مقاله تحقیقی

اثر تابش لیزر کم‌توان هلیوم - نئون بر تحرک و فراساختار اسپرمهای تازه و منجمد - ذوب شده انسان

امیر خوش‌وقتی M.D., Ph.D. *,**، منصوره موحدین Ph.D.***، ✉ محمد بیات Ph.D.*
احمد حسینی Ph.D.*، یوسف صادقی M.D. Ph.D.* فاطمه السادات رضایی B.Sc.****

* مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی

*** گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

**** دانشجوی کارشناسی ارشد مدیریت پژوهش جهاد دانشگاهی، پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۸۳

چکیده

هدف: انجماد مایع منی، روش مهمی در درمان ناباروری انسان است اما گزارشهای متعددی درباره اثرهای سوء آن بر اسپرم وجود دارد. لیزرهای کم توان از مودالیته های فیزیکی با آثار بیواستیمیولیتوری هستند. هدف این تحقیق، چگونگی تأثیر یک‌بار تابش لیزر کم‌توان هلیوم - نئون با دوز $16J/cm^2$ بر تحرک و خصوصیات فراساختاری اسپرم‌های تازه و منجمد است.

مواد و روشها: ۳۰ نفر از مراجعین واجد شرایط (براساس معیارهای سازمان جهانی بهداشت) به مرکز ناباروری کوثر در سال ۸۲ به روش نمونه‌گیری در دسترس انتخاب شده و مایع منی اخذ شده به صورت تصادفی در گروه‌های چهارگانه قرار داده شد. آنالیز اسپرم قبل و بعد از تابش لیزر، پس از انجماد و ذوب، و بعد از تابش لیزر به دنبال ذوب انجام شد. از هر چهار گروه برای میکروسکوپ الکترونی انتقالی، نمونه تهیه شد. تحرک اسپرم و درجات آن با آزمون ویلکاکسون تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: انجماد به صورت معنی‌داری موجب کاهش آماری درصد تحرک اسپرم شد ($p=0.0001$). تابش لیزر کم توان روی نمونه‌های طبیعی که هیچ‌گونه مداخله دیگری روی آنها انجام نشده بود تأثیری نداشت؛ اما روی نمونه‌های طبیعی منجمد - ذوب شده موجب افزایش معنی‌دار درصد تحرک اسپرم‌ها شد ($p=0.033$). در مطالعات میکروسکوپ الکترونی انتقالی پس از تابش لیزر، غشای هسته اسپرم نامنظم شده و در برخی قسمتها پاره و همراه با اکروزوم از هسته جدا شده بود. پس از انجماد - ذوب، اسپرمها شکل طبیعی خود را از دست داده بودند.

نتیجه‌گیری: لیزر کم‌توان می‌تواند تحرک اسپرم را بعد از انجماد - ذوب افزایش دهد و احتمالاً میزان باروری در موارد استفاده از اسپرم منجمد را افزایش دهد.

کلید واژه‌ها: تحرک اسپرم، لیزر، انجماد اسپرم، فراساختار

مقدمه

انجماد مایع منی و اسپرم، روش مهمی در درمان ناباروری انسان است [۱] که کاربرد آن در سالهای اخیر رو به افزایش است [۴-۲]. این روش در موارد زیر کاربرد دارد:

- برنامه‌های تلقیح مصنوعی به‌وسیلهٔ اسپرم اهدایی یا اسپرم همسر [۵]. امروزه با انجام تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) که امکان ایجاد باروری با استفاده از تعداد محدود اسپرم فراهم شده است [۷-۲] که می‌بایست همین تعداد نیز به‌گونه‌ای حفظ شود؛

✉ آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، صندوق‌پستی ۱۹۳۹۵-۴۷۱۹ Email:bayat_m@Yahoo.com

- قبل از شیمی درمانی با داروهای آلکیله کننده یا پرتو درمانی که هر دو باعث بروز وقفه در اسپرماتوژنز و به تبع آن درجات مختلف ناباروری در مردان می‌شود [۸و۹] و هر دو می‌تواند موجب ناباروری موقتی به مدت ۵ سال یا حتی عقیمی دائمی شود [۱۰]؛

- قبل از درمان بیماریهای سیستمیک با داروهای سایتوتوکسیک و ایمونوساپرسیو [۱۱]،

- مواردی نظیر وازکتومی، اعمال جراحی و مرگ مغزی [۸]،

- از آنجاکه عفونتهایی مانند ایدز و هپاتیت [۱۲و۱۳] قابل سرایت به نسل بعدی یا خانمهای تحت درمان IVF هستند می‌توان با انجماد اسپرم، امکان بررسی آنها را فراهم کرد؛

- راحتی جسم و روان بیمار (در افرادی همچون جانبازان قطع نخاعی و معلولین جسمی) که با یک بار تهیهٔ نمونه، امکان ایجاد موقعیتهای باروری در زمانهای بعدی فراهم می‌شود [۱۴].

علیرغم پیشرفتهای متعددی که در زمینهٔ انجماد اسپرم حاصل شده است گزارشهایی راجع به اثرهای سوء آن بر اسپرم موجود است [۱۵و۱۶]. این آثار را می‌توان به صورت زیر دسته‌بندی نمود:

- کاهش قابل توجه تحرک (motility) اسپرم، شایعترین اثر زیانبار ناشی از انجماد است [۲۱-۱۷] که ۳۷ درصد کاهش نیز گزارش شده است [۱۲]؛

- انجماد همچنین باعث بروز اختلالاتی در فراساختار غشا و اکروزوم می‌شود که تغییرات اکروزوم، بسیار مشخص بوده است [۲۲].

- سایر تغییراتی که مشاهده شده است عبارتند از: اختلال در قابلیت زیست اسپرم [۲۳]، اختلال در نفوذپذیری به موکوس سرویکس و نفوذ به تخمک فاقد زونای هامستر [۲۱]، اختلال در ساختار اکروزومی [۲۴] و افزایش واکنش اکروزومی خودبه‌خود [۲۵]، کاهش فعالیت پروتئاز اکروزومی و اکروزین و کاهش قدرت باروری اسپرم [۲۵].

محققان با استفاده از مواد مختلف سعی کرده‌اند که مقاومت اسپرم انسان را در برابر استرس ناشی از انجماد و گرم کردن متعاقب آن بالا ببرند [۲۶و۲۷] که در این میان می‌توان به کاربرد پنتوکسی‌فیلین و پروژسترون به‌عنوان محرک شیمیایی اشاره کرد و البته نتایج تحقیقاتی که در این زمینه انجام شده است با موفقیت کامل همراه نبوده است و کاربرد پنتوکسی‌فیلین در مردان با اسپرم طبیعی موجب افزایش اسپرمهای متحرک و افزایش سرعت پیش‌روندهٔ آنها نشد [۲۸] و کاربرد پروژسترون در نمونه‌های متعلق به افراد کم‌بارور نتوانست مانع آسیب‌های ناشی از انجماد شود [۲۹].

لیزر یکی از مودالیته‌های فیزیکی است که برای انواع آن، کاربردهای بسیار گسترده‌ای در علوم پزشکی پیشنهاد شده است. لیزرهای کم‌توان یکی از انواع لیزر است که در طب فیزیکی، کاربرد دارد و محققان آثار بیواستیمیولیتوری برای آن قائل هستند [۳۰] و همچنین تابش آن موجب سنتز DNA در استئوبلاست‌ها [۳۱]، تولید سایتوکاین در محیط کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان [۳۲] و تکثیر کراتینوسیت‌ها در محیط کشت [۳۳] شده است. در سالهای اخیر، تحقیقاتی راجع به آثار این نوع لیزر روی سلولهای دستگاه تولیدمثل انجام شده است که در این خصوص می‌توان به تأثیر مثبت تابش لیزر کم‌توان بر اسپرماتوژنز در مردان [۳۴]، در انتقال کلسیم در اسپرم گاو [۳۵]، القای واکنش اکروزومی و کاهش درصد مرگ در اسپرم گاو [۳۰] اشاره نمود.

با ملاحظهٔ موارد فوق، هدف تحقیق حاضر بررسی اثر تابش لیزر کم‌توان هلیوم - نئون بر تحرک و فراساختار اسپرمهای اهدایی افراد سالم از بین مراجعین به مرکز ناباروری کوثر - تهران در سال ۱۳۸۲ است که حداقل معیارهای سازمان جهانی بهداشت [۳۶] را داشته و مرحلهٔ انجماد را گذرانده باشند.

مواد و روشها

این تحقیق از نوع تجربی تصادفی شاهددار[1] است.

مایع منی به‌وسیله روش استمنا[2] از ۳۰ داوطلب اهدا کننده از بین مراجعین به مرکز ناباروری کوثر (تهران) تهیه شد. زمان تهیهٔ نمونه حداقل ۴۸ ساعت بعد از آخرین نزدیکی[3] بود. در این تحقیق، رضایت افراد مراجعه کننده کسب و اصول اخلاق پزشکی رعایت شد. مواد و روشهای این تحقیق به

1- Randomized controlled experimental study

2- Masturbation

3- Abstinence

وسیله کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه متبوع تائید گردید. نمونه‌هایی که برحسب نتایج آنالیز اولیه بر طبق معیارهای سازمان جهانی بهداشت [۳۶] طبیعی بود انتخاب شد.

هر نمونه مایع‌منی به شرح زیر به چهار گروه تقسیم و داخل یک لوله اپندورف نیم میلی لیتری ریخته شد:

در گروه اول، نمونه مایع منی بعد از اهدا و بدون اعمال هیچ‌گونه مداخله‌ای (انجماد و لیزر کم‌توان) و با در نظر گرفتن معیارهای سازمان جهانی بهداشت [۳۶] آنالیز شد.

در گروه دوم، نمونه مایع منی بلافاصله تحت یک بار تابش لیزر کم‌توان هلیوم - نئون (ساخت سازمان انرژی اتمی ایران - تهران) با طول موج ۶۳۲/۸ نانومتر، خروجی ۱۰ میلی‌وات و طول موج پیوسته به مدت ۴۰ ثانیه و دانسیته انرژی $16J/cm^2$ قرار گرفت. تابش لیزر از فاصله یک سانتیمتری به سطح نمونه انجام شد و مجددا آنالیز بعمل آمد. تابش لیزر با توجه به نتایج تحقیق اوکانا کوئرو (Okana-Quero) و همکاران [۳۰] انتخاب شد.

در گروه سوم، نیم سی‌سی از مایع منی به نسبت حجم مساوی با ضدیخ اسپرم را (SpermFreeze^{TM}, FertiPro N.V.8730 Beernem, Belgium) داخل ویال مخصوص انجماد اسپرم (Nunc Cryotube^{TM} vial, Nalge Nunc International, Denmark) ریخته، ویال را تکان داده تا محتویات آن کاملاً مخلوط شود. ویال به مدت ۲۰ دقیقه در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به منظور رسیدن به تعادل قرار داده شد تا کاملاً ذوب شود. سپس ویال در ازت مایع (منهای ۱۹۶ درجهٔ سانتی‌گراد) غوطه‌ور شد. ویال حاوی نمونه حداقل به مدت دو هفته در ازت مایع نگهداری شد. پس از آن ویال برای ذوب از ازت مایع خارج شده، چند دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه و سپس در آب ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً ذوب شود. با دو بار شستشو با محیط کشت Ham's F-10 (BIOCHROM AC, Leonrenstr 2-6 D-2247 Berlin, Germany) و آلبومین ده درصد (شرکت پالایش و پژوهش خون، سازمان انتقال خون، تهران، ایران)، ضدیخ از مایع منی خارج و آنالیز انجام شد.

در گروه چهارم مانند گروه سوم، انجماد و ذوب انجام شد. سپس نمونه تحت تابش لیزر کم‌توان با مشخصات فوق‌الذکر قرار گرفت و آنالیز انجام شد.

بررسی میکروسکوپی به این طریق انجام شد. نمونهٔ مایع منی روی لام مدرج[1] از نظر تعداد اسپرمها، میزان درصد تحرک، درجات آن و وجود آگلوتیناسیون بررسی شد. معیار برای طبیعی یا غیرطبیعی در نظر گرفتن نمونه، معیارهای سازمان جهانی بهداشت بود که تعداد بیش از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر و درصد تحرک بیش از ۵۰ درصد، طبیعی در نظر گرفته شد.

درجات تحرک نیز بدین ترتیب در نظر گرفته شد: درجهٔ یک: زنش دم اسپرم، درجهٔ دو: حرکت اسپرم به دور خود، درجهٔ سه: حرکت اسپرم در میدان میکروسکوپی به صورت قابل تعقیب با چشم، درجه چهار: حرکت بسیار سریع اسپرم در میدان میکروسکوپی.

آگلوتیناسیون نیز بر اساس روش سازمان جهانی بهداشت به این ترتیب محاسبه شد.

صفر: فقدان آگلوتیناسیون، +: به میزان کم، ++: به میزان زیاد

میانگین و انحراف معیار هر کدام از گروهها استخراج شد. آزمون توزیع نرمال به روش Kolmogorov-Smironov انجام شد. با توجه به توزیع داده‌ها، داده‌های گروهها به صورت دو به دو به روش ویلکاکسون تجزیه و تحلیل آماری شد و $p<0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

نمونه‌های مربوط به میکروسکوپ الکترونی انتقالی بلافاصله درون محلول گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد در بافر فسفات (pH=۷/۳) قرار داده شد. ثبوت ثانویه با تتراکسیداسمیوم یک درصد در بافر فسفات روی رسوب حاصل از سانتریفیوژ نمونه‌ها با دور ۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از آبگیری در محلولهای استون با غلظتهای افزاینده، نمونه‌ها درون ژل آگار قرار داده شد. ارتشاح با رزین و قالب‌گیری نمونه‌ها انجام شد و پس از اصلاح قالبها، عمل برش‌گیری توسط دستگاه اولترامیکروتوم Leica-Ultra-R صورت گرفته و برشهای نیمه نازک به ضخامت یک میکرون تهیه شد. برشهای نیمه نازک

1- Neubauer

جدول ۱. میانگین درصد و انحراف معیار خصوصیات اسپرموگرام نمونه‌های مایع منی تازه و منجمد - ذوب شده افراد طبیعی در قبل و بعد از تابش لیزر کم‌توان و مقایسه آنها با استفاده از روش آماری ویلکاکسون

ویژگی	نمونه‌های تازه قبل از تابش	نمونه‌های تازه بعد از تابش	نمونه‌های منجمد- ذوب‌شده قبل از تابش	نمونه‌های منجمد - ذوب‌شده بعد از تابش
درصد تحرک	۵۱/۴۷±۳/۶۸	۵۲/۱۷±۶/۵۲	۶۳/۸۳±۸/۷۶ a***	۳۸/۸۳±۹/۹۸ b*
تحرک درجه یک	۱۴/۳۳±۵/۲۱	۱۳/۳۰±۴/۷	۱۳/۸۷±۴/۲۳	۱۳/۱۷±۴/۲۵
تحرک درجه دو	۱۵/۰±۳/۲۲	۱۵/۶۷±۳/۴۱	۱۱/۹۰±۴/۴۷ a***	۱۲/۲۷±۴/۳۵
تحرک درجه سه	۱۳/۳۳±۳/۷۹	۱۴/۳±۳/۹۴	۷/۲۳±۳/۵۲ a***	۷/۹۰±۴/۷۶
تحرک درجه چهار	۸/۸±۴/۶۸	۹/۰±۴/۷۱	۳/۸۳±۳/۶۴ a***	۵/۳۳±۳/۹۲ b**
آگلوتیناسیون	۰/۴۷±۰/۸۲	۰/۰۶±۰/۸۶	۰/۵۰±۰/۸۸	۰/۵۳±۰/۷۷

a: تفاوت معنی‌دار با نمونه‌های تازه قبل از تابش

b: تفاوت معنی‌دار با نمونه‌های منجمد - ذوب شده قبل از تابش

* $p<0.05$

** $p<0.01$

*** $p<0.001$

توسط محلول یک‌درصد تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شد. پس از اطمینان از محل برش، برشهای فوق‌نازک به ضخامت ۵۰ تا ۷۰ نانومتر تهیه و توسط استات‌یورانیل و سیترات‌سرب رنگ‌آمیزی شد. سپس برشهای فوق‌نازک با بزرگنمایی ۱۲۰۰۰ و ۲۰۰۰۰ برابر با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (ZEISS-EM900) مشاهد و عکسبرداری شد.

یافته‌ها

نتایج آنالیز گروهها در جدول ۱ منعکس شده است و نشانگر آن است که تابش لیزر کم توان روی نمونه‌های گروه یک تأثیری نداشت.

بررسی جدول نشان می‌دهد که میزان درصد تحرک اسپرمها پس از انجماد به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($p=0.0001$). این میزان کاهش در همهٔ درجه‌های تحرک مشاهد شد اما تحرک درجه یک بین گروههای یک و سه، معنی‌دار نبود ($p=0.602$) ولی در درجه‌های دو، سه و چهار، این تفاوت معنی‌دار بود (به ترتیب $p=0.001$ برای درجه دو، $p=0.0001$ برای درجه‌های سه و چهار). از نظر میزان آگلوتیناسیون تفاوت معنی‌داری قبل و بعد از انجماد مشاهده نشد.

مقایسهٔ میزان درصد تحریک بین گروههای سه و چهار (جدول ۱) نشان داد که تابش لیزر توانست به‌صورت معنی‌داری تحرک را افزایش دهد ($p=0.033$) و این افزایش معنی‌دار در مقایسهٔ تحرک درجه چهار هم دیده شد ($p=0.007$) اما مقایسهٔ تحرک با درجه‌های یک، دو و سه، اختلاف معنی‌دار نداشت.

مطالعات میکروسکوپ الکترونی انتقالی اسپرم نشان داد که اکثریت اسپرمها در گروه یک به‌صورت کامل و دست نخورده بوده و واکنش اکروزومی خود را شروع نکرده بودند (میکروگراف ۱).

پس از تابش لیزر، غشای هسته در تعداد زیادی از اسپرمها نامنظم شده و در بعضی از قسمتها دچار پارگی و همراه با اکروزوم از هسته جدا شده بود. در بعضی از قسمتها غشای پلاسمایی اسپرم دچار پارگی شده بود (میکروگراف ۲).

پس از انجماد - ذوب، بسیاری از اسپرمها شکل منظم خود را از دست داده و تعدادی از آنها واکنش اکروزومی خود را شروع کرده بودند. در بسیاری از آنها اکروزوم چین‌خورده و از هسته اسپرم فاصله گرفته بود و در بعضی قسمتها پاره شده و محتویات خود را بیرون ریخته بود (میکروگراف ۳و۴).

تصاویر میکروسکوپ الکترونی انتقالی اسپرمهای گروه چهار، اختلاف چندانی با گروه سه نداشت و همان تغییرات ساختاری را نشان داد.

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تابش لیزر کم‌توان بر نمونه‌های مایع منی طبیعی که هیچگونه مداخله دیگری روی آنها انجام نشده بود بر میزان درصد تحرک و درجات آن تأثیری نداشت اما انجماد موجب کاهش معنی‌دار درصد تحرک و کاهش تحرک درجات دو الی چهار آن شد که این با نتایج سایر

تحقیقات انجام شده همخوانی دارد [۱۲و۳۷].

تابش لیزرکم توان روی نمونه‌های مایع منی طبیعی منجمد - ذوب شده موجب افزایش معنی‌دار میزان درصد تحرک و افزایش تحرک درجه چهار آن شد. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات دیگری که در این خصوص انجام شده است هماهنگی دارد: استانیچ (Stanic) و همکارانش پنتوکسی‌فیلین را به نمونه‌های مایع منی طبیعی منجمد - ذوب شده اضافه نمودند که منجر به افزایش میزان درصد تحرک و تحرک پیشرونده (درجه چهار) به میزان قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل شد [۳۸].

از آنجا که تحرک اسپرم نقش مهمی در میزان باروری و بارداری دارد [۳۷] می‌توان افزایش تحرک اسپرمها بعد از انجماد - ذوب را که در تحقیق حاضر مشاهده شد مثبت ارزیابی نمود.

نتایج تحقیق ماکلر (Makler) و همکاران نشان داد که تعدادی از اسپرمها پس از انجماد، زنده بوده ولی متحرک نیستند. اسپرمهای غیرمتحرک که غشای سالم داشته باشند ممکن است به علت کاهش وضعیت متابولیک پس از ذوب، ساکن باشند [۳۹]. غلظت cAMP[1] داخل اسپرم پس از ذوب تا سه برابر کاهش می‌یابد که به نظر می‌رسد ناشی از پایین بودن متابولیسم در اسپرم پس از ذوب باشد [۴۰]. cAMP نقش مهمی در مسیر گلیکولیز در اسپرم انسان داشته که از این طریق می‌تواند بر تولید انرژی مورد نیاز برای حرکت اسپرم مؤثر باشد [۴۱].

به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر هم تابش لیزر کم‌توان از طریق تأثیر تحریکی بر cAMP موجب افزایش تحرک اسپرمها شده است.

نتایج مطالعه میکروسکوپ الکترونی انتقالی روی اسپرمهای طبیعی که هیچگونه مداخله‌ای روی آنها انجام نشده است نشان داد که هسته و اکروزوم در بیشتر اسپرمها سالم و دست نخورده باقی‌مانده است و تغییرات اندکی که در فراساختار آنها مشاهده می‌شود ممکن است به‌دلیل فرآیند آماده‌سازی نمونه برای مشاهده با میکروسکوپ الکترونی باشد اما تصاویر میکروسکوپ الکترونی مربوط به اسپرمهای منجمد - ذوب شده که مداخله دیگری روی آنها صورت نگرفته است نشان دهنده ایجاد تغییرات مشخص فراساختاری در هسته، اکروزوم و غشای اسپرم در بیشتر اسپرمها است که این با سایر تحقیقات انجام شده در این خصوص همخوانی دارد [۴۲]. در این خصوص تحقیقات نوگوعیرا (Nogueira) و همکاران نشان داد که انجماد موجب تورم و پارگی غشای داخلی و خارجی اکروزوم و غشای خود اسپرم می‌شود [۴۳].

تابش لیزرکم‌توا روی اسپرمهای طبیعی که هیچگونه مداخله دیگری روی آنها اعمال نشده بود به‌نظر موجب بروز تغییرات در غشای هسته شد ولی تابش لیزر کم‌توان روی نمونه اسپرمهای منجمد - ذوب شده بیشتر باعث بروز تغییرات دیگری در غشای خارجی اکروزوم علاوه بر تغییرات ناشی از انجماد گردید و به نظر می‌رسد که تابش لیزر کم‌توان نتوانسته است موجب ترمیم و جبران آسیب‌های حاصل از انجماد در فراساختار اسپرم شود.

اوکانا کوئرو (Qcana quero) و همکاران آثار بیولوژیک تابش لیزر کم‌توان هلیوم - نئون با خروجی ۱۰ میلی‌وات و مدت زمان ۵ الی ۴۰ ثانیه و دوزهای ۲ الی ۱۶ ژول بر سانتیمتر مربع را بر اسپرمهای گاو بررسی کردند [۳۰]. آنها مشاهده کردند که تابش لیزر باعث افزایش قابل توجه درصد اسپرمهایی می‌شود که واکنش اکروزومی را انجام داده‌اند و درصد مرگ‌ومیر اسپرمها را کاهش می‌دهد. لوبارت (Lubart) و همکارانش در تحقیق خود راجع به اثر لیزر روی انتقال کلسیم در اسپرمهای گاو دریافتند که برداشت کلسیم در اسپرمهای گاو تحت تأثیر تابش لیزر افزایش می‌یابد [۳۵].

بریت بارت (Breitbart) و همکاران تغییرات انتقال کلسیم را در غشای اسپرم و غشای میتوکندی داخل اسپرم تحت تأثیر لیزر هلیوم - نئون با قدرت خروجی ۲ و ۱۳ میلی‌وات به مدت یک الی ۱۲ دقیقه را بررسی کردند [۴۴]. آنها مشاهده نمودند که میزان برداشت کلسیم از طریق غشای میتوکندریهای اسپرم تحت تأثیر تابش لیزر هلیوم - نئون افزایش می‌یابد و از آنجا که غلظت کلسیم در داخل اسپرم در کنترل تحرک اسپرم [۴۵] و واکنش اکروزومی [۴۶] مهم است؛ محققان افزایش غلظت کلسیم در اسپرم تحت تابش لیزر را مثبت ارزیابی کردند.

1- Cyclic Adnosine Mono Phosphate

در تحقیق حاضر چون امکان استفاده از تستهای ارزیابی‌کننده وضعیت عملکردی اسپرمهای دچار انجماد - ذوب که تحت تابش لیزر کم‌توان بوده‌اند فراهم نبود نتیجه نهایی تابش لیزر بر میزان باروری این اسپرمها نامعلوم است. مشاهده نتایج میکروسکوپ الکترونی انتقالی اسپرمها ممکن است کاربرد لیزر در این خصوص را با ابهام مواجه کند؛ هر چند که افزایش تحرک اسپرمها می‌تواند از مزایای مثبت لیزر قلمداد شود.

از این‌رو انجام تحقیقات دیگر با استفاده از سایر دوزهای لیزر روی اسپرمهای منجمد - ذوب شده و ارزیابی عملکردی اسپرمها و کاربرد آنها در باروری در مدلهای حیوانی و بالینی می‌تواند نکات تاریک دیگری از کاربردهای لیزر بر اسپرمها و باروری را روشن سازد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتایج طرح تحقیقاتی مصوب حوزه محترم پژوهش دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی است. نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن حوزه معاونت، آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی و مرکز درمان ناباروری کوثر به‌دلیل ارایه تسهیلات آزمایشگاهی اعلام می‌دارند.

References

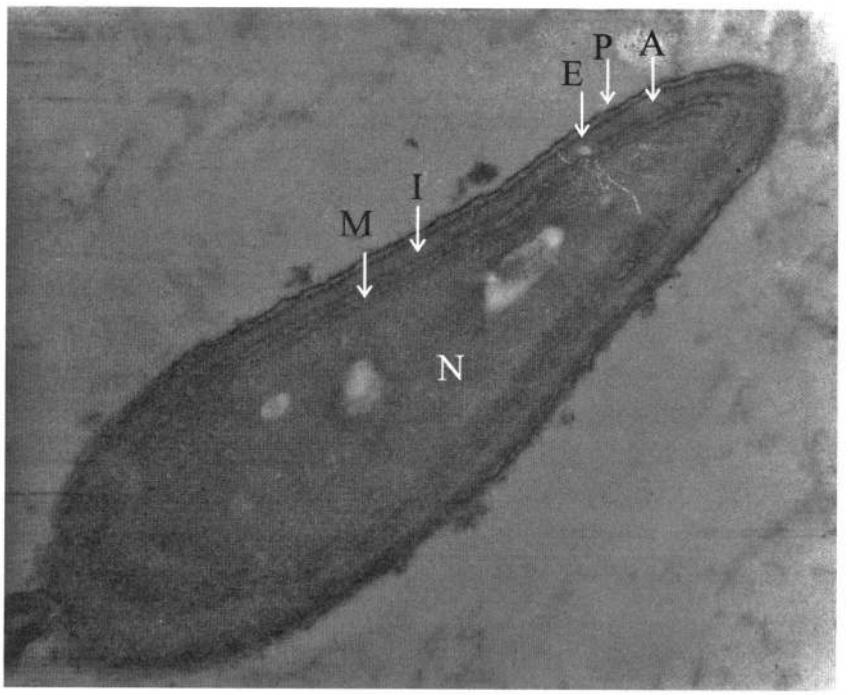
1. **Giraud MN, Motta C, Boucher D, Grizard G.** Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15: 2160-4.
2. **Sanger WG, Olson JH, Sherman JK.** Semen cryobanking for men with cancer-criteria change, Fert Steril 1992; 58: 1024-7.
3. **Al-Hasani S, Demirel LC, Schopper B, Bals-Pratsch M, Nikoletos N, Kupker W, et al.** Pregnancies achived after frozen-thawed pronuclear oocytes obtained by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen- thawed testicular tissues from non-obstructive azoospermic men. Hum Reprodu 2000; 14: 2031-5.
4. **Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R.** Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with nonobstructive azoospermia. Hum Reprod 1999; 14: 1794-801.
5. **Sherman JK.** Synopsis of the use of human semen since 1964: state of the art of human semen banking. Fert Steril 1973; 24: 397-412.
6. **Meirow D, Schenker JG.** Cancer and male fertility. Hum Reprod 1995; 10: 2017-22.
7. **Hallak J, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A.** Why cancer patients request disposal of cryopreserved semen specimens posttherapy: a retrospective survey. Fert Steril 1998; 69: 889-93.
8. **Lass A, Akagbosu F, Abusheikha N, Hassouneh M, Blayney M, Avery S, Brinsden P.** A programme of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility center: lessons from 8 years' experience. Hum Reprod 1998; 13: 3256-61.
9. **Naysmith TE, Blak DA, Harvey VJ, Johnson NP.** Do men undergoing sterilizing cancer treatments have a fertile future? Hum Reprod 1998; 13: 3250-5.
10. **Nijam JM, Scharaffordt Koops H, Kremer J, Sleijfer DT.** Gonadal function after surgery and chemotherapy in men with stage II and III non-seminimonous testicular tumors. J Clin Oncol 1987; 5: 651-6.
11. **Ranganathan P, Mahran AM, Hallak J, Agarwal A.** Sperm cryopreservation for men with nonmalignant, systemic diseases: a descriptive study. J Androl 2002; 23: 71-5.
12. **O'Conell M, McClure N, Lewis SEM.** The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod 2002; 17: 704-9.
13. **Sherman JK.** Frozen semen-efficiency in artificial insemination and advantage in testing for acquired immune deficiency syndrome. Fert Steril 1987; 47: 19-21.
14. **Tournaye H.** Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: which method is to be preferred? Hum Reprod 1999; 14: 71-81.
15. **Agarwal A, Tolentine Mv, Sidhu Jr RS, Ayzman I, Lee JC, Thomas AJ Jr, Shekarriz M.** Effect of

cryopreservation on semen quality in patients with testicular cancer. Urology 1995; 46: 382-9.

16. **Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH,** Cryopreservation of human semen: comparison of cryopreservation, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. J Androl 1992; 13: 283-8.
17. **Yoshida H, Hoshiai H, Fukaya T.** Fertilizability of fresh and frozen human spermatozoa. Assisted Reprod Technol Androl 1990; 1: 164-72.
18. **Englert Y, Delvigne A, Vekemans M, Lejeune B, Henlisz A, de Meartelaer G, et al.** Is fresh or frozen semen to be used in vitro fertilization with donor sperm. Fert Steril 1989; 51: 661-4.
19. **Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arenson BW, Ball GD.** Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. Fert Steril 1988; 50: 314-20.
20. **Henry MA, Noiles eE, Gao D, Mazur P, Crister JK.** Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. Fert Steril 1993; 60: 911-8.
21. **Crister JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR, Ball GD.** Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. Fert Steril 1987; 47: 980-7.
22. **Alvarez JG, Storey BT.** Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyls as sole cryoprotectant. J Androl 1993; 14: 199-209.
23. **McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG.** Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. J Reprod Fertil 1992; 95: 527-34.
24. **Abderazek A, Fahmy I, Mansour RT, Serour GI, Rhodes CA, Aboulghar MA.** The effect of Cryopreservation on the spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa. Fert Steril 2000; 25-s213.
25. **Mack SR, Zaneveld LJ.** Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. Gamete Res 1987; 18: 375-83.
26. **Sharma PK, Tolentino MV, Jr, Thomas AJ, Agarwal A.** Optimal dose and duration of exposure to artificial stimulants in cryopreserved human spermatozoa. J Urol 1996; 155: 568-73.
27. **Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A.** Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist induced acrosome reaction rate. Hum Reprod 1998; 12: 3384-9.
28. **Lewis SEM, Moohan JM, Thompson W.** Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. Fert Steril 1993; 59: 418-23.
29. **Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oeehninger S.** Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine dose not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. Fert Steril 2000; 74: 715-20.
30. **Ocana-Quero JM, Gomez-Villamandos R, Moreno-Millan M, Santisteban-Valenzuela JM.** Biological effects of helium-neon laser irradiation on acroscome reaction in bull perm cells. J Photochem Photobiol B: Biol 1997; 40: 294-8.
31. **R'epice F, Zonefrati R.** Irradiation at low energy levels with laser and incoherent infrared sources on rat osteoblasts cultured in vitro, Arch Ital Anat Embryol 1987; 92: 299-306.
32. **Funk JO, Kruse A, Kiechner H.** Cytokine production after helium-neon laser irradiation in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. J Photochem Photobiol B: Biol 1992; 16: 347-55.
33. **Grossman N, Schneid N, Reuveni H, Halevy S, Lubart R.** 780 nm low power diod laser irradiation stimulates proliferation of keratinocytes cultures: Involvement of reactive oxygen species. Laser Surg Med 1999; 22: 212-8.
34. **Kovalev EV.** The effect of low-intensity laser radiation on spermatogenesis in men. Vopr Kurotol Fizioter Lech Fiz Kult 1999; 5: 33-6.
35. **Lubart R, Friedmann H, Lavie T, Levinshal R, Breitbart H.** Effect of light on calcium transport in

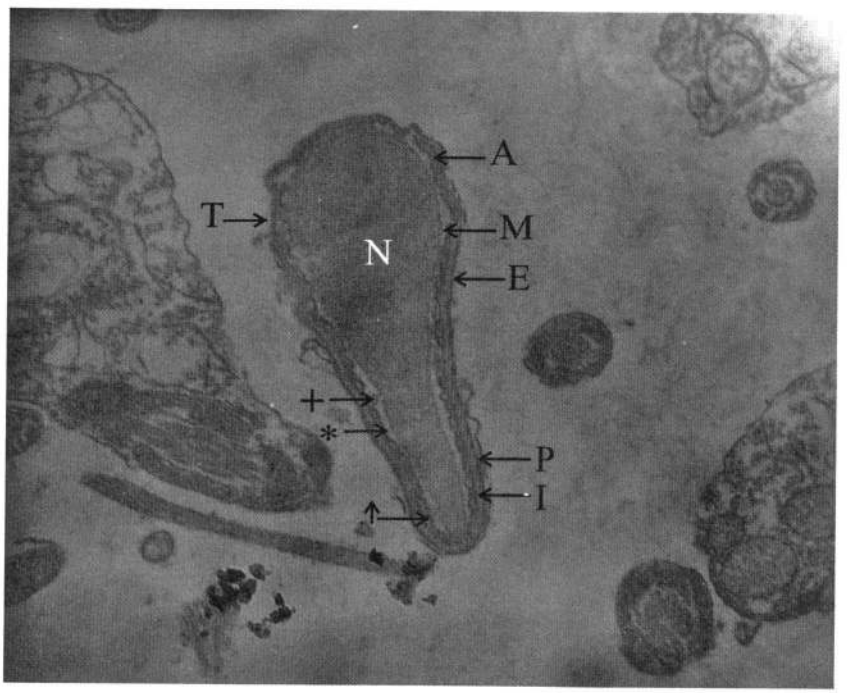
bull sperm cells. J Photochem Photobiol B: Biol 1992; 15: 337-41.

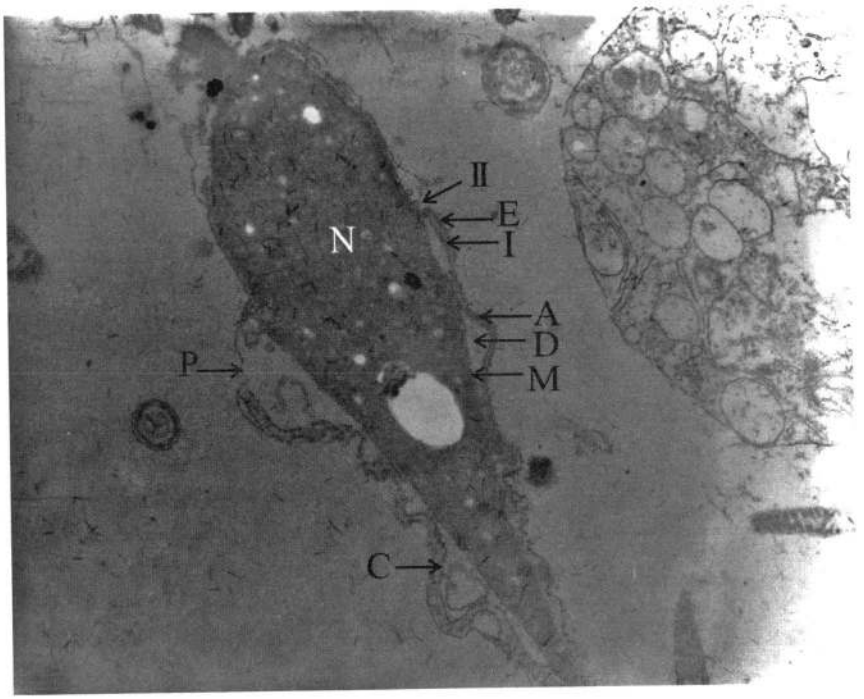
36. World Health Organization, Labortory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed, New York, Cambridge University Press, 1999.
37. **Park YS, Lee SH, Song SJ, Jun JH, Koong MK, Seo JT.** Influence of motility on the outcome of in vitro fertilization / intracytoplasmic sperm injection with fresh vs. frozen testicular sperm from men with obstructive azoospermia. Fert Steril 2003; 80: 526-30.
38. **Stanic P, Sonicki Z, Suchanek E.** Effect of pentoxifyllin on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. Int J Androl 2002; 25: 186-90.
39. **Makler A, Makler E, Itzkovitz J, Brandes JM.** Factors affecting spermatozoa motility. IV. Incubation of human semen with caffeine, kallikrein, and other metabolic active compounds. Fert Steril 1980; 33: 624-30.
40. **Wang R, Sikka SC, Veeraragavan K, Bell M, Hellstrom WJG.** Platelete activating factor and pentoxifylline as human sperm cryoprotectants. Fert Steril 1993; 60: 711-15.
41. **Hicks JJ, Pedron N, Rosado A.** Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic adenosine monophosphate (cAMP), estrogens, and follicular fluid. Fert Steril, 1972; 23: 886-93.
42. **Wooley DM, Richardson DW.** Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. J Reprod Fertil 1978; 53: 389-94.
43. **Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, Van Steirteghem AC.** Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. Hum Reprod 1999; 14: 2041-9.
44. **Breitbart H, Levinshal T, Cohen N, Friedmann H, Lubart R.** Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (HeNe laser). J Photochem Photobiol B: Biol 1996; 34: 117-21.
45. **Breitbart H, Robinstein S, Nass-Arden L.** The role of calcium ad Ca^{2+}-ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. J Biol Chem 1985; 260: 11546-53.
46. **Yanagimachi R, Usui N.** Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guina pig spermatozoa. Exp Cell Res 1974; 89: 161-74.



شکل ۱. میکروگراف یک: مقطع فوق نازک اسپرم گروه یک. غشای پلاسمایی: P، غشای خارجی اکروزوم: E، اکروزوم: A، غشای داخلی اکروزوم: I، غشای هسته: M، هسته: N و بزرگنمایی: ۲۰۰۰۰ ×

شکل ۲. میکروگراف دو: مقطع فوق نازک اسپرم گروه دو. غشای پلاسمایی: P، غشای خارجی اکروزوم: E، اکروزوم: A، غشای داخلی اکروزوم: I، غشای هسته: M، هسته: N. غشای پلاسمایی اسپرم در بعضی قسمتها دچار پارگی (T) شده است. غشای هسته نامنظم (*) شده و در بعضی از قسمتها دچار پارگی (↑) شده و هماره با اکروزوم از هسته جدا (+) شده است. بزرگنمایی: ۱۲۰۰۰ ×





شکل ۳. میکروگراف سه: مقطع فوق نازک اسپرم گروه سه. غشای پلاسمایی: P، غشای خارجی اکروزوم: E، اکروزوم: A، غشای داخلی اکروزوم: I، غشای هسته: M، هسته: N. اکروزوم چین خورده (C) و از هسته اسپرم فاصله (D) گرفته و در بعضی قسمتها پاره (II) شده و محتویات خود را بیرون ریخته است. بزرگنمایی: ۲۰۰۰۰×

شکل ۴. میکروگراف چهار: مقطع فوق نازک اسپرم گروه چهار. غشای پلاسمایی: P، غشای خارجی اکروزوم: E، اکروزوم: A، غشای داخلی اکروزوم: I، غشای هسته: M، هسته: N. اکروزوم چین خورده (C) و از هسته اسپرم فاصله (D) گرفته و در بعضی قسمتها پاره T شده و محتویات خود را بیرون ریخته است. بزرگنمایی: ۱۲۰۰۰ ×