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

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

چکیده

مقدمه: *منجمدسازی اسپرم به‌طور گسترده‌ای در برنامه‌های تلقیح مصنوعی و باروری آزمایشگاهی برای نگه‌داری گامت نر و فراهم آوردن شانسی برای باروری‌های بعدی به‌کار می رود. علی رغم پیشرفت هایی که در انجماد اسپرم صورت گرفته است، میزان تحرک اسپرم ها پس از انجماد و ذوب به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌یابد. با توجه به این‌که هیالورونیک اسید، میزان تحرک اسپرم را پس از انجماد و ذوب بهبود بخشیده و قدرت زنده ماندن اسپرم را افزایش می‌دهد و موجب حضور اسپرم در طی عمل متقابل اسپرم ـ اووسیت در بدن موجود زنده می‌شود، بنابراین استفاده از هیالورونیک اسید به‌عنوان یک راه‌کار کاربردی آماده، به‌منظور بهبود کیفیت اسپرم در طی انجماد و ذوب توصیه می‌شود. لذا در تحقیق حاضر اثر هیالورونان روی عوامل مورفولوژی، میزان تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌های موش‌سوری قبل از انجماد و پس‌از ذوب بررسی شده است.*

مواد و روش‌ها: *در این مطالعه تعداد ۶ سر موش نر سوری به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌های سیمن به‌دست‌آمده از هر حیوان نر به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول کنترل بدون انجماد، گروه دوم کنترل منجمدشده، گروه سوم قبل از انجماد هیالورونان افزوده شد و گروه چهارم پس از ذوب هیالورونان اضافه شد. انجماد اسپرم‌ها در کرایوتیوب ۱/۸ میلی‌لیتری و با استفاده از ضد یخ ۱۸درصد رافینوز و ۳ درصد skim milk انجام شد. مورفولوژی اسپرم‌ها توسط رنگ‌آمیزی پاپانیکولا و قابلیت زنده ماندن آن‌ها با رنگ‌آمیزی فوق حیاتی ائوزین B مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان تحرک اسپرم‌ها با مشاهده میکروسکوپی بررسی گردید. در این مطالعه برای مقایسه گروه‌های آزمون با گروه کنترل از آزمون آماری تی‌تست استفاده شد.*

یافته‌ها: *نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن هیالورونان پس از ذوب به نمونه‌ها به‌طور معنادار تأثیر مثبت روی میزان تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها دارد ($P<۰/۰۰۱$). اضافه کردن همین دوز قبل از انجماد در روی عوامل مذکور بی‌تأثیر بود و هیچ تأثیری از دوز مذکور هیالورونان قبل از انجماد و پس از ذوب روی مورفولوژی اسپرم‌ها مشاهده نشد.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به یافته‌های این مطالعه به‌نظر می‌رسد که افزودن هیالورونان به سیمن منجمدشده پس از ذوب موجب افزایش تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها می‌شود.*

«دریافت:۱۳۸۴/۹/۹ پذیرش: ۱۳۸۷/۶/۶»

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

---

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

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

E-mail: aligholi1177@yahoo.com

مقدمه

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

منجمدسازی اسپرم انسانی به‌طور گسترده‌ای در برنامه‌های تلقیح مصنوعی و باروری آزمایشگاهی برای نگه‌داری گامت‌نر و فراهم‌آوردن شانسی برای باروری‌های بعدی به‌کار می‌رود. به‌طور مثال در درمان بدخیمی (۳) شیمی درمانی سیتوتوکسیک، رادیوتراپی و بعضی از انواع درمان‌های جراحی که ممکن است منجر به یک نقص تستیکولار یا اختلال در عملکرد سیستم انزالی شود، فریز کردن اسپرم‌ها قبل از شروع درمان امیدی برای باروری بعدی بیماران را فراهم می‌کند (۴). در افراد اهداءکننده اسپرم، استفاده از سیمن فریزشده اجازه بررسی‌جزییات افراد اهداءکننده ازنظر وجود عفونت‌هایی از قبیل HIV و HBS را به‌وجود می‌آورد (۵). همچنین برای تکرار اعمال جراحی از قبیل MESA[1] و TESE[2] که به‌عنوان اعمال جراحی درمانی در آزوسپرمی استفاده می‌شود، می‌توان از منجمد کردن اسپرم استفاده‌نمود(۶).

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

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

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

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

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

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

1. Microsurgical epididymal sperm aspiration

2. Testicular sperm extraction

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

مواد و روش‌ها

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

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

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

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

با اسپرم تازه)، سپس بقیه قسمت‌ها را در پتری‌دیش حاوی ضدیخ گذاشته پس از ۳۰ ثانیه حرکت دادن ظرف برای کمک به آزاد شدن اسپرم‌ها، آن‌ها را با قیچی استریل قطعه‌قطعه کرده، پتری‌دیش را درحالی‌که درب آن را به حالت وارونه داخل انکوباتور قرار داده‌ایم با زاویه ۴۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه روی آن گذاشتیم. پس از زمان مقرر، پتری‌دیش را با همان زاویه از انکوباتور خارج کرده و در زیر هود لامینار کار را ادامه دادیم، ابتدا بقایای نسوج را از داخل پتری‌دیش برداشتیم، از محلول حاوی اسپرم‌ها و ضدیخ حجمی معادل ۱۰۰µlit برداشته و داخل کرایوتیوپ‌های ۱/۸ml ریخته شد. سپس بلافاصله کرایوتیوپ‌ها را روی توری تعبیه شده در سیستم انجمادی چیدیم به‌طوری‌که همه نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در معرض بخار نیتروژن قرار بگیرند (۹۰̊C-). پس از ۱۰ دقیقه کرایوتیوب‌ها را سریعاً در داخل نیتروژن مایع (۱۹۶̊C-) غوطه‌ور نمودیم.

برای ذوب نمونه‌ها کرایوتیوپ‌ها را در داخل آب ۳۷̊C، به‌مدت ۲ دقیقه شناور کردیم. سپس حدود ۲۰۰µl مدیوم HamsF10 روی آن ریخته و بعد از سانتریفیوژ (۵ دقیقه با ۵۰۰۰g) محلول رویی آن را دور ریخته و دوبار تکرار نمودیم. پس از دور ریختن محلول رویی (برای جدا کردن کامل ضدیخ) ۱۰۰µl، محیط کشت HamsF10 به آن افزودیم. محلول به‌دست‌آمده، حاوی اسپرم‌های منجمد و ذوب شده‌ای است که برای آنالیز آن‌ها کافی است، ۲۰µlit-۱۰ از آن را به قطرات محیط کشت افزوده و پس از دو ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار داد.

سپس نمونه‌های اسپرم تهیه‌شده از هر موش نر به ۴ گروه به‌شرح ذیل تقسیم‌بندی شد: گروه ۱ (کنترل تازه): نمونه‌هایی بودند که بدون انجماد تنها در معرض محیط HamsF10 قرار گرفتند و هیچ دوزی از هیالورونان (شرکت ژرف خرد sigma) به این محیط اضافه نشد، گروه ۲ (کنترل انجمادی): نمونه‌های این گروه در مراحل انجماد و پس از ذوب هیالورونان دریافت نکردند، گروه ۳: به این گروه قبل از انجماد ۷۵۰µg/ml هیالورونان افزوده شد و گروه ۴: این نمونه‌ها قبل از انجماد هیالورونان دریافت نکرده ولی پس از ذوب به آن‌ها ۷۵۰µg/ml هیالورونان افزوده شد.

در تمام گروه‌ها پس از ۲ ساعت انکوباسیون آنالیز اسپرم انجام شد. سپس تعداد (غلظت) اسپرم‌ها در هر گروه با استفاده از لام نئوبار شمارش شد. برای تعیین موتیلیتی، اسپرم‌ها را در چند میدان میکروسکوپی مشاهده نموده و سرعت آن‌ها را با استفاده از درجات قراردادی WHO که سرعت حرکت اسپرم‌ها را در چهار گروه به شرح ذیل طبقه‌بندی می‌کند به‌دست‌آورده‌شد: ۱- اسپرم‌های فاقد حرکت، ۲- اسپرم‌هایی که دم‌هایشان تکان می‌خورد ولی حرکت رو به جلو ندارند، ۳- اسپرم‌هایی که به‌طرف جلو حرکت می‌کنند اما در مسیری منحنی و پیچ‌دار یا با سرعت آهسته در مسیری مستقیم و ۴- اسپرم‌هایی که به‌طور سریع در مسیر مستقیم به طرف جلو شنا می کنند. با توجه به این‌که اسپرم‌های با موتیلیتی درجه ۳ و ۴ در فرایند لقاح مؤثر هستند، لذا در تحقیق حاضر میانگین مجموع موتیلیتی درجه ۳ و ۴ اسپرم‌ها به‌عنوان موتیلیتی کل در هر

دو گروه کنترل و گروه‌های آزمون در نظر گرفته شد. محاسبه میزان تحرک اسپرم‌ها نیز برای هر نمونه ۳ بار تکرار شد. سپس میانگین به‌دست‌آمده به‌عنوان نتیجه نهایی ثبت شد.

برای شناسایی اسپرم‌های زنده متحرک و غیرمتحرک از اسپرم‌های مرده می‌توان از رنگ‌آمیزی فوق‌حیاتی استفاده نمود. ترکیبات مختلفی برای رنگ‌آمیزی وجود دارند که اغلب آن‌ها مخلوط آئوزین و یک رنگ متضاد آن می‌باشند. در این تحقیق از رنگ‌آمیزی فوق‌حیاتی آئوزین B استفاده گردید.

مواد مورد استفاده در این رنگ‌آمیزی شامل: ائوزین و محلول نرمال‌سالین می‌باشند. برای این کار ۴۰µlit از نمونه اسپرم را با ۱۰µlit ائوزین B (۰/۵٪ در سالین) مخلوط نموده وسپس بلافاصله لامل را روی قطره قرار داده و آن را با بزرگ‌نمایی ۴۰۰x مطالعه نمودیم. اگر اسپرم در زمان رنگ‌آمیزی زنده باشد رنگ ائوزین را به خود نمی‌گیرد در نتیجه قسمت سر و تنه آن رنگ و حالت روشن دارد. درحالی‌که اسپرم‌های مرده به‌دلیل نقص در غشای پلاسمایی خود رنگ ائوزین را به خود گرفته و سر آن‌ها به رنگ قرمز در می‌آید. با محاسبه تعداد اسپرم‌های رنگ‌نگرفته به‌کل تعداد اسپرم‌های موجود درصد اسپرم‌های زنده به‌دست‌آمد. این کار ۳ بار تکرار شد، سپس میانگین نتایج به‌صورت جدول ثبت گردید.

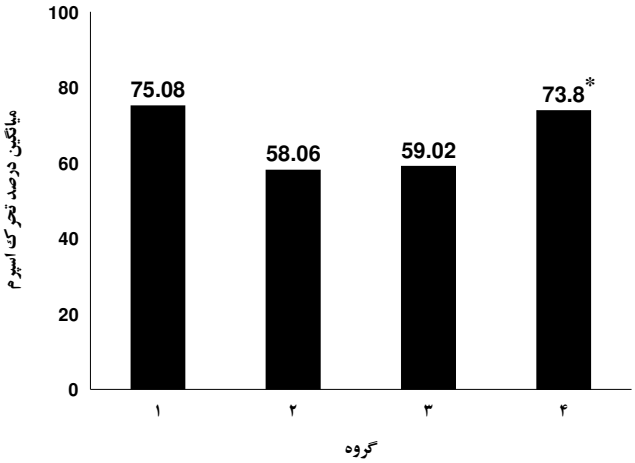
بهترین روش برای تشخیص مورفولوژی طبیعی از غیرطبیعی اسپرم استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا بوده است که اخیراً در این رابطه نظرات ضد و نقیضی ارایه‌شده‌است، اما باتوجه به این‌که هنوز هم در آزمایشگاه‌های جنین‌شناسی به‌طور معمول از این روش استفاده می‌شود، لذا در تحقیق حاضر هم از رنگ‌آمیزی مذکور استفاده شد.

ابنورمالی‌های زیادی برای اسپرم ذکر شده است اما ابنورمالی‌هایی که در این تحقیق بررسی شده‌اند شامل: Coild tail، Stumped tail، Cytoplasmic Droplet و Remanent می‌باشند.

برای تهیه اسمیر، یک قطره از محیط کشت حاوی اسپرم بر روی لام قرار داده شد و با استفاده از لامل به‌روی لام پخش گردید. اسمیر به‌دست‌آمده در هوای آزمایشگاه قرار داده شد تا قدری خشک شود، باید توجه داشت که ماندن به‌مدت زیاد در هوای آزمایشگاه موجب خشک شدن اسپرم‌ها و بدشکل شدن آن‌ها می‌شود، سپس رنگ‌آمیزی پاپانیکولا انجام شد. در این رنگ‌آمیزی هسته اسپرم به رنگ آبی، آکروزوم و دم اسپرم به رنگ صورتی و ناحیه پشتی آکروزوم به رنگ آبی تیره در می‌آید. در این تحقیق مورفولوژی سلول‌های اسپرم از نظر Stumped tail (S.T)، Coild tail (C.T)، Cytoplasmic Droplet (C.D) و (RE) در هر لام رنگ‌آمیزی شده با روش مذکور، در تعداد ۱۰۰ عدد اسپرم تعداد موارد مشاهده‌شده از چهار عامل تحت بررسی به‌طور مجزا یادداشت شد و این کار برای هر نمونه ۳ بار تکرار گردید. میانگین به‌دست‌آمده از ۳ بار شمارش به‌عنوان نتیجه نهایی به‌صورت جدول ثبت شد. در مطالعه حاضر برای مقایسه گروه‌های آزمون با گروه کنترل از آزمون آماری تی‌تست استفاده شد.

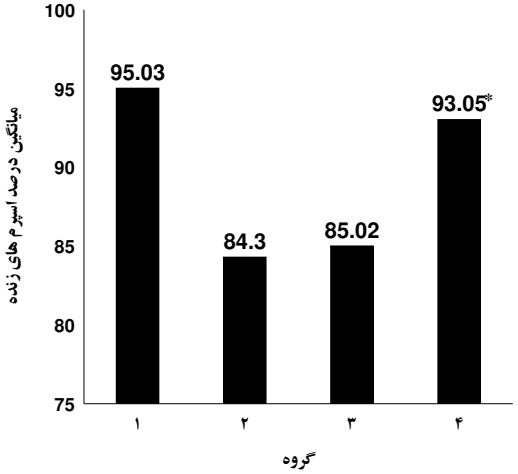
یافته‌ها

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

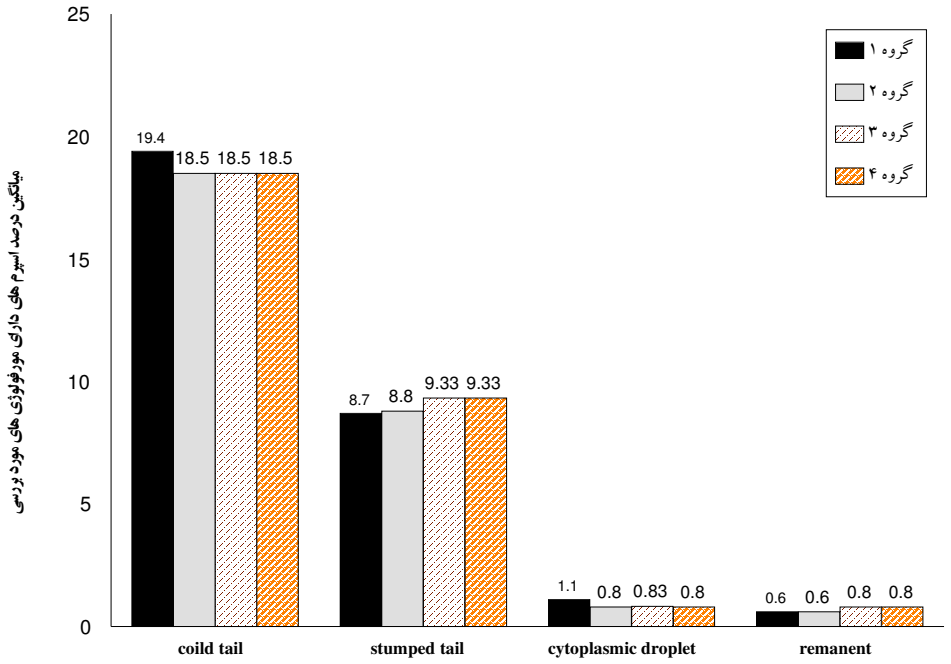


نمودار ۱– مقایسه میانگین درصد تحرک اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه[* (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل ۲ اسپرم منجمد بدون هیالورونان نشان داده شده است.]

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



نمودار ۲– مقایسه میانگین درصد اسپرم های زنده بین گروه های مورد مطالعه [* (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه کنترل ۲ اسپرم منجمد بدون هیالورونان نشان داده شده است.]



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

۳- مقایسه مورفولوژی اسپرم‌ها در گروه کنترل با گروه‌های آزمون: در مقایسه میانگین عوامل مورفولوژی (Stumped tail، Coild tail، Cytoplasmic Druplet و Remanent) بررسی‌های آماری نشان داد که به‌طورکلی بین گروه‌های مورد مطالعه هیچ‌گونه اختلاف معناداری وجود ندارد (P>۰/۰۵).

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

بحث

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

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

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

در این زمینه پینا و همکارانش در سال ۲۰۰۴ تأثیر دو دوز متفاوت ۵۰۰ و ۱۰۰۰μg/ml هیالورونان را روی میزان تحرک اسپرم خوک بعد از انجماد و ذوب کردن مجدد آن مطالعه کرده و گزارش نمودند که دوز ۵۰۰μg/ml تحرک اسپرم‌ها را ۹/۴ درصد و دوز ۱۰۰۰ موتیلیتی اسپرم‌ها را ۳۰ درصد افزایش می‌دهد (۱۴). که نتیجه حاصل از مطالعه محققین مذکور روی تأثیر دوز ۱۰۰۰μg/ml با نتیجه حاصل از مطالعه حاضر تا اندازه‌ای روی دوز مذکور مطابقت دارد. در روی تأثیر دوز کم‌تر از ۱۰۰۰μg/ml پینا و همکارانش روی تأثیر دوز ۵۰۰μg /ml هیالورونان مطالعه کرده، تأثیر آن را کم‌تر از دوز ۱۰۰۰μg/m گزارش نمودند. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه دیگری که توسط همین گروه تحقیق در آزمایشگاه جنین‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد اثر سه دوز ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰μg/ml هیالورونیک اسید بر روی اسپرم‌های موش سوری پس از انجماد و ذوب در محیط کشت بررسی گردید و طبق نتایج حاصله دوزهای ۷۵۰ و ۱۰۰۰μg/ml موجب بهبود موتیلیتی ویتالیتی و میزان باروری نمونه‌ها شدند، ضمن این‌که دوز ۷۵۰μg/ml هیالورونان بیشتر از دوز ۱۰۰۰μg/m موجب بهبود عوامل مذکور شد. علاوه بر دو دوز ذکرشده در این مطالعه، روی دوز ۱۲۵۰μg/ml نیز مطالعه شده و مشاهده شد که دوز اخیر نه‌تنها تأثیر مثبتی روی تحرک اسپرم‌ها ندارد بلکه تأثیر معکوس روی عامل مذکور دارد. همچنین هیچ‌کدام از سه دوز مذکور تأثیری بر روی مورفولوژی نداشتند (۱۸ و ۱۹). با توجه به موارد مذکور و گزارش‌های متناقضی که در مورد زمان اضافه کردن هیالورونان در پروسه انجماد وجود داشت دوز ۷۵۰μg/ml هیالورونان را در دو مرحله قبل از انجماد و پس از ذوب بررسی کردیم.

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

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

هال و همکارانش طی مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۶ روی گیرنده‌های هیالورونان انجام دادند گزارش نمودند که گیرنده‌های هیالورونان در ورود هیالورونان به داخل سلول مؤثر هستند و این گیرنده‌ها محدود بوده و با اضافه نمودن سطح بالایی از هیالورونان از خارج، افزایشی در آن‌ها دیده نمی‌شود (۱۶). لذا از نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات قبلی چنین استنباط می‌شود که یک مقدار دوز مناسب از هیالورونان برای افزایش تحرک سلول لازم است که در این مطالعه دوز ۷۵۰µg/ml بیشترین اثر را روی عامل مذکور نشان داد.

علاوه بر این در تحقیق حاضر تأثیر هیالورونان (۷۵۰µg/ml) روی عامل قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها نیز مطالعه شد و مشاهده گردید که افزودن دوز ۷۵۰µg/ml هیالورونان پس از ذوب روی قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها تأثیر مثبتی داشته و موجب افزایش آن می‌گردد. همچنین طبق مطالعات آماری انجام‌شده، افزودن دوز ۷۵۰µg/ml هیالورونیک اسید به نمونه‌ها قبل از انجماد، هیچ‌گونه تاثیری روی قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها نداشته و نتایج به‌دست‌آمده با گروه کنترل تفاوت معناداری ندارد. بنابراین نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که علی‌رغم اثر افزایش‌دهنده هیالورونان در روی زنده ماندن اسپرم، هنگامی که این ماده قبل از انجماد افزوده شود تأثیر مثبت خود را از دست می‌دهد و این نتیجه مشابه اثر آن در روی عامل تحرک می‌باشد. نتایج به‌دست‌آمده مشابه تحقیقی است که در این زمینه پینا و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام داده‌اند وگزارش کردند که هیالورونان، اسپرم‌های ذوب‌شده را در طی تکاملIn vitro محافظت کرده و موجب پایداری و استحکام غشای آن‌ها حتی بعد از انجام عمل انجماد و ذوب مجدد می‌شود (۱۴).

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

در پایان نتیجه‌گیری می‌شود که دوز ۷۵۰µg/ml هیالورونان موجب افزایش تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم موش پس از انجماد در محیط کشت می‌شود. طبق نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق افزودن هیالورونان پس از ذوب بیشترین تأثیر را در افزایش تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها پس از ذوب داشت. از طرفی با توجه به گزارش‌های متناقضی که در مورد زمان اضافه کردن هیالورونان در پروسه انجماد وجود داشت، دوز تحت آزمایش در دو مرحله قبل از انجماد و پس از ذوب با هم مقایسه شد. نتایج مطالعه نشان داد که احتمالاً انجماد موجب برهم ریختن ساختمان هیالورونان شده و مانع اثرگذاری آن در روی عوامل مذکور می‌شود.

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج حاصل از این تحقیق توصیه می‌شود در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی از دوز ۷۵۰µg/ml هیالورونیک اسید پس از ذوب اسپرم‌های منجمدشده موش سوری برای افزایش قابلیت باروری آن‌ها استفاده شود. ضمن این‌که با تکرار این آزمایش در روی اسپرم انسانی و تأیید آن می‌توان از نتایج آن در کلینیک‌های IVF بهره‌مند گردید.

Abstract

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

---

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

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

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

3. Professor in Anatomy, Tehran University of Medical Sciences

4.Statistician, TAT Organization

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

---

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

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

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

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

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

منابع

1. Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat Packs and Maxi-Straws. Anim Reproduct Sci 2000; 63:205-20

2. Koshimato C, Mazur P. The effect of osmolality of sugar-containing media on the survival of frozen-thawed mouse sperm. Cryobiol 2002; 45:80-90

3. Sanger WG, Olson JH, Shermman JK. Semen cryobanking for men with cancer criteria change. Fertil Stril 1992; 58:1024-27

4. Glander HJ, Schaller J. Hidden effects of cryopreservation on quality of human spermatozoa. Cell Tissue Bank 2000; 1(2):133-42

5. Sherman JK. Frozen semen- efficiency in artificial insemination and advantage in testing for acquired immune deficiency syndrome. Fertil Stril 1987; 47:19-24

6. Hsieh, et al. Cryopreservation of human sperm within mouse empty zona pellucida. Fertil Strel 2000; 79:694-702

7. Sztein JM, Farley JS, Mobraaten LE. In vitro fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm. Biol Reprod 2001; 63:1774-80

8. Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid improves retention of sperm motility and velocity in normospemic and oligospermic speciment. Fertil Steril 1990; 54:1127-33

9. Ranganathan S, Bharadwaj A, Datta K. Hyaluronan mediates sperm motility by enhancing phosphorylathon of proteins including hyaluronan binding protein. Cell Mol Res 1995; 41(5):467-76

10. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. Cell 1990; 61:1303-13

11. Hammond J. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa from the vagina. J Experiment Biol 1990; 7:175-91

12. Lokeshwar VB, SelzerM G. Hyaluronan activates cell motility of V-Src-Transformed Cells via Ras-Mitogen–Activated Protein Kinase and Phosphoinositide 3-Kinase-Akt in a tumor-specific manner. J Biol Chem 2001; 275:27641-49

13. Ilora G, Archana B, Kasturi D. Reduction in the level of hyaluronan binding protein 1(HABP1) is associated with loss of sperm motility. J Reproduct Immunol 2002; 53:45-54

14. Pena FJA, Johannisson M, Wallgren H. Rodriguez M. Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid architecture status after cryopreservation. Therogenol 2004; 61:63-70

15. Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa. Mammalian Genome 2000; 11:572-76

16. Hall CL, Collis L, Bo AJ, Lange L, McNicol A, Gerrard JM, Turley EA. Fibroblasts require protein kinase C activation to respond to hyaluronan with increased locomotion. Matrix Biol 2001; 20:183-92

17. Kornovski BS, McCshen J, Kredentser J Turly E. The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. Fertil Steril 1994; 58:599-602

18. Bakhtiari M, Sobhani A, Akbari M, Barbarestani M, Pasbakhsh P, Hedayatpur A. The effect of hyaluronic acid on motility, vitality and fertilization capability of mouse sperms after cryopreservation. Iran J Reproduct Med 2007; 5(2):45-50

۱۹. بختیاری میترا، سبحانی علیقلی، اکبری محمد، بربرستانی محمد، پاسبخش پریچهر، هدایت پور عظیم. بررسی اثر هیالورونان روی میزان لقاح اسپرم های موش سوری قبل از انجماد و پس از ذوب. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، آذر ۱۳۸۵؛ دوره ۶۴، شماره ۹، صفحات: ۱۹-۲۵

20. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. Hum Reprod 1997; 1(9):1949-54

21. Meyer MF, Kreil G. Cells expressing the DG42 gene from early xenopus embryossynthesize hyaluronan. Proc Natl Acad Sci 1996; 93:4543-47

22. Fraser JR, Laurent TC, and Laurent UB. Hyaluronan its nature, distribution, functions and turnover. J Intern Med 1997; 242:27-33

23. Gmachl M, Kreil G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. Proc Natl Acad Sci 2000; 90:3569-73

24. Tulsiani DR, Yoshida-Komiya H, Araki Y. Mammalian fertilization a carbohydrate-mediated event. Biol Reprod 2002; 57(3):487-94