲،۲۲). طی سالهای گذشته، جهت انجماد اسپرم انسان و کاهش آسیبهای ناشی از فرآیند انجماد/ ذوب مجدد، روشها و محیطهای انجمادی مختلفی ارائه شده است (۲۲). بطور معمول، دو روش برای انجماد اسپرم مورد استفاده قرار می گیرد، انجماد کند که با کاهش تدریجی دما طی چند مرحله همراه است، و انجماد سریع که طی آن نمونه ها بطور مستقیم و سریع درون ازت مایع قرار می گیرند. محققین نشان داده اند که اولین مرحله فرآیند انجماد باید تدریجی باشد که خود بخود توجه بیشتر منتهی بروش انجماد کند شده است، بطوریکه، بسیاری از مراکز درمانی، از روش انجماد در فاز بخار ازت مایع (انجماد کند) استفاده می کنند که طی آن نیهای حاوی مایع منی و محیط انجماد را پیش از انتقال به ازت مایع، برای مدتی در فاز بخار ازت مایع بتدریج منجمد کرده و پس از تکمیل انجماد، به درون مخزن حاوی ازت مایع منتقل می‌کنند(۲۳).

در مقایسه با روشهای انجماد آهسته، امروزه، استفاده از روش انجماد فوق العاده سریع، شیشه‌ای شدن (vitrification)، در حال گسترش می‌باشد. در این روش، با فرو بردن مستقیم و سریع نمونه ها به درون تانک ازت، عمل انجماد فوق العاده سریع انجام می شود که طی آن با سرعت خیلی بالای سرما دهی (K/min ۷۲۰۰۰۰ ~) و مدت زمان کم (۸-۵ ثانیه)، در فاز اولیه انجماد، نمونه ها منجمد می‌شود؛ سرعت فوق‌العاده بالای کاهش دما از تشکیل بلورهای یخ و در نتیجه از آسیبهای القائی ناشی از کریستالهای یخ جلوگیری می‌کند (۱۵ و ۱٦).

اولین بار، Luyet و همکاران(۱۹۳۷)، امکان استفاده از روش شیشه‌ای شدن را برای انجماد اسپرم، پیشنهاد کردند(۱۸). بدنبال انجماد موفقیت آمیز اسپرماتوزوئید قورباغه (Luyet and Hodapp, 1938) و اسپرماتوزوئید پرندگان (Shaffner, 1942)، این روش جایگزین مناسبی برای انجماد آهسته معرفی شد (۱٤ و ۲۷). با توجه به راندمان کارها، قبلاً از روش شیشه‌ای شدن کمتر برای انجماد اسپرم استفاده می‌شد و بیشتر برای انجماد تخمک و جنین بکار می رفت. با گسترش روشهای لقاح خارج

www.SID.ir

Archive of SID

رحمی و امکان درمان ناباروریهای ناشی از فاکتور مردانه و بدلیل اختلال در تحرک، تعداد و مورفولوژی اسپرم، نگهداری نمونه افراد مبتلا به اختلالات اسپرمی، مورد توجه زیاد قرار گرفته و با توجه به آسیب اسپرم در روش انجماد کند، روش شیشه‌ای شدن بعنوان روشی مفید جهت انجماد اسپرم مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). از سوی دیگر، برای کاهش اثرات منفی انجماد بر سلولهائی نظیر اسپرم، محیطهای منجمد کننده مختلفی معرفی شده اند که با کاهش میزان آب سلول و تغییرات اسمزی، میزان آسیب ناشی از انجماد را به حداقل می‌رسانند(۱،۳۱).

بطور معمول، سه محیط منجمد کننده متداول HSPM، (GEYC) Glycerol. Egg yolk Citrat ، و(TYBG) TEST- Yolk Buffer- Glycerol در روش انجماد کند، مورد استفاده قرار می‌گیرد، امروزه محیطهای متعدد دیگری نیز، با تغییر غلظت ترکیبات موجود در این محیطها معرفی شده است تا آسیب وارده به سلول را به حداقل ممکن کاهش دهد(۲۹). جهت جلوگیری از اثرات حاصل از تغییرات شدید فشار اسمزی و به حداقل رساندن آسیبهای ناشی از شوک اسمزی، ماده محافظ منجمد کننده به صورت قطره‌ای و تدریجی اضافه می شود. این مواد دارای درجات مختلفی از سمیت و نفوذ پذیری در غشاء سلول می باشند و همواره برای غلبه بر سمیت آنها، مخلوطی از چندین ماده محافظ (با غلظت پائین تر) استفاده می‌گردد (۵). جهت کاربرد محافظهای انجماد، استفاده از موادی توصیه می‌شود که بطور معمول در سلولها وجود داشته و افزایش غلظت آنها سمیت کمتری برای سلول دارد.

گلیسرول، با غلظت۱۰-۵ درصد، بعنوان اولین و شایع‌ترین ماده محافظ، جهت انجماد اسپرم، بکار می رود. برای افزایش میزان بازده تحرک و سایر پارامترهای اسپرم، این ترکیب با سایر مواد مکمل (از جمله پروتئینها و قندها) مورد استفاده قرار می‌گیرد. در اغلب موارد زرده تخم مرغ بعنوان منبع پروتئین و قندهای گلوکز، سوکروز بهمراه سیترات، گلیسین و آنتی بیوتیکها به محیطهای انجماد اضافه می‌گردد (۲۸). با توجه به تشابه ترکیب محیطهای محافظ و پلاسمای سمینال، انجماد اسپرم در پلاسمای سمینال، بدون افزودن سایر مواد محافظ، می‌تواند تا حدودی از اثرات تخریبی انجماد بر عملکرد اسپرم بکاهد.

با توجه به گسترش و پیشرفت سریع روشهای درمان ناباروری و امکان درمان اغلب ناباروریهای ناشی از فاکتورهای مردانه در آینده نزدیک، لزوم انجماد اسپرم در مراکز ناباروری را بیش از پیش ضروری می‌سازد. با توجه به اینکه روند انجماد با آسیب به ساختمان و عملکرد اسپرم از جمله آسیب غشاء سلولی، آکروزوم، DNA، تغییر در مورفولوژی و کاهش تحرک آن سبب کاهش ظرفیت باروری اسپرمها می‌گردد (۷) لذا، ارائه و استفاده از روشها و محیطهای مناسب منجمد کننده، بر اساس یافته های تجربی، اهمیت فوق‌العاده زیادی پیدا می‌کند. بنابراین، هدف اصلی این مطالعه، بررسی قابلیتهای عملکرد اسپرم انسان (تحرک، قابلیت بقاء و واکنش آکروزومی خودبخودی) با روش انجماد شیشه‌ای شدن، در حضور و عدم حضور محیط منجمد کننده می‌باشد

مواد و روشها

جمع آوری نمونه: نمونه منی ۲۹ مرد مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری ابن سینا، که بر اساس استانداردهای سازمان بهداشت جهانی دارای پارامترهای طبیعی بودند(۳۱)، پس از ۷-۲ روز خودداری از آمیزش جنسی، به طریق خود تحریکی در ظروف یکبار مصرف استریل دهانه گشاد، با اخذ رضایت کتبی از افراد، طی مدت ۳ ماه جمع آوری شد. سپس، برای مایع شدن، بمدت ۳۰-۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و مطابق استاندارد سازمان بهداشت جهانی(WHO) مورد آنالیز قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

پس از ارزیابی پارامترهای اسپرمی، باقیمانده نمونه منی جهت انجام آزمایشهای تکمیلی و انجماد، سریعاً، طی مدت حداکثر یک ساعت به آزمایشگاه آندرولوژی پژوهشکده ابن سینا دانشگاه شهید بهشتی منتقل شد. تراکم اسپرم (تعداد اسپرم/ میلی لیتر)، میزان تحرک، قابلیت حیات و واکنش آکروزومی خودبخودی نمونه ها قبل از انجماد و پس از ذوب مجدد، مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز مایع منی:

تحرک اسپرم: برای مشاهده تحرک، درصد کل اسپرمهای متحرک بر اساس معیار WHO ارزیابی شد. پس از مایع شدن مایع منی،۱۰ میکرو لیتر از نمونه انزال هموژن را بر روی لام شیشه ای قرار داده با لامل ۲۲×۲۲mm پوشانده، و با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمائی ٤٠x)، در چندین میدان میکروسکوپی، تعداد اسپرمهای متحرک دارای حرکت سریع پیشرونده و رو به جلو (a)، حرکت آهسته پیشرونده رو به جلو (b)، حرکت درجا (c) و اسپرمهای فاقد تحرکت (d)، شمارش، سپس، درصد اسپرمهای متحرک و غیرمتحرک (برای هر نمونه) ثبت شد. بمحض ذوب مجدد و حذف محافظهای منجمد کننده، میزان تحرک مشابه با روش قبل از انجماد، اندازه‌گیری شد.

تراکم اسپرم: برای تعیین تراکم اسپرم، ۱۰ میکرو لیتر از مایع منی به یک میلی لیتر آب مقطر اضافه شد، و مخلوط حاصل (به کمک شیکر) کاملا هموژن و یکنواخت گردید. سپس، ۱۰ میکرو لیتر از مخلوط فوق روی لام نئوبار (پوشیده شده با لامل) قرار گرفت، برای ثابت شدن، نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه در محیط مرطوب قرار داده شد. بکمک میکروسکوپ نوری و استفاده از عدسی ٤٠x، شمارش اسپرم در مربعات ویژه لام نئوبار صورت گرفت (تعداد مربعات مورد شمارش، بر اساس تعداد اسپرم موجود در نمونه، متغیر می‌باشد)، و تعداد اسپرم در هر میلی لیتر مایع منی، بر اساس تعداد مربعات مورد شمارش و ضریب فاکتور رقت، ثبت گردید.

ارزیابی قابلیت حیات و واکنش آکروزومی خودبخودی: برای تمایز اسپرمهای زنده از مرده و اسپرمهای دارای آکروزوم سالم، یا اسپرمهای با واکنش آکروزومی، رنگ آمیزی سه‌گانه صورت گرفت. در این روش، پس از سانتریفوژ ۲۰۰ میکرو لیتر منی و شستشوی اسپرمها با PBS بمدت ۵ دقیقه با دور ٦۰۰g، رسوب اسپرمی با افزودن ۱۵۰ میکرو لیتر از PBS رقیق شد. سپس، سوسپانسیون حاصل به نسبت مساوی(۱:۱) با محلول ترپیان بلوی ۲ درصد رقیق و بمدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس ۱۰ میکرو لیتر از این مخلوط هموژن را روی لام گذاشته و با میکروسکوپ نوری اسپرمهای زنده (بدون رنگ) از اسپرمهای مرده (رنگ آبی تیره) تفکیک شد. به رسوب حاصل از سانتریفوژ مخلوط اسپرمی باقیمانده (۵ دقیقه با دور ٦۰۰g در دمای آزمایشگاه)، ۱ میلی لیترمحیط Ham's F-10 اضافه، و جهت شستشو و حذف رنگ، نمونه ها سه مرتبه هر بار بمدت ۵ دقیقه با دور ٦۰۰g سانتریفوژ شد. در مرحله بعد، سوسپانسیون شفاف اسپرمی بمدت ۳۰ دقیقه در محلول گلوتارآلدئید ۳ درصد در دمای ٤ درجه سانتی گراد) تثبیت و مخلوط اسپرمی بمدت ۵ دقیقه با دور ٦۰۰g سانتریفوژ شد. از رسوب حاصل اسمیر تهیه و در مجاورت هوا خشک شد. لامهای خشک شده، در محلول رنگی بیسمارک براون ۰/۸ درصد بمدت ۱۵ دقیقه درانکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت، پس از شستشوی مجدد با آب مقطر، در محلول رنگی رزبنگال ۰/۸ درصد در دمای اتاق بمدت ٤۰ دقیقه قرار داده شد. در نهایت، پس از شستشو با آب مقطر، عمل آبگیری با اتانول ۹۰ درصد بمدت ۵ دقیقه انجام شد و لامها در مجاورت هوا خشک و توسط میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰x مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌سان، اسپرمهای مرده به رنگ آبی کم‌رنگ مایل به خاکستری و اسپرمهای زنده، به رنگ قهوه ای کم‌رنگ دیده می شوند؛ در عین حال غشاء پلاسمائی ناحیه آکروزومی اسپرمهای دارای آکروزوم سالم

www.SID.ir

Archive of SID

و دست نخورده، به رنگ صورتی تا قرمز و اسپرمهای زنده با واکنش آکروزومی، با غشاء پلاسمائی از دست رفته در ناحیه آکروزوم فاقد رنگ صورتی می باشند (۱).

محیط منجمد کننده: در این تحقیق، محیط منجمد کننده HSPM ، در آزمایشگاه آندرولوژی پژوهشکده ابن سینا، تهیه گردید. ابتدا، مقادیر محاسبه شده (۱۲) برای یک لیتر از NaCl، KCl، $CaCl_2$، $MgCl_2$، NaH_2PO_4، $NaHCO_3$، Hepes free acid، لاکتات سدیم، سوکروز، گلیسین و گلوکز در ۹۵۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل گردید. سپس، آلبومین سرم انسانی (HSA)، گلسیرول و آنتی بیوتیک (کانامایسین سولفات) را اضافه کرده، pH محلول در ٦/٥ تنظیم و حجم نهایی، با آب دوبار تقطیر، به ۱ لیتر رسانده شد. محلول نهایی را از فیلتر $0/22\mu m$ عبور داده و در ظروف استریل، تا زمان استفاده، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد، منجمد شد.

انجماد اسپرم: پس از ذوب و رساندن دمای محیط منجمد کننده به دمای آزمایشگاه، دو میلی لیتر از نمونه مایع سمینال افراد به دو بخش مساوی جهت انجماد شیشه ای در حضور و عدم حضور محیط منجمد کننده تقسیم شد. یک میلی لیتر از محیط منجمد کننده، قطره قطره و به آرامی به نمونه سمینال اضافه و بخوبی مخلوط گردید؛ سپس، در دمای آزمایشگاه، بمدت ۱۰ دقیقه به حالت ساکن نگه داشته شد.۵۰ میکرو لیتر از مخلوط محیط انجمادی و مایع سمینال، با کمک دستگاه مکنده اختصاصی پر کردن نیهای انجماد، بداخل نیهای ۰/۲۵ میلی لیتری ،که یک سر آن با فیلتر پنبه مسدود شده، وارد گردید (در دو طرف نی هوا باقی گذاشته تا تغییرات حجم نمونه در طول انجماد / ذوب مجدد، موجب ترکیدن نی و آغشته شدن فیلتر پنبه به مخلوط محیط و مایع سمینال نگردد). قسمت باز نی توسط ضامن پلاستیکی مخصوص (rod) مسدود گردید.

از مخلوط نمونه منی دارای محیط انجمادی و نمونه مایع منی فاقد محیط انجمادی، هر کدام دو نی جهت انجماد بروش شیشه ای شدن، تهیه گردید. در روش انجماد سریع، نیهای آماده را بطور مستقیم، سریعاً به درون ازت مایع (۱۹٦- درجه سانتی گراد) منتقل و نمونه ها منجمد شد؛ برخلاف روش انجماد کند، حرارت طی مدت کوتاهی از دمای اتاق به دمای ۱۹٦- درجه سانتی گراد ازت مایع درون تانک کاهش می یابد.

فرایند ذوب مجدد: نمونه ها بمدت یک هفته درون تانک محتوی ازت مایع (۱۹٦- درجه سانتی گراد) نگه‌داری شد؛ سپس بتدریج تمامی نیها، بر اساس برنامه زمان بندی شده قبل از انجماد، برای بررسی آزمایشها، از تانک ازت مایع خارج و ذوب مجدد صورت گرفت. بدین سان، پس از تأخیر ۱۰ ثانیه ای در بالای بخار ازت، جهت افزایش تدریجی دما، نیها بمدت ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از خارج نمودن ضامن نیها، انتهای دیگر نی با قیچی استریل قطع و محتویات هر نی در میکروتیوبهای جداگانه تخلیه شد. پس از شستشو با PBS و حذف مواد محافظ، پارامترهای تحرک، قابلیت بقاء و واکنش آکروزومی خود بخودی اسپرم مطابق قبل از انجماد مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها: جهت مقایسه تحرک، قابلیت بقاء و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم انسان در قبل و بعد از انجماد/ ذوب مجدد، از نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۱/۵ استفاده شد. پارامترها توسط آزمونWilcoxon signed-ranks مقایسه و نتایج به صورت means ± SD بیان و سطح معنی دار ۰/۰۵ ($p<0/05$)در نظر گرفته شد.

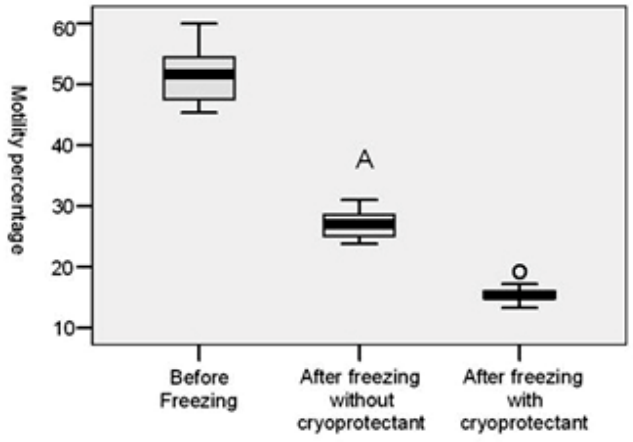
نتایج

اثر انجماد بر تحرک اسپرم: نتایج بدست آمده، کاهش معنی‌دار و اثرات مشخصی را در تحرک اسپرم نمونه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

منجمد شده، در مقایسه با نمونه‌های تازه و منجمد نشده نشان می دهد. انجماد در عدم حضور محیط انجمادی سبب کاهش کمتری در تحرک اسپرمها نسبت به نمونه‌های منجمد شده در حضور محیط منجمد کننده می‌گردد (نمودار ۱). براساس این نتایج، میانگین درصد تحرک اسپرمها، در قبل از انجماد بروش شیشه‌ای شدن۷/۲۱±۵۲/۸ بود، اما کاهش بارز و معنی‌داری به ۲/۹۵± ۱٦/۲۷ و ۳/۵±۲۷/۳۱ پس از انجماد/ذوب مجدد، با استفاده از انجماد بروش شیشه‌ای شدن، بترتیب، برای محیط منجمد کننده HSPM و بدون آن (فقط در حضور پلاسمای سمینال) مشاهده گردید (P<۰/۰۰۱). میزان بازیافت تحرک اسپرمهای منجمد شده در عدم حضور محیط منجمد کننده (فقط در حضور پلاسمای سمینال) پس از ذوب مجدد، نسبت به نمونه‌های منجمد شده و با محیط منجمد کننده، بطور معنی داری (P<۰/۰۰۱) بالاتر بود (A نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه درصد تحرک نمونه‌های مایع منی در قبل و بعد از انجماد (در حضور و عدم حضور محیط منجمد کننده)

اثر انجماد بر قابلیت حیات و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم: میانگین درصد اسپرمهای زنده در قبل از انجماد۳/۱ ± ۸۸/۷۰ و پس از انجماد شیشه‌ای بترتیب برای محیط منجمد کننده HSPM و بدون محیط، ٤/۹۸±۸۲/۱۲ و ۳/۵۷±۷۹/۹٦، بطور معنی‌داری (۰/۰۰۱ >P) کاهش یافته است. بین حضور و عدم حضور محیط منجمد کننده تفاوت معنی داری (p>۰/۰۵) مشاهده نمی‌شود (نمودار ۲). همچنین، میانگین درصد اسپرمهای با آکروزوم سالم در نمونه‌های منی تازه و منجمد نشده ۵/۱۱ ±۷۸/۷٤ است و پس از انجماد، بطور معنی داری به٦/۲٤ ±۷۲/۵٦ و ٦/۰۸ ±٦۹/۸۷، بترتیب در حضور(محیط HSPM) و عدم حضور محیط منجمد کننده (فقط در حضور پلاسمای سمینال)، کاهش یافت (P<۰/۰۰۱)، که بین محیطهای بکاررفته، این تفاوت معنی دار نمی‌باشد (نمودار ۳). افزون بر این، میانگین درصد اسپرمهای با آکروزوم آسیب دیده، با استفاده از محیط HSPM، نسبت به عدم استفاده از محیط منجمد کننده، پائین تر است. تفاوت معنی‌داری در رابطه با درصد اسپرمهای با واکنش آکروزومی، پس از انجماد/ ذوب مجدد مشاهده نمی شود.

بحث

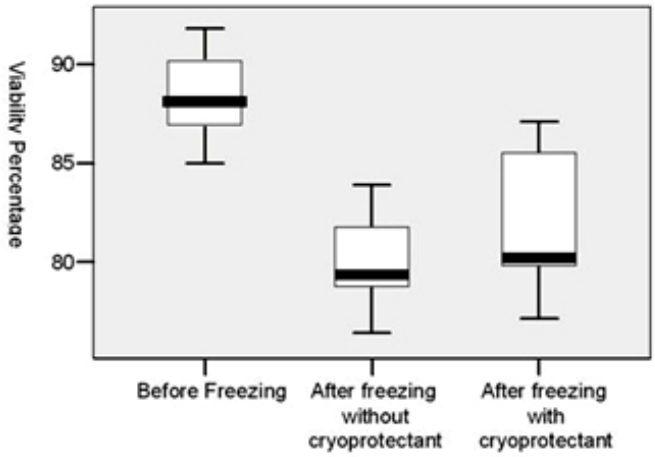
امروزه با توجه به پیشرفت روشهای کمک باروری، جهت ذخیره طولانی مدت انواع مختلف سلولها و بافتها (اسپرم، تخمک و جنین)، از انجماد استفاده می‌شود (۸). مطالعات نشان داده‌اند که روند انجماد/ ذوب مجدد مایع منی در انسان و حیوانات، سبب کاهش فعالیت متابولیک اسپرم، آسیب به غشاء پلاسمائی، در نتیجه،

www.SID.ir

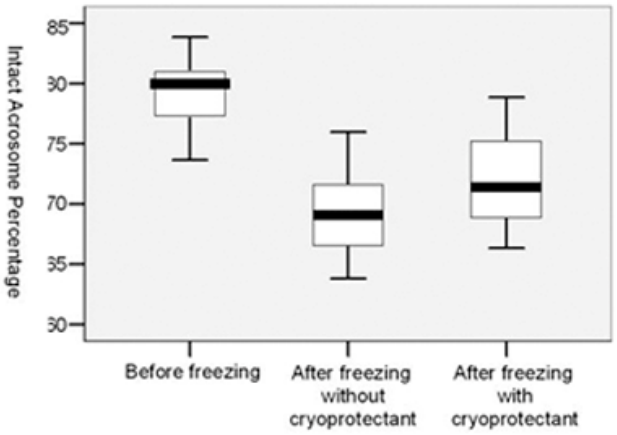
Archive of SID

کاهش اسپرمهای با عملکرد طبیعی می گردد (۱۲، ۱۳ و ۱۹)، بنابراین، استفاده از مواد محافظ و روش صحیح انجماد در حفظ اسپرم، از اثرات منفی این فرآیند بسیار مهم است.

کاهش تحرک اسپرم پس از انجماد/ ذوب مجدد، که ناشی از مواجهه اسپرم با مواد محافظ محیط منجمد کننده، در نتیجه شوک اسموتیکی می‌باشد ، موضوع تحقیقات اخیر انجماد اسپرم بوده و اولین فاکتوری است که طی فرآیند انجماد/ذوب مجدد اسپرم تحت تأثیر قرار می گیرد (۲۹). در این تحقیق، میانگین درصد پارامترهای اسپرم بطور معنی داری ($P<۰/۰۰۱$) در بعد از فرآیند انجماد، در مقایسه با قبل از انجماد، نه تنها در حضور محیط انجمادی، بلکه در عدم حضور محیط منجمد کننده، کاهش می یابد که در مورد نمونه های منجمد شده بروش شیشه ای شدن، در عدم حضور محیط منجمد کننده، کاهش کمتر است. بازیافت بالای نمونه ها در عدم حضور محیط منجمد کننده نشان می دهد که انجماد بروش شیشه ای شدن، در عدم حضور مواد محافظ منجمد کننده، می‌تواند روش مناسبی جهت انجماد اسپرم انسان باشد.



نمودار ۲: مقایسه درصد قابلیت بقاء نمونه‌های مایع منی در قبل و بعد از انجماد (در حضور و عدم حضور محیط منجمد کننده)



نمودار ۳: مقایسه درصد اسپرم‌های با آکروزوم سالم و دست‌نخورده نمونه‌های مایع منی در قبل و بعد از انجماد (در حضور و عدم حضور محیط منجمد کننده)

www.SID.ir

Archive of SID

علیرغم اهمیت تحرک اسپرم، مکانیسم مکانیکی یا فیزیکو-شیمیائی که سبب کاهش تعداد اسپرمهای متحرک می گردد، ناشناخته باقی مانده است (۸). آسیبهای مکانیکی به سلول، طی سرمادهی، منجر به شکل گیری کریستالهای یخ در درون و بیرون سلول، و در نتیجه آسیب اسموتیکی می‌شود. وجود غشاء پلاسمائی سالم و فیزیولوژیک، برای حفظ تحرک اسپرم ضروری می‌باشد. فرآیند انجماد/ ذوب مجدد کارائی غشاء را مختل کرده و از تحرک اسپرمها می‌کاهد (٤)، زیرا غشاء های درون و بیرون سلول اسپرم غنی از اسید های چرب با پیوند های اشباع نشده می‌باشد (۳۰). از سوی دیگر، سرمای زیر دمای فیزیولوژیک، فاز لیپیدی غشاء اسپرم را تغییر داده و از پایداری و ثبات آن می‌کاهد (۱۵). مطالعات نشان داده است که تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد و قرار دادن اسپرم انسان در معرض گونه های فعال اکسیژن، از کارائی و تحرک اسپرم می‌کاهد (۲ و ۷).

روند انجماد/ ذوب مجدد، قابلیت حیات نمونه ها را تحت تأثیر قرار می دهد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که انجماد، بدون توجه به محیط و روش انجمادی، سبب کاهش قابلیت حیات اسپرم می گردد. پژوهشگران نشان داده‌اند که قابلیت حیات نمونه‌ها، در طی انجماد، کاهش معنی داری دارد که این کاهش ممکن است به ترکیبات غشاء اسپرم مربوط باشد (۷).

اسپرم دارای ترکیبات لیپیدی خاص با مقادیر بالای فسفولیپید، استرول، اسید های چرب اشباع، غیر اشباع و لیپیدهای با دو فاز مایع و ژل است؛. در دمای فیزیولوژیک، هر دو شکل وجود دارد، اما در دمای پائین‌تر، به فاز ژل تبدیل می‌شود که ممکن است از سیالیت و قابلیت حیات اسپرم در طول انجماد کاسته و موجب تخریب غشاء گردد (۱۱). مطالعات نشان می دهد که آسیب پذیری و کاهش قابلیت حیات اسپرم در طول انجماد، خصوصا نسبت به حمله رادیکالهای آزاد، ممکن است مربوط به میزان بالای اسیدهای چرب غیر اشباع، میزان پائین کلسترول و فقدان مکانیسمهای ترمیمی باشد (۷).

یکی از فاکتورهای مهم در باروری اسپرم، آکروزوم سالم است که عامل مهمی برای ارزیابی باروری مردان است (۲۵) . نتایج این تحقیق نشان می دهد که فرآیند انجماد/ ذوب مجدد، بر ساختار آکروزوم اثر منفی می‌گذارد. عملکرد آکروزوم برای باروری طبیعی ضروری بوده و آنزیمهای آکروزومی اجازه رسیدن اسپرم به تخمک را مهیا می‌سازد (۳۲). آسیب اسموتیکی که به از دست رفتن غشاء اسپرم منتهی می‌شود، بعلت چروکیدگی سلول اسپرم در محلول هیپراسموتیک است (۹). بررسیهای مورفولوژیکی، سیتولوژیکی و ساختاری اسپرم پس از سرمادهی سریع، آسیبهای وسیعی به غشاء پلاسمائی پوشاننده ناحیه قدامی و آکروزوم را نشان می‌دهد که سبب تخریب و از دست دادن محتویات آکروزوم می‌شود (۱۲).

روش انجمادی همراه با محیط محافظ منجمد کننده برای انجماد اسپرم مهم است. محیطهای محافظ منجمد کننده، برای جلوگیری از تشکیل کریستالهای یخ در طول فرآیند انجماد و در نتیجه، اجتناب از آسیبهای ساختاری اسپرم در بعد از انجماد بکار می روند. اگر چه استفاده از فاز بخار ازت مایع (انجماد کند) بعنوان یک روش استاندارد، جهت انجماد مایع منی انسان بکار گرفته می‌شود، ولی در چند سال اخیر روش انجمادی فوق العاده سریع، شیشه ای شدن، گسترش یافته است (۱۵)، که بیشتر برای انجماد جنین بکار می رفت، ولی امروزه، بعلت عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت و زمان کوتاه فرآیند انجماد، بعنوان روش مفیدی جهت انجماد اسپرم بکار می‌رود.

هرچند همه تلاشهای اولیه برای انجماد اسپرم پستانداران با استفاده از روش شیشه ای شدن، بدلیل اثرات اسموتیکی کشنده غلظت بالای محافظهای انجمادی (۵۰-۳۰ درصد در مقایسه با ۷-۵ درصد برای انجماد کند)، میزان بقاء را پایین آورده و به حد صفر رسانده (١٤ و ۲۷) و سبب

www.SID.ir

Archive of SID

گردید که روشهای اولیه شیشه ای شدن برای انجماد اسپرم بکار گرفته نشود (۲۰). فقط در غلظتهای بالای (w/w) ۵۰ درصد مواد محافظ نفوذ پذیر و نفوذ ناپذیر است که سلولهای بزرگ، بافتها و حتی اندامها را می‌توان با روش شیشه‌ای شدن، منجمد کرد، این شرایط به سلولها آسیب رسانده و سبب تغییرات بیوشیمیائی و آسیبهای کشنده اسموتیکی می شود (۱۷). در حال حاضر بهترین روش، استفاده از سرعتهای خیلی بالای سرمادهی، گرمادهی، حجم کم نمونه و عدم بکارگیری محیط انجمادی، که مورد استفاده در این مطالعه، می‌باشد.

طی فرآیند انجماد بروش شیشه ای شدن، سرعتهای خیلی بالای سرمادهی، بدون شکل‌گیری کریستالهای یخ و آسیب به سلولها، سبب تبدیل محلول درون و بیرون سلول به حالت جامد یا شیشه مانند می شود. اگر پس از انجماد شیشه ای شدن، ذوب مجدد بکندی صورت گیرد، کریستالهای یخ شکل گرفته و سلول آسیب می‌بیند (۱۵ و ۱۷). برای غلبه بر این مشکل، ذوب مجدد نمونه‌ها گرمادهی در با سرعت بالا صورت می گیرد تا کریستالهای بزرگ یخ تشکیل نشود، بطوریکه به اندازه کافی برای آسیب رساندن به اسپرم انسان بزرگ نبوده و آب درون سلول در جای خود منجمد شده و بعلت زمان کوتاه به حالت شیشه درآید (۸،۱۵). بهترین نتایج، با استفاده از این روش و در عدم حضور محیط منجمدکننده (فقط در حضور پلاسمای سمینال) بدست آمد.

مسئله مهم دیگر این است که هنوز هیچ محیط مناسب ممانعت کننده از آسیب به اسپرم طی روند انجماد ارائه نشده است. قرار گرفتن اسپرم در محیط هیپراسموتیک به غشاء صدمه رسانده و اسپرم را از بین می‌برد (۱۳). موفق نبودن در انجماد اسپرم در محیط بدون ماده محافظ، در روش انجماد آهسته نشان می دهد که ممکن است نوعی بر همکنش بین غلظت مطلوب ماده محافظ و سرعت انجماد / ذوب مجدد، وجود داشته باشد. حذف ماده محافظ از محیط پیرامون اسپرم انسان، منجر به تغییر شرایط اسمزی، آسیب به غشاء اسپرم، کاهش طول عمر و توانائی باروری اسپرم می‌شود (۱۰)، که بیشترین کاهش تحرک مشاهده شده طی انجماد – ذوب مجدد اسپرم انسان، بخاطر تماس اسپرم با محیط محافظ انجماد می‌باشد(٦). همانطور که ذکر شد مواجهه غشاء اسپرم با محیط منجمد کننده سبب تخریب غشاء و از بین رفتن یکپارچگی آن می شود. در این تحقیق در عدم حضور محیط انجمادی بازیافت بهتر پارامترهای اسپرم مشاهده شد که بخاطر عدم مواجهه اسپرم با محیط منجمد کننده است که اثر منفی شوک اسمزی را به حداقل می رساند. در موقع انجماد کند به محض سرمادهی، و بدلیل کاهش تدریجی دما، آب بیرون و درون سلول با فاصله زمانی از همدیگر منجمد شده و کریستالهای یخ شکل می گیرند که سبب آسیب بیشتر به سلول می شوند. ولی در روش شیشه ای شدن به دلیل سرعت بالای سرما دهی، مایع بیرون و درون سلول در یک زمان منجمد شده و بصورت شیشه مانند درمی آید، در نتیجه زمان لازم برای شکل گیری کریستالهای یخ آسیب رسان به غشاء وجود ندارد، و سبب آسیب کمتر به اسپرم می گردد. بنابراین عدم تشکیل کریستالهای یخ و عدم وجود اثرات شوک اسمزی ناشی از افزودن محیط محافظ منجمد کننده سبب می شود که انجماد بروش شیشه ای شدن در عدم حضور ماده محافظ منجمد کننده و فقط در حضور پلاسمای سمینال، سبب حفظ بهتر پارامترهای سلامت اسپرم می گردد. پلاسمای سمینال با دارا بودن آنتی اکسیدانهای متفاوت، از اثرات مخرب رادیکالهای آزاد شکل گرفته در طی سرمادهی می کاهد و سبب حفظ غشاء اسپرم می‌شود. نکته حائز اهمیت این است که تحت هر شرایطی، فرآیند انجماد به اسپرم آسیب می رساند.

نتیجه گیری کلی آنکه انجماد بروش شیشه ای شدن بر تحرک، قابلیت بقاء و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم اثر گذاشته، سبب کاهش این پارامترها و آسیب به اسپرم

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود. انجماد شیشه ای با توجه به بازیافت بهتر پارامترهای اسپرم در عدم حضور منجمد کننده و تنها در حضور پلاسمای سمینال سریع و ساده انجام می گیرد و در این شرایط نیاز به تجهیزات پر هزینه، جهت انجماد اسپرم انسان در مراکز ناباروری نمی باشد. با پژوهشهای وسیعتر می توان این روش را جایگزین مناسبی برای دیگر روشهای انجماد قرار داد.

تشکر و سپاس: بدینوسیله از همکاری اعضای محترم پژوهشکده ابن‌سینا و مرکز درمان ناباروری ابن‌سینا در انجام این مطالعه و نیز از زحمات آقای اصغر طالبیان و سرکار خانم مهشید حجت تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱- درویش نیا، حمید.، صادقی، محمد رضا و شمس لاهیجانی، مریم (۱۳۸۵)، مقایسه اثر دو روش انجماد در فاز بخار ازت و انجماد به روش شیشه ای شدن روی پارامترهای تحرک، میزان شکست DNA و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم انسان. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد رشته علوم جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

2- Alvarez, J.G. and Storey, B.T, (1993), Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. J. Androl., 14:199-209.

3- Anger J.T., Gilbert B.R. and Goldstein M. (2003). Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J. Urol*., 170:1079-1084.

4- Bell, M., Wang, R. and Hellstrom, W.J.G, (1993), Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J. Androl*., 14:472-478.

5- Brook, P.F., Radford, J.A., Shalet, S.M., Joyce, A.D. and Gosden, R.G, (2001), Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil. Steril.*, 75:269-274.

6- Critser, J.K., Huse-Benda, A.R. and Aaker, D.V, (1988), Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil. Steril*., 50:314-320.

7- Donnelly, E.T., McClure, N. and Lewis, S.E. (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil. Steril*., 76:892-900.

8- Esteves, S.C., Sharma, R.K., Thomas, A.J. and Agarwal, A. (1996). Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. *Fertil. Steril*., 66:798-804.

9- Gao, D.Y., Liu, J., Liu, C., McGann, L.E., Watson, P.F. and Critser J.K. (1995) Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod*. 10:1109-1122.

10- Gilmore J.A., Liu J., Gao D.Y. and Critser J.K. (1997). Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum. Reprod*., 12:112-118.

11- Giraud, M.N., Motta, C., Boucher, D. and Grizard, G. (2000). Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod*., 15:2160-2164.

12- Hammadeh, M.E., Georg, T., Rosenbaum, P. and Schimidt, W. (2001). Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. *Andrologia*, 33:331-336.

13- Hammadeh, M.E., Szarvasy, D., Rosenbaum P., Georg, T. and Schmidt, W. (2001). Evaluation of cryoinjury of spermatozoa after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. *J. Assist. Reprod. Genet*., 18:364-370.

14- Hoagland, H. and Pincus, G. (1942). Revival of mammalian sperm after immersion in liquid nitrogen. Journal of Genetic and Physiology 25;337-344.

15- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I., Dessole, S. and Nawroth, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod. Bio.Med Online*., 6:191-200.

16- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I., Rahimi, G., Dessole S. and Nawroth F. (2004). DNA integrity and motility of human spermatozoa

www.SID.ir

Archive of SID

after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum. Reprod*., 19:932-939.

17- Liebermann, J., Naworth, F., Isachenko, V., Isachenko, E. and Rahimi, G. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod*., 67:1671-1680.

18- Luyet, B.J. (1937). The vitrification of organic collids and of protoplasm. *Biodynamica*, 1:1-14.

19- Mahadevan, M. and Trounson, A.O. (1984). Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa. *Andrologia*, 16:52-60.

20- Mazur, P. Katkov, I.I. and Katkov, N. (2000). The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an E.coli membrane preparation Oxyrase to lower the oxygen concentration. Cryobiology, 40:187-209.

21- Mortimer, D. (1994). Practical Laboratory Andrology, (Publisher: Oxford University Press, incorporated). Semen cryopreservation, 14:301-323.

22- Nallella, K.P., Sharma, R.K., Aziz N. and Agarwal A. (2004). Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil. Steril*., 82:913-918.

23- Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole S., Rahimi G., Farina M., Vargiu N., Orth I and Isachenko E (2002). Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. CryoLett 23:93-102.

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

25- Risopatron, J., Pena, W., Miska, W. and Sanchez, R. (2001). Evaluation of the acrosome reaction in human spermatozoa: comparison of cytochemical and fluorescence techniques. Andrologia, 33:63-67.

26- Sanger, W.G., Olson, J.H. and Sherman, J.K. (1992). Semen cryobanking for men with cancer--criteria change. Fertil Stril: 58:1024-1027.

27- Schaffner, C.S. (1942). Longevity of fowl spermatozoa in frozen condition. Science, 96:337.

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

29- Stanic, P., Tandara, M., Sonicki, Z., Simunic, V., Radakovic, B. and Suchanek, E. (2000). Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. Eur. *J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*., 91:65-70.

30- Wang, A.W., Sharma, R.K. and Agarwal, A. (1997). Effect of cryopreservation and sperm concentration on lipid peroxidation in human semen. *Urology*, 50:409-413.

31- World Health Organization (WHO) manual for the standadized investigation, diagnosis and management of the infertile male. (2000); 1th ed. Cambridge University Press, New York.

32- Zamboni, L. (1987). The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of the electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil. Steril*., 48:711-734.

www.SID.ir

Archive of SID

The effects of cryopreservation by vitrification on motility, viability and spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa.

Darvishnia H[1, 2]., Shams Lahijani M[2]., Akhondi M[3]., Mobaraki M[3]. and Sadeghi M.R[3].

[1] **Biology Dept., Payame Noor University (PNU), Ilam, I.R. of IRAN.**

[2] **Biology Dept., Faculty of Science, University of Shahid-Beheshti, Tehran, I.R. of IRAN**

[3] **Reproductive Biotechnology Research Center, Avesina Research Institute ACECR, Tehran, I.R. of IRAN**

Abstract

Cryopreservation of human sperm is routinely performed in assisted reproduction wards. During which, osmotic effects of freezing and thawing can impair sperm motility and viability, and decrease fertilizing capacity. In addition, variety of cryoprotectants is available to protect sperm from negative effects of cryopreservation processes. Aim of present study is to compare the effects of vitrification, with and without cryoprotectant, on postthaw sperm quality. Semen samples obtained from 29 healthy men referring to Avesina Infertility Clinic, were collected by masturbation, and analyzed according to WHO criteria. The semen samples were divided into two equal aliquots for: vitrification with (HSPM) and without (only seminal plasma) cryoprotectants. Equal volume of cryoprotectants was added to aliquots of samples and mixture filled in straws, plunged into liquid nitrogen, stored for at least 7 days and thawed. Percentage of motility was measured manually, using light microscope, and viability and acrosome reaction analysis were performed by triple staining. Sperm motility, viability and acrosome reaction of semen samples (n = 29), decreased significantly, after freeze/thawing, in comparison prior to freezing. Postthaw motility was highest in samples frozen without cryoprotectant, in comparison with HSPM ($p<0.001$). Significant differences were observed in the rate of viability and acrosome reaction before and after vitrification ($P<0.001$) with no significant differences between samples freezing with and without cryoprotectants. In conclusions, long-term storage in liquid nitrogen, at -196 ˚C, consistently causes reduction in postthaw sperm quality. Evaluation of motility, viability and acrosome reaction of human spermatozoa before and after vitrification, suggest that vitrification without cryoprotectant have less deleterious effects on sperm parameters versus HSPM cryoprotectant.

Keywords: *sperm, vitrification, motility, acrosome reaction, HSPM.*

www.SID.ir