فصل اول

مقدمه

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

۱-۱-ناباروری[1]:

ناباروری به معنای عدم توانائی برای بچه دار شدن، بعد از یکسال مقاربت بدون جلوگیری می باشد. حـدود ۱۵-۱۰٪ زوجین در سنین باروری خود با این مشکل مواجه می باشند [۲] .عدم برخورد صحیح با مسئله ناباروری مـی تواند منجر به بروز مشکلات روحی، روانی و اجتماعی گردد.طیف وسیعی ازعوامل زنانه و مردانه در نابـاروری نقـش دارند. حدود ۵۰٪ موارد ناباروری مربوط به فاکتورهای مردانه است و تقریباً ۱۵-۱۰٪ موارد ناباروری علت نامشخص دارد. علل ناباروری مردان شامل طیف وسیعی ازعوامل وراثتی، هورمونی، محیطی، فیزیولوژیک، مواد سـمی و داروئـی را شامل می شود که سبب بروزعلائمی شامل عدم تولید اسپرم، تعداد بسیار کم یا کیفیت بد اسپرم های تولید شده می گردد[3] .

۱-۲- تولید اسپرم:

تولید مثل جنسی، شامل الحاق گامت نر و ماده است . منشاء مشترک اسپرم و تخمک سلول هـای جنـسی اولیـه[۲] است. درانسان و سایر پستانداران، سلول های جنسی اولیه در حدود هفته پنجم جنینی ازکیسه زرده مشتق می شـوند و با مهاجرت خود از طریق آلانتوئیس به آندودرم روده خلفی رفته وبه دنبال آن وارد مزانتر پـشتی شـده و در نوارهـای تناسلی موجود درسمت پشتی جنین جای می گیرند. طناب های جنسی در دوران جنینی شکل می گیرند، در جنس نر ،هنگام تولد این طناب ها توپر بوده و دارای دونوع سلول جنسی وغیرجنسی مـی باشـند. سـلول هـای جنـسی دارای هسته ای بزرگ و روشن به همراه یک یا چند هستک است که بزرگترازسلول های غیرجنسی می باشند. این سلولها که اسپرماتوگونی [3] نوع A خوانده می شوند از تقسیمات میتوزی سلول های جنسی اولیه بوجود می آیند و بر روی غشاء پایه طناب های جنسی[4] قرار دارند(شکل ۱-۱) . سلول های غیر جنـسی کوچـک تـر مـی باشـند و در اوایـل دوران جنینی تکثیر یافته و سلول های سرتولی[5] (پـشتیبان) را مـی سـازند. بـا آغازسـن بلـوغ، در پاسـخ بـه سـیگنال هـای هیپوتالاموسی، سرعت تکثیر و تمایز این سلولها بالا می رود و پـس از مراحلـی ، بـه اسـپرم بـالغ تبـدیل مـی شـوند. مراحلی

1-Infertility
2- Primordial germ cells
3- Spermatogony
4- Sexual cord
5- Sertoli

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

که موجب تکثیر سلول های اسپرماتوگونی، میوز و تغییرات مورفولوژیک آنها و در نهایت تبدیل اسپرماتوگونی به اسپرماتوزوئید می شودرااسپرماتوژنز[1] گویند[59].

۱-۳- مایع انزالی[2]:

مایع انزالی انسان حاوی پلاسمای سمینال ، اسپرماتوزوئیدها و ترکیبات دیگر میباشد. حجم آن در افراد متغیر است . پلاسمای سیمینال از ترشحات غدد لیتر[3]، وزیکول سمینال، کوپر، پروستات، اپیدیدیم و آمپولا تشکیل شده است. درحین انزال اسپرم ازانتهای اپیدیدیم و مجرای دفران با ترشحات غدد ضمائم جنسی مخلوط می شود. ابتدا ترشحات غدد لیتر و کوپر، سپس ترشحات آمپول واپیدیدیم تخلیه شده و سرانجام بخش اعظم مایع انزالی در انسان(حدود۷۰٪) از ترشحات وزیکول سمینال ترشح می شود. ترشح زرد رنگ وغلیظ وزیکول سمینال حاوی مواد فعال کننده اسپرماتوزوئیدها مانند فروکتوز، سیترات، اینوزیتول، پروستاگلاندین ها و چندین پروتئین و تعدای عناصرمعدنی ومواد آلی می باشد. پلاسمای سمینال بخش اعظم سیمن انسان راتشکیل می دهد. ترکیبات پلاسمای سمینال ممکن است درانقباض بافت های مجرای دستگاه تولید مثل زن و در نتیجه تسهیل انتقال اسپرم مؤثرباشد. مایع سیمن دارای PH=7/5 است که علت آن ترشحات قلیائی پروستات است که علاوه برخنثی کردن اسیدتیه مختصرمایعات سیمن، خاصیت قلیائی مختصری به آن داده وباعث ظاهر شیری رنگ آن می شود. مایع پروستات همچنین دارای آنزیم منعقد کننده است که با اثر بر فیبرینوژن موجود درمایع سمینال وزیکول باعث شکل گیری لخته فیبرینی ضعیفی میشود که سیمن را درقسمت های عمقی واژن درمجاورت گردن رحم نگه می دارد و ظرف ۳۰-۱۵ دقیقه تحت تأثیرفیبرینولیزین حل می شود. هرچند نقش دقیقی برای پلاسمای سمینال شناخته نشده است ولی بعنوان محیطی برای انتقال اسپرم در دستگاه تناسلی مرد عمل میکندو همچنین شرایط قلیائی وغذائی برای زنده ماندن اسپرم در محیط اسیدی واژن فراهم مینماید[59] .

نمونه سیمن طبیعی ظرف ۶۰-۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق به حالت محلول در می آید. در بعضی نمونه ها محلول شدن کامل در عرض ۶۰ دقیقه اتفاق نمی افتد. وجود تکه های موکوس یک عامل مهم در این امر است. لوله سیمن نرمال حاوی تکه هایی شبیه ژله می باشد (اجسام ژلاتینوز) که محلول ، مایع نمی شود. علت این امر به طور

1- Spermatogenesis 3-Litter Glands 2-Semen

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

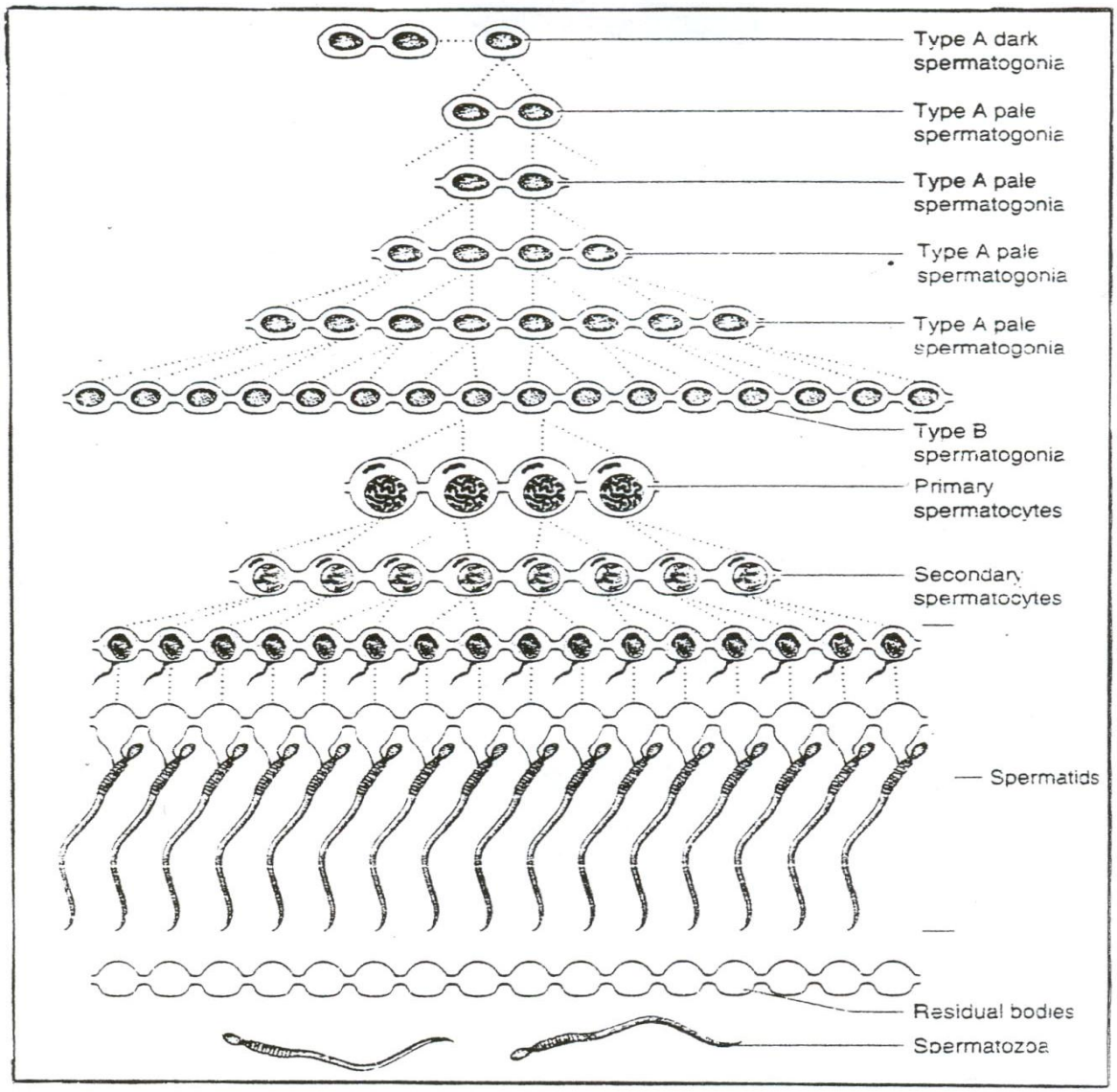
کامل مشخص نیست .گاهی می توان به نمونه ای که مایع نمی شود موادی اضافه کرد مانند برومیلن یا پلاسمین که در این صورت برای آزمایش آماده می باشد[171].

۱-۳-۱-آنالیز مایع انزالی:

به علت عدم وجود یک تست آزمایشگاهی برای پیشگویی قطعی پتانسیل باروری در مردان ، آنالیزمایع انزالی(SA)[1] اولین تست مورد استفاده برای پیش بینی قدرت باروری مردان می باشد . قبل از گرفتن نمونه انزالی ، به بیمار آموزش داده می شود تا از عمل انزال به مدت ۲-۳ روز پرهیز نماید .هر چند اورولوژیستها ۵ روز را ترجیح می دهند .حجم مایع انزالی ، غلظت اسپرم و تعداد اسپرم ، بطور مداوم طی ۱۰ روز پرهیز جنسی افزایش می یابد . انزال مکرر ممکن است همراه با کاهش حجم مایع انزالی و کاهش تعداد کلی اسپرمهای متحرک باشد. در حالیکه انزال با دفعات کمتر ، با کاهش اسپرمهای دارای مورفولوژی طبیعی همراه بوده است[118]. سازمان بهداشت جهانی(WHO) [2] استفاده ازپروتکل استانداردی را جهت ارزیابی مایع سمینال پیشنهاد کرده و طبق این پروتکل ، هرنمونه از نظر پارامترهای میکروسکوپی وماکرسکوپی مورد ارزیابی قرار می گیرد. برای انجام آنالیز، نمونه انزال افراد معمولاً به روش خود انزالی [3] جمع آوری می شود. این روش نمونه گیری نسبت به نمونه گیری سیمن ازطریق مقاربت فواید زیادی دارد. از جمله می توان به اجتناب از تأثیرحرارت، تسریع در انجام تست وعدم آلودگی با ترشحات دستگاه تولید مثل زن اشاره کرد. حدود۱۵٪ بیمارانی که ازلحاظ پروتکل استاندارد WHO، نرمال و دارای اسپرموگرام [4] طبیعی هستند، یعنی مایع سیمن آنها از لحاظ ماکروسکوپی (سیالیت، ظاهر، حجم، ویسکوزیته وPH) و میکروسکوپی (تعداد اسپرم، تحرک، آگلوتیناسیون، مورفولوژی، میزان زنده بودن و حضور یا عدم حضورسلول های غیراسپرمی) نرمال است، دارای مشکل ناباروری می باشند و بالعکس درمردان با آنالیز سیمن غیرطبیعی، موارد باروری هم مشاهده شده است.بنابراین آنالیزمایع سیمن برای شناسائی دقیق نقایص اسپرمی موجود دربیماران با فاکتورهای ناباروری مردانه کافی نیست و انجام تست های تکمیلی ضروری می باشد[118].

1-Semen Analysis
2-World Health Organization
3-masturbation
4-Spermogram

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!



شکل ۱-۱ : تصویر منشاء دودمانی سلولهای زایای مرد .

فقط سلولهای اسپرماتوگونیای A بسیار ابتدایی ، سیتوکینز کامل دارند تا بتوانند جمعیت سلولهای بنیادی را تامین کنند . اما وقتی این سلولها ، مجموعه سلولهای بنیادی را ترک می کنند در هر تقسیم متوالی ، پلهای سیتوپلاسمی ، سلولها را به هم وصل می کنند تا وقتیکه اسپرمهای منفرد از اجسام باقیمانده جدا شوند . در واقع ، تعداد حقیقی سلولهای به هم پیوسته از آنچه در تصویر نشان داده شده بسیار بیشتر است .

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

جدول ۱-۱: خصوصیات میکروسکوپی نمونه انزال طبیعی مطابق با استانداردهای سازمان بهداشت جهانی(WHO ۱۹۹۹/)

خصوصیات مورد نظر	مقادیر نرمال
حجم	۲ ml
غلظت اسپرم	٦ml ۱۰× ۲۰ یا بیشتر
کل تعداد اسپرم	٦ ۱۰ × ٤٠ اسپرم در هر انزال یا بیشتر
تحرک	دارای ۵۰ درصد یا بیشتر حرکت (a+b)* یا دارای ۲۵ درصد یا بیشترحرکت a در طی ٦۰ دقیقه پس از انزال
قابلیت حیات	دارای ۵۰ درصد یا بیشتر اسپرم زنده
سلولهای سفید	کمتر از ml /٦ ۱۰ × ۱
مورفولوژی	۳۰ درصد اسپرم دارای شکل طبیعی یا بیشتر

* a: حرکت تند پیشرونده

b: حرکت آهسته پیشرونده

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

۱-٤- پارامترهای اسپرم

۱-٤-۱-مورفولوژی[1]

یکی از پارامترهای مهم آنالیز اسپرم مورفولوژی است [96] . در واقع استاندارد کردن مورفولوژی اسپرم روش بسیار مشکلی است ، زیرا طیف مورفولوژی بسیار وسیع است. طبقه بندی های زیادی در زمینه مورفولوژی اسپرم انجام شده که کار دشواری است. زیرا هر کدام طیفی از طبقه بندی استاندارد را مشخص می کند ،در زمینه مورفولوژی اسپرم دو سوال مهم مطرح می باشد:مورفولوژی نرمال کدام است؟ مرفولوژی غیر طبیعی چه تاثیری در قدرت باروری اسپرم دارد؟ تقسیم بندی قدیمی شکل طبیعی اسپرم رابیضی شکل معرفی می کند که دارای سر به ابعاد ۵×۲/۵ میکرون است و حدود ۷۰٪ قدامی سر توسط آکروزوم یکنواخت پوشانده شده، در ضمن دارای گردن سالم و بدون نقائص آناتومیکی با دم دراز و کشیده می باشد. ولی تقسیم بندی Strict بر مبنای تعداد اسپرم موجود در موکوس کانال اندروسرویکس بعد از نزدیکی استوار است [97].برخی محققین دسته ای از اسپرم های یکنواخت را در کانال اندروسرویکس یافتند که از نظر بیولوژیکی برای باروری انتخاب شده بودند. محدوده های مورفولوژی طبیعی با مقایسه این اسپرمها با لقاح خارج رحمی مشخص شد. مورفولوژی فقط به عنوان یک اصل فرعی برای باروری تلقی می شود و یک عامل تعیین کننده باروری در مقابل ناباروری است . تمامی نمونه های سیمن دارای درصد خاصی از اسپرمهای غیر طبیعی هستند. ناهنجاریهای مورفولوژیک ممکن است شامل ناهنجاریهای سر ، قطعه میانی ، و یا دم اسپرم باشند . ناهنجاریهای سر اسپرم همراه با نازایی هستند. بیمارانی که بطور مداوم دارای کمتر از ٤٠ درصد اسپرماتوزوئید با مورفولوژی طبیعی هستند بعنوان افراد مبتلا به تراتوزوسپرمی[2] در نظر گرفته میشوند. پیشنهاد کرده اند که مورفولوژی اسپرم ممکن است پیشگویی کننده لقاح موفقیت آمیز خارج رحمی باشد [144].مورفولوژی اسپرم با قدرت باروری ارتباط دارد. ارزیابی مورفولوژی اسپرم یک شاخص حساس کیفیت اسپرماتوژنز و باروری است . وجود نقایص مورفولوژیکی می تواند با فعالیت نرمال اسپرم مغایرت داشته باشد.این نقایص میتوانددر

1- Morphology
2-Tratozoospermia

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

جلوگیری از عبور اسپرم از موکوس سرویکس ، باند شدن اسپرم با زونا پلوسیدا و واکنش آکروزومی نقش داشته باشد . گاهی افراد با تعداد طبیعی اسپرماتوزوئید نابارور می باشند. درچنین حالتی گاهی دیده می شود که تا ۱۰۰٪ اسپرم ها ازنظرمورفولوژی غیرطبیعی هستند . مثلا": داشتن دو سر، داشتن سرغیرطبیعی و یا دم غیرطبیعی دارند. درموارد دیگراسپرم از نظر ساختمانی کاملاً طبیعی به نظرمی رسد اما به دلایلی ، کاملاً بی حرکت یا نسبتاً بی حرکت است. هرگاه قسمت اعظم اسپرماتوئیدها از نظرشکل غیرطبیعی باشند و یا فاقد حرکت باشند، با وجودیکه اسپرماتوزوئیدهای شخص طبیعی به نظر می رسند ولی احتمال ناباروری وجود دارد. براساس مطالعات اپیدمیولوژی کمترین حد مورفولوژی طبیعی اسپرم برای حاملگی طبیعی ۳۰٪ درنظرگرفته می شود.اسپرماتوزوئید پستانداران مختلف از نظرشکل ظاهری با هم متفاوت می باشند. درهمه پستانداران اسپرم از سه قسمت اصلی سر [1] ،بخش میانی[2] و دم [3] تشکیل شده است . هر سه قسمت توسط غشاء پلاسمائی پوشیده شده اند. غشاء پلاسمائی ساختمان پیوسته ای است که درانتقال مواد غذائی به داخل سلول نقش فعال دارد. قسمتی ازغشاء پلاسمائی که سطح قدامی سراسپرم را می پوشاند درارتباط با واکنش آکروزومی عمل می نماید. این عمل بعد از ظرفیت یابی و قبل از نفوذ به ناحیه شفاف اطراف تخمک صورت می گیرد[86] . بخش عمده سر حاوی هسته با کروموزم های هاپلوئید است . هر کروموزوم حاوی DNA است که با پروتئین های پروتامین پیچیده شده است . پروتامین نقش عمده ای در تراکم DNA اسپرم دارد. این متراکم شدن باعث کاهش حجم اسپرماتوزئید جهت تسهیل انتقال در دستگاه تناسلی ماده و به حداقل رسیدن آسیب به DNA اسپرم می شود.دو سوم جلوی سر اسپرم دارای ساختمان کلاهک مانندی به نام آکروزوم است که از دستگاه گلژی مشتق می شود.آکروزوم دارای آنزیم های هیدرولیتیکی ازجمله هیالورونیداز ، اسید فسفاتاز و نورآمینیداز می باشد که برای انجام واکنش آکروزومی و جهت نفوذ اسپرم به پوشش خارجی محاط کننده دور تخمک

1-Head 2-Midpiece 3-Tail

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

ضروری است . بخش میانی اسپرم حاوی میتوکندری است که ATP [1] لازم برای حرکت دم ودرنتیجه حرکت اسپرم و حفظ تعادل اسمزی را تولید می کند. در بخش دم که تاژک نامیده می شود نیروی حرکتی لازم برای رسیدن اسپرم به تخمک و نفوذ به داخل زوناپلوسیدا [2] را فراهم می کند. این تحرک ناشی از حرکات موجی شکل تاژک است که از انرژی بیوشیمیایی ATP حاصل می گردد و با تبدیل انرژی جنبشی باعث روی هم لغزیدن میکروتوبولهای موجوددرتاژک و تحرک اسپرم شود [86].

۱-٤-۲- تحرک[3] اسپرم:

یک پارامتر مهم در آنالیز مایع سیمن ، تحرک اسپرم است که بصورت درصد اسپرمهای دارای تحرک پیشرونده در مایع انزال تعریف میشود. تحرک پیشرونده ، در واقع با محاسبه حرکت سریع (a) به اضافه حرکت کند (b) به دست می آید . تعداد کل اسپرمهای متحرک ، با محاسبه تحرک پیشرونده به اضافه حرکت غیر پیشرونده (در جا d) محاسبه می شود . WHO و اکثر آزمایشگاهها از تحرک ۵۰٪ بعنوان حد پایین طبیعی استفاده میکنند. با وجود این ، انجمن تکنولوژی کمک باروری(ART) [4] ، تحرکی به میزان ٤۰ درصد را به عنوان معیاری برای تعریف ناباروری ناشی از فاکتور مردانه قبول دارد . به این ترتیب حد پایین طبیعی ، تغییرات بارزی را نشان می دهد و بستگی به تجربه آزمایشگاه منطقه دارد . بطور کلی مردان با تعداد اسپرم متحرک بیشتر از ۱۰ میلیون در هر میلی لیتر ، نسبت به آنهایی که ۲ تا ۱۰ میلیون اسپرم در هر میلی لیتر دارند ، میزان باروری بالاتری دارند. تحرک اسپرم ناشی از حرکات موجی شکل تاژک می باشد که از تبدیل انرژی بیوشیمیائی ATP به انرژی جنبشی ناشی می گردد و سبب روی هم لغزیدن میکروتوبول های موجود درتاژک می شود. دراسپرماتوزوئیدهای انسان ناهنجاری های عناصرمختلف تاژک، باعث اختلال در تحرک می شود و براساس نقص در ساختمان آکسونم و یا پیش آکسونم[5] تقسیم بندی می شود. حرکت نفوذی اسپرم برای عبورازموکوس گردن رحم ونفوذ به لایه شفاف تخمک ضروری به نظر می رسد.

1-Adenosine three hosphate
2-Zona pllucida
3- Motility
4- Assisted Reprodactive Technology
5– Preaxonem

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

اسپرم های حاصل ازانزال دارای سرعت های مختلف بوده و تحت تأثیرفاکتورهای متعددی می باشد.مثلا"اگر ویسکوزیته مایع سمینال زیاد باشد یا درجه حرارت محیط اسپرم کاهش یابد، تحرک اسپرم کاهش می یابد[123] . رادیکالهای آزاد اکسیژن[1] (ROS) می تواند با آسیب به ساختمان تاژک سبب کاهش تحرک اسپرم شوند یا مثلا" واریکوسل باعث افزایش حرارت کیسه بیضه شده و سبب کاهش اسپرماتوژنز و تجمع ترکیبات فرعی متابولیک می شود که باعث کاهش بیشتر تحرک وافزایش مورفولوژی غیرعادی و کاهش عملکرد سلولهای بینابینی می گردد[4].با کمک روش های رنگ آمیزی مناسب مشخص شده که وجود اسپرمهای غیرمتحرک به مفهوم مرگ این سلولها نمی باشد. بدنبال مقاربت، اسپرمهارامی توان بین ۳-۱/۵ دقیقه پس از انزال،درموکوس گردن رحم جستجو کرد و حدود۲ساعت پس از مقاربت اسپرماتوزوئیدها خودرا به لوله رحم می رسانند.ازمیلیون ها اسپرماتوزوئیدی که دروازن وجود دارند، تنها ۵۰۰۰-۱۰۰۰عدد ازآنها به تخمک می رسدوفقط یکی ازآنها تخمک را بارورمی کند[59].کاهش تحرک اسپرم که با عنوان آستنوزواسپرمیا[2] خوانده می شود توسط عواملی ایجاد می شود که عبارتند از: واریکوسل[3]، عدم انزال طولانی مدت،ابنورمالی های بیوشیمیایی یا ساختمانی اجزای اسپرم و اپیدیدیم و آنتی بادیهای ضد اسپرم[ ] 115. بسیاری از مراکز میزان تحرک اسپرم را طبقه بندی کرده اند که از بیحرکت تا حرکت سریع رو به جلو متغیراست [104،150] .گرچه امروزه در آزمایشگاههای پیشرفته از تکنولوژی CASA[4] برای بررسی کلینیکی حرکت اسپرم استفاده می کنند اما روش مرسوم ، بررسی میکروسکوپی در آزمایشگاه است.

۱-٤-۲-۱- درجه بندی تحرک اسپرم :

سازمان بهداشت جهانی (WHO) اسپرمها را از نظر تحرک به ٤ دسته تقسیم کرده است که شامل :

الف) حرکت سریع و پیش رونده درمسیرمستقیم(نوع a)[5] : اگر اسپرمی چهار برابر اندازه سر به جلو حرکت کند (حدود ۲۵ میکرو متر در ثانیه) آن را دارای حرکت سریع میدانیم. (اندازه سر اسپرم حدود 4-5 میکرون طول دارد) .

ب) حرکت رو به جلو پیشرونده آهسته(نوع b)[6]:اگر اسپرم سریع از جلوی چشم ما دور نشود ، یعنی حدود 5/ ۱۵µm حرکت داشته باشد

1-Reactive oxygen species
2-Astenozoospermia
3-Varicocele
4-Computer-aided sperm analysis
5- Quick Progressive
6- Slow Progressive

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

دارای حرکت آهسته است.

ج)دارای تحرک اما بدون الگوی پیشرونده(نوع C)[1]:اگراسپرم،متحرک باشدولی هیچگونه پیشرفتی به جلونداشته باشددارای حرکت درجا است.

د) فاقد تحرک [2] (نوعD):چنین اسپرمی ثابت است وهیچ حرکتی ندارد [150]

۱-٤-۳- قابلیت حیات [3]اسپرم :

قابلیت حیاتی اسپرم و میزان هیپواسمولاریتی ، توسط ساختمان غشاء اسپرم و عملکرد آن تعیین میشود.اسپرم زنده با غشاء سالم اجازه عبور برخی رنگها مانند ائوزین و تریپان بلو را به داخل سیتوپلاسم نمیدهد.بنابر این در مقابل زمینه تاریک ، سفید به نظر میرسد.اسپرمی که ساختمان غشاء آن نقص داشته باشدنمیتواند از نفوذ رنگ به داخل خود جلوگیری کند لذا سیتوپلاسم آن به رنگ صورتی یا آبی دیده میشود.بنابراین کل ساختمان غشایی بوسیله آزمایش قابلیت حیات اسپرم اندازه گیری میشود[172 ، 93 , 92] . اندازه گیری قابلیت حیاتی اسپرم مهم است ، زیرا باعث جداسازی نمونه های نکرواسپرمیک از نمونه های اسپرم زنده ولی بدون تحرک میشود. قابلیت حیاتی اسپرم با میزان باروری ارتباط دارد [132 ، 23] . بررسی قابلیت حیات اسپرمها معمولا" در نمونه هاییکه درصد اسپرمهای بیحرکت در آنها بیش از ۵۰ در صد است انجام میشود [172]. بنابر این برای شناسایی اسپرمهای زنده از مرده ، در نمونه های آستنو اسپرمی و نمونه های حاصل از انجماد که در صد اسپرمهای بیحرکت در آنها زیاد است ، از این تستها استفاده میشود [132 ،23 ، 93]. روش دیگر بررسی قابلیت حیات اسپرم ، استفاده از تست هیپواسمولاریتی [4](HOS) می باشد. یکی از خصوصیات مهم غشاء سلول در این است که بطور انتخابی اجازه عبور ملکولها از خود را میدهد .سلول اسپرمی نیز وقتی در شرایط اسمزی پایین قرار گرفت دراثر ورود آب بداخل سیتوپلاسم، اسپرم متورم و غشاء آن گسترش می یابد،این وضعیت در ناحیه دم بصورت پیچ خوردگی و تورم در غشاء بخوبی ظاهر میشود و میتوان آنرا با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده کرد.این تغییرات مورفولوژی نشانه پایداری ساختمان غشاوفعالیت طبیعی غشای اسپرم است [85].

1-Non Progressive
2- Immotile
3- Viability
4-Hipo Osmolarity

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

۱-٤-٤- حجم[1]:حجم نرمال مایع انزالی براساس معیارWHO بیشترازml ۲ می باشد و ازفردی به فرد دیگرمتغیرمی باشد. اگرحجم انزال کمترازml۱باشد، هیپواسپرمی[2] و اگر حجم انزال بیش ازml٦ باشد به آن هیپراسپرمی[3] می گویند. غالباً حجم خیلی کم مایع سمینال (کمترازml۱) همراه با شمارش پائین و درحجم زیاد (بیش ازml٦)، تعداد اسپرماتوزوئیدها کمتراز حد نرمال است که ممکن است ناشی از یک دوره طولانی مدت اجتناب از انزال، یا تولید زیاد مایع سمینال باشد. غالباً قسمت ابتدائی انزال حاوی تعداد زیادی اسپرماتوزوئید است و ترشحات وزیکول سمینال که ۷۰٪ انزال را شامل می شود قسمت دوم انزال را تشکیل می دهد. اگرفرد فاقد مایع انزال باشد به آن"آسپرمی" [4] گویند. حجم نمونه را می توان از روی ظرف نمونه گیری توسط کشیدن نمونه به داخل پیپت دهانه گشاد اندازه گیری کرد. چنانچه قرار باشد سیمن در محیط کشت قرار گیرد یا برای لقاح خارج رحمی استفاده شود یا برای مطالعات بیولوژیک لازم باشد، باید با ظروف استریل حمل و نقل شود[85] .

۱-٤-٥- غلظت[5]:

یکی از فاکتورهای مهم آنالیز سیمن ، تعیین تعداد اسپرم درهرمیلی لیترانزال است. غلظت اسپرم ممکن است با استفاده از روش هموسیتومتر یا روش بکارگیری حفره ویژه شمارش اسپرم اندازه گیری شود که روش هموسیتومتر مرسوم تر است . هرچند گستره تعداد اسپرم برای افراد بارور بین ۱۲۰-٦۰ میلیون درمیلی لیتراست اما طبق معیارWHO، افراد دارای بیش از۲۰میلیون اسپرم درهرمیلی لیتررا جزء افراد بارور به حساب می آورند. بطور کلی از نظرتعداد اسپرم افراد را به چهار گروه تقسیم می کنند:

نرموزوسپرمی[6]: مایع انزالی دارای تعداد اسپرم مطابق با استانداردWHO است(بیشتراز۲۰میلیون درهرمیلی لیترانزال)

اولیگوزوسپرمی[7]: مایع انزالی دارای تعداداسپرم کمترازاستانداردWHO (کمتراز۲۰میلیون درهرمیلی لیترانزال)

1-Volume
2-Hypospermia
3-Hyperspermia
4-Aspermia
5-Concentration
6-Normozoospermia
7-Oligozoospermia

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

پلی زوسپرمی[1]: مایع انزالی دارای اسپرم بالا (بیشتراز ۲۵۰میلیون درهرمیلی لیترانزال).

آزوسپرمی [2]: عدم وجود اسپرم درمایع انزال که میتواند بدلایل زیر باشد:

۱) وجود نقص در مسیر سنتز و ترشح گنادوتروپین ۲)فقدان اسپرماتوژنز در بیضه ها ۳) انسداد مجرا ،حالتی که اسپرم فعال تولید میشود اما در بیضه ها محبوس بوده و راهی به خارج ندارد[90].

۱-٤-٦- PH : PH نمونه نرمال مطابق استانداردWHO، ۷/۲≤(۷/۸-۷/۲)است که به علت ترشحات اسیدی پروستات و ترشحات قلیائی سمینال وزیکول می باشد.PH بالای ۸ ممکن است به علت عفونت پروستات باشد که باعث کاهش ترشحات اسیدی پروستات ازجمله اسیدسیتریک می شود و PH خیلی اسیدی پائین تراز ٦/٥ به علت نقص در عملکرد سمینال وزیکول میباشد.

۱-٤-۷- ظاهر[3]: نمونه ها باید به سرعت پس ازانزال مشاهده شوند. رنگ طبیعی آن سفید شیری است. غالباً بعد از محلول شدن سیمن یا یک ساعت بعد از نمونه گیری در دمای اتاق، ظاهر نرمال سیمن یکنواخت و به رنگ خاکستری کدر در می آید. اگر تعداد اسپرم در نمونه کم باشد زیاد هموژن به نظر نمی رسد و اگر گلبول قرمز در سیمن باشد قهوه ای است [172] .

۱-٤-۸- ویسکوزیته4:

بلافاصله پس ازانزال، مایع سمینال بصورت لخته، منعقد می گردد که ازنظر میکروسکوپی بصورت شبکه باریک و فشرده دیده می شود که حرکت اسپرم را محدود می سازد. این ژل لخته مانند به طورطبیعی حداکثر تا ظرف یک ساعت پس ازانزال بصورت مایع درمی آید. ویسکوزیته مایع انزالی باید بعد ازسیالیت کامل ارزیابی شود و مایع سمینال غیر سیال با ویسکوزیته بالا دارای اسپرم با تحرک کمتر و قدرت باروری کمتری می باشد.

۱-٥- انجماد5:

انجماد به منظور حفظ و نگهداری طولانی مدت سلول ها و بافت ها در شرایط حرارت بسیار پایین انجام می شود .بیولوژی انجماد مطالعه اثرات دماهای پائین روی سلول های زنده می باشد. اگر آب موجود در سلول ها در اثر کاهش حرارت به یخ تبدیل گردد، و به سلول آسیب نرساند و به طور مؤثری حرکت مولکولی را متوقف نماید، فرآیندهای بیوشیمیایی متابولیسم در سلول به تعویق افتاده و یا متوقف می گردد و باعث افزایش بقاء سلول می گردد. در هنگام انجماد اصلی ترین بخش سلول یعنی غشاء آن بیشتر از سایر قسمت ها در

1-Polyzoospermia
2-Azoospermia
3- Appearance
4- Viscosity
5- Cryopreservation

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

معرض آسیب قرار دارد[117].امروزه از اسپرم منجمد شده / ذوب شده انسان برای بسیاری از روش هـای کمـک باروری با استفاده از اسپرم اهدایی و تلقیح داخل رحمی توسط اسپرم شوهر به طور روتین در آزمایشگاه ها انجام مـی گردد[107]. محیط های تجاری، روش ها و تجهیزات مختلفی جهت انجماد اسـپرم وجـود دارد، ولـی متـداولترین محیطها شامل محیط HSPM[1]، GEYC[2] و TYBG[3]، است [154].

۱-5-۱- تاریخچه انجماد اسپرم:

در سال ۱۷۷٦ برای اولین بار انجماد اسپرم گزارش شد که اسپرمهای سیمن یخ زده حیوان در برف، پس از ذوب مجدد 4 و رساندن به حرارت محیط، مجددا" تحرک خود را به دست می آورند. ۹۰ سال بعد، (سال ۱۸٦٦) متوجه شدند که تعداد کمی از اسپرم ها پس از ذوب که مدت زیادی در ۱۹ ^{o}C- ذخیره شده بود، دوباره تحرک خود را به دست آورده اند و پیشنهاد شد که بانک اسپرم منجمد انسان می تواند باعث بقای نسل وی بعد از مرگ پدر گردد[7]. در سال ۱۹۳۸، Jhanel ، مشاهده کرد که بخشی از اسپرمهای انسان با ذخیره در حرارت ۷۹^{o}C-، بعد از گذشت ٤۰ روز تا حدی زنده و دارای تحرک بودند [87]. در اوایل سال ۱۹٤۰ دریافتند که برخی از اسپرم ها بعد از انجماد، قابلیت حیات خود را حفظ می کنند. آزمایشات اولیه با سیمن منجمد انسان نشان داد که بازده تحرک و بقاء اسپرم ها در غیاب محیط های نگهدارنده[5] بسیار محدود می باشد [74] . در سال ۱۹٤٦ نقش حفاظتی گلیسرول در انجماد گزارش شد. Polge و همکارانش در سال ۱۹٤۹ از گلیسرول، به عنوان نگهدارنده مناسب برای اسپرم پرندگان، استفاده کردند [76] . در سال ۱۹۵۳ انجماد اسپرمهای انسان روی یخ خشک (۷۰ ^{o}C-) گزارش شد و مشاهده گردید که اسپرمها پس از ذوب ، قادر به باروری بوده و جنین طبیعی ایجاد می کند. اولین نوزاد متولد شده توسط اسپرماتوزوئیدهای منجمد شده انسان در سال ۱۹۵۳ گزارش شد. در سال ۱۹٦۳، Sherman تکنیک استفاده از بخار نیتروژن برای انجماد اسپرم انسان و سپس

ذخیره کردن آن در ۱۹٦ ^{o}C- راابداع نمودوتولد نوزاد با استفاده

1-

Human Sperm Preservation Medium

2-Glycerol Egg Yolk Citrate

3-Tes-Yolk Buffer Glycerol

4- Thawing

5-Cryoprotectant

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

از اسپرم منجمد شده به این روش را گزارش کرد [74]. در سال ۱۹٦٤ تولد اولین نوزاد حاصل از تکنیک انجماد در فاز بخار ازت مایع و استفاده از نگهدارنده گلیسرول گزارش شد و در همین سال سمی بودن ترکیب DMSO[1] برای اسپرم انسان مشخص گردید[75]. تاکنون آخرین گزارش مربوط به طولانی ترین مدت انجماد اسپرم که منجر به تولد نوزاد پس از AIH[2] شد، ۱۵ سال و ۹ ماه می باشد [74]. پیشرفت در زمینه انجماد اسپرم باعث ایجاد بانک های اسپرم گردید. از سال ۱۹۷۰ بانک های اسپرم انسان توسعه بسیار یافت و در سال ۱۹۷۳ اولین انجمن بانک اسپرم انسان در فرانسه تشکیل شد [125]. مهمترین اصل در فرآیند انجماد، به حداقل رساندن آسیبی است که در اثر تشکیل کریستال های یخ[3] درون سلولی در هنگام قرار گرفتن سلول در معرض محلول های بسیار غلیظ رخ میدهد و نیز کاهش شوک اسمزی است که با آهسته سرد کردن و خروج آب داخل سلولی واستفاده از نگهدارنده انجمادی مناسب بهبود می یابد [117]. انجماد سازی معمولی باعث وارد شدن آسیب فیزیکی ـ شیمیایی زیاد به غشاهای خارج سلولی و درون سلولی اسپرمی می گردد که به جهت تغییر در عبور فاز مایع و یا پراکسیداسیون مایع افزایش یافته نسبت داده می شود [79].

۱-۵-۲- اندیکاسیون های انجماد اسپرم:

امروزه به دلیل نیاز زوجین نابارور به داشتن فرزند، تکنیک های کمک باروری (ART) نظیر IVF 4 ، IUI 5 ، 6 ICSI، GIFT 7 ، ZIFT 8 ، AID 9، AIH ، SUZI 10 گسترش فراوانی یافته است. در روش AID از تلقیح داخل رحمی اسپرم اهدا کننده و در روش AIH از تلقیح داخل رحمی اسپرم شوهر استفاده می شود. در AID شخص اهدا کننده به عنوان فرد بارور تلقی می گردد که بارور بودن او به اثبات رسیده است، ولی در AIH، شوهر کاهش قدرت باروری دارد و میزان موفقیت در باروری ضعیف است. روش های متعددی جهت بهبود کیفیت نمونه سیمن برای تلقیح مورد استفاده قرار می گیرند در AID سیمن

1-Dimethyle sulphoxide
2-Artificial Insemination with Husband´s sperm Gamete
3- Ice formation
4- In Vitro Fertilization
5- Intra Uterine Insemination
6- IntraCytoplasmicSpermInjection
7- Intra Falopian Transfer
8- Zygot Intrafallopian Transfer
9- Artificial Insemination by Donor
10- Sub-Zonalin semination

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

کامل بدون هیچ تغییری به داخل واژن تزریق می گردد و بهترین نتایج با استفاده از سیمن تازه به دست آمده است .اما امروزه در تمامی روش های مدرن AID از نمونه های سیمن منجمداستفاده می گردد که در بانک اسپرم از جمله بانک های اسپرم بین المللی در بریتانیا، فرانسه، دانمارک و آمریکا ذخیره شده اند[20].اگر نمونه های مایع سیمن به صورت ذخیره وجود داشته باشند برنامه ریزی برای AID بسیار راحت تر خواهد بود. چرا که حضور شخص اهدا کننده اسپرم در کلینیک جهت دسترسی در روزهای تخمک گذاری همسر ضروری نخواهد بود،همچنین از سیمن منجمد شده یک اهدا کننده می توان برای تمام دوره چهار روزه قبل از تخمک گذاری و نیز از یک اهدا کننده می توان برای حاملگی های بعدی استفاده کرد[7].

۱-۵-۳- نگهدارنده های محیط انجماد:

برای انجماد سلول های مختلف از جمله اسپرم، استفاده از یک محیط بیولوژیکی حاوی مواد محافظ انجماد ضروری می باشد. مواد محافظ انجماد ، باعث کاهش نقطه انجماد می گردد و با جلوگیری از تشکیل نامناسب کریستالهای یخ ، اثرات زیانبار انجماد را به حداقل می رساند . همچنین این مواد باعث کاهش غلظت الکترولیت ها و حفظ PH محیط می گردد.انجماد اسپرم انسان بدون ماده محافظ، باعث کاهش زیاد قدرت حیاتی اسپرم می گردد . ولی باید توجه داشت که مواد محافظ انجماد ، برای سلول توکسیک هستند. برای غلبه بر سمیت معمولاً از مخلوطی از چندین نوع ماده محافظ با غلظتهای پائین تر استفاده می گردد[79]. نگهدارنده های محیط انجماد به دو دسته کلی تقسیم می شوند: مواد محافظ نفوذ پذیر، مواد محافظ نفوذناپذیر[1].

۱-۵-۳-۱- مواد محافظ نفوذ پذیر:

این ترکیبات میتوانند به درون سلول نفوذ کنند و شامل گلیسرول، دی متیل سولفوکساید(DMSO)[2]، پروپاندیول(PROH)[3] و اتیلن گلیکول(EG)4 هستند. این مواد

1-Impermeable Cryoprotectant

2-DimethylSulfoxide

3- Propanediol

4-Ethylenglycol

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

در آب محلول می باشند و باعث جلوگیری از دسترسی سلول به غلظت بالای نمک هـا و الکترولیـت هـا از طریـق باند شدن با آنها، میانکنش با غشاء با تغییر حالت سلول از شکل نسبتاً مایع به شکل نسبتاً جامد در طی سـرد کـردن و لذا جلوگیری از چروکیدگی سلول و جانشین شدن آب داخل سلول، کاهش اندک نقطه انجماد محـیط و جلـوگیری از تغییر ساختمان ترکیبات درون سلولی مثل آنزیم ها می گردند و در نتیجه در حضور آنها یخ داخل سلولی در دمای ^{o}C ٤٠- تا ٥٠- تشکیل نمی شود. در صورتی که شکل گیری یخ در بیرون سلول القاء شده و فشار اسمزی بیرون سلول افزایش یابد، آب از سلول به محلول بیرون سلولی جریان می یابد . از آنجاییکه نفوذپذیری غشاء نسبت بـه آب بیـشتر از نفوذپذیری غشاء نسبت به مواد محافظ انجماد است، بنابراین سرعت خروج آب از سـلول سـریع تـر از ورود مـواد محافظ به درون سلول می باشد، تا زمانی که مواد محافظ دوباره به تعادل برسند می تواند باعث چروکیدگی سلول، بـه علت خروج سریع آب گردد که با گذشت زمان تعادل اسمزی برقرار شده و سـلول بـا ورود مـواد محـافظ بـه انـدازه طبیعی خود بر می گردد. خروج آب از سلول برای انجماد ضروری بوده و از تولید کریستال های یخ درون سلول مـی کاهد و اگر کریستال های یخ درون سلولی از حد مجاز بیشتر گردند به غشاء انـدامک هـای درون سـلول آسـیب مـی رسانند.در بسیاری از تکنیک های انجماد بسته به نوع سلولی که قرار اسـت منجمـد گـردد، تـشکیل بلورهـای یـخ بـه صورت کنترل شده در طی انجماد القاء می گردد که به این فرآیند سیدینگ (Seeding) می گویند. که ایـن عمـل بـا آهسته سرد کردن محیط (در روش دستگاهی یا برنامه ریزی شده) یا القاء تشکیل کریـستال یـخ در طـرف محـیط (در روش غیر دستگاهی یا دستی) صورت می گیرد که باعث افزایش تدریجی اسمولاریته محیط و خارج کردن آب داخـل سلولی می شود[148] .

۱-۵-۳-۲- مواد محافظ نفوذ ناپذیر:

این دسته ترکیبات غیر قابل نفوذ در سلول بوده و مولکول های بزرگی شـامل سـوکروز، فـایکول، زایلـوز و دکـستران هستند که ایجاد یک محیط هیپراسموتیک خارج سلولی جهت خارج کردن آب داخل سلولی مـی نماینـد و بـه همـراه پروتئین ها، لیپوپروتئین ها، زرده تخم مرغ و سرم به عنوان مواد افزودنی استفاده می شـوند کـه سـبب تغلـیظ محـیط خارج سلولی جهت دهیدراتاسیون، جلوگیری از تورم سلول طی ذوب مجدد و در نتیجه کاهش آسیب سلولی به دنبال فریز / ذوب می گردند [148] .مواد محافظ نفوذناپذیردر سلول مـی توانـد کـاهش آب داخـل سـلول راازطریـق دهیدراتاسیون اسموتیک آغاز کند لذا وضعیت

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

سرد کردن/گرم کردن، سرنوشت نهائی آب داخل سلولی را طی روند انجماد تعیین مـی کنـد. درجـه هیدراتاسـیون در داخل یک سلول و در نتیجه شانس بقاء سلول، طی سرد کردن به عوامل زیر بستگی دارد:

۱. درجه حرارتی که در آن با فرو بردن مستقیم نمونه ها در داخل نیتروژن مایع، انجماد خاتمه می یابد که هر چه ایـن درجه حرارت پایین تر باشد، وقت بیشتری برای دهیدراتاسیون بیشتر وجود خواهد داشت.

۲. نوع و غلظت مواد محافظ انجماد. سرعت عبور مولکول های آب از عرض غشاء وابسته به اختلاف غلظت مولکول های حل شده در دو طرف غشاء دارد، هر چه غلظت مواد محافظ انجماد بیشتر باشد. نقطه انجماد پایین تر بوده و این امر سبب دهیدراتاسیون بیشتری قبل از یخ زدن کل آب خارج می گردد.

۳. نفوذپذیری غشای سلول به مولکول های آب و مواد محافظ انجماد.

٤. اندازه سلول، سلول کوچک تر، به دلیل بزرگتر بودن نسبت سطح به حجم، سریع تر سرد می شـود و لـذا مولکـول های آب سلول کوچکتر را نسبت به سلول بزرگتر، سریعتر ترک کنند[148] .

۱-۵-٤- محیط های انجماد اسپرم:

محیط انجمادی که برای اسپرم مورد استفاده قرار می گیرد حاوی یک ماده محافظ مناسب، سیستم بـافری بـرای حفـظ pH و مواد مکمل دیگری مانند زرده تخم مرغ و سرم های حیوانی یا انـسانی مـی باشـد. بعـد از مطالعـه اولیـه روی DMSO به عنوان نگهدارنده محیط انجماد، گلیسرول ۱۰-۵٪ که امروزه استفاده جهانی دارد انتخاب گردید که معمولاً به تنهایی به کار می رود ولی جهت افزایش میزان تحرک بعد از ذوب مجدد با ماده مکمل حاوی پروتئین هـا و قنـدها رقیق می گردد. این مواد مکمل اکثراً دارای زرده تخم مرغ، گلوکز، سوکروز، سیترات، گلیسین و آنتی بیوتیـک هـا مـی باشند . محیط انجمادی DMSO به خاطر وزن مولکولی کم و نفوذپذیری خوبی که به داخـل سـلول دارد، در کـشت های سلولی و روند انجماد استفاده می شود[86]و مانند گلیسرول یک نگهدارنده محیط انجماد بـوده کـه بـه علـت سمیت و اختلال در تحرک اسپرم ها پس از روند انجماد و ذوب، برای انجماد منی انسان پیشنهاد نمی گـردد[20]و عموماً برای انجماد جنین های ١٦-٨ سلولی کاربرد دارد [148].امروزه در بسیاری از این محیط هـا از سـرم جنـین گوساله به منظور تأمین پروتئین های مواد غذایی از دست رفته که با محلول نمکی ساده قابل جبران نبوده، استفاده مـی کنند [20].زرده تخم مرغ اضافه شده به محیط های انجماد همان موادی را که در سرم جنین گاو وجـود دارد، مهیـا می کند و به نظر می رسد که اجزای لیپوپروتئین زرده تخم مرغ فعالیت حفاظتی بیـشتری داشـته و غـشاء اسـپرم را از

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

طریق افزایش سیالیت آن، در برابر آسیب های حاصل از انجماد حفاظت می کند. در محیط انجمادی آنتی بیوتیک های پنی سیلین واستریتومایسین هم استفاده میشود، اگرچه گاهی استفاده از اریترومایسین ارجح تر مـی باشـد و بـه عنـوان جزء استاندارد همه محیط های رشد سلول توصیه می شود، اما استفاده از آنها در محیط های انجمـاد ضـامن وضـعیت استریل نیستند[20] .

۱-۵-۵- روش های انجماد اسپرم[1]:

انجماد شامل رسوب مولکول های آب به صورت کریستال های یخ می باشد که نتیجه آن جدا شدن آب از مـواد حـل شده می باشد که در این روند تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی و غلظت مواد حل شده مشکل ساز می باشـند و بقـاء سلول های منجمد شده بستگی به نوع سلول، مرحله پیشرفت یا تغییرات سـرعت انجمـاد، نـوع نگهدارنـده محـیط و روش انجماد دارد[102].

روش های انجماد را می توان به دو دسته تقسیم نمود:

۱-۵-۵-۱- روش انجماد آهسته[2]:

این روش در چند مرحله انجام می گیرد و به منظور حفظ تعادل بین تشکیل کریستال های یخ داخل سـلول و غلظـت مواد حل شده بکار میرود . این روش به وسیله دستگاه و تجهیزات برنامه ریـزی شـده یـا توسـط روش هـای دسـتی صورت می گیرد. با تحقیقاتی که محققین انجام داده اند مشخص شد که اولین مرحله فرایند انجماد باید تدریجی باشد که سبب توجه بیشتر به این روش گردیده و بسیاری از مراکز درمانی از روش بخار نیتروژن استفاده می کنند که در آن ظروف نگهداری نمونه قبل از انتقال به نیتروژن مایع، در داخل بخار نیتروژن مایع نگه داشته مـی شـوند. دمـای بخـار نیتروژن مایع متغیر بوده و حرارت های C ° ۷۰-،C ° ۸۰- و °C ۹۹- گزارش گردیده است. در سطح نیتـروژن مـایع یک کاهش پیوسته دما وجود دارد و لذا دمای دقیق در یک ارتفاع، بستگی به میزان نزدیکی ظروف نگهداری نمونه بـه سطح نیتروژن مایع، شکل ظروف و عمق آن دارد[102،20].

1-Sperm freezing

2-Slow cooling

روش استفاده از فاز بخار ثابت[1]، نوع ابتدایی سرد کردن آهسته بوده که در آن از فاز بخار نیتروژن مـایع جهـت سـرد کردن استفاده می گردد و ظروف محتوی نمونه، در ارتفاع مشخص از سطح نیتروژن مایع ، بخـار نیتـروژن بـه اطـراف نمونه ها جریان یافته و با تولید سرمای مناسب، ظروف محتوی نمونه را سرد می کنند، سـپس ظـرف را داخـل تانـک

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!

ازت مایع قرار می دهند. در این روش لازم است گرادیان حرارت پایدار در فاز بخار، در بـالای نیتـروژن مـایع تنظـیم گردد. این نکته اهمیت دارد که به دلیل وجود گرادیان حرارتی در فاز بخار، ظروف حاوی نمونه جهت تـاثیر سـرما در طول آنها باید به طور افقی در بخارازت قرار گیرند[117،153 ،156].ساده ترین وسیله برای ذخیره کردن نمونـه ها ، تانک با گردن باریک جهت به حداقل رساندن تبخیر نیتروژن است . این تانک ها جهت نگهداری نـی هـا[2] بـسیار مناسب می باشند و دارای نگهدارنده هایی هستند که نی ها را درون تانک به صورت آویزان نگه مـی دارنـد. در روش انجماد تدریجی نمونه ها را به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال قرار می دهند و با کاهش اندکی در حرارت، نمونه به مـدت ۲۰ دقیقه در بخار نیتروژن، قرار میگیرد. در نهایت نمونه ها در داخل نیتروژن مـایع قـرار داده مـی شـوند[20].نـوع دیگر انجمادآهسته روش انجماد برنامه ریزی شده است که در آن نی های محتوی نمونه درداخل دسـتگاه از حـرارت اتاق تا حرارت^{o}C ۷- تا^{o}C ۵- آهسته سرد می شود (سرعت حدود $۲^{\circ}C/\min$) و چند دقیقه در این حـرارت مانـده، سپس خیلی آهسته تا حرارت^{o}C ٤۰- تا^{o}C ۳۰- سرد می شود (سرعت حدود $-۰/۳^{\circ}C/\min$) و سپس بـا سـرعت حدود $-۵۰^{\circ}C/\min$ تا حرارت^{o}C ۱۹٦- کاهش می یابد و در پایان، نی ها در نیتروژن مایع، تـا موقـع ذوب ، ذخیـره می گردد[117، 156] . اگر سرعت سرد کردن بالا باشد سلول نمی تواند با سرعتی آب را خارج کنـد کـه مـانع از تشکیل کریستال داخل سلولی گردد. از طرفی اگر سرعت سرد کردن خیلی آهسته باشد نیز مجاورت طولانی سلول بـا نمک ها و مواد حل شونده در محیط در غلظت بالا ، سمیت زا مـی باشـد. سـرعت مناسـب سـرد کـردن بـستگی بـه ترکیبات و نفوذپذیری غشاء سلول، نسبت سطح به حجم سلول،حرارت و اختلاف فـشار اسـموتیک دو طـرف غـشاء دارد[148].

1-Static vapor phase cooling method

2-Straw

۱-۵-۵-۲- روش انجماد سریع[1]:

دراین روش ، سلولها برای مدتی بدون برنامـه ریـزی در فاصـله خـاص (۱۵ - ۳۰ cm) از سـطح نیتـروژن مـایع در معرض بخار نیتروژن ، قرار گرفته(حدود ٦۰ °C-) ، سپس بدرون مخزن نیتروژن مایع انتقال داده میـشوند[128]. مهم این است که سرعتهای بسیار سریع(۱۰۰°c/min <)برای سلول کشنده انـد[127] .اگـر چـه انجمـاد سـریع مقداری یخ درون سلولی تولید میکند،اما به علت کوچک بودن، کریستالها سـلول را از بـین نمـی برنـد .اگـر سـرعت

pdfMachine
Is a pdf writer that produces quality PDF files with ease!
Produce quality PDF files in seconds and preserve the integrity of your original documents. Compatible across nearly all Windows platforms, if you can print from a windows application you can use pdfMachine.
Get yours now!