Original Article

Determination of the Detrimental Effects of Cryopreservation Process on Sperm Functional and Molecular Parameters in Infertile Men with Asthenoteratozoospermia

Elham Asa[1], *Rahim Ahmadi*[1*], *Minoo Mahmoodi*[1], *Abdolreza Mohammadniya*[2,3]

[1]*Department of Biology, School of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran.*

[2]*Department of Biotechnology, School of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[3]*Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Rahim Ahmadi;
Department of Biology, School of Basic Sciences, Hamadan Branch, Islamic Azad University, Hamadan, Iran.

Email:
drrahahmadi@yahoo.com,
rahahmadi2001@yahoo.com

Received: 12 Apr, 2020
Accepted: 6 Jun, 2020

Abstract

Background and Objectives: Cryopreservation of sperm is a widely used technique to maintain and protect fertility men in certain conditions, such as infertility and malignancy treatments. The aim of this study was to determine the effects of cryopreservation on sperm functional and molecular parameters in infertile men with asthenoteratozoospermia.

Methods: According to previous studies in this field, semen samples were collected from 20 people with asthenoteratozoospermia. A part of sample was first examined as a fresh sample before rapid freezing. In the following, the samples were freezed using rapid freezing protocol for 14 days in liquid nitrogen and then were thawed, and finally, the functional parameters were analyzed by sperm analysis method and DNA fragmentation was assessed using TUNEL test. Viability percentage was evaluated by eosin-nigrosin staining. Data were analyzed using paired t-test.

Results: Cryopreservation led to significant decrease in sperm motility, viability, concentration, and normal morphology ($p < 0.001$). DNA damage significantly increased during cryopreservation ($p < 0.01$).

Conclusion: Common cryopreservation process has detrimental effects on human sperm functional and molecular parameters and can reduce fertility potential.

Keywords: Cryopreservation; Asthenoteratozoospermia; Semen analysis; DNA fragmentation.

DOI: 10.29252/qums.14.3.64

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهاردهم، شماره سوم، خرداد ۹۹
صفحه ٦٤ الی ۷۳

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی اثرات آسیب‌زای فرایند انجماد بر ویژگی‌های عملکردی و مولکولی اسپرم مردان نابارور دچار آستنوتراتوزواسپرمیا

الهام آسا[۱]، دکتر رحیم احمدی[۱*]، دکتر مینو محمودی[۱]، دکتر عبدالرضا محمدنیا[۲]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران.

[۲]گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده ی فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[۳]مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی- پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
رحیم احمدی؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
drrahahmadi@yahoo.com,
rahahmadi2001@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: انجماد اسپرم یک روش پرکاربرد برای نگهداری و حفظ باروری مردان در شرایط خاص مانند درمان ناباروری و بدخیمی می‌باشد. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات انجماد بر پارامترهای حیاتی و مولکولی اسپرم در مردان نابارور مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمیا انجام شد.

روش بررسی: با توجه به مطالعات پیشین در این زمینه، مایع منی ۲۰ فرد مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمیا جمع‌آوری شد. بخشی از هر نمونه ابتدا به عنوان نمونه تازه مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. در ادامه به منظور بررسی اثرات انجماد، هر نمونه به روش سریع منجمد شد و به مدت ۱۴ روز در نیتروژن مایع ذخیره گردید. در ادامه نمونه‌ها ذوب گردیدند و در نهایت پارامترهای عملکردی با استفاده از روش آنالیز اسپرم و میزان شکست DNA (Deoxyribonucleic acid) از طریق آزمون تانل بررسی شد. درصد زنده‌مانی نیز با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین سنجیده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری t زوجی تجزیه و تحلیل گردیدند.

یافته‌ها: فرایند انجماد سبب کاهش معنادار درصد حرکت، زنده‌مانی، غلظت و مورفولوژی طبیعی نمونه‌های اسپرم بیماران مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمیا گردید ($P<۰/۰۰۱$). بر مبنای نتایج، میزان شکست DNA طی فرایند انجماد افزایش معناداری یافت ($P<۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: فرایند مرسوم انجماد اثرات مخربی بر ویژگی‌های عملکردی و مولکولی اسپرم انسان دارد و می‌تواند موجب کاهش پتانسیل باروری گردد.

کلیدواژه‌ها: انجماد اسپرم؛ آستنوتراتوزواسپرمیا؛ آنالیز سمن؛ شکست DNA.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Asa E, Ahmadi R, Mahmoodi M, Mohammadniya A. Determination of the Detrimental Effects of Cryopreservation Process on Sperm Functional and Molecular Parameters in Infertile Men with Asthenoteratozoospermia. Qom Univ Med Sci J 2020;14(3):64-73. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مقدمه

در سال‌های اخیر در پی پیشرفت در روش‌های کمک باروری و دستکاری سلولی، درمان‌های ناباروری در حال پیشرفت چشمگیر می‌باشد. امروزه مردان الیگواسپرمیا و حتی آزواسپرمیا نیز از امکان بچه‌دار شدن برخوردار هستند؛ حتی اگر تنها یک اسپرم از آن‌ها به دست بیاید.

انجماد اسپرم و بافت بیضه، قدرت باروری مردان را صرف نظر از اتیولوژی ناباروری، برای سال‌ها حفظ می‌کند (۱). به طور کلی، محیط‌های فریز اسپرم شامل: مواد محافظ، منابع انرژی، پروتئینی، مواد یونی و غیر یونی جهت حفظ PH و فشار اسمزی محیط و سایر مواد افزودنی مانند اسیدهای چرب و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. گلیسرول غالباً به عنوان یک ماده محافظ قابل نفوذ به اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ هرچند ممکن است اثرات سمی بر غشای پلاسمایی و متابولیسم اسپرم منجمد و ذوب شده داشته باشد (۱).

در فرایند انجماد، کیفیت و قدرت باروری اسپرم فریز و ذوب شده کاهش می‌یابد (۲). در این فرایند، منی با شوک سرمایی و اکسیژن جوی مواجه می‌شود. نمونه‌ها در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد در نیتروژن مایع نگهداری می‌شوند. در این دما عملکرد بیولوژیک سلول متوقف شده و محتوای آب سلول در فرایند فریز و ذوب دستخوش تغییر می‌شود. از آنجایی که اسپرم در انتهای تمایز، مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد، در مقابل عوامل مختلف اکسیدکننده و پراکسیداسیون لیپید غشا حساس‌تر می‌باشد. پراکسیداسیون لیپیدی در واکنش‌های آنزیمی و نیز توسط اسپرم در فرایند انجماد ایجاد شده و ساختار غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳). به دلیل تمایل زیاد عوامل اکسیدکننده به واکنش با مولکول‌های دیگر می‌تواند تغییراتی را در ساختار و عملکرد سلول اسپرم پدید آورد (۴) که این امر منجر به آسیب‌پذیری اسپرم و تغییرات مخرب در عملکردها و ساختار مولکولی اسپرم به ویژه DNA می‌گردد. این امر به نوبه خود می‌تواند باعث کاهش تحرک اسپرم گردد. همچنین انجماد ممکن است تغییراتی را در ساختار کربوهیدراتی غشای اسپرم ایجاد کند و عملکرد فیزیولوژیکی اسپرم از جمله میزان ظرفیت‌پذیری، واکنش آکروزومی و نفوذپذیری اسپرم را دستخوش تغییر قرار دهد (۵).

انجماد اسپرم می‌تواند تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش دهد و بر ساختار DNA تأثیرگذار باشد (۶). در مطالعات پیشین بیان شده است که یکپارچگی ساختار کروماتین پستانداران یکی از پارامترهای حیاتی اسپرم برای به اشتراک گذاشتن ژنتیک پدری در تکوین جنین و نسل سالم می‌باشد. انجماد و استرس اکسیداتیو می‌تواند با تأثیر بر کروماتین بر ناباروری مردان اثرگذار باشد؛ بنابراین، ارزیابی کروماتین پس از فرایند فریز و ذوب برای اطمینان از موفقیت روش انجماد بسیار اهمیت دارد (۹-۷).

با توجه به شیوع قابل توجه ناباروری در ایران و سایر نقاط جهان و نیز نظر به عواقب قابل توجه و مخرب اجتماعی و روانی حاصل از ناباروری برای خانواده‌ها، ضرورت انجام فرایند انجماد اسپرم و بافت بیضه در روش‌های نوین کمک باروری و حفظ پتانسیل باروری در افراد با روند کاهشی تعداد اسپرم، افراد تحت شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و یا افراد تحت اعمال جراحی خاص و همچنین با توجه به مطالعات محدود در زمینه اثرات فرایندهای مرسوم انجماد و ذوب مورد استفاده در مراکز ناباروری کشور بر ویژگی‌های اسپرم به ویژه در نمونه‌های اسپرم مردان مبتلا آستنوتراتوزواسپرمیا و نیز از آنجایی که این گروه از افراد نابارور، تعداد بسیاری از مراجعه‌کنندگان به مراکز درمان ناباروری را تشکیل می‌دهند، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات مخرب فرایند انجماد و ذوب همچون رادیکال‌های آزاد بر پارامترهای عملکردی و میزان سلامت کروماتین (شکست DNA) در نمونه‌های اسپرم مردان نابارور مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمیا انجام شد.

روش بررسی

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی- آزمایشگاهی می‌باشد که در کمیته اخلاق دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد همدان با شماره ۱۳۹۸/۵/۱۶۶۳ مورد تأیید قرار گرفته است. در این پژوهش با رعایت موازین اخلاقی و حفظ اسرار بیماران و با توجه به مطالعات پیشین، مایع منی ۲۰ مرد با مشخصات آستنوتراتوزواسپرمیا (میزان حرکت کلی کمتر از ۴۰ درصد، حرکت پیشرونده کمتر از ۳۲ درصد و نرمال مورفولوژی کمتر از ۴ درصد) و رده سنی ۲۰ تا ۴۰ سال مراجعه‌کننده به مرکز درمان

International License Creative Commons Attribution License 4.0

ناباروری جهاد دانشگاهی قم در فاصله زمانی شهریور تا اسفند سال ۱۳۹۸ پس از سه تا چهار روز خودداری از مقاربت و با رضایت کامل در مورد انجام آزمایشات تجربی در ظروف استریل جمع‌آوری گردید. مردان نابارور آستنوتراتواسپرمیا مبتلا به عفونت‌های دستگاه تناسلی، واریکوسل، لکواسپرمیا، هیدروسل، دیابت ملیتوس، چاقی و اختلالات هورمون‌های جنسی از مطالعه خارج شدند.

پس از اخذ نمونه، به منظور مایع شدن، نمونه‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از مایع شدن نمونه، پارامترهای اسپرمی از نظر تعداد، حرکت پیش‌رونده و غیر پیش‌رونده، میزان زنده‌مانی و مورفولوژی براساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت بررسی و ثبت گردید. میزان شکست DNA نیز سنجیده شد. از سوی دیگر بر مبنای مطالعات پیشین (۹)، نمونه‌ها با روش فریز سریع منجمد شدند و به مدت ۱۴ روز در نیتروژن مایع با دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. برای بررسی تأثیر فریز بر نمونه‌ها، مجدداً ذوب شده و آنالیز گردیدند.

به منظور بررسی اسپرموگرام بیماران از پروتکل‌های جهانی WHO (*World Health Organization*) (۲۰۱۰) استفاده شد (۱۰). همچنین برای سنجش میزان حرکت از میکروسکوپ نوری (Nikon) مجهز به نرم‌افزار (CASA-LABOMED ،SDC313B ،Germany) بهره گرفته شد. بدین‌منظور، ۱۰ میکرولیتر از نمونه روی لام تمیز و عاری از چربی قرار داده شد و با لامل پوشیده گردید و با بزرگنمایی ۴۰X مورد بررسی قرار گرفت و میزان حرکت براساس حرکت پیش‌رونده، غیر پیش‌رونده و کاملاً فاقد حرکت دسته‌بندی و گزارش گردید. مورفولوژی اسپرم‌ها نیز بر مبنای تحقیقات پیشین با روش رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو بررسی شد. در این مرحله ۲۰۰ اسپرم مورد بررسی قرار گرفت و درصد اسپرم‌های نرمال و غیر نرمال و نیز درصد انواع ناهنجاری‌ها بررسی و ثبت گردید. شایان ذکر است که تعداد اسپرم‌ها با استفاده از لام نئوبار (Rohem ،India) بررسی گردید و بر حسب میلیون بر میلی‌لیتر بیان شد.

میزان زنده‌مانی اسپرم براساس پروتکل تک مرحله‌ای رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین (هوشمند فناور تهران، ایران) سنجیده شد. ابتدا دو قطره از رنگ ائوزین ۱ درصد با یک قطره از نمونه منی مخلوط گردید و پس از گذشت ۳۰ ثانیه، سه قطره از نگروزین ۱۰ درصد به نمونه اضافه شد. سپس روی لامی تمیز و عاری از چربی، ۱۰ میکرولیتر از مخلوط آماده شده قرار داده شد و اسمیر تهیه گشت. سپس لام آماده شده با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شد. برای هر نمونه ۲۰۰ اسپرم شمارش گردید و اسپرم‌های با رنگ سفید یا بدون رنگ، زنده در نظر گرفته شدند و اسپرم‌های با رنگ صورتی تا قرمز، اسپرم‌های مرده محسوب گردیدند (۱۱).

در این مطالعه فریز اسپرم براساس پروتکل فریز سریع انجام شد (۱۲). فریز اسپرم به وسیله محیط فریز اسپرم انسانی (Life global-Belgium) صورت گرفت.

در این راستا پس از مایع شدن منی، نمونه‌ها در کرایو ویال (Greiner bio-one ،Germany) ریخته شدند و محیط فریز اسپرم به آرامی و قطره قطره به نمونه اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق باقی ماند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه روی بخار نیتروژن با فاصله تقریبی ۱۵-۱۰ سانتی‌متر از سطح نیتروژن مایع با دمای تقریبی ۱۸۰- درجه سانتی‌گراد به صورت افقی قرار گرفت. پس از این مدت در نیتروژن مایع غوطه‌ور شد و به مدت ۱۴ روز در تانک مخصوص حاوی نیتروژن مایع ذخیره گردید. پس از سپری شدن این زمان به منظور فرایند ذوب نمونه‌ها از تانک خارج شده، به مدت ۲-۱ دقیقه در دمای محیط و به مدت ۳۰ ثانیه در بن ماری با دمای تقریبی ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بلافاصله پس از این مرحله، به منظور حذف مواد محافظ اسپرم و محیط فریز، هر نمونه اسپرم دو بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه با محیط شستشوی اسپرم (ویتا اسپرم- ایران) سانتریفیوژ (Hettich ،Germany) گردید. در ادامه، محیط رویی خارج شده و رسوب باقیمانده با محیط شستشو رقیق شد. تمام نمونه‌ها از نظر پارامترهای اسپرم مانند قبل از فریز آنالیز گردیدند. نتایج قبل از انجماد و پس از ذوب به لحاظ آماری مورد بررسی قرار گرفتند.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

در ادامه جهت بررسی آسیب وارد شده به DNA از آزمون TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling) و کیت (Germany، Mannheim، Roche) استفاده شد (۱۳). در این مرحله میزان آسیب به DNA در ۲۰ نمونه اسپرم آستنوتراتوزواسپرمیا، قبل و بعد از فریز سنجیده شد. به طور کلی قبل و بعد از فرایند انجماد، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه شسته شده با بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) روی لام تمیز و عاری از چربی گسترش تهیه شد و پس از خشک شدن با فرمالدهید ۴ درصد بدون متانول فیکس گردید و به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس با محلول PBS شستشو داده شد و محلول نفوذپذیر (۰/۱ درصد تریتون X100 در ۰/۱ درصد سدیم سیترات) به آن اضافه گردید. پس از ۱۰ دقیقه قرار گرفتن در دمای اتاق، دو بار با PBS شستشو داده شد. سپس اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از ترکیب واکنشگر فعال به هر لام در تاریکی و انکوباسیون لام‌ها در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در انتها، دو بار شستشو با PBS و اضافه کردن فسفاتیدیل اینوزیتول (PI: *Phosphatidylinositol*) انجام شد. براساس این روش، رنگ فلورسنت با استفاده از آنزیم TdT به انتهای OH– از 3'DNA (قطعات شکسته DNA) اتصال می‌یابد. رنگ فلورسنت مشاهده شده در هر اسپرم نشان‌دهنده شکستگی در رشته یا رشته‌های DNA می‌باشد. در این مطالعه ۲۰۰ اسپرم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Japan، Tokyo، BX51) شمارش گردید. اسپرم‌های با سر قرمز رنگ به عنوان اسپرم‌های سالم و اسپرم‌های با سر سبز به عنوان اسپرم‌های دارای شکست DNA در نظر گرفته شدند.

در نهایت، به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری t زوجی تجزیه و تحلیل گردیدند. اختلاف آماری در سطح (α<۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین سنی افراد شرکت‌کننده در این مطالعه ۳۴/۷±۴/۲۷ سال و مدت زمان ناباروری ۲/۸±۱/۲ سال بود و میانگین حجم سمن ۲/۸±۰/۹ میلی‌لیتر محاسبه شد. آنالیز آماری نشان داد که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار هستند. در این مطالعه بررسی اثر آسیب‌زای انجماد بر پارامترهای عملکردی و مولکولی اسپرم افراد نابارور آستنوتراتوزواسپرمیا با استفاده از روش‌های آنالیز اسپرم، رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین و آزمون تانل انجام شد تا بدین‌وسیله میزان آسیب اسپرم در فرایند انجماد مورد ارزیابی قرار گیرد.

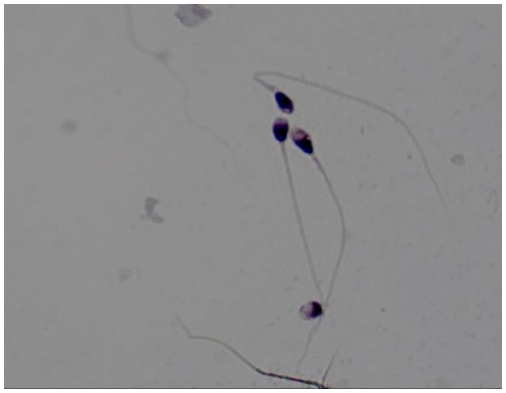
نتایج نشان دادند که فرایند انجماد- ذوب در نمونه‌های اسپرم گرفته شده از مردان مبتلا به آستنوتراتوزواسپرمیا موجب کاهش معنادار میانگین کل تحرک اسپرم شده است. بر مبنای نتایج، فرایند انجماد اسپرم بر غلظت آن اثرگذار بوده و به شکل معناداری موجب کاهش تعداد اسپرم در حجم شده است. از سوی دیگر، فرایند انجماد باعث کاهش معنادار درصد قابلیت زنده ماندن اسپرم در مردان آستنوتراتوزواسپرمیا گردیده است. باید خاطرنشان ساخت که درصد نرمال مورفولوژی اسپرم در فرایند انجماد دستخوش تغییر شده و به طور معناداری کاهش می‌یابد (جدول ۱ و شکل ۱).

جدول شماره ۱: پارامترهای اسپرم افراد آستنوتراتوزواسپرمیا قبل و بعد از فرایند انجماد

آنالیز	قبل از فریز و ذوب	بعد از فریز و ذوب	سطح معناداری
میزان حرکت (درصد)	۳۴/۷±۰/۹	۱۵/۹±۱/۹	P<۰/۰۰۱
حرکت پیش‌رونده (درصد)	۱۲/۸±۱/۴	۴/۱±۰/۸	P<۰/۰۰۱
میزان زنده‌مانی (درصد)	۵۸/۶±۳/۰	۲۱/۲±۲/۹	P<۰/۰۰۱
غلظت (میلیون/میلی‌لیتر)	۶۱/۹±۶/۵	۲۶/۵±۴/۷	P<۰/۰۰۱
نرمال مورفولوژی	۲±۰/۱	۰/۸±۰/۱	P<۰/۰۰۱
پیچ‌خوردگی دم	۸/۳±۰/۶	۱۶/۷±۱/۳	P<۰/۰۰۱

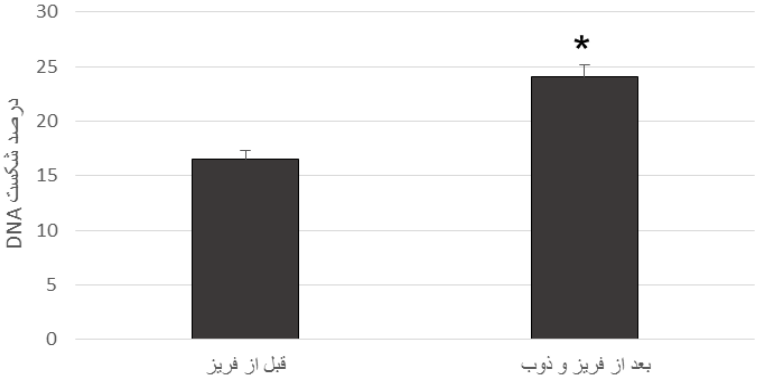
***داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده‌اند.**

International License Creative Commons Attribution License 4.0

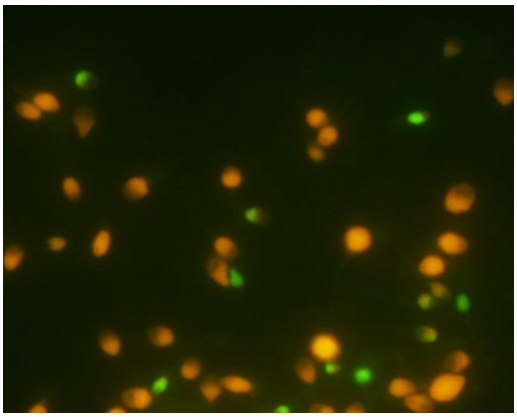


شکل شماره ۱: الف (سمت راست): رنگ‌آمیزی ائوزین- نگروزین جهت بررسی میزان زنده‌مانی اسپرم: اسپرم‌های با سر سفید، اسپرم‌های زنده و اسپرم‌های با سر قرمز، اسپرم‌های غیر زنده می‌باشند؛ ب (سمت چپ): رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو به منظور بررسی مورفولوژی و ناهنجاری‌های اسپرم که توسط میکروسکوپ نوری انجام شده است

در این مطالعه میانگین درصد تکه تکه شدن DNA پس از فرایند انجماد- ذوب افزایش معناداری پیدا کرد (نمودار ۱ و شکل ۲).



نمودار شماره ۱: مقایسه درصد شکست DNA قبل و بعد از فرایند فریز و ذوب در اسپرم آستنوتراتواسپرمیای انسان (N=۲۰).
***نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین دو گروه است (P<۰/۰۱).**



شکل شماره ۲: آزمون TUNEL برای بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA در اسپرم. اسپرم‌های با سر قرمز دارای DNA سالم و اسپرم‌های با سر سبز دارای DNA آسیب‌دیده بودند که به وسیله میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

بحث

امروزه انجماد اسپرم انسان بخشی از فرایند درمان ناباروری است. هرچند طی انجماد، تنش‌های شیمیایی و فیزیکی منجر به تغییراتی در ترکیبات لیپیدی، زنده‌مانی اسپرم، تحرک، سلامت آکروزوم و شکست DNA می‌شود. تمام این تغییرات پتانسیل باروری مردان را کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد چند فاکتور در میزان آسیب‌های وارد شده به اسپرم نقش دارد. در این راستا، برخی از مطالعات آسیب فیزیکی مستقیم به ساختار یا عملکرد اسپرم را گزارش کرده‌اند که مربوط به تشکیل یخ و فشار اسمزی بالا در طول فرایند انجماد می‌باشد (۱۴). شوک سرما در طول انجماد اسپرم با استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های اکسیژن فعال مرتبط می‌باشد. اثرات تخریبی استرس اکسیداتیو از طریق حمله عوامل اکسید کننده به گروه‌های متیلن فسفولیپیدهای غشای اسپرم اعمال می‌شود. یافته‌ها حاکی از آن هستند که پس از انجماد، تحرک و زنده ماندن اسپرم در حدود ۲۵ تا ۷۵ درصد کاهش می‌یابد (۱۵). از سوی دیگر، تولید رادیکال آزاد می‌تواند منجر به تکه تکه شدن DNA و آپاپتوز شود. اسپرم‌های منجمد شده از طول عمر کوتاه‌تر و باروری کمتر نسبت به اسپرم‌های تازه برخوردار هستند. این مهم می‌تواند ناشی از تفاوت زیاد در تولید O^{2-} و H_2O_2 و یا افزایش غلظت یون‌های کلسیم آزاد Ca^{2+} درون سلولی باشد (۱۶). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان دادند که میزان زنده‌مانی اسپرم‌های تازه به طور معناداری بالاتر از گروه اسپرم فریز و ذوب شده است که این امر می‌تواند نشان‌دهنده اثر منفی فرایند انجماد بر اسپرم انسان باشد. کاهش درصد زنده‌مانی طی فرایند انجماد می‌تواند ناشی از در معرض قرار گرفتن غشای اسپرم با تغییرات اسمزی و شیمیایی ناشی از فرایند انجماد باشد. گلیسرول استفاده شده در محیط‌های فریز نیز می‌تواند اثر سمی بر اسپرم داشته باشد (۱۷). تحرک در اسپرم یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های اسپرم برای لقاح و باروری می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که انجماد تأثیر منفی بر حرکت اسپرم انسان دارد؛ به طوری که به شکل معناداری حرکت اسپرم را پس از فریز و ذوب کاهش می‌دهد که این نتایج همراستا با نتایج دیگر مطالعات انجام شده می‌باشد. تحرک در اسپرم یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های اسپرم برای لقاح و باروری است.

نتایج مطالعات صورت‌گرفته نشان داده‌اند که مواجهه با غلظت بالای عوامل استرس اکسیداتیو منجر به اختلال در ساختار میتوکندری و غشای پلاسمایی و در نهایت منجر به تکه تکه شدن DNA و شکست کروموزومی می‌شود. همچنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو بیشتر بر قسمت میانی دم اثرگذار است؛ در نتیجه ایجاد نقص در میتوکندری و پراکسیداسیون لیپیدی در غشا متعاقباً موجب کاهش میزان حرکت اسپرم و مورفولوژی در پروسه انجماد می‌گردد (۱۹،۱۸). نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که مورفولوژی نرمال طی فرایند اسپرم به طور معناداری کاهش می‌یابد؛ که این مهم با نتایج مطالعات Ozkavukcu و تولایی و سعیدنیا همراستا می‌باشد. علاوه‌براین، انجماد موجب افزایش درصد پیچ‌خوردگی در دم اسپرم شده و سر اسپرم را به صورت دوکی شکل درمی‌آورد. این امر می‌تواند به دلیل آسیب به ساختار لیپیدی غشا به دنبال تغییرات اسمزی در انجماد باشد (۲۰،۲،۱). یافته‌های میکروسکوپ الکترونی اثبات کرده‌اند که درصد اسپرم‌های با مورفولوژی نرمال در فرایند انجماد کاهش یافته و میزان ناهنجاری در دم اسپرم افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند اثر منفی بر لقاح و تکوین جنین داشته باشد (۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که میزان تکه تکه شدن DNA در حین انجماد دچار افزایش می‌شود. در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است که DNA اسپرم افراد نابارور طی فرایند انجماد- ذوب دچار آسیب می‌گردد (۲۱). در این راستا، مطالعات نشان داده‌اند که میزان آسیب‌پذیری اسپرم افراد نابارور در فرایند انجماد به طور معناداری بیشتر از افراد بارور می‌باشد (۲۲). مکانیسم درگیر در اتیولوژی آسیب DNA ناشی از انجماد تاکنون به طور کامل مشخص نشده است. برخی از مطالعات افزایش کاسپازهای فعال پس از انجماد در اسپرم را گزارش نموده و برخی دیگر افزایش آسیب اکسیداتیو DNA را نشان می‌دهند (۲۳). برخی از محققان گزارش کرده‌اند که فرایند فریز منجر به تغییر در ساختار کروماتین می‌شود (در اصطلاح به تراکم بیش از حد کروماتین گفته می‌شود) (۲۴). این تراکم بیش از حد به افزایش باندهای دی‌سولفید نسبت داده شده و می‌تواند یک خطر بالقوه برای کاهش باز شدن هسته در هنگام تزریق اسپرم به داخل تخمک و

International License Creative Commons Attribution License 4.0

کاهش لقاح باشد (۲۵). شکست DNA می‌تواند ناشی از حمله رادیکال‌های آزاد به رشته‌های DNA، باندهای دی‌سولفیدی و یا القای آپاپتوز و فعال شدن فاکتورهای آپاپتوزی باشد (۲۶). مطالعات اولیه نشان داده‌اند که طی فرایند فریز، میزان H_2O_2 داخل سلولی به شکل معناداری نسبت به اسپرم‌های تازه افزایش می‌یابد. پراکسید هیدروژن مهم‌ترین رادیکال آزادی است که منجر به کاهش تحرک اسپرم و در نهایت کاهش لقاح می‌شود (۲۷). موقعیت‌های مختلف بیولوژیکی در اسپرم انسانی منجر به آسیب DNA می‌شوند که این مهم می‌تواند ناشی از القای آبشار آپاپتوز باشد. از سوی دیگر تغییر در نفوذپذیری، یکپارچگی و تقارن غشای پلاسما مربوط به القای آپاپتوز است. آپاپتوز اسپرم پس از انجماد به دلیل استرس اکسیداتیو و ایجاد گونه‌های اکسیژن فعال رخ می‌دهد و ممکن است منجر به کاهش طول عمر اسپرم‌های بازمانده شود (۲۹،۲۸). فرایند انجماد با افزایش غلظت Ca^{2+} داخل سلولی منجر به آزادسازی فاکتورهای آپوپتوز در سیتوپلاسم می‌شود (۳۰). با توجه به کاهش معنادار پارامترهای عملکردی و تغییرات منفی ساختاری کروماتین متعاقب فرایند انجماد- ذوب که بخش عمده‌ای از آن ناشی از اثرات اکسیداتیو این فرایند است، یک راهکار برای کاهش اثرات منفی انجماد بر اسپرم و جبران نقص آنتی‌اکسیدانی سیتوپلاسم اسپرم و اضافه کردن مواد محافظ مانند آنتی‌اکسیدان‌های مناسب به محیط فریز می‌باشد (که محققان در پژوهش حاضر در حال انجام آن می‌باشند). روش‌های جدید فریز اسپرم نیز ممکن است به کاهش تأثیرات منفی انجماد کمک کند.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر به روشنی نشان دادند که فرایند انجماد، اثرات منفی بر پارامترهای مهم و حیاتی اسپرم داشته و باعث کاهش میزان زنده ماندن، تحرک، مورفولوژی نرمال و غلظت اسپرم‌ها می‌شود و میزان شکست DNA را در اسپرم‌های آستنوتراتوزواسپرمیا افزایش می‌دهد. این آسیب‌ها می‌تواند ناشی از رادیکال‌های آزاد، تغییرات اسمزی، تشکیل یخ داخل سلول، نقص آنتی‌اکسیدانی و القای آپوپتوز باشد. از سوی دیگر، انجماد می‌تواند پتانسیل باروری اسپرم را در افراد آستنوتراتوزواسپرمیا کاهش دهد؛ از این رو پیشنهاد می‌شود جهت غلبه بر این مشکل و بهبود نتایج روش‌های کمک باروری، محیط‌های فریز و یا ذوب اسپرم با استفاده از مواد بیولوژیک و محافظ مانند آنتی‌اکسیدان‌های مناسب غنی گردد. روش‌های نوین در فرایند انجماد اسپرم که همچنان در فاز تحقیقاتی می‌باشند نیز می‌توانند امیدبخش آسیب‌های کمتر به اسپرم‌های منجمد و ذوب شده باشند. به منظور شناسایی کامل‌تر تأثیرات استرس سرمایی، مطالعات بیشتری در زمینه مولکولی و انجام آزمون‌های اختصاصی‌تر مورد نیاز است که می‌توان این مهم را از محدودیت‌های پژوهش حاضر قلمداد کرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با حمایت معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی همدان انجام شده است. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از کارکنان محترم IVF مرکز تحقیقات ناباروری ACECR شهرستان قم اعلام می‌نمایند.

References:

1. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. J Assist Reprod Genet 2008;25(8):403-11. PMID: 18704674

2. Saeednia S, Bahadoran H, Amidi F, Asadi MH. Impact of cryopreservation process on viability, nitric oxide and dna apoptosis in fertile human spermatozoa. Anatom Sci J 2013;10(4):17-23. Link

3. Koppers AJ, De Iuliis GN, Finnie JM, McLaughlin EA, Aitken RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. J Clin Endocrinol Metab 2008;93(8):3199-207. PMID: 18492763

International License Creative Commons Attribution License 4.0

4. Bansal AK, Bilaspuri G. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int 2011;2011:386137. PMID: 20871827

5. Saeednia S, Amidi F, Aleyasin A, Naji M. Impact of sperm cryopreservation on semen parameters in asthenozoospermic men. Int J Health Stud 2015;1(2):21-5. Link

6. García-Macías V, De Paz P, Martinez-Pastor F, Álvarez M, Gomes-Alves S, Bernardo J, et al. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm–Bos–Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. Int J Androl 2007;30(2):88-98. PMID: 17166172

7. Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L, McKerlie C. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. Reproduction 2007;133(3):585-95. PMID: 17379653

8. Karabulut S, Demiroğlu-Zergeroğlu A, Yılmaz E, Kutlu P, Keskin İ. Effects of human sperm cryopreservation on apoptotic markers in normozoospermic and non-normozoospermic patients. Zygote 2018;26(4):308-13. PMID: 30220260

9. Tavalaee M, Torki BB, Azadi L, Nasr EM. Human sperm cryopreservation update in treatment of infertility: a review study. J Cell Tissue 2018;8(4):332-53. Link

10. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker H, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010;16(3):231-45. PMID: 19934213

11. Björndahl L, Söderlund I, Kvist U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Hum Reprod 2003;18(4):813-6. PMID: 12660276

12. Sherman JK. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. Fertil Steril 1973;24(5):397-412. PMID: 4735423

13. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaee M, Deemeh M, Mardani M, Moshtaghian J, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. Hum Reprod 2009;24(10):2409-16. PMID: 19553239

14. Taher-Mofrad SMJ, Topraggaleh TR, Ziarati N, Bucak MN, Nouri M, Seifi S, et al. Knockout serum replacement is an efficient serum substitute for cryopreservation of human spermatozoa. Cryobiology 2020;92:208-14. PMID: 32004575

15. Nabi A, Khalili MA, Talebi AR, Mangoli E, Yari N, Nottola SA, et al. In-vitro application of pentoxifylline preserved ultrastructure of spermatozoa after vitrification in asthenozoospermic patients. Urol J 2017;14(4):4038-43. PMID: 28670673

16. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. Fertil Steril 2004;82(4):913-8. PMID: 15482768

17. Mocé E, Fajardo AJ, Graham JK. Human sperm cryopreservation. EMJ 2016;1(1):86-91. Link

18. Lampiao F, Du Plessis SS. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. Asian J Androl 2008;10(5):799-807. PMID: 18645684

19. Seify M, Zarabadipour M, Ghaleno LR, Alizadeh A, Valojerdi MR. The anti-oxidant roles of Taurine and Hypotaurine on acrosome integrity, HBA and HSPA2 of the human sperm during vitrification and post warming in two different temperature. Cryobiology 2019;90:89-95. PMID: 31330124

20. O'connell M, McClure N, Lewis S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod 2002;17(3):704-9. PMID: 11870124

21. Roque M, Esteves SC. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. Int Urol Nephrol 2018;50(4):583-603. PMID: 29542060

International License Creative Commons Attribution License 4.0

22. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. Adv Urol 2012;2012:854837. PMID: 22194740

23. Raad G, Lteif L, Lahoud R, Azoury J, Azoury J, Tanios J, et al. Cryopreservation media differentially affect sperm motility, morphology and DNA integrity. Andrology 2018;6(6):836-45. PMID: 30105872

24. Li MW, Lloyd KC. DNA fragmentation index (DFI) as a measure of sperm quality and fertility in mice. Sci Rep 2020;10(1):3833. PMID: 32123279

25. Erenpreiss J, Zubkova K. Cytochemical tests of sperm chromatin maturity. a clinician's guide to sperm DNA and chromatin damage. Berlin, Germany: Springer; 2018. P. 153-62. Link

26. John Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. Cryobiology 2012;64(2):71-80. PMID: 22197768

27. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. Reprod Biol Endocrinol 2005;3(1):67. PMID: 16313680

28. Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. Reprod Biomed Online 2009;18(2):184-9. PMID: 19192337

29. Majzoub A, Agarwal A. Antioxidants in sperm cryopreservation. Male infertility. Berlin, Germany: Springer; 2020. P. 671-8. Link

30. Dalal J, Kumar A, Honparkhe M, Deka D, Singh N. Minimization of apoptosis-like changes in cryopreserved buffalo bull sperm by supplementing extender with Bcl-2 protein. Vet World 2016;9(5):432-6. PMID: 27284216

International License Creative Commons Attribution License 4.0