مقاله مروری

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ٤، زمستان ۱۳۹٦

تازه‌های فریز اسپرم انسانی در درمان ناباروری: یک مطالعه مروری

مرضیه تولائی .Ph.D[1]*، بهاره ترکی بلداجی .M.Sc [2،1].لیلا آزادی .M.Sc[1]، محمد حسین نصراصفهانی .Ph.D [1و2]

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران

۲- مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Tavalaee.m@royaninstitute.org

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۹

چکیده

فریز موثرترین روش نگه‌داری طولانی مدت اسپرم است. روش‌های متعددی برای فریز – ذوب مایع منی وجود دارد که ممکن است هر کدام آسیب‌هایی را به عملکرد اسپرم، حیات اسپرم و در نهایت کیفیت و توانایی باروری وارد نماید. علاوه بر این‌که درصد حیات و تحرک اسپرم پس از فریز – ذوب کاهش می‌یابد، درصد آسیب DNA نیز به‌دلیل سطح بالای استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد. برای به حداقل رساندن این آسیب، ما باید بینش خود را در رابطه با روش‌های مختلف فریز، مکمل‌های آنتی اکسیدانت و حفظ فریز، افزایش دهیم تا بتوان غشای اسپرم را در طی فریز حفظ نمود و از طریق این درک، کارایی این روش‌ها را بهبود بخشید. در این مقاله مروری، در رابطه با اصول فریز، انواع روش‌های فریز-ذوب، مزایا و معایب هر یک از این روش‌ها، اثرات انجماد بر روی پارامترهای اسپرم، نتایج بالینی و در نهایت نقش آنتی اکسیدانت‌ها در حفظ یکپارچگی اسپرم در طی فریز-ذوب بحث شد. برای این مقاله مروری از اطلاعات و داده‌های مرتبط و حاصل از جستجوی پایگاه داده PubMed و موتور جستجوگر Google Scholar، بین سال‌های ۱۹۶۶ تا ۲۰۱۶، استفاده شد.

واژگان کلیدی: فریز اسپرم، ازت مایع، آسیب DNA، باروری، ترکیبات محیط فریز

مقدمه

تاریخچه فریز اسپرم انسان، به قرن ۱۸ و ۱۹ میلادی برمی‌گردد که برای اولین بار توسط اسپالانزای در سال ۱۷۷۶ و مانتگاز در سال ۱۸۶۶ انجام شد. اما این تکنولوژی در قرن ۲۰ توسعه پیدا کرد (۱) و در اواخر دهه ۱۹۴۰ (حدود ۷۰ سال پیش) امکان فریز اسپرم انسان مهیا شد. امروزه فریز اسپرم به‌ویژه در افراد مبتلا به سرطان، گونه‌های جانوری در معرض انقراض (۱،۲)، تکنیک‌های کمک باروری یا ART (Assisted Reproductive Techniques)، حفظ باروری و فعالیت‌های تحقیقاتی استفاده می‌شود (۳،۲). حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از زوج‌ها در سراسر جهان در حال تلاش برای درمان ناباروری و فرزنددار شدن هستند که ۵۰ درصد مشکلات این زوج‌های نابارور می‌تواند مرتبط با گامت اسپرم باشد (۴). بانک فریز اسپرم برای چند هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد: برای مردانی که باروری آن‌ها به‌واسطه وازکتومی، درمان با عوامل سیتوتوکسیک یا پرتودرمانی تحت تاثیر قرار گرفته است و یا افرادی که اسپرم آن‌ها به‌واسطه شغلشان در معرض آسیب است. به‌علاوه بانک‌های فریز می‌توانند برای ذخیره نمونه مایع منی در موارد زیر به‌کار بروند: ۱- در موارد ناباروری که در آن مرد نمی‌تواند میزان کافی یا مناسب اسپرم برای استفاده در ART فراهم کند ۲- در روز تخمک گیری، جمع آوری مایع منی به‌هر دلیلی ممکن نیست ۳- افراد آزواسپرمی که اسپرم آن‌ها با تکنیک‌های جراحی به‌دست می‌آید (۴،۵). با این‌حال توانایی لقاح اسپرمی که در دمای پایین نگه داشته می‌شود نسبت به اسپرم تازه کاهش می‌یابد. در فرآیند فریز، دمای سلول‌ها یا کل بافت تا زیر صفر درجه سانتی گراد کاهش می‌یابد که به‌طور معمول این دما ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد است که در نیتروژن مایع یا LN2 (Liquid Nitrogenl) انجام می‌شود (۴). ذخیره سازی طولانی مدت اسپرم از طریق مهار متابولیسم داخل سلولی انجام می‌شود، در واقع در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد، اساسا هیچ فعالیت بیوشیمیایی رخ نمی‌دهد که به‌دلیل عدم انرژی حرارتی کافی جهت واکنش‌های شیمیایی در این دما است. به‌علاوه محیط آبی که برای فعالیت‌های متابولیک ضروری است، وجود ندارد. قابل تشخیصی وجود ندارد، زیرا انرژی حرارتی کافی برای واکنش‌های شیمیایی در این دما در دسترس نیست و هیچ آب مایعی که برای فرآیندهای متابولیک ضروری است، نیز وجود ندارد (۴). با این‌حال، ممکن است بافت‌ها و سلول‌های زنده طی فرآیندهای فریز-ذوب دچار آسیب شوند (۴). اثرات منفی فریز در عملکرد اسپرم شامل: اختلال در تحرک، حیات، ساختار کروماتین، غشای پلاسمایی اسپرم، توانایی لقاح، رشد و نمو اولیه جنین، لانه گزینی و در نهایت کاهش میزان بارداری می‌باشند. همچنین اسپرم انسان در روش‌های فریز بسیار مستعد آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو است. آپوپتوزیس، مکانیسم دیگری است که می تواند سلامت اسپرم را در طول فریز به مخاطره بیاندازد (۳). بقای سلول بعد از فریز نه فقط دلالت بر آسیب ناشی از فرآیند فریز دارد، بلکه به فرآیند ذوب آن نیز بستگی دارد (۱). با توجه به مطالب بالا، هدف از مقاله مروری حاضر بررسی انواع روش‌های فریز، کاربردها، معایب و مزایای فریز اسپرم می باشد.

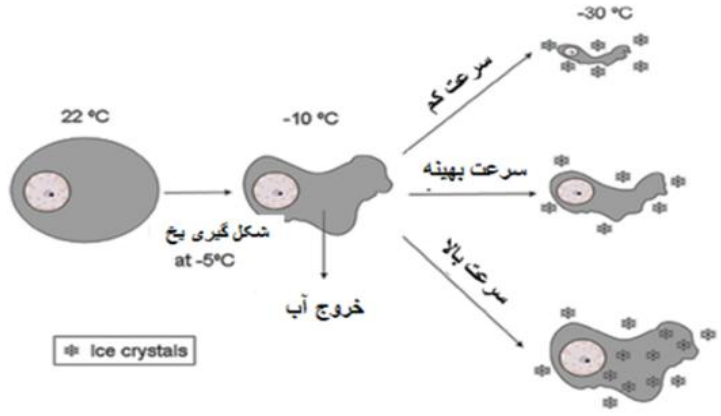
انواع تکنیک های فریز اسپرم

فریز آهسته (Slow Freezing): تکنیک فریز آهسته به‌وسیله بهرمن و سوادا پیشنهاد شده است (۶) که شامل سردکردن تدریجی اسپرم در طی یک دوره ۲ تا ۴ ساعته، در دو یا سه مرحله می‌باشد که با استفاده از دستگاه و یا از طریق بخار ازت مایع انجام می‌شود (۷). در هر یک از این دو روش، یک محیط شیمیایی با وزن مولکولی کم به یک نمونه مایع منی افزوده می شود تا از تشکیل یخ در سلول‌های اسپرم در طی فرآیند فریز جلوگیری شود. این مواد شیمیایی موجود در منجمدکننده‌ها، فشار اسمزی و pH را بهینه سازی کرده

و انرژی خارج سلولی اسپرم را تامین می‌کنند و به‌دلیل داشتن آنتی بیوتیک، آلودگی باکتریایی را مهار می‌کند (۲). در فریز آهسته، آب خارج سلولی به‌صورت بلورهای یخ منجمد شده و دو فاز ایجاد می‌کند که شامل کریستال‌های یخ از آب خالص و بخش غیرمنجمد که شامل تمام املاح، عوامل محافظ فریز یا CAP (Cryoprotective Agent) و سلول‌های نمونه می‌باشد (۸). تغییر در درجه حرارت باعث تغییر در وضعیت فیزیکی لیپیدهای غشای اسپرم شده که باعث می‌شود غشای اسپرم یک فاز گذر از حالت مایع به‌حالت ژل داشته باشد که می‌تواند باعث آسیب به غشای اسپرم شود. علاوه بر این، از دست دادن آب، در قالب یخ، اسمولاریته را در بخش غیر منجمد محلول افزایش می‌دهد که این مسئله نیز باعث آسیب سلولی می‌شود (۴). بنابراین از ایرادهای عمده این روش سرعت فریز است (۲) اگرچه تکنیک فریز آهسته دارای برخی مشکلات است ولی هنوز روشی معمول برای نگه‌داری طولانی مدت اسپرم‌ها در برخی مراکز درمانی و تحقیقاتی می‌باشد (۱).

فریز سریع(Rapid Freezing): فریز سریع یا شیشه‌ای برای اولین بار توسط شرمن (۹) ارائه شده است. در پروتکل فریز سریع، بعد از این‌که محیط انجماد به نمونه اضافه شد، نمونه درون نی‌ها، لود می‌شود و در فاصله ۱۵ تا ۲۰ سانتی متری از نیتروژن مایع (فاز بخار نیتروژن مایع با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد) به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار می‌گیرند و سپس در نیتروژن مایع فرو برده می‌شوند. فاز بخار نیتروژن مایع با توجه به فاصله و حجم نیتروژن مایع در زیر آن یک شیب حرارتی ایجاد می‌کند. عدم مهارت در کنترل سرعت فریز ممکن است باعث تغییر در کیفیت اسپرم پس از ذوب شود (۲). در طول فریز سریع، آب به‌صورت ساختاری شیشه مانند و نه یخ، منجمد می‌شود (۱۰). سرعت فریز در این روش بالا است و از این طریق آسیب کمتری به سلول وارد می‌شود و دارای مزایای بیشتری نسبت به فریز آهسته می‌باشد. بدین‌ترتیب که حداقل تجهیزات مورد نیاز است و در زمان کوتاه‌تری قابل انجام است. با این حال اسپرم فریز شده با این روش دارای کیفیتی مشابه با روش فریز آهسته و یا حتی بالاتر می‌باشد (۴).

در هر یک از این دو روش، اگر سرعت فریز بیش از حد زیاد باشد، آب داخل سلولی به‌طور کامل به بیرون جریان نمی‌یابد و در داخل سلول فریز می‌شود و کریستال‌های یخ در داخل سیتوپلاسم شکل می‌گیرد که در نهایت باعث آسیب‌هایی در سلول می‌شود (۱۱). شکل‌گیری کریستال یخ در داخل سلول نه تنها به‌سرعت فریز بستگی دارد بلکه به غلظت CPA ها در محیط فریز نیز بستگی دارد. استفاده از این عوامل محافظتی باعث کاهش شکل گیری کریستال‌های یخ در داخل سلول می‌شوند. در حالی‌که اگر فرآیند فریز به کندی انجام شود آب فرصت کافی برای خارج شدن از سلول را دارد و در این‌حالت سلول کاملا دهیدراته شده و حجم سلول و اندامک‌های درون آن کم می‌شود و غلظت املاح درون سلولی قبل از این‌که به دمای فریز برسند، افزایش می‌یابد (شکل ۱)(۱). این وضعیت کمپلکس پروتئین و لیپید غشا را تحت تاثیر قرار می‌دهد و باعث دناتوره شدن ماکرومولکول‌ها، کاهش اندازه کانال‌ها و القای غیرقابل برگشت انتشار (۱۲) و در نتیجه استرس هیپرتونیک می‌شود که می‌تواند تعادل الکترولیت‌ها را برهم زده و منجر به متورم شدن بیش از حجم طبیعی (ایزوتونیک) شود و متعاقب آن سلول لیز شود. اما اگر فریز با سرعت بهینه انجام شود آسیب کمتری به سلول وارد می‌شود، در این روش سرعت فریز به اندازه کافی کم است تا از شکل گیری یخ در داخل سلول جلوگیری کند و به اندازه کافی زیاد است تا آسیب ناشی از به هم خوردن تعادل املاح و الکترولیت‌ها را در سلول به حداقل برساند (شکل ۱) (۱).



شکل۱: اثرات مختلف سرعت انجماد بر روی سلول

فریز برنامه ریزی شده (ProgrammableFreezing): فقدان کنترل برسرعت فریز در هر دو روش فریز آهسته و سریع را می‌توان با استفاده از یک فریز خودکار برنامه ریزی شده، جایگزین کرد. این روش در واقع نوع برنامه ریزی شده فریز آهسته است. در این روش نمونه‌ها بر روی یک صفحه در فریزر بارگذاری شده و یک برنامه فریز انتخاب می‌شود و درجه حرارت به‌طور خودکار تنظیم می‌شود (۲) و دستگاه، پس از برنامه ریزی با استفاده از نرم افزار ورودی داده ها جهت سرد کردن نمونه از ۲۰ تا ۸۰- درجه سانتی‌گراد با میزان ۱/۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و سپس با میزان ۶ درجه سانتی‌گراد در دقیقه نمونه را سرد و منجمد می‌کند. در تکمیل فرآیند فریز، نی‌ها در نیتروژن مایع در ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد ذخیره می‌شود. این فرآیند حدود ۴۰ دقیقه طول می‌کشد (۲،۱۳). ایراد اصلی فریز با این روش این است که این روش فقط زمانی مفید است که به تعداد زیادی از نمونه‌ها دسترسی داشته باشیم. از ایرادات دیگر این است که، در این روش، گرما (حرارت نهان ذوب) از خود نمونه‌ها آزاد می‌شود که به‌طور قابل توجهی دمای صفحه را تغییر می‌دهد و باعث تاخیر در سرعت خنک شدن می‌شود. این تاخیر در خنک سازی ممکن است برای اسپرم مضر باشد (۲). برخی از محققان بر این باورند که فریز آهسته چه به‌صورت دستگاهی و یا دستی، باعث آسیب‌های وسیع شیمیایی و فیزیکی به سلول شده، که احتمالا به‌دلیل تشکیل بلورها یا کریستال‌های یخ می باشد (۱۴).

فریز خشک (Lyophilization): این روش جدیدترین روش فریز برای حفظ اسپرم است. اساس این روش، شامل حذف تمام رطوبت و یا مولکول‌های آب در یک نمونه مایع منی است که این روش عمدتا در حفاظت از مواد غذایی و داروها انجام می‌شود. این روش شامل فریز نمونه زیر نقطه سه گانه (نقطه سه گانه درجه حرارتی است که در آن جامد، مایع و حالت گازی از یک ماده، هم‌زمان وجود دارد) و سپس کاهش فشار هوای محیط اطراف نمونه است. با این روش بعد از فریز آب نمونه و تبدیل شدن آن به یخ پس از کاهش دما، این یخ به‌طور مستقیم به گاز تبدیل می‌شود و از نمونه متصاعد می‌شود. متاسفانه، این روش اثر مخربی بر غشای اسپرم می‌گذارد و در نتیجه باعث کاهش تحرک و حیات پس از ذوب می‌شود. اما سلامت کلی ژنوم سلول در این روش حفظ می‌شود و با این روش نسبت به فریز در نیتروژن مایع، آسیب کمتری به DNA وارد می‌شود. بزرگترین مزیت این روش این است که نمونه لیوفیلیزه را می‌توان در ۴ درجه سانتی گراد ذخیره کرد و در دمای اتاق از فریز برگرداند. علاوه بر

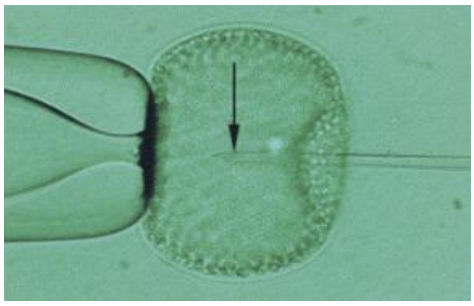
این، فریز خشک ویروس‌ها را غیرفعال می‌کند. اما در حال حاضر، با توجه به عدم وجود مطالعات انسانی استفاده از این روش محدود است (۲).

فریز کوتاه مدت: فرآیند فریز ممکن است باعث آسیب DNA و کاهش کیفیت اسپرم شود، زحمت فراوانی دارد و به‌طور بالقوه خطرناک است، اما به‌صورت روتین و تجاری در دام انجام می‌شود. یک مطالعه فریز کوتاه مدت اسپرم را با استفاده از محیط عاری از الکترولیت یا FEM (Free Electrolyte Medium)، به‌مدت یک هفته، با روش‌های معمول فریز اسپرم مورد مقایسه قرار داد. در روش فریز اسپرم با استفاده از FEM پارامترهای اسپرمی مانند تحرک، حیات و سلامت کروماتین کمتر تحت تاثیر قرار می‌گیرند. در واقع، اسپرم ذخیره شده در محیط FEM، چهار هفته زمان می‌برد تا قطعه قطعه شدن DNA اسپرم به سطح معادلش در روش معمول فریز برسد. در مطالعات حیوانی ذخیره اسپرم در محیط FEM منجر به باروری شده ولی در رابطه با انسان قطعیتی وجود ندارد. علاوه بر این، در تکنیک ICSI (Intera Cytoplasmic Sperm Injection) که بیشتر مواقع در آن کیفیت اسپرم بیماران مناسب نمی‌باشد ذخیره سازی درFEM پتانسیل این را دارد که جایگزین فریز برای ذخیره سازی کوتاه مدت اسپرم شود تا پارامترهای اسپرمی کمتر تحت تاثیر قرار بگیرند، اما نیاز به مطالعات انسانی بیشتر است (۲).

فریز نمونه های دارای حجم و مقدار کم: میزان لقاح و حاملگی در افراد نابارور و آزواسپرمی انسدادی و غیر انسدادی که اسپرم تازه یا فریز استفاده شده بود، یکسان گزارش شده است (۱۵) بنابراین فریز اسپرم‌های بازیابی شده از طریق جراحی میکروتسه (Micro-TESE) و بیوپسی (Biopsy) در این بیماران مفید است و نتایج تنها به نوع آزواسپرمی، نه خود روش فریز آن بستگی دارد (۱۶). فریز معمولی اسپرم بازیابی شده از بیضه بازده‌ای به‌میزان تنها ۱ درصد در تکنیک‌های ART دارد (۱۷) از این‌رو، نیاز به تکنیک‌های خاص برای ذخیره سازی نمونه‌هایی با اسپرم‌های کم است. علاوه بر این، اگر اسپرم بازیابی شده برای ICSI در حجم زیادی از منجمد کننده‌ها که در روش‌های معمول به‌کار می‌رود رقیق شوند می‌تواند مشکلاتی را به‌همراه داشته باشد (۱۸). حامل‌های مختلف در فریز نمونه‌های با مقادیر کم اسپرم استفاده شده است که این حامل‌ها به‌طور کلی به دو گروه بیولوژیکی و غیربیولوژیکی تقسیم می‌شوند. حامل‌های بیولوژیکی شامل زونا پلوسیدای خالی، اسفیرهای جلبک ولوکس گلوباتور و حامل‌های غیر بیولوژیکی شامل کرایولوپ، میکرودرابلت‌ها، نی‌ها و پیپت ICSI می‌باشند (۲) که در ادامه به توضیح آن‌ها پرداخته شده است.

- **زونا پلوسیدای خالی** (Empty zona Pellucida): تعداد کمی از اسپرم‌ها می‌توانند به‌طور موثر در زونا پلوسیدای تهی شده ذخیره شوند. در طی این روش یک تخمک انسان یا حیوان با استفاده از تکنیک دستکاری میکروسکوپی از محتویات سیتوپلاسمی تهی می‌شود و سپس اسپرم انتخاب شده با استفاده از یک پیپت مورد استفاده در تکنیک ICSI در زوناپلوسیدا قرار داده می‌شود (۱۹). سوراخ مورد نیاز برای حذف محتویات سیتوپلاسمی می تواند با استفاده از انواع پروتکل از جمله تکنیک‌های لیزر ایجاد شود (۲۰). فریز در زونای خالی به‌طور قابل توجه ای بازیابی اسپرم را پس از ذوب شدن بهبود می‌دهد و موجب حفظ تحرک و سلامت DNA و کروماتین اسپرم می‌شود که موجب شده این روش را به یک روش عالی برای ذخیره سازی نمونه های کوچک اسپرم تبدیل کند (۲).
- **اسفیرهای ولوکس گلوباتور(Volvox Globator Spheres)**: اسفیرهای ولوکس گلوباتور، کلونی‌های کروی شکل تشکیل شده توسط جلبک ولوکس گلوباتور هستند. در سال ۲۰۰۴ در یک مطالعه نشان داده شد که تعداد کمی از اسپرم‌ها را می‌توان در این کلونی‌ها منجمد کرد. به این‌صورت که اسپرم انتخاب شده با استفاده از یک پیپت ICSI (شکل ۲) به‌درون این حوزه‌های موجود در یک محیط حاوی منجمد کننده‌ها هدایت می‌شوند و

سپس با استفاده از یک پروتکل معمولی فریز اسپرم منجمد می‌شوند. میزان بازیابی اسپرم‌ها پس از ذوب با استفاده از این روش ۱۰۰ درصد و تحرک در حدود ۶۰ درصد بوده است (۲۱)



شکل۲: هدایت اسپرم با استفاده از یک پیپت ICSI به‌درون یک کلونی جلبک ولوکس به‌عنوان یک حامل زیستی

- **کرایولوپ:** کرایولوپ متشکل از یک حلقه نایلونی است (شکل ۳) که می‌تواند حجم کوچکی از نمونه اسپرمی را با استفاده از عمل مویرگی به دام بیاندازد. این کرایولوپ‌ها ابتدا برای ذخیره سازی جنین‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفتند اما امروزه این روش برای ذخیره سازی حجم کمی از نمونه‌های اسپرمی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش در سال ۲۰۰۳ مورد مطالعه قرار گرفت. مزایای استفاده از این روش شامل سهولت بازیابی و عدم قرار گرفتن در معرض محصولات حیوانی می‌باشد. از آنجایی‌که نایلون یک ماده خنثی، بی خطر و ایمن است، سطح تماس کمی بین نمونه و نایلون در کرایولوپ ایجاد می‌شود که چسبیدن اسپرم به کرایولوپ و از دست دادن اسپرم در نمونه کوچک را به حداقل می‌رساند. ایراد عمده‌ی این روش این است که یک سیستم باز است و در نتیجه در طول ذخیره سازی در LN2 احتمال آلودگی وجود دارد (۲۲،۲۳).

شکل ۳: کرایولوپ

- **میکرودراپلت‌ها (Microdroplets)**: حجم کمی از اسپرم مخلوط شده با CPA می‌تواند به‌سرعت بر روی یخ خشک یا در فولاد ضد زنگ سرد شده که به فرم میکرودراپلت شکل گرفته اند، به‌سرعت منجمد شوند. این قطرات می‌توانند برای ذخیره سازی به LN2 هدایت شوند. در یک مطالعه، از این روش ذخیره سازی اسپرم یک حاملگی بالینی گزارش شد و میزان لانه گزینی در این روش شبیه به کسانی است که از نمونه‌های تازه اسپرم استفاده کرده بودند (۲۴).
- **نی‌ها و پیپت ICSI**: حجم کمی از اسپرم نیز می‌تواند در نی باز، نی کشیده باز و نی‌های کوتاه ذخیره شوند. ذخیره سازی اسپرم با استفاده از پیپت ICSI نیز مورد بررسی قرار گرفته است. میزان بازیابی و تحرک اسپرم پس از ذوب شدن در این روش به‌ترتیب ۵۲ و ۹۰ درصد گزارش شده است. حتی اگر پیپت ICSI برای ذخیره سازی تعداد کمی از اسپرم مفید باشد، آن‌ها معمولا شکسته شده و خطر آلودگی را افزایش می‌دهد (۲).

همه‌ی تکنیک‌های توصیف شده در بالا کم و بیش و با شدت‌های مختلفی به اسپرم آسیب وارد می‌کنند و نزدیک به نیمی از اسپرم‌های منجمد شده دچار آسیب‌های برگشت ناپذیری در طی فریز می‌شوند. علاوه بر این، باروری اسپرم منجمد شده کمتر از مایع منی تازه است، این امر می‌تواند یک مشکل بالقوه برای حفظ نمونه اسپرم بیماران، به‌منظور حفظ باروری باشد (۲۶،۲۵). لذا ضروری به‌نظر می‌رسد که در ادامه به تاثیرات ترکیبات موجود در منجمد کننده‌ها و علت آسیب‌های وارده در طی فریز پرداخته شود.

ترکیبات موجود در منجمد کننده ها

این عوامل بر اساس توانایی در نفوذ به اسپرم به‌دو گروه نفوذپذیر و نفوذناپذیر تقسیم می‌شوند.

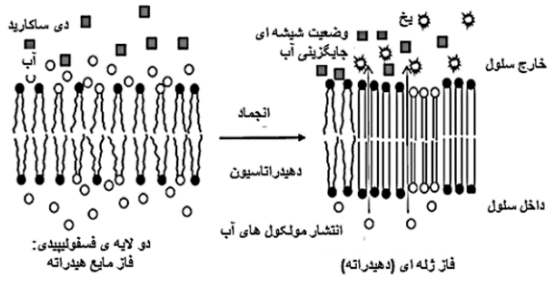
الف- عوامل نفوذناپذیر: عوامل نفوذ ناپذیر شامل پروتئین‌های موجود در شیر و زرده تخم مرغ، قندها و ترکیباتی با وزن مولکولی بالا مانند پلی ونیل پیرولیدون (Polyvinylpyrrolidone)، نشاسته، هیدروکسی اتیل (Hydroxyethyl Starch)، پلی اتیلن گلیکان ها (Polyethyleneglycols) و دکسترانها (Dextrans) می‌باشند که از شکل گیری یخ جلوگیری می‌کنند و موجب تثبیت پروتئین‌ها و غشای سلولی می‌شوند. این ترکیبات قادر به عبور از غشا نیستند و نقش خود را در خارج سلول اعمال می‌کنند و عمدتا محتوی قندهایی نظیر دی ساکاریدها (لاکتوز و ترهالوز) می‌باشند که نسبت به منوساکاریدها نتایج بهتری را نشان می‌دهند. پروتئین زرده تخم مرغ حفاظت بهتری را در فرآیند فریز برای اسپرم ایجاد می‌کند. زرده تخم مرغ دارای لیپوپروتئین‌هایی با چگالی کم (LDL) هستند که اثرات مفیدی بر کیفیت اسپرم و سلامت DNA بعد از فریز- ذوب دارند. لیپوپروتئین‌هایی با چگالی کم که از زرده تخم کبوتر گرفته می‌شود دارای اثرات حفاظتی بیشتری نسبت به LDL های استخراج شده از تخم مرغ، شتر مرغ، اردک و بلدرچین است. لسیتین سویا می‌تواند یک جایگزین برای پروتئین زرده تخم مرغ باشد که مطالعات مختلف با نتایج متفاوتی بر روی آن انجام شده است. اما، مطالعات در مورد اسپرم انسان و اثرات پروتئین زرده تخم مرغ و لسیتین سویا بر کیفیت اسپرم، سلامت DNA و توانایی اسپرم در اتصال با اسید هیالورونیک نشان دادند که اختلافی بین زرده تخم مرغ و لسیتین سویا در حفاظت اسپرم وجود ندارد (۱).

ب- عوامل نفوذپذیر: عوامل نفوذپذیر شامل گلیسرول (Glycerol)، DMSO، اتیلن گلیکول (Ethylene Glycol)، متانول (Methanol)، پروپیلین گلیکول (Propylene Glycol) و دی متیل استامید (Dimethylacetamide) می‌باشند. این مواد قادر به نفوذ به درون غشاء اسپرم هستند، اما ترکیباتی مثل DMSO، در غلظت‌های بالا سمی هستند (۲۷). مکانیسم عمل این ترکیبات مربوط به کاهش غلظت الکترولیت‌ها و تا حدی کاهش فشار اسمزی در دماهای پایین می‌باشد (۲۸). مشخصا این عوامل ویسکوزیته سیتوپلاسم را تحت

تاثیر قرار داده و سرعت انتشار را تغییر می‌دهند و از طریق جاگیری در لیپید دو لایه غشا باعث تغییر خواص غشاء سلولی می‌شوند (۱۵). اما این مواد ممکن است باعث آسیب غشا و تغییرات فشار اسمزی در دماهای بالاتر از ۵ درجه سانتی گراد شوند. به همین دلیل است که یک نارضایتی از آن‌ها وجود دارد و باید در طی ذوب به‌سرعت حذف شوند (۲۹) در نهایت می‌توان گفت که مناسب بودن CPA ها برای حفاظت از فرآیند فریز بستگی به توانایی آن‌ها در نفوذ به سلول، نوع سلول و همچنین غلظت آن‌ها دارد (۲۷). گلیسرول که یک CPA نفوذپذیر است در غلظت ۲ تا ۳ درصد اثرات بهینه دارد و در غلظت بالای ۴ درصد می‌تواند روی تکای دور هسته اسپرم‌ها اثر بگذارد، به‌همین دلیل تلاش‌هایی برای جایگزین کردن آن با ترکیبات دیگر شده است. مطالعات نشان داده است که جایگزینی آن با ترهالوز، حرکت اسپرم را افزایش داده و باعث افزایش سلامت آکروزوم و پتانسیل غشای میتوکندری می‌شود. جایگزین کردن گلیسرول و لاکتوز با پودر آب نارگیل و دی متیل فورم آمید، کیفیت اسپرم را پس از ذوب افزایش می‌دهد. از طرفی CPA های نفوذپذیر دیگر، نظیر دی متیل استامید و DMSO نتایج بدتری نسبت به گلیسرول دارند (۱). معمولا محیط محافظ فریز اسپرم در حجم مساوی از مایع منی به‌صورت قطره قطره اضافه شده، به‌آرامی در دمای اتاق مخلوط شده، و پس از آن به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت برقراری تعادل مناسب بین سلول‌ها و محیط قرار می‌گیرد. این امر جهت تعامل محیط با سلول لازم می‌باشد. در واقع، اثر حفاظتی محیط فریز اسپرم تابعی از زمان تعامل بین محیط فریز و سلول‌های اسپرمی می‌باشد. اگر چه بیشتر محیط‌های نگه‌دارنده، اسپرم را از نظر کیفیت تا حدودی حفظ می‌کنند، ولی انتخاب بهترین محیط و بهترین روش نیاز به بررسی‌های بسیار زیاد دارد (۱).

اثرات فریز بر عملکرد اسپرم

اثرات فریز بر غشاء پلاسمایی اسپرم: غشای پلاسمایی به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه ای که دارد، نسبت به فرآیند فریز-ذوب بسیار حساس است. شوک سرمایی می‌تواند باعث اثرات سوء، ناشی از بی ثباتی غشای پلاسمایی در دمای پایین تر از ۵ درجه سانتی گراد شود. این بی ثباتی می‌تواند بر هومئوستازی یون کلسیم و سلامت آکروزوم تاثیر گذاشته و موجب اختلال در غشای لیپیدی شود. غشا از دو لایه فسفولیپید تشکیل شده است که متشکل از سرهای آبدوست و زنجیره آسیل آبگریز می‌باشد که باعث سیالیت غشا می‌شوند. تحت شرایط طبیعی و فیزیولوژیکی، غشا در یک فاز به نام فاز سیال-مایع-کریستالی قرار دارد و در این شرایط نسبت به مواد محلول مانند دی ساکاریدها نفوذ ناپذیر است، در حالی‌که آب می‌تواند آزادانه از عرض غشاء سلولی منتشرشود. یک تغییر در غلظت استرول‌های غشاء (مانند کلسترول) باعث خروج غشا از حالت سیال شده و در این حالت از فاز مایع و سیال به فاز ژله ای تغییر می‌یابد (شکل ۴).



شکل٤: تصویر شماتیک از تغییرات فاز غشا که در طی فریز رخ می‌دهد

با این تغییر ساختاری، غشا در مقابل سرما آسیب پذیرتر می‌شود زیرا باعث اختلال در واکنش بین پروتئین‌های غشا با لیپیدهای آن، تغییر مکان کانال‌های یونی و کاهش عملکرد نفوذپذیری انتخابی غشا می‌شود، بنابراین جریان یون‌هایی نظیر کلسیم و بی‌کربنات را تحت تاثیر قرار می‌دهد. این تغییرات ممکن است علاوه بر این اختلال در عملکرد غشا، غیرقابل برگشت نیز باشند (۱،۳۰). در طی فرآیند فریز، سیالیت غشا کاهش می‌یابد و با خروج آب داخل سلولی به خارج و تشکیل یخ، غلظت مواد داخل سلولی افزایش می‌یابد. پس از حذف آب از گروه سر فسفولیپید، فسفولیپیدها با افزایش پیوندهای واندروالس بین گروه CH- زنجیره‌های آسیل تبدیل به فاز ژله ای می‌شوند. قندهای غشا که دارای گروه‌های OH- هستند در جایگزینی آب پس از دهیدراتاسیون غشا دخیل هستند. سپس تحت دمای مورد نظر حالت شیشه ای یا منجمد تشکیل می‌دهند (شکل ۴) (۳۰).

اثرات فریز بر هسته اسپرم: مطالعات پیشین اذعان داشتند که آسیب DNA اسپرم در افراد نابارور به‌طور معنی‌داری بالاتر از افراد بارور می‌باشد و در صورتی‌که اسپرم این افراد فریز شود به مراتب آسیب DNA بیشتر خواهد شد (۳۱). مطالعات انجام شده در این زمینه، مکانیسم اثرات فریز بر هسته اسپرم به‌ویژه کروماتین را بررسی می‌کنند. کروماتین اسپرم از DNA و نوکلئوپروتئین‌ها، عمدتا پروتامین (P1 و P2) و درصد کمی هم هیستامین تشکیل شده است (۳۲). نوع پروتامین‌ها و همچنین نسبت P1 به P2 بین گونه‌های مختلف یکسان نیستند که این می‌تواند برمیزان مقاومت هسته نسبت به‌روش فریز-ذوب اثر گذار باشد. فریز اسپرم می‌تواند بر مکان و توزیع پروتامین‌ها اثرگذارد. اگرچه این اثرات پس از پایان فریز از بین می‌روند اما تعامل پل‌های دی سولفیدی سیستئین با پروتامین‌ها به منزله اسکلت استخوانی کروماتین پس از ذوب نیز مختل می‌شود (شکل ۵) (۱). میزان آسیب وارد شده به اسپرم، به توانایی خود اسپرم نیز بستگی دارد. با توجه به آنکه قطعه قطعه شدن DNA یک نگرانی محسوب می‌شود، تاثیر آن بر عملکرد تولید مثلی اسپرم بارز می‌باشد (۳۳). از جمله علل اصلی آسیب DNA اسپرم، می‌توان به افزایش سطح استرس اکسیداتیو، کمبود پروتامین در طی بسته بندی کروماتین و آپوپتوز اشاره نمود و این نقایص می‌تواند با میزان لقاح و باروری در افراد نابارور مرتبط باشد (۳۴). بررسی‌ها بر روی اسپرم خوک نشان داده اند که قطعه قطعه شدن DNA بلافاصله پس از ذوب به‌طور قابل توجه ای افزایش نمی‌یابد و زمانی این آسیب بیشتر آشکار می‌شود که فریز-ذوب در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به‌مدت حداقل ۲ ساعت انجام شود (۳۵،۳۶). آسیب‌های DNA که در ارتباط با فرآیند فریز هستند در گونه‌هایی که دارای پروتامین P1 و P2 هستند بیشتر از گونه هایی است که در کروماتین خود فقط پروتامین P1 را دارند (۳۷). اگرچه فریز اسپرم تا حد زیادی می‌تواند بر سلامت اسپرم و تراکم کروماتین آن در انسان و اسب اثر بگذارد، اما تاکنون هیچ اثری بر اسپرم سگ‌ها گزارش نشده است. تاکنون مکانیسم‌هایی که علت افزایش قطعه قطعه شدن DNA را پس از فریز توضیح دهد، مشخص نشده اما به‌نظر می‌رسد که در ارتباط با افزایش آسیب اکسیداتیو DNA باشد. همچنین در انسان، فریز اسپرم باعث اختلال در ژن‌های مهم دخیل در لقاح و رشد و نمو جنین می‌شود که از مهمترین این ژن ها می‌توان به *SNORD116/ PWSAS* و *UBE3A* اشاره کرد (۱). برخی از محققان گزارش کردند که فرآیند فریز منجر به تغییر در ساختار کروماتین شده که در اصطلاح تراکم بیش از حد کروماتین گفته می‌شود (۳۸). این تراکم بیش از حد، به افزایش تشکیل باندهای دی‌سولفید نسبت داده شده که منجر به یک خطر بالقوه از عدم باز شدن تراکم هسته اسپرم پس از تزریق به‌داخل تخمک و در نتیجه، کاهش میزان لقاح می‌شود (۳۹). از طرفی این حقیقت ثابت شده که انکوباسیون نمونه اسپرم پس از ذوب با افزایش آسیب DNA همراه بوده و پروسه فریز-ذوب تغییرات غیرقابل برگشتی را در سلامت ژنوم اسپرم ایجاد

می‌کند (۳۸). دو عامل می‌تواند منجر به آسیب DNA اسپرم در اثر فریز-ذوب شود: الف) شوک سرمایی، ایجاد استرس اکسیداتیو و به‌دنبال آن آزاد شدن رادیکال های آزاد که می تواند منجر به آسیب DNA اسپرم شود. همچنین با افزایش تولید ROS، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانت‌ها کاهش یافته و DNA را مستعد آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو می کند. ب) روند فریز باعث القاء فرآیند آپوپتوزیس می‌شود که به‌دنبال آن کاسپازها فعال شده و اندونوکلئازهای اختصاصی باعث قطعه قطعه شدن DNA اسپرم می‌شود. اخیرا گزارش شده که آسیب DNA اسپرم مستقل از کاسپازها صورت گرفته و مسیر آپوپتوز یک نقش جزئی در القاء آسیب DNA در اسپرم منجمد و ذوب شده دارد. استرس اکسیداتیو در ایجاد آسیب DNA در اسپرم منجمد و ذوب شده نسبت به آپوپتوزیس سهم عمده‌ای دارد (۴۰). اختلاف در نتایج حاصل از مطالعات در تحقیقات مختلف می‌تواند به‌علت تفاوت در تعداد نمونه‌های مورد بررسی، روش فریز، روش بررسی آسیب DNA، گونه مورد نظر، روش‌های آماده سازی نمونه قبل از فریز و غیره باشد.

اثرات فریز بر غلاف دور هسته ای: غلاف دور هسته‌ای منطقه ای است که دور هسته اسپرم را احاطه می‌کند و شامل پروتئین‌های اسکلتی و بسیار مهمی است که سلامت آن‌ها برای حفظ ساختار سر اسپرم و فرآیند لقاح بسیار اهمیت دارند. غلاف دور هسته ای در اسپرم پستانداران، باز شدن طبیعی کروماتین اسپرم پس از ورود به تخمک و تشکیل پرونوکلئوس‌های پدری را در لقاح تضمین می‌کند. در این راستا تحقیقات نشان داده اند که فریز اسپرم باعث آسیب این منطقه و تغییر در ثبات F-اکتین‌ها و در نهایت اختلال در بین غلاف و اسکلت اکتینی می‌شود (۱). این امر نه تنها موجب به‌هم خوردن ساختار غلاف می‌شود بلکه باعث دکاندنس شدن هسته می شود. اخیرا آنالیزهای میکروسکوپ الکترونی از اسپرم گراز منجمد و ذوب شده نشان داده است که شکست شدیدی در ساختار غلاف دور هسته‌ای وجود دارد. طی فریز، صدمه به اسپرم منجر به حذف پروتئین‌های غلاف دور هسته ای شده که این امر می‌تواند باز شدن تراکم طبیعی اسپرم در لقاح را مختل کند (۳۸).

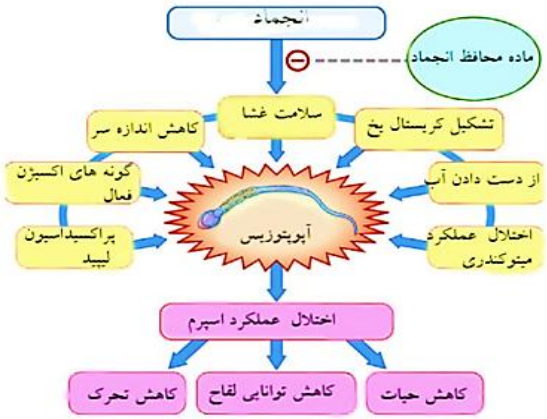
اثر فریز بر تحرک اسپرم و عملکرد میتوکندری: تحرک اسپرم نیز یکی دیگر از پارامترهای اسپرمی است که تحت تاثیر فریز اسپرم قرار می‌گیرد. شاید مکانیسم دقیق کاهش تحرک اسپرم در طی فرآیند فریز هنوز مشخص نیست اما اثر مخرب فریز بر میتوکندری و غشا پلاسمایی اسپرم می‌تواند منجر به کاهش تحرک اسپرم در طی فرآیند فریز شود. میتوکندری در امتداد قسمت میانی اسپرم بوده و انرژی لازم برای تحرک اسپرم را ایجاد می‌کند (۵). انرژی مورد نیاز اسپرم به شکل سنتز ATP یا با گلیکولیز در سیتوپلاسم عرضه می‌شود و یا از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو (OXPHOS) در میتوکندری تامین می‌شود (۱،۴۱). مولکول ATP که توسط فسفوریلاسیون اکسیداتیو در غشا داخلی میتوکندری ایجاد می‌شود جهت راه‌اندازی حرکت، به میکروتوبول‌ها انتقال داده می‌شود. بنابراین، با توجه به اینکه بیشتر مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت میتوکندری پس از فریز – ذوب کاهش می‌یابد (۵،۴۲) بنابراین اختلال در فعالیت میتوکندری ممکن است با کاهش در تحرک همراه باشد (۵). اگرچه مطالعات متعدد این پارامترها را به‌صورت جداگانه اندازه‌گیری کرده اند اما هیچ‌کدام تمام پارامترهای اسپرمی را در جمعیت‌های اسپرمی مشابه و تحت شرایط یکسان، اندازه گیری نکرده اند بنابراین نمی‌توان گفت که کاهش تحرک اسپرم به‌طور کامل در ارتباط از دست دادن عملکرد میتوکندری است. زیرا برخی مطالعات منبع اصلی انرژی برای تحرک را گلیکولیز و نه OXPHOS عنوان می‌کنند، به‌طوری که کاهش تحرک پس از فریز-ذوب را نمی‌توان به سادگی ناشی از اختلال در متابولیسم میتوکندری دانست (۵) از طرف دیگر اختلال در عملکرد میتوکندری و تغییر در متابولیسم انرژی پس از فریز-ذوب

ممکن است تحت تاثیر آسیب غشاء و اختلال در عملکرد آن باشد (۱). تغییر در سیالیت غشاء میتوکندری نیز ممکن است منجر به تغییر در پتانسیل غشاء میتوکندری و آزاد شدن ROS شود (۷). آسیب پراکسیداتیو ناشی از افزایش غلظت ROS بوده که منجر به آسیب به غشا پلاسمایی اسپرم و اختلال در ساختار آکسونمال و کاهش تحرکت اسپرم می‌شود (۴۳). در نتیجه برای ارائه مکانیسم دقیق برای توضیح اثرات فریز-ذوب بر عملکرد میتوکندری مطالعات بیشتری نیاز می‌باشد.

اثر فریز بر مورفولوژی اسپرم: مورفولوژی اسپرم نیز از دیگر پارامترهایی است که تحت تاثیر فریز اسپرم قرار می‌گیرد و تعداد اسپرم ها با مورفولوژی طبیعی پس از فریز به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابند. بر اساس برخی مطالعات، در همه نمونه‌های منجمد شده ناهنجاری‌های مربوط به دم و سر به‌طور قابل توجه ای افزایش پیدا می‌کنند (۵،۴۴).

فریز و آپوپتوزیس

افزایش سطح ROS و کاهش آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی منجر به آپوپتوزیس (مرگ برنامه‌ریزی شده) سلولی می‌شود (شکل ۵) (۴۵).



شکل ۵: عوامل ایجاد آپوپتوزیس در اثر فریز و نتایج آن

در این زمینه آبشار آپوپتوز با فعال شدن پروتئین‌های خانواده BCL_2 راه‌اندازی می‌شود. نفوذپذیری غشاء خارجی میتوکندری افزایش یافته و دو پروتئین Bax و BAK منجر به آزاد شدن سیتوکروم c (Cytochrome-c) می‌شوند (۴۶). به‌نوبه خود، کاسپاز ۹ به‌همراه APAF-1 فعال شده تشکیل یک آپوپتوزوم (Apoptosome) را می دهد (۴۷). انتشار عوامل القای آپوپتوزیس از میتوکندری منجر به قطعه‌قطعه شدن DNA می‌شود. به‌نظر می‌رسد میزان آپوپتوزیس در اسپرم مربوط به نوع محیط محافظ فریزی استفاده شده و پروتکل‌های فریز- ذوب باشد. از جمله علائمی که نشان‌دهنده آپوپتوزیس اسپرم است، جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین غشا از لایه داخلی به لایه خارجی می‌باشد (۴۸). جهت ارزیابی فسفاتیدیل سرین (Phosphatidylserine) خارجی پس از پروتکل‌های فریز مختلف، از آنکسین V (Anexin-v) استفاده می‌کنند. به‌عبارتی اسپرم آنکسین V مثبت نشان‌دهنده آپوپتوزیس سلول می‌باشد اسپرمی که در معرض استرس

ناشی از فریز (بدون محیط محافظ فریز) قرار گرفته دارای حداقل آنکسین V منفی می‌باشد (۴۹). تصور می‌شود که ممکن است گلیسرول به‌طور مستقیم از طریق اثرات سمی که روی میتوکندری در طی فریز می گذارد منجر به فعال شدن کاسپازها شود (۵۰). بهینه‌سازی تکنیک‌های آماده سازی اسپرم، غلظت محیط محافظ فریز اسپرم و پروتکل‌های فریز-ذوب باید به گونه‌ای باشد که القای آپوپتوزیس را درطی فریز اسپرم به حداقل برساند که به‌دنبال آن می‌توان به موفقیت‌های بیشتری در روش‌های کمک باروری با استفاده از اسپرم منجمد شده دست یافت (۷).

اثرات فریز بر واکوئول‌ها

واکوئل‌های مختلفی در آکروزوم و قطرات سیتوپلاسمی اسپرم پستانداران وجود دارند که در روند اسپرماتوژنز مشاهده می‌شود. مطالعات کمی بر اثرات فریز اسپرم بر این واکوئل‌ها انجام شده است. مطالعات اولیه اثر تنش گرمایی را بر افزایش واکوئل‌های هسته ای نشان داده است. اما اطلاعات ضد و نقیضی در این زمینه وجود دارد برخی تحقیقات نشان داده اند که فرآیند فریز-ذوب واکوئل‌ها را تغییر نمی‌دهد ولی برخی دیگرنشان داده اند که روش‌های فریز-ذوب موجب افزایش واکوئولیزاسیون هسته ای اسپرم می‌شوند (۱) و لذا هنوز نتایج قطعی از اثرات فریز-ذوب بر واکوئول‌های اسپرمی منتشر نشده است و به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز است.

اثرات فریز بر mRNAs و microRNAs

mRNA های پدری زمانی که درطی لقاح وارد تخمک می‌شوند نقش مهمی را در تکوین ایفا می‌کنند. در طی مطالعه ای که بر اسپرم گراز صورت گرفت، نشان داده شد که فراوانی رونوشت‌های غیر کدکننده مربوط به پروتئین‌های مختلف نظیر B2M, BLM, HPRT1, PGK1, S18, SDHA, YWHAZ, PPIA, RPL4, DNMT3A, DNMT3B, JHDM2A, KAT8, و PRM1 تحت تاثیر پروتکل‌های مختلف فریز قرار می‌گیرند (۵۱). اما این اثر فقط مربوط به اسپرم گراز نیست بلکه mRNA های اسپرم انسان که در لقاح و موفقیت حاملگی دخیل‌اند نظیر ADD1, PEG1/MEST, PRM1 and PRM2 و PLC-ζ در طی فریز اسپرم کاهش می‌یابند (۵۲). بنابراین تخریب mRNA های ویژه اسپرم به‌وسیله فرآیند فریز اسپرم می‌تواند کاهش عملکرد تولید مثلی اسپرم را پس از فریز به‌همراه داشته باشد. این یک فرضیه منطقی است زیرا ارتباط بین mRNA های اسپرم (از جمله MYC، CYP19، ADAM2، PRM1 و PRM2) و رشد و نمو اولیه تایید شده است (۵۳) برخی از mRNA ها نسبت به بقیه بیشتر تحت تاثیر فرآیند فریز قرار می‌گیرند.

از سوی دیگر، microRNA که مولکول‌های RNA کوچک غیر کدکننده تنظیمی هستند و بیان ژن را یا از طریق مهار ترجمه mRNA یا از طریق هدف قرار دادن mRNA برای تخریبشان تنظیم می‌کنند نیز تحت تاثیر فریز اسپرم قرار می‌گیرند (۱). در یک مطالعه اخیر در خوک‌ها مشاهده شده است که سطح برخی از microRNA ها بیش از دیگران با روش فریز تحت تاثیر قرار می‌گیرند (۵۴). مطالعات در این زمینه بسیار اندک است و مطالعات آینده باید به جواب این سوال که آیا microRNA اسپرم در طی فریز تخریب می شود یا نه و چه ارتباطی با موفقیت لقاح دارند، بپردازند.

آیا فریز اسپرم تنظیم اپی ژنتیک والدین را تحت تاثیر قرار می‌دهد؟

اپی ژنتیک به تغییرات ژنومی صورت گرفته بدون تغییر دادن توالی ژن گفته می‌شود که موجب تغییر فنوتیپ حاصله می‌شود. مکانسیم‌های عمده‌ی مربوط به اپی ژنتیک شامل متیلاسیون DNA و اصلاح پروتئین‌های هیستون می‌باشند (۵۵) که در اسپرم این مکانیسم ها شامل متیلاسیون نوکلئوپروتئین های ویژه اسپرم، RNA های منتقل شده به اسپرم و سازمان دهی دامنه حلقه DNA توسط ماتریس هسته ای اسپرم می‌باشند (۵۶).

ازآنجائی‌که در لقاح، تخمک، سیگنال‌های اپی ژنتیک را از کروماتین اسپرم به ارث می‌برد و این سیگنال‌ها در رشد و نمو اولیه جنین نقش مهمی دارد، آسیب‌های وارد شده به آن‌ها توسط فریز اسپرم ممکن است به ارث برسد (۱). اما یک مطالعه‌ی مقدماتی در این زمینه درجه متیلاسیون بیش از ۹ ژن را تعیین کرد که شامل: ژن‌های اثرگذاری شده (Imprinting) مادری (*LIT1*, *SNRPN*, *MEST*) و ژن‌های اثرگذاری شده پدری (*MEG3,H19*)، عناصر تکراری (ALU, LINE1)، ژن‌های مخصوص اسپرماتوژنیک (*VASA*) و ژن مربوط به ناباروری مردان (*MTHFR*) می شوند و دریافتند که نه فریز و نه مدت زمان فریز (۲ روز نسبت به ۴ هفته)، الگوی متیلاسیون ژن را تغییر نمی‌دهد (۵۷). این داده‌ها و داده‌های دیگری که تا الان در دسترس داریم نشان می‌دهند ژن‌های اثرگزاری شده در برابر فرآیند فریز ایمن هستند (۵۷). مطالعات در این زمینه به‌ویژه بر روی انسان بسیار اندک می‌باشند و اطلاعات موجود ضد و نقیض است و احتمالا به مطالعات بیشتر و دقیق تری نیاز است.

مارکرهای مقاومت فریزی

یکی از مشکلات اصلی فریز اسپرم، عدم شناسایی انزال خوب از بد قبل از شروع فرآیند فریز است، زیرا بررسی پارامترهای معمولی نمونه اسپرم می‌تواند توانایی مقاومت آن نمونه انزالی را در برابر فرآیند فریز-ذوب پیش بینی کند. این واقعیت باعث شده محققان بر روی مارکرهای مقاوم در برابر فریز بیشتر تمرکز کنند. در جدول ۱ می‌توان این مارکرهای درونی موجود در اسپرم گراز را که تاکنون گزارش شده اند مشاهده کرد. دیگر مارکرهای مقاوم به فریز شامل الگوهای حرکتی اسپرم، پارامترهای جنبشی خاص و فعالیت آکروزین می باشند (۱).

جدول۱: مارکر های موجود در اسپرم که موجب مقاومت در برابر فریز می‌شود.

پروتئین	مارکر	عملکرد
فعالیت آکروزین	اسپرم	ارتباط مثبت بین فعالیت آنزیمی با تحمل فریز اسپرم
پروتئین باندشونده به آکروزین (ACRBP)	اسپرم	سطوح بالاتر در GFE نسبت به PFE
فیبرونکتین (FN1)	پلاسمای اسپرم	سطوح بالاتر در GFE نسبت به PFE
پروتئین های شوک حرارتی (HSP90AA1)	اسپرم	سطوح بالاتر در GFE نسبت به PFE
N- استیل-β-هگزوزآمیداز (ß -HEX)	پلاسمای اسپرم	ارتباط منفی بین فعالیت آنزیمی با تحمل فریز اسپرم
تریوز فسفات ایزومراز (TP1)	اسپرم	سطوح پایین تر در GFE نسبت به PFE
کانال های یونی وابسته به ولتاژ (VDAC2)	اسپرم	سطوح بالاتر در GFE نسبت به PFE

اختصارات: GFE: Good Freezability Ejaculates; PFE: Poor Freezability Ejaculates

عوامل بیرونی موثر بر مقاومت اسپرم(Freezability) در برابر فریز

تغییرات فصلی: درجه حرارت و فتوپریود (Photoperiod) بر روند اسپرماتوژنز و بلوغ اپی‌دیدیمی موثر می‌باشد (۱). بارانکو و همکاران نشان داده اند که مقاومت نمونه مایع منی انزال شده به فریز وابسته به فصل جمع آوری نمونه می‌باشد (۵۸). در انسان، یوگو و همکارانش نشان دادند که مقاومت فریزی اسپرم از مهر تا بهمن نسبت به اسفند تا شهریور بالاتر است (۵۹). در هر صورت، اکثر مطالعات به وضوح اشاره می‌کنند که فصل، مقاومت فریزی اسپرم در پستانداران را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

رژیم غذایی: رژیم غذایی بر کیفیت اسپرم تاثیر می‌گذارد، به‌طور مثال در اسب ها مکمل شدن رژیم غذایی با DHA برای ۱۴ هفته باعث افزایش تحرک اسپرم پس از فریز-ذوب شد (۶۰). با این‌حال، اضافه

کردن روغن بزرک و ترکیب تجاری از آنتی اکسیدانت‌ها برای دوره ۱۲ هفته ای هیچ تاثیری بر پارامترهای اسپرمی نداشته است (۶۱). با این‌حال، مطالعات انجام شده در گونه‌های مختلف به وضوح نشان می‌دهد که اصلاح رژیم غذایی، (به‌ویژه هنگامی که مکمل DHA استفاده می‌شود)، ترکیب لیپیدی غشا اسپرم را تعدیل می‌کند. اگر چه باید آگاه بود که نتایج حاصل از یک گونه را نمی توان به دیگر گونه‌ها تعمیم داد. بنابراین، نه تنها رژیم غذایی در مقاومت اسپرم به فریز بستگی دارد بلکه مدت زمان استفاده از آن رژیم غذایی نیز ممکن است موثر باشد که این فرضیه به تحقیقات بیشتری نیاز دارد (۱).

نژاد: اینکه آیا اسپرم برخی از نژادها مقاوم تر از دیگر نژادها به‌روش فریز-ذوب هستند کاملا روشن نیست. اما این اتفاق نظر وجود دارد که صرف نظر از نژاد، تفاوت‌های فردی (بین نرها) وجود دارد و این تفاوت ها به ترکیب فسفولیپید غشای پلاسما مربوط است. مثلا مطالعات اخیر نشان داده اند که مقاومت غشا آکروزومی اسپرم به فشار اسمزی ناشی از فریز-ذوب در گونه‌های سفید و بزرگ گراز بیشتر از گونه بومی گراز است (۶۲) اما مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است.

بخشی از انزال (Ejaculate fractions): به‌نظر می‌رسد بخش‌های خاصی از انزال مقاومت بیشتری در برابر فریز-ذوب از خود نشان می‌دهند. اما در کل، فریز بخشی از اسپرم به‌ویژه بخش غنی از اسپرم انزالی که در ابتدای انزال خارج می شود بهتر از کل اسپرم است (۶۳). همسو با این مطالعات، مطالعاتی دیگر قسمت‌های مختلف بخش‌های غنی از اسپرم را مقایسه کرده اند و گزارش داده‌اند که اولین بخش از انزال نسبت به بخش‌های دیگر انزال بیشتر قادر به مقاومت در برابر فریز است که احتمالا به‌خاطر این است که این بخش حاوی سطوح پایین‌تر بی‌کربنات هستند (۶۴). این مطابق با این واقعیت است که اسپرم‌های بخش اول انزال، دارای سطوح بالایی از کلسیم داخل سلولی می باشد و اگزوسیتوز آکروزوم و فسفوریلاسیون پروتئین تیروزین نیز در این بخش کمتر از بخش باقی مانده انزال است (۶۵).

آیا زمان نگه‌داری اسپرم قبل از فریز بر مقاومت اسپرم به فرآیند فریز اثر دارد؟

زمان نگه‌داری، به فاصله زمانی از زمان جمع آوری نمونه تا شروع فرآیند فریز اسپرم در دمای ۱۵ تا ۱۷ درجه سانتی‌گراد اطلاق می‌شود (۱). درحالی‌که برخی از محققان گزارش کرده اند که طول این دوره تاثیری بر مقاومت در برابر روش‌های فریز-ذوب اسپرم ندارد، دیگر محققان نشان دادند که زمان نگه‌داری نمونه اسپرم قبل از فریز برای گونه‌های مختلف متفاوت است و به‌طور مثال برای اسپرم بز بهتر تا ۲۴ ساعت باشد (۶۶). احتمالا این مدت زمان نگه‌داری اسپرم، مقاومت فریزی اسپرم را از طریق نگه‌داری لیپیدهای غشای پلاسمایی (۶۷) که به‌وسیله مکانیسم‌های ناشناخته ای که در فسفوریلاسیون برخی از پروتئین‌ها مانند HSP70 دخیل هستند افزایش دهد (۶۸).

افزایش موفقیت در فریز به‌وسیله مواد افزودنی:

تعدادی از مطالعات نشان می‌دهند که افزودن یک‌سری از مواد مختلف به محیط فریز موجب افزایش موفقیت فریز اسپرم می‌شود. با این‌حال و همان‌طور که در بخش‌های زیر بحث می‌شود افزودنی‌هایی که برای برخی گونه‌ها مفید می‌باشند ممکن است برای گونه‌های دیگر مفید نباشند. جدول ۲ تعدادی از این افزودنی‌ها را به‌همراه اثراتشان نشان می‌دهد (۱).

جدول۲: اثرات مفید مکمل های محیط فریز-ذوب

افزودنی	محیط	اثرات
آلژینات	فریز	حفظ سلامت آکروزوم، افزایش فعالیت SOD و GPX کاهش سطح مالون دی آلدئید.
اسید اسکوربیک	فریز-ذوب	بهبود تحرک اسپرم و سلامت غشاء، افزایش اثر گلوتاتیون (GSH).
آلفا-توکوفرول	فریز	افزایش تحرک رو به جلو، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزوم.
BHT	فریز	بهبود بقای اسپرم و رشد جنین به بلاستوسیست بعد ازIVF با اسپرم های منجمد شده.
سیکلودکسترین ها	فریز -ذوب	بهبود ثبات پلاسمای اسپرم و حفظ سلامت آکروزوم ، افزایش نتایج IVF
L- سیستئین	فریز	بهبود تحرک پیشرونده، سلامت غشای پلاسمایی و آکروزوم.
لوتئین	فریز	بهبود تحرک اسپرم، سلامت DNA و آکروزوم و مقاومت به تنش اسمزی(HOST).

GPX: Glutathione Peroxidase; HOST: Hypoosmotic Sswelling Test; SOD: Superoxide Dismutase; BHT: Butylated Hydroxytoluene

افزودن پروتئین پلاسمای سمینال: خوب یابد؟

برخی محققان بر این باورند که پروتئین‌های پلاسمای سمینال مقاومت اسپرم در فرآیند فریز را افزایش می‌دهد. اما برخی دیگر معتقد بر حذف این بخش از انزال در طی فرآیند فریز می‌باشند. اما شناسایی آن‌که کدام جز از اجزای پلاسمای سمینال برای فریز اسپرم مضر یا مفید است هنوز ناشناخته باقی مانده و تحت بررسی است. در مطالعات حیوانی گزارش شده است که حذف پروتئین با وزن مولکولی پایین (۱۴-۱۲ کیلو دالتون) نتایج فریز را بهبود می‌بخشد (۶۹). علاوه بر این حذف باکتری‌های موجود در پلاسمای سمینال نیز موجب بهبود نتایج فریز اسپرم شده است زیرا اندوتوکسین منتشر شده از باکتری‌های موجود در پلاسمای سمینال (لیپوپلی ساکارید) می‌تواند باعث بی ثباتی غشای پلاسمایی اسپرم شود و در نتیجه مقاومت اسپرم را در برابر فریز مختل کند (۷۰). از طرفی اضافه کردن پلاسمای سمینال ۵ درصد به محیط فریز نمونه به‌عنوان یک GFE (Good Freezability Ejaculates) باعث بهبود حرکت، سلامت غشاء و بهبود نتایج IVF می‌شود (۷۱). این اثر مثبت می‌تواند از طریق مهار ظرفیت یابی در شرایط آزمایشگاهی اسپرم یا تغییرات شبه ظرفیت یابی در طی فریز اسپرم از طریق هپارین متصل شده به پروتئین‌های غشای پلاسمایی (AQN-3, AQN-1, DQH AWN,) رخ دهد (۷۲). با این‌حال ترکیباتی که در پلاسمای سمینال باعث افزایش مقاومت به فریز اسپرم‌ها می‌شوند شناخته نشده اند. در مورد اثرات پلاسمای سمینال بر اسپرم پس از ذوب، برخی از مطالعات نشان داده اند که افزودن پلاسمای سمینال به محیط ذوب برای تحرک اسپرم و سلامت غشا مفید است در حالی‌که دیگر مطالعات گزارش کرده اند که باعث کاهش سلامت آکروزوم و غشاء پلاسمایی و افزایش سطح ROS می‌شود. تغییرات در نتایج حاصل می تواند در ارتباط با حجم نمونه، مدت زمان استفاده از پلاسمای سمینال و دمای انکوباسیون باشد. از آنجائی‌که پلاسمای سمینال با آندومتر واکنش می‌دهد ممکن است بر نتایج باروری موثر باشد. متاسفانه، آزمایش‌های انجام شده تاکنون مطمئن و قانع کننده نیستند (۱).

سیکلودکسترین ها(Cyclodextrins)

سیکلودکسترین یک هپتاساکارین حلقوی است که از واحدهای گلیکوپیرانوز با یک مرکز آب گریز تشکیل شده است. وقتی به کلسترول متصل می‌شوند می‌توانند میزان این استرول را در غشاء پلاسمایی افزایش دهند و باعث ثبات پلاسمالما، افزایش سلامت غشای پلاسمایی و آکروزوم اسپرم و بهبود بقای اسپرم پستانداران در طی فریز-ذوب شوند (۷۳).اما نگرانی اصلی در استفاده از

سیکلودکسترین‌ها نیاز داشتن به میزان زیادی کلسترول است که ممکن است برای اسپرم مضر باشند (۱).

آنتی اکسیدانت‌ها

اضافه کردن آنتی اکسیدانت‌ها به محیط فریز اثرات مثبتی می‌تواند داشته باشد. در انسان، اضافه کردن آنتی اکسیدانت‌هایی نظیر ویتامین D، هیپوتارین و آنتی اکسیدانت‌های طبیعی مانند انجیر هندی باعث بهبود حرکت اسپرم و کاهش قطعه قطعه شدن DNA اسپرم پس از فریز-ذوب می‌شود (۷۴). لیستی از آنتی اکسیدانت‌هایی که دارای اثرات مثبت بر کیفیت اسپرم پس از فریز-ذوب هستند در جدول ۲ ذکر شده است (۱). یکی آنتی اکسیدانت‌هایی که نتایج جالب توجه‌ای داشته گلوتاتیون یا GSH (Glutathion) است که اضافه کردن آن هم به محیط فریز و هم ذوب باعث افزایش کیفیت اسپرم، تثبیت ساختار نوکلئوپروتئین و بهبود توانایی لقاح در هر دو محیط داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. در اسپرم انسان وقتی محتوای GSHرا در محیط فریز-ذوب تا ۶۴ درصد کاهش می‌یابد کارایی سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی در مقابل فریز اسپرم کاهش می‌یابد. در طی مطالعاتی، GSH از طریق کاهش سطح ROS باعث بهبود حرکت اسپرم انسان می‌شود (۷۵).

آلژینات (Alginate)

اضافه کردن آلژینات به محیط فریز باعث حفظ بهتر سلامت آکروزوم، افزایش فعالیت‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD: Superoxide Dismutase) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX: GlutathionPperoxidase) و کاهش سطح مالون دی آلدئید پس از فریز و ذوب اسپرم می‌شود (۱).

ملاتونین

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که افزودن ملاتونین به اسپرم تازه و فریز شده خواص آنتی اکسیدانتی از خود بروز می‌دهند. در گاو، با اضافه کردن ملاتونین به محیط فریز در غلظت نهایی بین ۲ و ۳ میلی مولار بقا و تحرک اسپرم حفظ می‌شود و پراکسیداسیون لیپیدی در مرحله‌ی پس از ذوب را کاهش می‌دهد (۷۶). ملاتونین همچنین دارای اثرات مثبت بر پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم منجمد شده اسب است که این تاثیر بر تحرک کمتر آشکار است (۷۷). در قوچ، نتایج مشابهی زمانی‌که ۱ میلی‌مولار از ملاتونین به محیط فریز اضافه شده است، مشاهده می‌شود و نه تنها اثرات مفید در تحرک اسپرم، زنده ماندن اسپرم و سلامت DNA دارد بلکه باعث بهبود تسهیم جنین بعد از IVF می‌شود (۷۸).

فاکتور رشد انسولین

در مطالعات حیوانی اضافه کردن فاکتور رشد انسولین (IGF-I) همراه با ویتامین E به مایع منی گراز، تحرک اسپرم را پس از ۷۲ ساعت نگه‌داری در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد بهبود بخشیده است (۷۹). در قوچ، افزودن IGF-I به محیط فریز، حیات و تحرک اسپرم منجمد شده قوچ را افزایش داده اما هیچ تاثیری بر توانایی لقاح نداشت (۸۰).

پروتئین‌های شوک حرارتی: مکمل‌های جدید برای محیط‌های فریز؟

یک استراتژی جدید برای بهبود محیط های فریز می‌تواند اضافه کردن پروتئین‌هایی باشد که با اثرات روش فریز مقابله می‌کنند. به‌عنوان مثال، مشخص شده است که پروتئین شوک حرارتی ۷۰ کیلو دالتون ۸ (HSPA8) باعث افزایش بقای اسپرم در لوله رحمی است. مکانیسمی که از طریق آن این پروتئین موجب حفظ حیات اسپرم در فرآیند فریز می‌شود می‌توان به توانایی آن برای حفظ سیالیت و ثبات پلاسمالما اسپرم مرتبط دانست (۸۱).

ویتامین E

ویتامین E یک آنتی اکسیدانت بسیار قوی است که بر روی غشای سلولی مستقر می‌شود و می‌تواند پیوندهای کوالانسی کهROS بین زنجیره‌های جانبی اسید چرب در لیپیدهای غشایی تشکیل داده است را بشکند. در انسان،

مصرف خوراکی این آنتی اکسیدانت (۲۰۰ میلی‌گرم در روز به‌مدت ۳ ماه) میزان لقاح را بهبود بخشیده و می‌تواند به‌عنوان یک درمان برای ناباروری مردان ناشی از افزایش سطح ROS استفاده شود. محققین در مطالعات خود نشان داده اند که افزودن ویتامین E به محیط فریز باعث افزایش تحرک اسپرم پس از ذوب شدن، حفظ DNA اسپرم در مایع منی افراد با پارامترهای اسپرمی طبیعی و آستنوزواسپرمی و در نهایت، منجر به افزایش میزان حاملگی در سیکل روش‌های کمک باروری می‌شود (۸۲).

ویتامین C

ویتامین C یک آنتی اکسیدانت با سمیت پایین و قدرت بالا در حذف رادیکال‌های اکسیژن می‌باشند و اثرات H_2O_2 را در DNA خنثی می‌کنند، ویتامین E غیر فعال را بازیابی و پراکسیداسیون چربی را کاهش می‌دهد. اسید اسکوربیک، مترشحه از کیسه‌های منی، یک آنتی اکسیدانت مهم در پلاسمای سمینال مردان بارور می‌باشد که تا ۶۵ درصد از کل ظرفیت آنتی اکسیدانت پلاسمای سمینال را شامل می‌شود. در انزال افراد با غلظت کم اسید اسکوربیک در پلاسمای سمینال تعداد کم اسپرم، افزایش تعداد اسپرم‌های غیر طبیعی، کاهش تحرک و آگلوتیناسیون مشهود می‌باشد. ویتامین C نیز می‌تواند به‌عنوان پراکسیدانت عمل کند و رادیکال‌ها را واکنش پذیرتر کند و در حضور فلزات واسطه بسیار مخرب باشد بنابراین، ویتامین C ممکن است اثر تامل برانگیزی به‌ویژه در فرآیند فریز از خود نشان دهد (۸۲).

گلوتاتیون

گلوتاتیون یک ترکیب تیولی غیر پروتئینی عمده در سلول‌های پستانداران است که به‌طور مستقیم در خنثی سازی ROS و همچنین حفظ آنتی اکسیدان برونزاد مانند ویتامین C و E در اشکال فعال خود شرکت می‌کند و گروه سولفیدریل از GSH سلول‌ها را در برابر اکسیدانت‌ها، الکتروفیل و رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. محتوای GSH و ظرفیت دفاعی آنتی اکسیدانتی آن در طول فرآیند فریز ذوب، تغییر می‌کند که احتمالا به‌دلیل استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی است به‌طوری‌که اضافه کردن GSH به محیط فریز، نتایج متغیری به‌دست می‌دهد (۸۲).

سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز

از آن‌جا که محتویات سیتوپلاسمی در اسپرم کم است و در طول مراحل نهایی اسپرماتوژنز حذف می‌شود، پلاسمای منی دفاع بزرگی در برابر ROS توسط آنزیم مهار کننده ROS مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز است. نتایج نشان می‌دهد که افزودن کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز به محیط فریز بقا و باروری آزمایشگاهی اسپرم را بهبود می‌بخشد (۸۲).

تمپول (Tempol)

تمپول یک عاملی است که اثرات سوپراکسید دیسموتاز را تقلید می‌کند و موجب تبدیل شدن سوپر اکسید به هیدروژن پراکسیداز (H_2O_2) با سمیت کمتر می‌شود. در طی مطالعه‌ای نشان داده شده است که افزودن تمپول به محیط فریز به‌طور معنی‌داری موجب بهبودی تحرک و حیات اسپرم پس از ذوب می‌شود و همچنین آسیب DNA را کاهش می‌دهد. این اثرات تمپول به توانایی نفوذ آن به سلول و کاهش تولید سوپراکسید تولید شده در داخل و خارج سلول در طی فریز اسپرم بر می‌گردد (۸۳،۸۴).

L- سیستئین

L– سیستئین(L-CYS) اسید آمینه غیرضروری با وزن مولکولی کم حاوی تیول است که به‌راحتی به غشای سلولی نفوذ می کند و در بیوسنتز GSH داخل سلولی در شرایط آزمایشگاهی و درون بدنی شرکت می کند و لیپیدها و پروتئین های غشایی را از طریق مهار غیرمستقیم رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. همچنین به‌عنوان تثبیت کننده غشاء و مهار ظرفیت‌یابی اسپرم عمل می‌کند. مطالعات حیوانی نشان دادند که افزودن L-سیستئین به محیط فریز موجب بهبود تحرک،

مورفولوژی، حیات و سلامت ساختار کروماتین می‌شود (۸۲).

کوئرستین (Quercetin)

کوئرستین یک فلاونوئید است که به‌عنوان مهار کننده ROS و شلات کننده یونی شناخته شده است. همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت را افزایش می‌دهد و فعالیت آنزیمی مانند NADPH اکسیداز و اکسید ردوکتاز وابسته به NADH را کاهش می‌دهد که موجب بهبود تحرک و حیات اسپرم پس از ذوب می‌شود و همچنین آسیب DNA و سطح ROS را کاهش می‌دهد (۸۴).

نتیجه‌گیری

روش‌های مختلفی جهت فریز اسپرم برای اهداف درمانی و تحقیقاتی وجود دارد. در تمام روش‌ها پتانسیل زنده مانی اسپرم کاهش می‌یابد ولی بسته به نوع روش می‌توان از مواد محافظ اسپرم در طی فریز-ذوب استفاده نمود که حداقل تغییرات را در سطح غشا، تحرک و کروماتین اسپرم داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با همکاری پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام گرفته است. لذا از کلیه مسئولین و پرسنل مراکز فوق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. Theriogenology. 2016; 85(1): 47-64.

2. Sharma R, Kattoor AJ, Ghulmiyyah J, Agarwal A. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. Syst Biol Reprod Med. 2015; 61(1):1-12.

3. Najafi A, Asadi E, Moawad AR, Mikaeili S, et al. Supplementation of freezing and thawing media with brain-derived neurotrophic factor protects human sperm from freeze-thaw-induced damage. Fertil Steril. 2016; 106 (7):1658-1665.

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

5.O'Connell M, McClure N, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod. 2002; 17(3): 704-9.

6. Behrman SJ, Sawada Y. Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. Fertil Steril. 1966; 17(4): 457-66.

7. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. Reprod Biomed Online. 2010; 21(4): 456-62.

8. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Androl. 1990; 11(1): 73-88.

9. 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.

10. Chian, R.C. "Cryobiology: an overview," Chian RC, Quinn P (eds.), Fertility cryopreservation, Cambridge: Cambridge University Press, pp. 20101-9.

11. Muldrew K, McGann LE. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. Biophys J. 1994; 66(2 Pt 1): 532-41.

12. Wiest SC, Steponkus PL. The osmometric behavior of human erythrocytes. Cryobiology. 1979; 16(1): 101-4.

13. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science. Anim Reprod Sci. 2000; 62(1-3): 3-22.

14. Mazur P, Rall WF, Rigopoulos N. Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. Biophysical Journal. 1981; 36(3): 653-75.

15. Karacan M, Alwaeely F, Erkan S, Cebi Z, et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles with fresh testicular spermatozoa obtained on the day of or the day before oocyte collection and with cryopreserved testicular sperm in patients with azoospermia. Fertil Steril. 2013; 100(4): 975-80.

16. Schwarzer JU, Fiedler K, Hertwig I, Krusmann G, et al. Sperm retrieval procedures and intracytoplasmatic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. Urol Int. 2003; 70(2): 119-23.

17. Borini A, Sereni E, Bonu, Flamigni C. Freezing a few testicular spermatozoa retrieved by TESA. Mol Cell Endocrinol. 2000; 169(1-2): 27-32.

18. Podsiadly BT, Woolcott RJ, Stanger JD, Stevenson K. Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy. Hum Reprod. 1996; 11(6): 1306-8.

19. Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, Kieck KA, et al. Cryopreservation of single human spermatozoa. Hum Reprod. 1997; 12(5): 994–1001.

20.Montag M, Rink K, Dieckmann U, Delacretaz G, et al. Laser-assisted cryopreservation of single human spermatozoa in cell-free zona pellucida. Andrologia. 1999; 31(1): 49-53.

21. Just A, Gruber I, Wober M, Lahodny J, et al. Novel method for the cryopreservation of testicular sperm and ejaculated spermatozoa from patients with severe oligospermia: a pilot study. Fertil Steril. 2004; 82(2): 445-7.

22. Schuster TG, Keller LM, Dunn RL, Ohl DA, et al. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. Hum Reprod. 2003; 18(4): 788-95.

23. Elnahas A, Alcolak E, Abu Marar E, Elnahas T, et al. Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. Middle East Fertility Society Journal. 2010; 15(1): 2-9.

24. Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, et al. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Mol Cell Endocrinol. 2000; 169(1-2): 15-9.

25. Keel BA, Webster BW, Roberts DK. Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. J Reprod Fert. 1987; 81(1): 213-20.

26. Watcher MAM. Ethical aspects of cryobiology: responsible applications in biomedicine and in clinical practice. Cryobiology. 2004; 48(2): 205-13.

27. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. ILAR J. 2000; 41(4): 187-96.

28. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol. 1984; 247(3 Pt 1): C125-42.

29. Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Hum Reprod. 1995; 10(5): 1109-22.

30. H Sieme, H Oldenhof, WF Wolkers. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. Reprod Domest Anim. 2015; 50: 20-6.

31.Tavalaee M, Bahreinian M, Barekat F, Abbasi H, et al. Effect of varicocelectomy on sperm functional characteristics and DNA methylation. Andrologia. 2015; 47(8): 904-9.

Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. Mol Hum Reprod. 2010; 16(1): 30-6.

33. Tavalaee M, Abbasi H, Deemeh MH, Fotohi F, et al. Semen Parameters and Chromatin Packaging in Microsurgical Varicocelectomy Patients. Int J Fertil Steril. 2012; 6(3): 165–174.

34. Tavalaee M, Razavi S, Nasr-Esfahani MH. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. Fertil Steril. 2009; 91(4):1119-26.

35. Yeste M, Flores E, Estrada E, Bonet S, et al. Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freezethawing by stabilising disulfide bonds. Reprod Fertil Dev. 2013; 25(7): 1036-50.

36. Alkmin DV, Martinez-Alborcia MJ, Parrilla I, Vazquez JM, et al. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax. Theriogenology. 2013; 79(9): 1294-300.

37. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Gouraud A, et al. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. Mol Reprod Dev. 2011; 78(12): 951-61.

38. Fraser L, Strzeżek J, Kordan W. Effect of freezing on sperm nuclear DNA. Reprod Domest Anim. 2011; 46: 14-7.

39. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperminjection. Hum Reprod. 1996; 11(4): 837-43 .

40. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, et al. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum Reprod. 2009; 24(9): 2061-70.

41. Mahadevan M, Trounson AO. Eff ect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa. Andrologia. 1984; 16(1): 52-60.

42. Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rigau T, et al. Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. Theriogenology. 2010; 74(3): 354-63.

43. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. J Androl. 2002; 23(6): 737-52.

44. Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nottola SA, Miglietta S, et al. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in new artificial seminal fluid. Andrology. 2016; 4(6): 1037-1044.

45. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, et al. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. Fertil Steril. 2003; 80(3): 531–535.

46. Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. Apoptosis. 2002; 7(4): 313-9.

47. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, et al. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bakmediated permeabilization. EMBO J. 2003; 22(17): 4385-99 .

48. Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, et al. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. Hum Reprod. 2007; 22(2): 380–388.

49. Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. Mol Hum Reprod. 1999; 5(2): 109-15.

50. Wündrich K, Paasch U, Leicht M, Glander HJ. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation – an immunoblot study. Cell Tissue Bank. 2006; 7(2): 81-90.

51. Zeng C, He L, Peng W, Ding L, et al. Selection of optimal reference genes for quantitative RT-PCR studies of boar spermatozoa cryopreservation. Cryobiology. 2014; 68(1): 113-21.

52. Valcarce DG, Cartón-García F, Herráez MP, Robles V. Effect of cryopreservation on human sperm messenger RNAs crucial for fertilization and early embryo development. Cryobiology. 2013; 67(1):84-90.

53. Hwang JY, Mulligan BP, Kim HM, Yang BC, et al. Quantitative analysis of sperm mRNA in the pig: relationship with early embryo development and capacitation. Reprod Fertil Dev. 2013; 25(5): 807–17.

54. Zhang Y, Zeng CJ, He L, Ding L, et al. Selection of endogenous reference microRNA genes for quantitative reverse transcription polymerase chain reaction studies of boar spermatozoa cryopreservation. Theriogenology. 2015; 83(4): 634-41.

55. Deans C, Maggert KA. What Do You Mean, “Epigenetic”? Genetics. 2015; 199(4): 887-96.

6. Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. Asian J Androl. 2011; 13(1): 31-5.

57. Kläver R, Bleiziffer A, Redmann K, Mallidis C, et al. Routine cryopreservation of spermatozoa is safedevidence from the DNA methylation pattern of nine spermatozoa genes. J Assist Reprod Genet. 2012; 29(9): 943-50.

58. Barranco I, Ortega MD, Martinez-Alborcia MJ, Vazquez JM, et al. Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. Cryobiology. 2013; 67(3): 299-304.

59. Yogev L, Kleiman S, Shabtai E, Botchan A, et al. Seasonal variations in pre- and post-thaw donor sperm quality. Hum Reprod. 2004; 19(4): 880-5.

60. Brinsko SP, Varner DD, Love CC, Blanchard TL, et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutriceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. Theriogenology. 2005; 63(5): 1519-27.

61. Schmid-Lausigk Y, Aurich C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. Theriogenology. 2014; 81(7): 966-73.

62. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller Jr RR. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. Reproduction. 2006; 131(5): 887-94.

63. Alkmin DV, Perez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, et al. Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. Cryobiology. 2014; 69(2): 203-10.

64. Saravia F, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. Anim Reprod Sci. 2010; 117(3-4): 279-87.

65. Kumaresan A, Siqueira AP, Hossain MS, Bergqvist AS. Cryopreservation- induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. Cryobiology. 2011; 63(3): 137-44.

66. Juarez JD, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, et al. Boar semen can tolerate rapid cooling rates prior to freezing. Reprod Fertil Dev. 2011; 23(5): 681-90.

67. Casas I, Althouse GC. The protective effect of a 17oC holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5oC. Cryobiology. 2013; 66: 69–75.

68. Yeste M, Estrada E, Rivera Del Álamo MM, Bonet S, et al. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17oc is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. PLoS One. 2014; 9(3): e90887.

69. Fraser L, Dziekonska A, Strzezek R, Strzezek J. Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics. Theriogenology. 2007; 67(5): 994-1003.

70. Okazaki T, Shimada M. New strategies of boar sperm cryopreservation: development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. Anim Sci J. 2012; 83(9): 623-9.

71. Hernández M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, et al. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. J Androl. 2007; 28(5): 689-97.

72. Vadnais ML, Roberts KP. Seminal plasma proteins inhibit in vitro and cooling-induced capacitation in boar spermatozoa. Reprod Fertil Dev. 2010; 22(6): 893-900.

73. Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. Cryobiology. 2004; 48(1): 36-45.

74. Albrizio M, Moramarco AM, Nicassio M, Micera E, et al. Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium

channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. Theriogenology. 2015; 83(3): 421-9.

75. Estrada E, Rodríguez-Gil JE, Rocha LG, Balasch S, et al. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozenthawed boar semen. Andrology. 2014; 2(1): 88-99.

76. Ashrafi I, Kohram H, Ardabili FF. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. Anim Reprod Sci. 2013; 139(1-4): 25–30.

77. Da Silva CM, Macías-García B, Miró-Morán A, González- Fernández L, et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. J Pineal Res. 2011; 51(2): 172–9.

78. Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, et al. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. J Pineal Res. 2011; 50(3): 310–8.

79. Mendez MF, Zangeronimo MG, Rocha LG, Faria BG, et al. Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. Animal. 2013; 7(5): 793–8.

80. Padilha RT, Magalhães-Padilha DM, Cavalcante MM, Almeida AP, et al. Effect of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of cryopreserved ovine semen. Theriogenology. 2012; 78(4): 907–13.

81. Moein-Vaziri N, Phillips I, Smith S, Alminana C, et al. Heat-shock protein A8 restores sperm membrane integrity by increasing plasma membrane fluidity. Reproduction. 2014; 147(5): 719–32.

82. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell Tissue Bank. 2016; 17(4): 745–756.

83. Bateni Z, Azadi L, Tavalaee M, Kiani-Esfahani A, et al. Addition of Tempol in semen cryopreservation medium improves the post-thaw sperm function. Syst Biol Reprod Med. 2014; 60 (4): 245-50.

84. Azadi L, Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M, et al. Effects of Tempol and Quercetin on Human Sperm Function after Cryopreservation. Cryo Letters. 2017; 38(1): 29-36.

Journal of Cell & Tissue (JCT) *review Article*
Winter 2018; 8(4)

Human sperm cryopreservation update in treatment of infertility: a review study

Tavalaee M, Ph.D.[1*], Torki-Boldaji B, M.Sc.[1, 2], Azadi L, M.Sc.[1], Nasr- Esfahani MH, Ph.D.[1,2]

1. Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
2. Isfahan Fertlity and Infertility Center, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: Tavalaee.m@royaninstitute.org

Received: 12 Sep. 2017 Accepted: 29 Apr. 2018

Abstract

Cryopreservation is the most effective method for long-term maintenance of sperm. There are several procedures for freeze-thawing of semen and each may impose damage on sperm function, viability and finally decreases semen quality and fertility potential. In addition to decreased percentage of sperm viability and motility after freeze-thawing, percentage of DNA damage is also increases due to high level of oxidative stress. To minimize these damages, we need to increase our insights regarding different cryopreservation procedures, cryoprotectant and antioxidant supplements, which can protect sperm membrane during cryopreservation. Therefore, by using these experiments, we can improve the efficiency of these procedures. In this review, we discuss about principles of cryopreservation, types of freeze-thawing methods, advantages and disadvantages of each of these methods, effects of freezing on sperm parameters and clinical outcomes, and finally role of antioxidants in preservation of sperm integrity during freeze-thawing. For this review, all relevant information was collected via databases such as PubMed and Google Scholar during the period of 1966-2017.

Keywords: Sperm freezing, liquid nitrogen, DNA damage, fertility, Freeze compound composition