اثرهای دو ضدیخ مختلف بر قدرت بارورسازی اسپرم منجمد - ذوب شده موش

منصوره موحدین Ph.D.☆♦، لیلی حاتمی M..Sc.☆، تقی الطریحی Ph.D.☆

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

چکیده

* **هدف:** بررسی اثرهای دو ضدیخ مختلف بر زنده ماندن، حرکت، مورفولوژی و قدرت بارورسازی اسپرم موش پس از انجماد - ذوب

* **مواد و روشها:** اسپرمها از بخش دم اپی دیدیم موشهای نژاد NMRI با سن ۱۰-۸ هفته تهیه و به گروههای شاهد و آزمون ۱ و ۲ تقسیم شدند. ضدیخ گروه آزمون ۱ شامل (w/v) ۱۸ درصد رافینوز و (w/v) ۳ درصد شیر خشک در آب مقطر، ضدیخ آزمون ۲ (v/v) ۷ درصد گلیسرول، (w/v) ۱ درصد گلوکز و (v/v) ۲۵ درصد زردهٔ تخم‌مرغ در PBS بود، ضدیخ مورد نظر در هر گروه به اسپرمها افزوده شد. پس از گذشت ۲ دقیقه در هوای آزمایشگاه، ابتدا نمونه‌ها ۱۰ دقیقه در گاز نیتروژن سرد شده و سپس مستقیماً در نیتروژن مایع غوطه ور گردیدند. برای ذوب، نمونه‌ها از نیتروژن مایع خارج و در حرارت آزمایشگاه و آب ۳۷° سانتیگراد قرار داده شدند. پس از شستشو در محیط T6-BSA، درصد زنده ماندن، حرکت و مورفولوژی اسپرمها در گروههای آزمون اندازه گیری و با گروه شاهد مقایسه گردیدند.

تخمک موشهای ماده نژاد NMRI با سن ۱۰-۶ پس از تحریک تخمک گذاری با استفاده از تزریق داخل صفاتی گنادوتروپینها و گذشت ۱۳-۱۲ ساعت از لوله فالوپ خارج و با اسپرمهای گروههای مختلف تلقیح شدند و تشکیل پیش هسته‌ها و تکامل زیگوت تک سلولی به دو سلولی بررسی شد. برای هر دو گروه آزمون، تست سمیت نیز انجام شد.

* **یافته‌ها:** نتایج این تحقیق نشان داد که در گروههای کنترل و آزمون ۱ و ۲، میزان زنده ماندن اسپرم در گروههای شاهد، آزمون به ترتیب ۸۰/۳، ۳۵/۸، ۲۰/۵ درصد، میزان حرکت آنها به ترتیب ۷۵/۴ و ۳۱/۸ و ۱۸/۶ درصد، میزان اسپرمهای نرمال به ترتیب ۵۷/۲ و ۴۳/۲ و ۳۷/۸ درصد و درصد باروری آنها به ترتیب ۸۷ و ۳۱ و ۲۰ می‌باشد. تمام تفاوتها میان گروه شاهد وگروههای آزمون معنی‌دار بود.

* **نتیجه‌گیری:** برای انجماد اسپرم موش ضدیخ رافینوز بهتر از گلیسرول - گلوکز محسوب می‌شود اما مطالعات بیشتری برای بهبود این روش انجمادی مورد نیاز می‌باشد.

گل واژگان: اسپرم، موش، انجماد، رافینوز، گلیسرول

مقدمه

سالها انسان در فکر حفظ سلولهای زنده به طریق انجماد بود تا اینکه Polge و همکارانش در سال ۱۹۴۹ (تقریباً ۵۰ سال قبل) برای اولین بار موفق به انجماد اسپرم با استفاده از ضدیخ گلیسرول شدند (۱). با انجماد اسپرم و ایجاد بانک آن، نگهداری انواع ژنوم در وضعیت هاپلوید و اطلاعات ژنتیکی حیوانات در حال انقراض امکان‌پذیر است (۲). موش بهترین مدل حیوان آزمایشگاهی (۳) جهت مطالعه عملکرد ژن پستانداران است (۴) بنابراین انجماد جنین و اسپرم موش ضروری به نظر می‌رسد (۵). در سال ۱۹۸۲ Sherman و همکارانش برای اولین بار جهت انجماد اسپرم موش تلاش کردند اما اسپرمهای زنده و متحرکی به دست نیاوردند (۶). هر چند زمان زیادی از انجماد اسپرم انسان و دیگر پستانداران می‌گذرد، انجماد اسپرم موش به دلیل ویژگیهای خاص آن هنوز در مرحله تحقیق است که علتهای زیادی برای آن شمرده‌اند (۷). از جمله کم بودن ضریب نفوذپذیری غشای پلاسمایی اسپرم موش نسبت به آب، داشتن دم دراز نسبت به اسپرم حیوانات اهلی (۷، ۸)، حساس بودن شوکهای اسمزی (۳) به دلیل حضور اسکلت سلولی خاص در اسپرم موش که به سلولها قابلیت کمتری جهت مقابله با فشار اسمزی می‌دهد (۹) و حساس بودن به تغییرات درجه حرارت.

شوک وارده ناشی از سرما با حضور بعضی ضدیخهای غیر قابل نفوذ مانند رافینوز و قابل نفوذ مانند گلیسرول کم می‌شود (۴) زیرا این محلولها، سلول (اسپرم) را در برابر صدمه ناشی از سرما محافظت کرده، درصد زنده ماندن اسپرم را پس از ذوب، افزایش می‌دهند (۳) و از طرفی تحمل سلولها را نیز در برابر تغییرات اسمزی زیاد می‌کنند (۵). یکی از اثرات ضدیخ غیر قابل نفوذ این است که موجب از دست دادن ۳۵ درصد آب درون سلولی قبل از انجماد می‌شود که این عمل موجب چروک خوردگی کمتر سلول می‌گردد. زنده ماندن اسپرمها در طی انجماد به نوع و غلظت ضدیخ بستگی دارد (۴). همچنین موفقیت لقاح توسط اسپرم منجمد - ذوب شده موش به نوع و گونه موش و ترکیب و غلظت ضدیخ وابسته است (۱۰). برای اولین بار Tada و همکارانش در سال ۱۹۹۰ به دنبال انجماد اسپرم موش، اسپرمهای زنده و متحرک به دست آوردند (۱۱). تاکنون نیز محققین بسیاری با روشهای مختلف و ضدیخهای گوناگون موفق به انجماد اسپرم موش شده‌اند اما هنوز هم یک روش معتبر و قابل اطمینان جهت انجماد اسپرم موش مورد نیاز است. بنابراین در این پژوهش انجماد و اسپرم موش نژاد NMRI با استفاده از دو نوع ضدیخ نفوذپذیر (گلیسرول) به علاوه گلوکز و تخم‌مرغ و نفوذناپذیر (رافینوز) به علاوه شیرخشک بررسی و اثرات آنها بر زنده ماندن تحرک، مورفولوژی و قدرت باروری اسپرم مقایسه گردیده است.

مواد و روشها

* تهیه و ارزیابی اسپرم

اسپرمها از دم اپی‌دیدیم موشهای سوری نر نژاد NMRI به سن ۱۰-۸ هفته که قدرت لقاحشان ثابت شده بود در شرایط استریل جدا شدند و سپس نمونه‌ها در محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم سرم آلبومین گاوی (BSA-Sigma) و در انکوباتور تحت شرایط ۳۷° سانتیگراد دما و ۵ درصد CO2 قرار گرفتند تا ظرفیت‌پذیر شوند. بعد به گروههای شاهد و آزمون ۱ و ۲ تقسیم شده و جهت اندازه‌گیری میزان درصد زنده بودن، تحرک، درجه‌بندی حرکت، مورفولوژی و قدرت باروری اسپرم مورد بررسی قرار گرفتند.

* انجماد و ذوب اسپرم

جهت انجماد اسپرم، ابتدا ضدیخها تهیه شدند. ضدیخ شماره ۱ شامل (w/v) ۱۸ درصد رافینوز و (w/v) ۳ درصد شیرخشک شود که در آب مقطر ۶۰° سانتیگراد حل شده و با سرعت ۱۰۰۰۰g برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید برای تهیه ضد یخ محلول رویی[1] با فیلتر ۰/۴۵μm فیلتر شد (۱۱). ضدیخ شماره ۲ شامل (v/v) ۷ درصد گلیسرول، (w/v) ۱ درصد گلوکز و (v/v) ۲۵ درصد زردهٔ تخم‌مرغ بود که ابتدا زردهٔ تخم‌مرغ در PBS حل شده، پس از ۳۰ دقیقه با سرعت ۸۸۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید، گلیسرول و گلوکز در محلول رویی در حمام آب گرم کاملاً حل شده، سپس با فیلتر ۴۵μm فیلتر شدند.

پس از تهیه ضدیخها، برای اطمینان از سمی نبودن آنها برای اسپرم هر دو گروه آزمون تست سمیت انجام شد به این ترتیب که ضدیخها به اسپرمهای گروه سمیت ۱ و۲ اضافه شده، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. سپس با شستشوی اسپرمها، ضدیخ از محیط خارج شد و محیط کشت اضافه گردید. جهت انجماد اسپرمهای گروه آزمون ۱ و ۲ در کرایوتیوپهای ۱cc به نسبت ۱ به ۱ اسپرم و ضدیخ ریخته و برای تعادل بین اسپرم و ضدیخ به مدت ۲ دقیقه در محیط آزمایشگاه و سپس ۱۰ دقیقه در گاز ازت مایع قرار گرفتند. بعد از آن کرایوتیوپها در ازت مایع (دمای ۱۹۶° سانتیگراد) غوطه‌ور شدند. پس از ذخیره کردن اسپرمها به مدت یک هفته، کرایوتیوپها از ازت مایع خارج شده ابتدا ۲۰ ثانیه در هوای آزمایشگاه و ۲ دقیقه در آب گرم ۳۷° سانتیگراد قرار گرفتند. پس از دو بار شستشو، محیط کشت به آنها اضافه گردید و در انکوباتور قرار داده شدند و پس از آن جهت ارزیابی مورد بررسی قرار گرفتند و میزان زنده ماندن، تحرک، درجه‌بندی حرکت از ۱ تا ۴ و شکل ظاهری طبیعی و انواع شکلهای غیر طبیعی اسپرم برحسب درصد در همه گروهها اندازه‌گیری شد. به این منظور یک قطره از اسپرمهای واقع در محیط کشت را در لام قرار داده و یک لامل ۲۰×۲۰ روی آن قرار داده شد. لام حاصله در زیر میکروسکوپ نوری جهت بررسی اسپرمها با عدسی ۴۰ شیئی مشاهده و بر اساس معیارهای WHO (۱۲) دسته بندی شدند و برای مشاهده اسپرمهای زنده از رنگ حیاتی ائوزین B استفاده شد به طوری که سر اسپرمهای مرده رنگ قرمز به خود می‌گرفتند و با شمارش صد اسپرم میزان اسپرمهای زنده مشخص شد.

* تلقیح تخمکها

موشهای سوری ماده نژاد NMRI به سن ۱۰-۶ هفته، با تزریق

1. Supernatant

داخل صفاتی IU ۷/۵ hMG (Serono, Italia) و ۴۸ ساعت بعد با IU ۷/۵ hMG (Organon, Holland) تحریک تخمک گذاری شدند. ۱۳-۱۲ ساعت پس از تزریق hCG، موشهای ماده به روش قطع نخاع گردنی کشته شدند. لوله‌های رحمی آنها جدا و به محیط کشت T6 حاوی سرم که از قبل آماده شده بود، انتقال یافتند. در زیر استریومیروسکوپ تخمکها از لوله خارج و به قطره‌ای از محیط کشت T6 حاوی ۵ میلی‌گرم BSA منتقل شدند و برای تلقیح تخمکها تعداد ۱۰۰۰ اسپرم به ازای هر تخمک از گروههای شاهد و آزمون به قطره حاوی تخمک (T6+15%BSA) افزوده شد، پس از ۶-۴ ساعت، محیط کشت تعویض و به ترتیب ۸ و ۲۴ ساعت پس از تلقیح، تشکیل پیش هسته‌ها و جنین دو سلولی با میکروسکوپ اینورت ارزیابی گردید.

* بررسی آماری

درصد زنده ماندن، تحرک، درجه‌بندی حرکت و مورفولوژی اسپرمها در هر یک از گروههای کنترل، سمیت ۱ و ۲ و آزمون آماری نسبتها بین گروهها مقایسه انجام شد. درصد لقاح و تکامل جنین تک سلولی نیز پس از بررسی با آزمون آماری مجذور کای، بین گروهها مقایسه گردید.

یافته‌ها

مقایسه میزان زنده ماندن، تحرک، درجه‌بندی حرکت، مورفولوژی، میزان باروری اسپرم و تکامل جنین تک سلولی بین گروه سمیت ۱ و شاهد نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه وجود ندارد. بنابراین ضدیخ رافینوز اثر سمی بروی اسپرم نگذاشت (اطلاعات نشان داده نشده است). همین مقایسه بین گروه سمیت ۲ و شاهد، در میزان زنده ماندن، تحرک و درجه‌بندی حرکت میزان باروری اسپرم و تکامل جنین تک سلولی با $P<0.05$ اختلاف معنی‌دار داشت که مشخص شد این ضدیخ برای اسپرمها سمی است (اطلاعات نشان داده نشده است).

بقیه نتایج پژوهش حاضر در جداول ۱ تا ۳ خلاصه شده است:

در جدول ۱ درصد زنده ماندن، تحرک و درجه‌بندی حرکت اسپرمها بین گروههای شاهد و آزمون ۱ و۲ مقایسه شده است. گروه شاهد شامل اسپرمهای منجمد نشده، گروه آزمون ۱ شامل اسپرمهای منجمد شده با ضدیخ رافینوز - شیرخشک و آزمون ۲ شامل اسپرمهای منجمد شده با ضدیخ گلیسرول-گلوکز- زردهٔ تخم مرغ بود که میزان زنده ماندن در گروه شاهد، آزمون ۱ و ۲ به ترتیب ۸۰/۳ و ۳۵/۸ و ۲۰/۵ درصد بود که اختلاف بین گروه شاهد و آزمون ۱، شاهد و آزمون ۲ و آزمون ۱ و ۲ با $P<0.001$ از نظر آماری معنی‌دار بود. میزان تحرک اسپرمها در گروه شاهد، آزمون ۱ و ۲ به ترتیب ۷۵/۴، ۳۱/۸ و ۱۸/۶ درصد بود؛ اگر چه این اختلافها از نظر آماری بین گروه شاهد و آزمون ۱، شاهد و آزمون ۲ و آزمون ۱ و ۲ با $P<0.001$ معنی‌دار بود. از نظر درصد اسپرمهای متحرک درجه I، II، IV مابین گروههای آزمون و گروه شاهد تفاوت معنی‌داری در میزان درصد اسپرمهای متحرک با درجه III مابین گروهها مشاهده نشد.

در مجموع جدول نشان می‌دهد با اینکه هر دو گروه آزمون تفاوتهای معنی‌داری با گروه شاهد دارند اما تاثیرات سوء ضدیخ رافینوز - شیرخشک بر میزان زنده ماندن و تحرک اسپرمها کمتر بوده است.

در جدول ۲، مقایسه مورفولوژی اسپرمها بین گروههای شاهد، آزمون ۱ و ۲ ارائه شده است. میزان درصد اسپرمهای طبیعی در گروههای شاهد، آزمون ۱ و ۲ به ترتیب ۵۷/۲ و ۴۳/۲ و ۳۷/۸ درصد می‌باشد که این اختلافها بین گروه شاهد و آزمون ۱، آزمون ۲ با گروه شاهد و آزمون ۱ و ۲ با $P<0.001$ معنی‌دار بوده است.

درصد اسپرمهای Loose head که ناحیه سر از بقیه قسمتهای اسپرم جدا شده، به ترتیب در سه گروه ۲/۴، ۸/۸ و ۹/۷ درصد بود که اختلافها بین گروه شاهد و آزمون ۱، شاهد و آزمون ۲، با $P<0.05$ از نظر آماری معنی‌دار بود. درصد اسپرمهای Bent neck که ناحیه گردنشان کج شده بود، در سه گروه بالا به ترتیب ۲۹/۱، ۳۶/۸ و ۴۱/۸ درصد بود که این اختلافها بین گروه شاهد و آزمون ۱، آزمون ۱ و ۲ و گروه شاهد و آزمون ۲ با $P<0.05$ معنی‌دار بوده است.

در سایر شکلهای غیر طبیعی شامل Macro head، Micro Cytoplasmic droplet و دم Short، Coiled تفاوت معنی‌داری ما بین گروهها مشاهده نشد. از این جدول مشخص شد که انجماد باعث افزایش شکلهای غیر طبیعی Loose head، Bent neck شده که این مقادیر در گروه آزمون ۲ بیشتر بوده است.

جدول ۱: مقایسه میزان درصد زنده ماندن، تحرک و درجه‌بندی آن در گروههای شاهد، آزمون ۱ و ۲

گروه شاهد: اسپرمهای منجمد نشده، گروه آزمون ۱: اسپرمهای منجمد شده با ضدیخ رافینوز - شیرخشک، گروه آزمون ۲: اسپرمهای منجمد شده با ضدیخ گلیسرول - گلوکز - زردهٔ تخم‌مرغ

گروه	تکرار	زنده ماندن P±S.D.	اسپرم متحرک P±S.D.	درجه‌بندی حرکت P±SD			
				درجه I	درجه II	درجه III	درجه IV
شاهد	۶	۸۰/۳±۲۱/۸	۷۵/۴±۱۲/۹	۱۴/۹±۸/۹	۲۰±۱۰	۲۹/۷±۱۱/۴	۳۵/۴±۱۸/۶
آزمون ۱	۶	a*** ۳۵/۸±۷/۹	a*** ۳۱/۸±۸/۸	a* ۲۳/۸±۸/۴	a* ۳۱/۷±۹/۳	۲۵/۸±۹/۲	a** ۱۸/۷±۵/۹
آزمون ۲	۶	b***,c*** ۲۰/۵±۳/۹	b***,c*** ۱۸/۶±۳/۵	b* ۳۲±۷/۸	b* ۳۰±۲/۵	۲۶±۱۱/۹	b** ۱۰/۳±۲/۹

a: تفاوت گروه آزمون ۱ با شاهد معنی دار است.

b: تفاوت گروه آزمون با شاهد معنی دار است.

c: تفاوت گروه آزمون ۱ و ۲ با هم معنی دار است.

* $P<0.05$، ** $P<0.01$، *** $P<0.001$

میانگین درصد ±: انحراف معیار S.D.

در جدول ۳، میزان باروری اسپرم و تکامل جنینهای تک سلولی به دو سلولی میان گروههای شاهد، آموزن ۱ و ۲ مقایسه شده است. میزان باروری اسپرم بر حسب درصد در گروههای شاهد، آزمون ۱ و ۲ به ترتیب ۸۷، ۳۱ و ۲۰ درصد بود که این اختلافها بین گروه شاهد و آزمون ۱، شاهد و آزمون ۲ و آزمون ۱ و ۲ با $P<0.001$ معنی‌دار بود.

ضدیخ، همچنین به گونه و نژاد موش بستگی دارد (۴). ترکیب ضدیخ رافینوز - شیر خشک حاوی یک ضدیخ نفوذناپذیر و یک ماکرو مولکول است و ترکیب ضدیخ گلیسرول - گلوکز زردهٔ تخم‌مرغ حاوی ضدیخ نفوذ پذیرو نفوذناپذیر و یک ماکرو مولکول است. انجماد اسپرم پستانداران غیر از موش، با استفاده از ضدیخ گلیسرول به

جدول ۲: مقایسه مورفولوژی اسپرمها (بر حسب درصد) بین گروههای شاهد، آزمون ۱ و ۲

گروه شاهد: اسپرمهای منجمد نشده، گروه آزمون ۱: اسپرمهای منجمد شده با ضدیخ رافینوز - شیرخشک، گروه آزمون ۲: اسپرمهای منجمد شده با ضدیخ گلیسرول - گلوکز- شیر خشک.

گروه	تکرار	نرمال P±S.D.	مورفولوژی غیرطبیعی P±SD					
			Head defects			Neck defects		Tail defects	
			Loose	Macro	Micro	Bent	C.D.	Colied	Short
شاهد	۶	۵۷/۲±۱۰/۷	۲/۴±۱	۲/۴±۱/۸	۳/۵±۳/۷	۲۹/۱±۵/۹	۱۲/۵±۹/۳	۸/۵±۵/۷	۱/۹±۱/۸
آزمون ۱	۶	a** ۴۳/۲±۷	a** ۸/۸±۲/۵	۲/۸±۱/۶	۱/۳±۰/۸	a* ۳۶/۸±۱۴/۸	۷/۵±۸/۹	۹/۲±۷/۷	۰/۲۲±۰/۴
آزمون ۲	۶	b** ۳۷/۸±۶/۹	b** ۹/۷±۱/۴	۳±۲/۳	۲/۵±۱/۶	b*,c* ۳۱/۸±۲/۹	۳/۶±۳/۸	۱۶±۸/۷	۰/۹±۰/۷

a: تفاوت گروه آزمون ۱ با شاهد معنی دار است. میانگین درصد: P

b: تفاوت گروه آزمون با شاهد معنی دار است C.D: Cytoplasmic Droplet

c: تفاوت گروه آزمون ۱ و ۲ با هم معنی دار است.

$P<0.01$:**, $P<0.05$:*

جدول ۳: مقایسه میزان باروری اسپرم و تکامل جنینهای تک سلولی بین گروههای شاهد، آزمون ۱ و ۲

گروه شاهد: اسپرمهای منجمد نشده، گروه آزمون ۱: اسپرمهای منجمد شده با ضدیخ رافینوز - شیرخشک، گروه آزمون ۲: اسپرمهای منجمد شده با ضدیخ گلیسرول - گلوکز - شیر خشک

گروه	تکرار آزمایشات	تخمکهای متافاز II	لقاح (درصد)	جنینهای دو سلولی (درصد)
شاهد	۶	۳۱۴	۲۷۲(۸۷)	۲۴۱(۸۹)
آزمون ۱	۶	۳۱۱	a*** ۹۷(۳۱)	a*** ۳۲(۳۳)
آزمون ۲	۶	۲۰۸	b***,c*** ۴۱(۲۰)	b***,c*** ۸(۲۹)

a: تفاوت گروه شاهد با آزمون ۱ معنی دار است.

b: تفاوت گروه شاهد با آزمون ۲ معنی دار است.

c: تفاوت گروه آزمون ۱ و ۲ با هم معنی دار است.

$P<0.0001$:***

درصد تکامل جنینهای تک سلولی به دو سلولی نیز در گروههای شاهد، آزمون ۱ و ۲ به ترتیب ۸۹ و ۳۳ و ۲۰ درصد بود که این اختلافها بین گروه شاهد و آزمون ۱، شاهد و آزمون ۲ آزمون ۱ و ۲ با $P<0.001$ معنی‌دار بود. در مجموع جدول ۳ نشان می‌دهد که انجماد اسپرم باعث کاهش قدرت بارورسازی آن شده و از این جهت انجماد با استفاده از ضدیخ گلیسرول - گلوکز اثرت سوء بیشتری داشته است.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که با استفاده از ضدیخ رافینوز و شیرخشک در انجماد اسپرم موش نژاد NMRI تعداد بیشتری اسپرم زنده و متحرک و درصد لقاح و تکامل جنین بالاتری نسبت به ضدیخ گلیسرول، گلوکز و زردهٔ تخم‌مرغ به دست می‌آید. زنده ماندن، تحرک و همچنین میزان باروری اسپرمها پس از انجماد - ذوب به نوع و غلظت

همراه ضدیخهای نفوذناپذیر (۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶) باعث می‌شود که درصد بالایی اسپرم زنده به دست آید، اما این موضوع در مورد انجماد اسپرم صادق نبوده است (۱۱) که در تحقیق حاضر نیز به اثبات رسید. یکی از علل مناسب نبودن ضدیخ گلیسرول ممکن است ناکافی بودن زمان تعادل اسپرمها با ضدیخ باشد زیرا آب درون سلولی اسپرمهای موش بسیار زیاد است بنابراین سلولها در زمان انجماد آب زیادی داشتند و به خاطر تشکیل کریستالهای یخ داخل سلولی بعد از انجماد زنده نماندند. از طرفی هر گاه زمان تعادل طولانی‌تر شود اثر سمیت آن بر اسپرم موش بیشتر خواهد بود (۱۷). هر چه زمان در معرض قرار گرفتن اسپرم با گلیسرول کمتر باشد حرکت اسپرمها پس از ذوب بیشتر خواهد بود و در طی یک دقیقه، کمترین آسیب به آنها وارد می‌شود (۱۸). از طرفی این زمان محدود برای به تعادل رسیدن اسپرمها و ضدیخ کافی نیست. اثر سمیت گلیسرول به عنوان ضدیخ در گرانولوسیتهای انسانی،

اسپرم انسان و موش گزارش شده است (۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰).

در این تحقیق نیز مشخص شد که علاوه بر تاثیرات زیانبار بر اسپرم، ضدیخ محتوی گلیسرول اثرات منفی بر تعداد اسپرمهای زنده، متحرک و قدرت بارورسازی آنها دارد به هر حال با وجود اثر سمیت گلیسرول، از آن در انجماد اسپرم انسان به صورت گسترده‌ای استفاده می‌شود (۱۹). اما همان طور که نتایج این پژوهش و دیگران (۸) نشان داد گلیسرول ضدیخ مناسبی در انجماد اسپرم موش نمی‌باشد.

دربارهٔ درجه‌بندی حرکت اسپرمها پس از پروسه انجماد - ذوب گزارشی وجود ندارد اما به هر حال نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که انجماد اسپرم می‌تواند باعث کاهش تعداد اسپرمهای متحرک با درجه IV شود. بعضی از محققات ثابت کردند که حرکت اسپرم به ویژه اسپرم موش در برابر آسیب ناشی از انجماد و شوک اسمزی بسیار حساس است (۲۰). از دست دادن حرکت در اسپرم یا کاهش آن پس از انجماد - ذوب ممکن است مربوط به تجمع رادیکالهای آزاد اکسیژن در اسپرم باشد، در حالت طبیعی سیستمهای آنتی اکسیدان در اسپرم و احتمالاً در غشای آن وجود دارد که موجب پیشگیری از تجمع رادیکالهای آزاد اکسیژن می‌شود اما از طرفی در جریان انجماد - ذوب بخشی از سیستمهای آنزیمی که در نرمال کردن رادیکالهای آزاد اکسیژن نقش دارند تخریب می‌گردند (۲۱) که می‌تواند یکی از علتهای مهم از دست دادن تسریع فعالیتهای اسپرم پس از انجماد - ذوب باشد (۲۲).

از دیگر پارامترهایی که در ارزیابی اسپرم قبل و پس از انجماد در تحقیق حاضر بررسی شده، شکل ظاهری اسپرم بود به طوری که انواع اسپرمها با شکل غیرطبیعی Bent neck، Loose head در هر دو گروه انجمادی نسبت به گروه کنترل بیشتر شده بود. نتایج مشابه آن را Sztein (۲۳) با استفاده از ضدیخ رافینوز - گلیسرول ارائه داد. گزارش دیگری در این مورد به دست نیامده است. از طرفی میزان اسپرمهای Bent neck در گروه آزمون ۲ بیشتر از آزمون ۱ است. تغییر شکل ظاهری اسپرم ممکن است به دلیل آسیب اسکلت سلولی که در شکل دادن به سلول نقش اصلی را ایفا می‌کند، باشد. در این مورد نیاز به مطالعات بیشتری است که احتمالاً در سطح فرا ساختاری اسپرم در اثر انجماد تغییراتی ایجاد می‌شود که باعث این گونه ناهنجاریها در مورفولوژی آن می‌گردد.

عامل مهم دیگر در ارزیابی اسپرم پس از انجماد - ذوب، قدرت باروری آن و میزان تکامل زیگوتهای تک سلولی به دو سلولی بود. در این پژوهش با استفاده از ضدیخ رافینوز، میزان باروری بیشتری نسبت به ضدیخ گلیسرول - گلوکز به دست آمد که مشابه آن را محققین روی اسپرم نژادهای مختلف موش به دست آوردند (۱۱، ۲۴). با توجه به این که پس از انجماد - ذوب، درصد اسپرمهای متحرک به ویژه درجه IV در هر دو گروه آزمون، به ویژه آموزن ۲ پایین بود، می‌توان انتظار داشت که میزان باروری در گروه آزمون ۲ کمتر باشد.

زیگوتهای حاصل از IVF با اسپرمهای منجمد ـ ذوب شده در هر دو گروه آزمون نتوانستند به خوبی تکامل پیداکرده و تبدیل به جنینهای دو سلولی شوند که مشابه این نتیجه برای دیگر محققین نیز به دست آمده است (۴، ۱۱، ۲۴) که احتمالاً علت آن آسیب وارده به DNA در طی انجماد است. همان طوری که Karabinus ذکر کرده است، انجماد موجب DNA denaturation شده و همین عامل می‌تواند در روند باروری و تکامل جنین تاثیر بگذارد (۲۵). در عین حال محققین دیگری هم احتمال over condensation در طی انجماد را عامل دیگری برای ناکامی در لقاح و تکامل جنین ذکر کرده‌اند (۲۶).

در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که ضدیخ محتوی رافینوز و شیرخشک برای انجماد اسپرم موش نژاد NMRI سمی نبوده و پس از انجماد - ذوب تعداد بیشتری اسپرم زنده و متحرک و میزان باروری و تکامل جنین بالاتری نسبت به ضدیخ گلیسرول - گلوکز - زردهٔ تخم‌مرغ به دست می‌آید. هر چند که این میزان ایده آل نیست ولی در مقایسه با ضدیخهای دیگر و مشکلاتی که انجماد اسپرم موش دارد قابل قبول می‌باشد و شاید تغییراتی در آن باعث بهبود نتایج شود.

References

1. Polge C, Smith AU, Parkes A: Revival of spermatozoo after vitrification and dehybration at low temperatures. Nature 1949; 164: 666

2. Devireddy RV, Swanlund DJ, Bischorf JC: Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice cryoprotective agents. Biol Reprod 1999; 61: 764-775

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

4. 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: 231-236

5. Du J, Tao J, Mazur P, Critser JK: Water volume and osmotic behaviour of mouse spermatozoa determined by electron paramagnetic resonance. J Reprod Fertil 1994; 101: 37-42

6. Sherman JK, Liu KC: Ultrastructure before freezing, while frozen and after thawing in assessing cryo injury of mouse epididymal spermatozoa. Cryobiology 1982; 19: 508-510

7. 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

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

9. Esther EN, Kathleen A, Bayard TS: Water permeability, Lp, of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. Biol Reprod 1987; 31: 234-40
10. Yoshida M: Conservation of sperms: current status and new trends.Anim Reprod Sci 2000; 60(61): 349-355
11. 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
12. World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, United Kingdom, 1999, pp 8-19
13. Bung RG, Sherman JK: Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature 1953; 172: 767-768
14. Fox RR: Preservation of rabbit spermatozoa: Fertility results from frozen semen. Proc Soc Exp Biol Med 1961; 108: 663-668
15. Nishikawa Y, Waide Y, Shiomiya S: Studies of deep freezing of horse spermatozoa. Proc 6th Int congr Anim Reprod: 1968; 2: 1589-1591
16. Seager SW: Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. AL Digest 1969; 17: 6-10
17. Gilmore JA, McGann LE, Gao DY, Critser JK: Effect of cryoprotectant solutes on water permeabiliyt of human spermatozoa. Biol Reprod 1995; 53: 985-995
18. Armitage WJ, Mazur P: Toxic and osmotic effects of glycerol on human granulocytes. Am J Physiol 1984; 247: C382-C389
19. Ali JI, Fahim Z, Weaver DJ, Noteboom W: The importance of prefreeze equilibration of glycerol in cryopreservation of human spermatozoa and the biochemical conversion of glycerol. Int J Fertil 1993; 38: 180-186
20. Songsason N, Leibo SP: Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. Cryobiology 1997; 35: 240-254
21. Storey BT, Alvarez JG: Perioxidation damage to cryopreserved sperm is consequent to partial inactivation by superonide dismutase induced by freeze thaw process. J Androl 1992; 3: 18-24
22. Keel BA: Effectsof cryopreservation on motility characteristics of spermatozoa: J Reprod Fertil 1981; 81: 213-220
23. Sztein JM, Schmidt K: Cryopreservation of mouse spermatozoa in a glycerl/raffinose solution: Cryobiology 1992; 29: 736-737
24. Nakagata N: Cryopreservation of mouse spermatozoa. Mam Gen 2000; 11: 572-576
25. Karabinus DS, Evenson DP, Kaproth MT: Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. J Dairy Sci 1991; 74: 3836-3848
26. Royere D, Hammamah S, Nicolle JC, Lansac J: Chromatin alternations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. Int J Androl 1991; 14: 328-332