مجله علمی پژوهشی دانشگاه علـوم پزشکی زنجـان
دوره ۱۴، شـماره ۵۷، زمسـتان ۱۳۸۵، صفحات ۱ تا ۸

بررسی مقایسه‌ای تحرک و بقای اسپرم‌های منجمد ـ ذوب شده درون اپی‌دیدیم و مقایسه‌ی آن با اسپرم‌های منجمد ـ ذوب شده در خارج اپی‌دیدیم موش سفید آزمایشگاهی

دکتر قاسم ساکی*، دکترمحمود هاشمی‌تبار*، دکتر بابک قوامی‌زاده**، دکتر زاهد صفی‌خانی***،
داریوش بیژن نژاد ****، دکترعلیقلی‌سبحانی*****
نویسنده مسئول: تهران، گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی تهران sobhania@Tums.ac.ir
دریافت:۸۵/۴/۲۲ پذیرش:۸۵/۸/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: *روش‌های مختلف انجمادی به‌کاررفته جهت نگهداری اسپرماتوزوا، میزان تحرک و زنده ماندن آن‌ها را کاهش می‌دهد که یکی از علل آن را، تماس مستقیم اسپرم با محلول انجمادی می‌دانند. به همین دلیل در این مطالعه نقش اپی‌دیدیم در جلوگیری از تماس مستقیم اسپرم با محلول انجمادی طی فرآیند انجماد ـ ذوب از طریق مقایسه‌ی متغیرهای تحرک و بقای اسپرم قبل و بعد از عمل انجماد- ذوب مورد مطالعه قرار گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه قسمت دمی اپی‌دیدیم سمت راست ۳۰ سرموش سوری نژاد (NMRI) به روش شیشه‌ای منجمد شدند اما اسپرم‌های اپی‌دیدیم سمت چپ استخراج و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و غلظت ۵ درصد Co_2 قرارداده شدند و تحرک و بقای آن‌ها به عنوان گروه شاهد بررسی‌گردید. باقی‌مانده‌ی اسپرم‌ها به لوله‌ی اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری محتوی محلول انجمادی (رافینوز ۱۸ درصد و شیرخشک بدون چربی ۳ درصد) منتقل گردیده و منجمد شدند. بعد از ۴۸ ساعت هردو نوع نمونه‌ی منجمد شده، ذوب شدند و تحرک و بقای اسپرم‌ها ارزیابی شد. برای نمونه‌ی اپی‌دیدیم به این صورت عمل شد که نمونه‌ها پس از استخراج از تانک نیتروژن و شست وشو در محیط کشت اسپرم درون اپی‌دیدیم منجمد- ذوب شده استخراج و در ادامه، مشابه روش بالا عمل شد. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون‌های (ANOVA) و(Tukey) استفاده شد.*

یافته‌ها: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بین میزان بقای اسپرم‌های منجمد ـ ذوب شده در داخل اپی‌دیدیم (۷/۰۸ ± ۹/۹۷) و خارج از اپی‌دیدیم (۷/۸۶ ± ۳۴/۶۷) به طور معنی‌داری اختلاف وجود دارد ($P<0/05$). هم‌چنین حرکت رو به جلوی اسپرم‌های منجمد شده‌ی درون اپی‌دیدیم (صفر) و حرکت رو به جلوی اسپرم‌های خارج از اپی‌دیدیم (۳/۵۵±۳/۲۹) محاسبه شد که اختلاف بین دو گروه معنی‌دار نبود. تحرک در جای اسپرم‌ها در دوگروه داخل و خارج اپی‌دیدیم به ترتیب برابر۴/۹۴ ± ۶/۷۸ و ۱۰/۳۷ ± ۲۹/۲۱ بود. آنالیز آماری انجام شده نشان داد که بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$).*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد که اپی‌دیدیم طی فرآیند انجماد ـ ذوب اثر محافظتی روی اسپرم نداشته است. با این وجود برای رسیدن به نتایج دقیق‌تر مطالعات و تحقیقات بیشتری باید انجام شود.*

واژگان کلیدی: اپی‌دیدیم، اسپرم، انجماد شیشه‌ای، موش سفید آزمایشگاهی

---

* دکترای تخصصی علوم تشریح، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
** دکترای تخصصی علوم تشریح، استادیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
*** دکترای تخصصی علوم تشریح، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور
**** کارشناس ارشد علوم تشریح، مربی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
***** دکترای تخصصی علوم تشریح، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تاکنون تلاش‌های زیادی توسط محققین مختلف جهت انجماد اسپرم و بهبود روش‌های آن صورت گرفته است. پولگ(Polge) و همکارانش در سال ۱۹۴۹ برای اولین بار موفق به انجماد اسپرم با استفاده از ضدیخ گلیسرول شدند(۱). انجماد اسپرم انسانی با قابلیت لقاح پس از عمل انجماد- ذوب در حدود پنجاه سال پیش توسط شرمن(Sherman) و بانج(Bunge) انجام گرفت(۲). از آن زمان تا به حال تحقیقات زیادی برای درک بهتر رخدادهای ایجاد شده طی عمل انجماد صورت گرفته است. هنگامی که دمای محلول حاوی اسپرم پایین می‌آید، کریستال‌های یخ خارج سلولی باعث می‌شوند که مایع خارج سلولی بیشتر تغلیظ شود. در نتیجه گرادیان اسمتیک حاصل از این مسئله باعث خروج آب سلول و عمل آب‌گیری می‌شود. چنان‌چه گرادیان اسمتیک خیلی زیاد باشد منجر به خروج سریع آب می‌شود و علاوه بر این می‌تواند غلظت محلول‌های درون سلولی را افزایش دهد که این مسئله خود برای سلول مضر است. از سوی دیگر اگر آب قبل از تشکیل یخ داخل سلولی به اندازه‌ی کافی برداشته نشود احتمال آسیب به ارگانل‌ها و سیتواسکلتون سلولی وجود خواهد داشت(۳). هر چند زمان زیادی از انجماد اسپرم انسانی می‌گذرد و در این راه تاکنون پیشرفت‌های زیادی حاصل شده و امروزه در اکثر مراکز ناباروری، اسپرم انسان به دلایل گوناگون منجمد می‌شود اما انجماد اسپرم موش به دلیل ویژگی‌های خاص آن مثل کم بودن ضریب نفوذپذیری غشای پلاسمایی نسبت به آب، داشتن دم دراز نسبت به اسپرم حیوانات اهلی(۴، ۵) و حساس بودن نسبت به شوک‌های اسمزی(۶) و حضور اسکلت سلولی خاص آن که به سلول‌ها قابلیت کمتری جهت مقابله با فشار اسمزی می‌دهد، هنوز در مرحله‌ی تحقیق است(۷).

مطالعات نشان داده است که کیفیت اسپرم‌های منجمد شده پس از عمل ذوب به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که سرعت انجماد، سرعت ذوب، نوع و غلظت عامل ضدیخ و... می‌توانند بر این مسئله تأثیرگذار باشند(۸). بنا به سرعت عمل انجماد تکنیک‌های مختلفی هم‌چون انجماد آهسته (۹)، انجماد سریع (۱۰) و انجماد شیشه‌ای (Vitrification) ارایه شده است. انجماد شیشه‌ای که در آن از غلظت‌های خیلی زیاد ضدیخ‌ها استفاده می‌شود و نمونه به طور آنی در نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد) غوطه‌ور می‌شود دارای مزایای معینی نسبت به دیگر روش‌های انجمادی است. زیرا از آسیب ایجاد شده توسط کریستال‌های یخ داخل سلولی و اثرات اسمزی ایجاد شده توسط تشکیلات یخ خارج سلولی جلوگیری می‌کند(۱۱). کاهش تحرک و میزان بقا (Survival rate) و در نتیجه کاهش قدرت لقاح اسپرم‌های منجمد- ذوب شده منجر به پذیرش این حقیقت شده است که هنوز روش‌های انجمادی به حد قابل قبولی تکامل نیافته‌اند. حفظ یکپارچگی غشای اسپرماتوزوا طی عمل انجماد - ذوب بسیار حیاتی است و از بین رفتن این یکپارچگی منجر به کاهش تحرک می‌شود. از سویی حساسیت غشا به آسیب ناشی از عمل انجماد -ذوب ممکن است بر حسب نزدیک بودن آن به عوامل ضدیخ متفاوت باشد(۱۲). در تحقیقات گذشته نیز تماس مستقیم سلول از جمله سلول اسپرم با محلول انجمادی به عنوان یک عامل آسیب‌رسان به سلول مطرح شده است(۱۳). بنابراین در این مطالعه تصمیم‌گرفته شد تا نقش اپی‌دیدیم در جلوگیری از تماس مستقیم اسپرم با محلول انجمادی طی فرآیند انجماد- ذوب از طریق مقایسه‌ی تحرک و زنده ماندن اسپرم قبل و بعد از عمل انجماد- ذوب مورد مطالعه قرارگیرد.

روش بررسی

روش استخراج اپی‌دیدیم و اسپرم در این تحقیق ۳۰ سر موش نرسفید آزمایشگاهی سوری نژاد (Naval Medical Research Institute [NMRI]) که

Archive of SID

www.SID.ir

قدرت باروری آن‌ها ثابت شده بود و از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز خریداری شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفتند. سن موش‌ها در هنگام انجام مطالعه بین ۸ تا ۱۲ هفته بود. به منظور استخراج اپی‌دیدیم ابتدا موش‌ها به روش دررفتگی گردنی(Cervical dislocation) کشته شدند و در ادامه با باز کردن شکم قسمت دمی(Caudal) اپی‌دیدیم برداشته شد. اپی‌دیدیم سمت راست بلافاصله درون لوله‌ی اپندورف حاوی محیط کشت T6 دارای ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA قرار داده شد. سپس به کمک سرسوزن سرنگ انسولین دیواره‌ی لوله اپی‌دیدیم سوراخ سوراخ شد تا اسپرم‌ها خارج شوند. پس از آن نمونه در آنکوباتور تحت شرایط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد Co_2 نگهداری شد تا عمل ظرفیت‌گیری (Capacitation) صورت پذیرد سپس نمونه‌ها به دو گروه **منجمد نشده** (به عنوان گروه کنترل) و انجماد (گروه آزمایشی۱) تقسیم شدند. پس از یک ساعت انکوباسیون، تحرک و بقای اسپرم‌های خارج شده از اپی‌دیدیم سمت راست توسط میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی قرارگرفت.

انجماد اسپرم‌های خارج اپی‌دیدیم (گروه آزمایشی۱): باقی‌مانده‌ی محلول حاوی اسپرم به کمک یک سمپلر به لوله‌ی اپندورف حاوی محلول انجمادی (رافینوز ۱۸ درصد به همراه شیرخشک بدون چربی۳ درصد) منتقل گردید به طوری‌که نسبت محلول انجمادی به محلول حاوی اسپرم ۱ به ۱ باشد. لوله‌ی اپندورف به مدت ۲ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرارگرفت تا تعادل بین اسپرم و ضدیخ برقرار شود. در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در معرض بخار نیتروژن قرارگرفت و سپس در نیتروژن مایع غوطه‌ور گردید(۱۴).

انجماد اسپرم‌ها داخل اپی‌دیدیم(گروه آزمایشی۲): قسمت دمی‌اپی‌دیدیم سمت چپ پس از استخراج، درون لوله‌ی‌اپندورف حاوی محلول انجمادی (رافینوز ۱۸ درصد به همراه شیرخشک بدون چربی ۳ درصد) قرار داده شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرارگرفت تا تعادل بین اسپرم و ضدیخ برقرار شود. سپس به مدت ۱۰ دقیقه روی بخار نیتروژن قرار داده شد و در نهایت در نیتروژن مایع غوطه‌ور و به مدت ۴۸ ساعت منجمد گردید.

بررسی تحرک اسپرم: مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی اسپرم را روی Makler chamber قرار داده و تحرک اسپرم‌ها به کمک میکروسکوپ معکوس ارزیابی شد. به این صورت که ابتدا کل اسپرم‌ها در هر میلی‌لیتر محاسبه شده سپس تعداد اسپرم‌های دارای حرکت رو به جلو(a+b)، حرکت درجا (c) و بدون حرکت (d) موجود در ۱۰ خانه به طور تصادفی مورد شمارش قرارگرفتند و نتایج حاصل به صورت درصد در فرم مربوط به ثبت اطلاعات نوشته شدند. برای بررسی میزان بقای اسپرم از محلول هیپواسمولار (ترکیبی از محیط کشت T6 و آب مقطر) استفاده شد. به این صورت که مقداری از محلول حاوی اسپرم و محلول هیپواسمولار به نسبت۱ به ۲ در یک دیش ۳۵ میلی‌متری با هم مخلوط شدند. پس از نیم ساعت آنکوباسیون، نمونه‌ها با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. اسپرم های زنده دارای دمی پیچ‌خورده بودند(۱۵).

چگونگی ذوب اپی‌دیدیم منجمد شده: پس از ۴۸ ساعت انجماد، نمونه از تانک نیتروژن خارج و ذوب گردید. برای این کار لوله‌ی اپندورف حاوی نمونه ابتدا به مدت ۲۰ ثانیه در هوای آزمایشگاه و سپس به مدت ۲ دقیقه در آب گرم ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه، محلول انجمادی به کمک یک سمپلر از لوله‌ی اپندورف خارج گردید و عمل شست‌وشو به کمک محلول محیط کشت T6 دارای ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA دو بار صورت گرفت. فاصله‌ی زمانی هر بار شست‌وشو ۲ دقیقه بود تا تعادل بین اسپرم و محلول انجمادی حاصل شود. در پایان با افزودن محیط کشت T6 دارای ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA به اپی‌دیدیم

Archive of SID

www.SID.ir

شست‌وشو داده شده آن را سوزن سوزن نموده و به مدت یک ساعت مورد آنکوباسیون قرارگرفت. سپس اسپرم‌ها را از لحاظ تحرک و زنده بودن مورد ارزیابی قرارگرفتند.

چگونگی ذوب اسپرم منجمد شده: نمونه پس از ۴۸ ساعت انجماد از تانک نیتروژن خارج شده، به مدت ۲۰ ثانیه در دمای آزمایشگاه قرارگرفت سپس به مدت ۲ دقیقه در آب ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. به محلول انجمادی حاوی اسپرم حجمی برابر از محیط کشت T6 دارای ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA افزوده شد و جهت شست‌وشو به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از اتمام عمل سانتریفوژ یک پلاک در ته ظرف تشکیل شد که در ادامه کار محلول روی پلاک برداشته شد و به آن محیط کشت T6 و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA افزوده گردید و به مدت یک ساعت تحت انکوباسیون قرارگرفت. پس از آن اسپرم‌ها از نظر تحرک و بقا ارزیابی شدند.

طرز تهیه محلول انجمادی: به این منظور ۱/۸ گرم رافینوز به همراه ۰/۳ گرم شیرخشک بدون چربی(Skim milk) در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حل شده و با سرعت g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از عمل سانتریفوژ، محلول رویی (Supernatant) برداشته شد و با فیلتر ۴۵ درصد میکرومتری و به کمک پمپ خلا فیلتر گردید. در ادامه محلول انجمادی تهیه شده به صورت Aliquot در لوله‌های اپندورف در دمای ۴- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۶).

محلول هیپواسمولار: از ترکیب محلول T6 و آب مقطر به نسبت ۱ به ۱ جهت تهیه‌ی محلول هیپواسمولار استفاده شد. این محلول جهت بررسی بقای اسپرماتوزواها مورد استفاده قرارگرفت(۱۵،۱۷).

روش آماری: جهت آزمون میانگین گروه‌های مختلف از آزمون آماری آنالیز واریانس(ANOVA) استفاده شد. با توجه به معنی‌دار بودن این آزمون جهت مقایسه‌ی بین گروهی متعاقبا از آزمون توکی (Tukey) استفاده شد.

یافته‌ها

کلیه‌ی اطلاعات لازم در مورد حرکت و بقای اسپرم‌های مورد مطالعه، در جدول شماره۱ آورده شده است. میانگین بقای اسپرم‌ها در گروه کنترل، اسپرم‌های منجمد شده در داخل و خارج اپی‌دیدیم به ترتیب ۱۳/۰۱±۷۸/۷۵، ۷/۰۸±۹/۹۷ و ۷/۸۶±۳۴/۶۷ می‌باشد. آنالیز آماری انجام شده نشان داد که اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های کنترل و خارج اپی‌دیدیم (P=۰/۰۰۰)، میان گروه‌های کنترل و درون اپی‌دیدیم (P=۰/۰۰۰) و میان گروه‌های خارج و داخل اپی‌دیدیم (P=۰/۰۰۰) وجود دارد. میانگین حرکت رو به جلو در سه گروه یاد شده به ترتیب ۱۵/۳۳±۳۰/۲۹، ۳/۵۵±۳/۲۹ و صفر به دست آمد. آنالیز آماری انجام شده نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و خارج اپی‌دیدیم (P=۰/۰۰۰) و کنترل و درون اپی‌دیدیم (P=۰/۰۰۰) وجود دارد. اما میان گروه‌های داخل و خارج اپی‌دیدیم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(P=۰/۳۴۴). تحرک درجای اسپرم‌ها در سه گروه کنترل، خارج و داخل اپی‌دیدیم به‌ترتیب ۱۲/۲۱±۳۴/۷۲، ۱۰/۳۷±۲۱/ ۲۹ و ۴/۹۴±۶/۷۸ محاسبه شد که اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های کنترل و درون اپی‌دیدیم (P=۰/۰۰۰) و گروه‌های داخل و خارج اپی‌دیدیم (P=۰/۰۰۰) وجود داشت. اما اختلاف میان گروه‌های کنترل و خارج اپی‌دیدیم معنی‌دار نبود (P=۰/۰۷۰). میزان اسپرم‌های غیرمتحرک به‌دست آمده در سه گروه فوق به ترتیب برابر ۱۳/۸۷±۳۴/۸۶، ۱۲/۴۵±۶۶/۸۴ و ۵/۰۰±۹۳/۵ محاسبه شد. در این خصوص اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها به صورت دو به دو مشاهده شد(P=۰/۰۰۰).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱: میزان بقا و تحرک اسپرم‌های منجمد ـ ذوب شده در سه گروه مورد مطالعه

گروه‌ها	درصد میزان بقا	درصد تحرک رو به جلو	درصد تحرک درجا	درصد اسپرم‌های غیرمتحرک
گروه کنترل	۷۸/۷۵±۱۳/۰۱	۳۰/۲۹±۱۵/۳۳	۳۴/۷۲±۱۲/۲۱	۳۴/۸۶±۱۳/۸۷
خارج اپی‌دیدیم	۳۴/۶۷±۷/۸۶*	۳/۲۹±۳/۵۵*	۲۹/۲۱±۱۰/۳۷*	۶۶/۸۴±۱۲/۴۵*
داخل اپی‌دیدیم	۹/۹۷±۷/۰۸ **	۰/۰۰۰ ± ۰/۰۰۰ **	۶/۷۸±۴/۹۴ **	۹۳/۵± ۵/۰۰ **

* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می دهد($p<۰/۰۵$).

** اختلاف معنی دار با گروه کنترل و گروه خارج اپی‌دیدیم را نشان می دهد($p<۰/۰۵$).

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پروسه‌ی انجماد هم حرکت و هم بقای اسپرم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و حرکت اسپرم‌های منجمد- ذوب شده را تا حدود ۵۰ درصد کاهش می‌دهد. بعضی از محققان اثبات کرده‌اند که حرکت اسپرم به ویژه اسپرم موش در برابر آسیب ناشی از انجماد و شوک اسمزی، بسیار حساس است(۱۳، ۶). از دست دادن حرکت در اسپرم و یا کاهش آن پس از انجماد- ذوب ممکن است مربوط به تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن در اسپرم باشد. در حالت طبیعی سیستم‌های آنتی‌اکسیدان در اسپرم و احتمالا در غشای آن وجود دارد که موجب پیشگیری از تجمع رادیکال‌های آزاد می‌شود اما از طرفی در جریان انجماد- ذوب بخشی از سیستم‌های آنزیمی که در نرمال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش دارد تخریب می‌شود (۱۸) و این می‌تواند یکی از علت‌های مهم از دست دادن فعالیت‌های اسپرم پس از انجماد- ذوب باشد(۱۹). موحدین و همکارانش(۱۴) در تحقیقات خود مشاهده کردند که انجماد باعث کاهش تعداد اسپرم‌های متحرک با درجه IV می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر نیز مشاهده شد که تعداد اسپرم‌های با حرکت پیشرونده به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد و در عوض تعداد اسپرم‌های غیرمتحرک به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. با توجه به این که مطالعات نشان داده است که در روش‌های انجمادی استاندارد جهت انجماد اسپرماتوزوا از رافینوز ۱۸ درصد به همراه شیرخشک ۳ درصد استفاده می‌شود (۱۳) در این مطالعه نیز از این محلول استفاده شد. نتایجی که در زمینه‌ی بقای اسپرماتوزوا به دست آمد نشان داد که این میزان در گروه منجمد- ذوب شده خارج اپی‌دیدیم نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که این نتیجه با نتایج حاصل از کار برخی محققان مطابقت دارد (۱۳،۱۴) ولی در مقایسه با نتیجه‌ی حاصل از مطالعه صورت گرفته در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد (۲۰) اندکی کاهش را نشان می‌دهد. البته این تفاوت می‌تواند به این دلیل باشد که مطالعه‌ی صورت گرفته در دانشگاه مذکور روی نمونه‌ی انسانی و با محلول انجمادی فروکتوز، گلوکز، نیترات سدیم، گلیسرول و زرده‌ی تخم‌مرغ انجام گرفته و همه‌ی این مواد می‌توانند به عنوان عوامل تأثیرگذار بر نتیجه، مورد توجه واقع شوند. این مطلب در مطالعات گذشته به خوبی مشخص شده است که گونه‌ی سلولی و نوع محلول به طور مؤثری بر کیفیت سلول منجمد - ذوب شده تأثیر دارد(۲۱). در این تحقیق هم چنین مشخص شد که تحرک و بقای اسپرم‌های منجمد- ذوب شده درون اپی‌دیدیم در مقایسه با گروه‌های خارج اپی‌دیدیم و کنترل کاهش چشمگیری را نشان می‌دهد (به استثنای حرکت رو به جلو که در دو گروه درون و بیرون اپی‌دیدیم این تفاوت معنی‌دار نیست). ذکر این نکته ضروری

Archive of SID

www.SID.ir

است که همراهی بافت اپی‌دیدیم با اسپرم در گروه انجمادی درون اپی‌دیدیم پیچیدگی ساختار نمونه را در مقایسه با نمونه‌ی اسپرم به تنهایی زیادتر می‌سازد، زیرا هنگامی که اسپرم مستقیماً و بدون واسطه در تماس با محلول انجمادی قرار می‌گیرد آب و محلول انجمادی در صورت نفوذپذیر بودن آن تنها از یک لایه‌ی غشای سلول اسپرم خواهند گذشت تا به تعادل برسند. اما با قراردادن اپی‌دیدیم در محلول انجمادی، آب و محلول انجمادی برای به تعادل رسیدن نیازمند عبور از چندین غشای سلولی و بافتی می‌باشند و این موضوع باعث می‌شود که به تعادل رسیدن آب و محلول و یا خارج ساختن آب از سلول با مشکل مواجه شود.

نکته‌ی دیگری که باید به آن اشاره کرد این است که شاید یکی از دلایل نتایج به دست آمده در ارتباط با تحرک و بقای اسپرم‌های منجمد ـ ذوب شده درون اپی‌دیدیم، نوع و غلظت محلول انجمادی استفاده شده باشد. غلظت ۱۸ درصد رافینوز و۳ درصد شیرخشک اگر چه به عنوان یک غلظت استاندارد در روش‌های انجمادی به کار گرفته می‌شود اما نباید این نکته را نادیده گرفت که این غلظت‌ها برای انجماد اسپرم در شرایطی است که به تنهایی و بدون واسطه در تماس با عامل انجمادی قرار می‌گیرد، حال این که در مطالعه‌ی انجام شده مداخله دادن بافت اپی‌دیدیم شرایط را کاملاً متفاوت می‌سازد و به نظر می‌رسد برای کارآمد ساختن اثر رافینوز و شیرخشک با توجه به شرایط جدید به غلظت‌ها و زمان بیشتری نیاز است تا امکان خروج آب از سلول فراهم شده و متعاقب آن از تشکیل یخ داخل سلولی به عنوان یک عامل آسیب‌رسان جلوگیری شود. احتمال می‌رود فشار اسمتیک ایجاد شده توسط رافینوز ۱۸درصد و شیرخشک ۳ درصد در شرایطی که اسپرم توسط اپی‌دیدیم احاطه شده به حدی نباشد که بتواند آب درون سلول اسپرم را به بیرون هدایت کند، به این صورت که به هنگام قرارگرفتن بافت اپی‌دیدیم درون محلول انجمادی در ابتدا سلول‌های خود بافت اپی‌دیدیم که در مجاورت نزدیک با محلول هستند تحت تأثیر فشار اسمتیک ایجاد شده آب خود را از دست می‌دهند و به دنبال آن نیاز است تا فشار اسمتیک درون سلول‌های بافت به حدی افزایش یابد تا بتواند سلول‌های درون لومن خود را تحت تأثیر قرار داده و منجر به خروج آب از آن‌ها شود. حال این امکان وجود دارد که چنین وضعیتی بنا به غلظت پایین محلول و یا عدم زمان کافی به‌وجود نیامده است و مقدار زیادی آب در درون سلول اسپرم به دام افتاده که به هنگام عمل انجماد ـ ذوب باعث آسیب به سلول شده است.

نکته‌ی دیگر این‌که وجود بافت اپی‌دیدیم اطراف اسپرم ممکن است به هنگام عمل انجماد ـ ذوب به عنوان عایق عمل نموده و سرعت انجماد ـ ذوب را که بسیار مهم است دچار تغییر ساخته باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد که انجماد اسپرم‌های موش‌سفید آزمایشگاهی به همراهی بافت اپی‌دیدیم کمک چندانی به بهبود کیفیت اسپرم‌های منجمد ـ ذوب شده نکرده باشد بنابراین پیشنهاد می‌شود که در ادامه‌ی این مطالعه، مطالعات بیشتر و گسترده‌تری در مورد روش‌های انجمادی دیگر انواع محلول‌های انجمادی انجام شود.

تقدیر و تشکر

کلیه‌ی هزینه‌های این طرح بر مبنای قرارداد شماره‌ی ۸/۲۰/۱۴۶پ مورخ ۱۳۸۴/۱/۱۷ از بودجه‌ی تحقیقاتی معاونت پژوهشی دانشگاه جندی شاپور تأمین شده است که به این وسیله نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1- Polge C, Smith AU, Parkes AS.Survival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. ***Nature.*** 1949; 69: 626-627.

2- Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. ***Nature.*** 1953; 127: 767-8.

3- Mazur P, Leibo SP, Chu Ehy. A two factor hypothesis of freezing injury. ***EXP Cell Res.*** 1972; 71: 345-355.

4- Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. ***J Reprod Fertil.*** 1998; 112: 11-17.

5- Songasason N, Betteridge KJ, Leibo SP. Birth of live mice resulting from oocytes fertilized in vitro with cryopreserved spermatozoa. ***Biol Reprod.*** 1997; 56: 143-152.

6- An TZ, Lwakiri M, Edashige K, Kasai M. Factors affecting the survival of frozen–thawed mouse spermatozoa. ***Cryobiology.*** 2000; 40: 237-249.

7- Esther EN, Kathleen A, Bayard TS. Water permeability of the mouse sperm plasma membrane and activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. ***Biol Reprod.*** 1987; 31: 234-240.

8- Tao J, Du J, Kleinhans FW. The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa. ***J Reprod Fertil.*** 1995; 104: 231-239.

9- Critser JK, Huse –Benda AR, et al. Cryopreservation of human spermatozoa. I: Effect of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosomal reaction. ***Fertil Steril.*** 1978; 47: 656- 663.

10- Sherman JK. Improved methods of human spermatozoa by freezing and freez-drying. ***Fertil Steril.*** 1963; 14: 49-64.

11- Fahy GM. ***Vitrification in low temperature biotechnology: Emerging application and engineering contributions.*** Mc Grath, JJ and diller KR; Eds 98,1989.

12- Coonel MO, Mcclure N, Lewis SEM. The effect of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. ***Hum Reprod.*** 2002; 17(3): 704-409.

13- Nishizono H, Shioda M, Takeo T, Irie T, Nakagata N. Decrease of fertilizing ability of mouse spermatozoa after freezing and thawing is related to cellular injury. ***Biol Reprod.*** 2004; 71: 973-978.

۱۴- موحدین منصوره، حاتمی لیلا، الطریحی تقی. اثر دو ضدیخ متفاوت بر قدرت بارورسازی اسپرم منجمد- ذوب شده موش. یاخته ۱۳۸۱، شماره۶: صفحات۲۲-۱۷.

۱۵- ابوترابی روشنک، اسفندیاری ابراهیم، نصر اصفهانی محمدحسین، مردانی محمد. یک روش نوین برای بررسی حیات اسپرم با استفاده از MTT . یاخته ۱۳۸۰؛ شماره ۹: صفحات ۲۲-۱۷.

Archive of SID
www.SID.ir

16- Tada N, Sato M, Yamanoi J, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. ***J Reprod Fertil.*** 1990; 89: 511-516.

17- Sallam HN, Farrag A, Agameya AF. The use of a hypo-osmotic swelling test for the selection of viable ejaculated and testicular immotile spermozoa in ICSI. ***Human Reprod.*** 2001; 16: 272-276.

18- Storey BT, Alvarez JG. Peroxidation damage to cryopreserved sperm is consequent to partial inactivation by superoxide dismutase induced by freeze thaw process. ***J Androlol.*** 1992; 3: 18-24.

19- Keel BA. Effects of cryopreservation on motility characteristics of spermatozoa. ***J Reprod Fertil.*** 19981; 81: 213- 220.

۲۰- انوری مرتضی، خلیلی محمد علی، یادگاری صادقو. تأثیر انجماد سریع بر قدرت حرکتی، مورفولوژی و بقای اسپرم. یاخته ۱۳۷۹; شماره ۸: صفحات ۱۹۵-۱۹۱.

21- Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends. ***Anim Reprod Sci.*** 2002; 60(61): 349-355.

Archive of SID

www.SID.ir