مقاله مروری

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۱۱، آبان ۱۳۹۵، صفحه ۴۳-۳۵

روشهای انجماد اسپرم در مردان نابارور با الگوی الیگواسپرمیا و کریپتواسپرمیا

مریم غلامی تبار طبری (MSc)[۱]، سید غلامعلی جورسرایی (PhD)[۱*]، یوسف‌رضا یوسف‌نیاء پاشا (MD)[۱]

۱-مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری فاطمه زهرا(س)، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل

دریافت: ۹۵/۳/۳، اصلاح: ۹۵/۵/۶، پذیرش: ۹۵/۷/۷

خلاصه

سابقه و هدف: انجماد اسپرم در حال حاضر نقش مهمی را در حفظ باروری زوجین تحت درمان ناباروری، به ویژه در بیماران اولیگواسپرمیا و کریپتواسپرمیا، ایفا می کند. برای اجتناب از بیوپسی های مکرر این بیماران زمان زیادی را باید به جمع آوری اسپرم اختصاص داد تا بعد از فراهم شدن شرایط لازم، بیمار در سیکل درمان ناباروری قرار گیرد. این مطالعه به بررسی انجماد اسپرم در نمونه های اولیگواسپرمیا و کریپتواسپرمیا می پردازد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از بانک اطلاعاتی و معتبر NCBI مقالاتی که در زمینه روش های مختلف انجماد اسپرم بودند با استفاده از کلید واژه هایی نظیر الیگواسپرمیا و کریپتو اسپرمیا و انجماد اسپرم و مقالاتی که مقوله انجماد را از دیدگاه پزشکی و کاربردی، مورد بحث و بررسی قرار دادند، استفاده شد.

یافته‌ها: برای انجماد اسپرم از سه روش آهسته، سریع و شیشه ای استفاده می شود. نگهدارنده های زیادی همراه با محیط کشت ها برای انجماد اسپرم به کار می روند که برای بقا اسپرم ضروری هستند. از آنجائیکه انجماد ممکن است سبب ضعیف تر شدن حرکت اسپرم در بیمارانی با اختلال شدید اسپرماتوژنزیس گردد محققین درصدد ابداع روشهایی جهت کاهش این اثرات برآمدند. استفاده از زونا پلوسیدا، جلبک ولوکس گلوباتور، آلژینات آگارز، کرایولوپ، نی و سوزن میکرو اینجکشن، روش هایی هستند که برای حفظ و نگهداری و بقا بیشتر اسپرم ها توصیه شده اند.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این استفاده از ابزارهای مختلف برای نتیجه گیری بهتر در این روشها به نوع نمونه های دریافتی در این بیماران بستگی دارد.

واژه‌های کلیدی: الیگواسپرمی، کریپتواسپرمی ، ناباروری.

مقدمه

حدود ۱۵درصد زوجین دارای ناباروری هستند. در این میان عوامل و مشکلاتی که باعث ناباروری مردان می شود، از هر ۲۰ مرد یک نفر را تحت تاثیر خود قرار داده و به عنوان یک فاکتور مشارکت کننده، نیمی از مواردی را که به درمان های کمک باروری نیاز دارند به خود اختصاص داده است. بسیاری از اختلالات و بیماری های شناخته شده، ممکن است منجر به ناباروری مردان شود. همچنین موارد غیر قابل توضیحی وجود دارد که علت اصلی ناباروری را نامشخص می سازد (۱). ناباروری مردان می تواند دلایل مختلفی داشته باشد. واریکوسل یا واریسی شدن عروق بیضه شایعترین بیماری پس از بلوغ جنسی و یک عامل مهم در ناباروری مردان است. اگرچه واریکوسل یکی از شایع‌ترین علتی است که باعث می گردد تا پارامترهای اسپرم دچار آسیب گردد، ولی باید در نظر داشت که در همه افراد شاید یک آسیب جدی را به همراه نداشته باشد. ناهنجاری‌های کروموزومی و ژنتیکی از عوامل شناخته شده‌ای هستند که هریک از آنها می‌توانند به تنهایی علتی برای ناباروری باشند. عوامل متعدد دیگری نیز باعث ناباروری می شوند. از جمله تغییراتی که در شرایط محیطی بوجود آمده و باعث افزایش آلاینده ها شده است (۲). اختلالاتی که در سیستم هورمونی اتفاق می افتد (۳). تغییراتی که در سیستم ایمنی بدن بوجود می‌آید (۴). همچنین کمبود عناصر و آنتی اکسیدانها (۵و۶)، سموم محیطی نظیر کادمیوم، جیوه، بیس فنول، دی اکسین (Dioxin) (۷)، سموم کشاورزی نظیر هینوزان و دیازینون، (۸) هر کدام می‌توانند بر روند اسپرماتوژنزیس اثر منفی گذاشته و با کاهش پارامترهای اسپرم، باعث ناباروری در مردان شوند. اما از آنجایی که بسیاری از روش های کمک باروری از جمله تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم یا میکرواینجکشن، این امکان را فراهم کرده تا مردانی با تعداد بسیار کم اسپرم و پارامترهای ضعیف آن نیز دارای فرزند شوند، لذا بیماران اولیگو اسپرمیا و کریپتواسپرمیا که میزان تولید اسپرم، در آنها ناچیز است، با موفقیت می توانند از این روش سود ببرند (۱۰و۹). الیگو اسپرمی حالتی است که تعداد اسپرم در مایع سیمن کمتر از ۲۰ میلیون در یک میلی لیتر بوده و در حالت شدید آن، ممکن است به زیر ۵ میلیون برسد. کریپتواسپرمیا به افرادی از مردان اطلاق می‌گردد که تعداد اسپرم آنها کمتر از صدهزار در هر میلیتر مایع سیمن است. در حال حاضر درمان دارویی قابل اطمینان و قطعی برای این اینگونه عارضه‌ها وجود ندارد. لذا دستیابی به یک بارداری طبیعی برای این دسته از بیماران بعنوان یک معضل به حساب آمده ولی غیر ممکن نیست. در اینگونه موارد تنها با روش بسیار دقیق در نمونه های مکرر مایع سیمن، شاید موجب دستیابی به اسپرم گردد (۱۳-۱۱). با توجه به اینکه در زمان پانکچر و جمع آوری تخمک ها، شاید نتوان در نمونه هایی که دارای اسپرم بسیار کم هستند و همچنین پارامترهای آن نیز ضعیف است، به تعداد اسپرم‌های لازم برای انجام

*مسئول مقاله: دکتر سید غلامعلی جورسرایی
آدرس: بابل، دانشگاه علوم پزشکی، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری. تلفن: ۳۲۲۷۴۸۸۱-۰۱۱
E-mail: alijorsara@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]

میکرواینجکشن دست یافت، لذا لازم است تا قبل از انجام هر عملی، تمهیدات لازم سنجیده شود. در اینگونه مواقع بهترین روش برای جلوگیری از متوقف شدن پانکچر، در طی چند مرحله اقدام به جمع آوری و انجماد اسپرم می باشد. مراکز متعددی از روش بیوپسی بیضه همزمان با روز استخراج تخمک ها جهت جلوگیری از متوقف شدن عمل میکرو اینجکشن یا تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI:Intracytoplasmic sperm injection) استفاده می‌کنند. بعضی ها نیز استفاده از انجماد تخمک را پیشنهاد کرده اند. اما این کارها تنها باعث به تعویق انداختن حل مشکل کمبود اسپرم می گردد. لذا انجماد اسپرم در این افراد قبل از روز استحصال تخمک بسیار کمک کننده خواهد بود و باید قبل از تحریک تخمدانی انجام پذیرد (۱۴).

بعضی از مراکز ناباروری، برای اینکه از بیوپسی های مکرر بیماران اولیگواسپرمیای شدید و یا کریپتواسپرمیا اجتناب کنند، زمان زیادی را به جمع آوری اسپرم اختصاص داده و بعد از انجماد و فراهم شدن شرایط لازم، بیمار را در سیکل درمان ناباروری قرار می دهند (۱۵). این مطالعه به بررسی انجماد اسپرم در نمونه های اولیگواسپرمیا و کریپتواسپرمیا می پردازد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه با استفاده از بانک اطلاعاتی و معتبر NCBI مقالاتی که در زمینه روش های مختلف انجماد اسپرم بودند مورد بررسی قرار گرفتند. از کلیدواژه‌هایی نظیر الیگواسپرمیا و کریپتو اسپرمیا و انجماد اسپرم و مقالاتی که مقوله انجماد را از دیدگاه پزشکی و کاربردی، مورد بحث و بررسی قرار می‌دادند، استفاده شد.

یافته ها

روشهای انجماد اسپرم: مکانیسم انجماد بر این پایه استوار است که هرگاه آب داخل سلول ها در اثر دمای مناسب به یخ تبدیل شود، به گونه ای که بدون آسیب به سلول، حرکات مولکولی آن را به طور مؤثری متوقف سازد، فرآیندهای بیوشیمیایی سلول نیز به تعویق افتاده و یا متوقف می شود. در این حالت است که میزان بقای سلول افزایش پیدا می کند. انجماد اسپرم به سه روش؛ انجماد آهسته، انجماد سریع و انجماد شیشه ای تقسیم می شود. روش انجماد آهسته در چند مرحله انجام پذیرفته و دمای سلول به تدریج کاهش می یابد، اما در روش سریع، اسپرم ها مدت زمان معینی در فاصله بین ۵/۱ تا ۳ سانتیمتر از سطح نیتروژن و در معرض بخار آن، قرار می گیرند. در این حالت دمای اسپرم تا ۶۰ درجه سانتی گراد زیر صفر کاهش می یابد. سپس اسپرم ها به داخل مخزن نیتروژن مایع انتقال داده می شوند. باید در نظر داشت که در هر دو روش ذکر شده، به دلیل تشکیل کریستال‌های یخ، نتیجه کار چندان مطلوب نیست. لذا مطالعات زیادی جهت کاهش زمان و حذف کریستال های یخ صورت پذیرفته و تجهیزات گران قیمتی برای غلبه بر آن به کار گرفته شد. یکی از راههای اجتناب از آسیب سلولها که می تواند ناشی از تشکیل کریستالهای یخ باشد، استفاده از روش انجماد شیشه ای است. در این روش، با قرار دادن مستقیم و سریع نمونه ها در داخل نیتروژن مایع، روند انجماد، فوق العاده سریع انجام می پذیرد. در این روش نمونه ها با سرعت بسیار بالا سرما دهی (۷۲۰۰۰ k/min) شده و در مدت زمان بسیار کوتاهی (۵تا۸ ثانیه) منجمد می شوند (۱۶). در سال ۲۰۰۳، گروهی از پژوهشگران، یک روش جدید انجماد شیشه ای برای اسپرم ارائه کردند. در این روش سعی شده تا از محیط کشت مخصوص انجماد که خود اثرات سمی و کشنده ای بر اسپرم دارد، استفاده نشود. آنها با کشیدن اسپرم به داخل کرایولوپ، نمونه ها را مستقیما در داخل نیتروژن مایع قرار دادند. استفاده از این روش کمک کرد تا قابلیت حیات و تحرک اسپرم، در مقایسه با روش های معمول افزایش پیدا کند (۱۷). بعضی از محققین بر این عقیده اند که، روند انجماد–ذوب اسپرم انسان، منجر به کاهش حرکت، تغییر الگوی نفوذ در موکوس سرویکس، تغییر ساختمان آکروزوم و غشای پلاسمایی در کنار کاهش فعالیت پروتئاز آکروزومی (آکروزین) آن می‌گردد (۱۸).

امروزه علی رغم استفاده از پروتکل های مدرن برای انجماد، پارامترهای کمی و کیفی اسپرم‌های زنده پس از ذوب در مقایسه با نمونه قبل از انجماد چندان رضایت بخش نبوده و میزان باروری حاصل از اسپرم های منجمد شده در مقایسه با نمونه تازه آن کمتر است (۱۹). انجماد در فاز بخار و ذوب نه تنها باعث مرگ اسپرم بلکه باعث آسیب آکروزوم نیز می گردد. اثرات انجماد در فاز بخار و ذوب روی اسپرم ها در افراد طبیعی بارور و الیگواسپرمیا کاملاً مشابه است. لذا کیفیت اسپرم در افراد الیگواسپرمیا در مقایسه با افراد بارور بعد از انجماد و ذوب تفاوت چندانی ندارد (۲۰). نتایج حاصل از یک مطالعه نشان می دهد که وجود اختلاف فشار اسموتیک ناشی از مواد محافظ در محیط انجمادی به غشای پلاسمایی اسپرم آسیب می‌رساند. همچنین کاهش دمای شدید اسپرم در هنگام انجماد، آسیب زیادی به غشای پلاسمایی روی قسمت قدامی سر اسپرم و غشای آکروزومی زیرین آن ایجاد می کند. شوک ایجاد شده می تواند منجر به پارگی و کاهش ماتریکس آکروزومی گردد. آنزیم های آکروزومی برای قابلیت لقاح و رسیدن اسپرم ها به غشای پلاسمایی اووسیت ضروری بوده و آسیب آن با کاهش قدرت لقاح همراه است، بنابراین باید درصد مواد تشکیل دهنده محیط انجماد اسپرم به نحوی اصلاح گردد که اسپرم ها حداقل آسیب را ببینند. این امر به خصوص در افراد الیگواسپرمیا و کریپتواسپرمیا که تعداد اسپرم های زنده و متحرک آنها محدود است اهمیت زیادی دارد (۲۱).

مهمترین اصل در فرآیند انجماد، کاهش آسیب در اثر تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی و نمک های سمی موجود در سلول است. سرد کردن سلول باید آهسته انجام گرفته و آب داخل سلولی بنحو مناسبی خارج گردد. باید توجه داشت که قبل از سردکردن یا در طی آن، جایگزین مناسبی برای آبی که از سلول خارج شده صورت پذیرد (۲۲). با توجه به اینکه روند انجماد، سبب کاهش ظرفیت باروری اسپرم ها از طریق آسیب به غشاء سلولی، آسیب به حرکت اسپرم ها، تغییر در مورفولوژی و آسیب آکروزومی، آسیب به ساختمان DNA و عملکرد اسپرم می‌گردد، چند سالی است که ارزیابی روش های مختلف انجماد جهت بررسی تأثیر آنها در حرکت اسپرم قوت بیشتری گرفته است. محیطهای نگهدارنده مختلف نیز، اسپرم ها را از اثرات منفی روند انجماد حفاظت می‌کنند. همه این عوامل کمک می‌کند تا بهترین و مناسبترین روش که کمترین آسیب را برای اسپرم داشته باشد، انتخاب گردد. سه محیط متداول که در انجماد اسپرم بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل محیط TYBG، HSPM و GEYC می باشند (۲۳). ترکیبات حفظ کننده فشار اسمزی خارج سلولی در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]

محیط TYBG تنها دکستروز است. در محیط GEYC از گلوکز، فروکتوز و گلایسین و در محیط HSPM نیز از گلوکز، ساکاروز و گلایسین استفاده شده است. بنظر می رسد محیط GEYC و HSPM نسبت به محیط TYBG از نظر حفظ فشار اسمزی خارج سلولی دارای نگهدارنده بهتری باشند (۲۴). همچنین یکی از مطالعات حاکی از آن است که، میزان باروری اسپرم منجمد شده در دو محیط کشت GEYC و HSPM، تفاوت معنی دار را نشان نداد. ولی درصد سیکل منتج به حاملگی برای نمونه های منجمد شده در محیط HSPM در مقایسه با محیط GEYC بیشتر بود (۲۵).

نگهدارنده های زیادی همراه با محیط کشت هایی که برای انجماد اسپرم به کار می رود، مورد استفاده قرار می گیرند. از جمله می توان زرده تخم مرغ، شیر، بافرهای دو یونی (دارای یون های مثبت و منفی)، سیترات، فروکتوز، بافر تریس، گلوکز، دکستروز و گلایسین را نام برد (۲۶). لذا با توجه به تأثیر نگهدارنده های مختلف در محیط کشت های انجماد اسپرم پیشنهاد شده تا از محیط HSPM به عنوان رقیق کننده بهتر نسبت به GEYC استفاده گردد. برتری HSPM نسبت به دو محیط TYBG وGEYC در این است که یک محیط استریل و از نظر بیوشیمیایی تعریف شده است. به دلیل اینکه این محیط فاقد زرده تخم مرغ و یا هرگونه پروتئین های غیرانسانی است، لذا بنحوی از حضور احتمالی آنتی بادی های ناخواسته در پاسخ به تلقیح داخل رحمی اسپرم جلوگیری شده است. بعضی از مطالعات نشان می دهد که بهترین بازده حرکت و میزان بقاء اسپرم پس از ذوب، طی روش انجماد آهسته بدست می آید. همچنین در مقایسهٔ بین محیط کشت های انجماد، محیط HSPM به صورت معنی داری میزان بقاء اسپرم ها را پس از ذوب، نسبت به محیط های TYBG و GEYC دارا می باشد. به همین خاطر با توجه به عدم امکان دسترسی به دستگاه انجماد در همه مراکز ناباروری، استفاده از محیط انجماد HSPM واستفاده از روش انجماد در فاز بخار برای نمونه های اسپرم با پارامترهای طبیعی توصیه شده است (۲۷).

یکی از مشکلاتی که در روند انجماد اسپرم وجود دارد این است که هنوز محیطی که از آسیب اسپرمها طی روند انجماد به طور کامل جلوگیری کند، وجود ندارد. آسیب به اسپرم ها را میتوان بلافاصله با کاهش حرکت آن پس از ذوب تشخیص داد. به همین خاطر افزودن ترکیبات نگهدارنده، قبل از انجماد جهت بقا بهتر اسپرم ها ضروری است. البته این نظریه هم وجود دارد که شاید کاهش حرکت اسپرم در طی انجماد و ذوب به خاطر تماس اسپرم با نگهدارنده های محیط باشد (۲۸). در سال ۲۰۰۵، محققین به این نتیجه دست یافتند که DMSO برای محافظت از ساختار اسپرم در طی فرآیند انجماد، بهتر از گلیسرول یا ۱و۲ پروپانودیول عمل می‌کند (۲۹). گروهی دیگر از پژوهشگران، در سال ۲۰۱۴، در بررسی اثر سلنیوم روی اسپرم های طبیعی متوجه شدند که دوز ۵ میکرو گرم در لیتر سلنیوم، سبب افزایش حرکت، مورفولوژی و زنده ماندن اسپرم ها پس از فرآیند ذوب می گردد (۳۰). اثر آنتی اکسیدان ها نیز بر کیفیت اسپرم ذوب شده در روش انجماد سریع نشان می دهد که ویتامین E در غلظت ۱و۲ میلی مولار، باعث افزایش درصد حرکت، حرکت پیشرونده به جلو و درصد زنده ماندن اسپرم های طبیعی شده که در حرکت پیشرونده و میزان درصد زنده ماندن، نسبت به گروه شاهد معنی دار بود. در نمونه های الیگواسپرمیا، اگرچه همین افزایش مشاهده می شود، ولی نسبت به گروه شاهد دارای تفاوت معنی داری نیست. اسید اسکوربیک (ویتامین C) یکی دیگر از مواردی است که بر هیچیک از پارامترهای اسپرم، تاثیر خاصی ندارد (۳۱). اسپرم های متعلق به افراد اولیگوآستنوتراتواسپرمیا نسبت به افراد عادی بسیار مستعد آسیب بعد از انجماد هستند. انجام سانتریفیوژ هم قبل از انجماد سبب انتخاب اسپرم های مقاوم به انجماد می گردد. در این خصوص، هایپوتورین یکی از آنتی اکسیدان هایی است که تاثیر محافظتی روی عملکرد اسپرم ها دارد (۳۲). بعضی از محققین به این نتیجه دست یافتند که روش انجماد دستگاهی، کیفیت اسپرم را بهتر از انجماد با استفاده از فاز بخار حفظ می کند (۳۳). ممکن است درصد حرکت پیشرونده اسپرم بعد از انجماد شیشه ای به طور معنی داری کاهش پیدا کند. همچنین، کاهش معنی داری را در قابلیت حیات و مورفولوژی اسپرم و افزایش معنی داری را در میزان آپوپتوز بدون اینکه تعداد اسپرم ها تغییری نماید، ایجاد نماید. به عبارتی، انجماد شیشه ای، روی پارامترهای حیاتی و میزان آپوپتوز اسپرم که البته نسبت به سایر روشها کمتر است، در مردان نابارور اثر منفی می گذارد (۳۴). ارزیابی حرکت، قابلیت حیات و واکنش آکروزومی در اسپرم، قبل و بعد از انجماد نمایانگر آن است که روش شیشه ای، بدون حضور محیط انجمادی و فقط با حضور پلاسمای سمینال در مقایسه با محیط HSPM، منجر به کاهش کمتری در میزان حرکت، قابلیت حیات و واکنش آکروزومی خودبخودی اسپرم انسان می گردد (۳۵). اگرچه انجماد باعث ضعیف تر شدن حرکت اسپرم در بیمارانی با اختلال شدید اسپرماتوژنزیس می گردد، اما میزان لقاح و حاملگی را چندان به خطر نمی اندازد (۳۶). مقایسه بین اسپرم های منجمد شده و تازه در افراد الیگو اسپرمیا نشان می دهد که پارامتر های اسپرم، میزان لقاح و حاملگی در هر دو گروه مشابه بوده و انجماد اسپرم در افراد الیگواسپرمیا می تواند مفید هم باشد (۱۴). محققین جهت نتیجه گیری بهتر پارامترهای اسپرم پس از ذوب از روشها و ابزارهای مختلفی برای انجماد اسپرم در افراد الیگو اسپرمیا استفاده کردند:

۱- استفاده از زونا پلوسیدا: گرچه ایده انجماد اسپرم برای افرادی با ویژگیهای خاص و یا در افرادی که تعداد اسپرم در آنها بسیار کم است، به بیش از یک دهه قبل بر می گردد، اما مسائل بیولوژیک متعددی برای غلبه بر آن وجود داشت. تلاش های اولیه برای انجماد اسپرماتوزوآ و قرار دادن آنها در زونا پلوسیدای خالی حیوانی و یا انسانی که، به طور آزمایشی با مواد نگهدارنده پر شده بودند (۴۰-۳۷)، به این نتیجه منجر گردید که، میزان سالم ماندن و لقاح اسپرم با زونای انسانی کمتر از زونای حیوانی مانند هامستر است. محققین این احتمال را که وقتی از زونای انسانی استفاده می شود، ممکن است حضور پروتئین متصل شونده به ZP3 باعث القاء در واکنش آکروزومی گردد، را رد نکردند. با وجود اینکه این روش نیاز به مهارت های خاص، تجهیزات و کار بسیار فشرده ای دارد، اما تولد زنده با استفاده از زونای انسانی و همستر توسط بعضی از متخصصین مربوطه گزارش گردید. از مزایای این روش این بوده که از اتلاف وقت برای غربالگری و جدا سازی اسپرم های متحرک که در روش های معمول بعد از ذوب نیاز است، تا حدودی جلوگیری شده است. همچنین به خاطر تماس کمتر ماده انجماد و جلوگیری از معایب احتمالی ناشی از خطر آلودگی بیولوژیکی، از آن به عنوان یک روش مناسب ذکر می شود. ولی دشواری انجام آن، نتوانست نظر متخصصین را به خود جلب نماید (۴۴-۴۱).

۲- استفاده از جلبک ولوکس گلوباتور: در این روش، اسپرماتوزوا در داخل محوطه کروی جلبک تزریق شده و سپس منجمد می شوند. در این روش قرار دادن اسپرم و همچنین بازیافت آن پس از ذوب، باید به وسیله سوزن مخصوص

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]

میکرواینجکشن صورت پذیرد (۴۵). استفاده از جلبک کروی ولوکس گلوباتور یک روش امید بخش، ارزان و آسان برای نگهداری اسپرمهای متحرک بوده و از عملکرد بالایی برخوردار است. گرچه این روش برای انجماد اسپرم بسیار جذاب و عالی به نظر می رسد، اما با محدودیت هایی نیز همراه است. قرار گرفتن گامت انسانی در برابر مواد ژنتیکی جلبک و ثابت بودن سطح جلبک از مواردی بودند که استفاده از آن را محدود می کرد.

۳- استفاده از آلژینات آگارز: پیشنهاد استفاده از حاملین غیر زیستی و غیر بیولوژیک نظیر پلی ساکارید آلژینات آگارز در حقیقت جایگزین کردن یک ماده غیر سمی برای انجماد اسپرم با تعداد کم می باشد. در این روش، مقدار کمی از اسپرم ها را در داخل قطره های اسید آلژینیک قرار می‌گیرد که می توان برای بازیافت اسپرم ها دوباره آن را ذوب کرده و به شکل مایع در آورد. از مزایای این روش، بی تاثیر بودن اسید آلژینیک روی اسپرم بوده و تقریبا هیچ تغییری ایجاد نمی کند. همچنین در این روش اسید آلژینیک مانع از چسبندگی اسپرم به دیواره پیپت و یا آلودگی با مواد بیولوژیکی خارجی می شود. ضمنا این شانس هم برای بیمارانی که تعداد اسپرم در آنها بسیار کم است، نمونه ها را به چند قسمت تقسیم نموده تا در چند مرحله قابل استفاده باشند. از معایب این روش می توان به کاهش حرکت اسپرم بعد از ذوب نام برد (۴۷و۴۶). در این روش می توان از بعضی مواد به عنوان نگهدارنده استفاده نمود. ابتدا اسپرم را با مواد نگهدارنده، مخلوط نموده و به آلژینات، قبل از مرحله ژلاتینی شدن اضافه نمود. سپس نمونه ها را در اندازه های گرد و کوچکی منجمد کرد. باید در نظر داشت که به دلیل اینکه در روش انجماد آهسته، نمونه ها باید در محلول اسید سیترات حل شود و در این حالت، مقدار کمی اسید آلژینیک در غشاء اسپرم باقی مانده و باعث کاهش حرکت اسپرم می شود، لذا تقسیم نمونه ها به قطعات کوچک آگارز و قرار دادن آنها در نی های ۰/۲۵ سی سی و سپس انجماد شیشه ای می تواند، پارامترهای اسپرم را تا حدود زیادی حفظ کند (۴۷).

۴- استفاده از کرایولوپ: در این روش، نمونه اسپرم به حجم های کوچکی بین ۱۵ تا ۲۰ میکرولیتر تقسیم شده و برای انجماد، روی کرایوهای مخصوص انجماد جنین قرار می گیرند (۵۰-۴۸). یا اینکه اسپرم ها را روی نواری از ماده انجماد که از حلقه نایلونی پوشیده شده است، قرار داده و مستقیما وارد مایع نیتروژن می نمایند. از مزایای این روش این است که دسترسی به آن آسان بوده و نیازی به مقدمات و یا تدارکات اضافی ندارد. از معایب آن می توان به خطر آلودگی ناشی از باز بودن سیستم اشاره کرد (۵۲و۵۱).

۵- استفاده از نی (straw): یکی دیگر از روشهای مرسوم، استفاده از پیپت است. پیپت های کشیده شده، همانند نی عمل کرده و می توان آنها را در اندازه های مختلف تهیه نمود. اسپرم ها باید به صورت سوسپانسیون ۱ تا ۵ میکرولیتر آماده شده و به روش انجماد شیشه ای در داخل پیپت ها قرار گیرند (۵۳). در این حالت، ترکیب اسپرم و ماده انجماد داخل پیپت کوچک گذارده شده و سپس درون نیتروژن مایع قرار داده می شوند. از مزایای این روش استریل، ساده و راحت بودن آن است، ولی برای نمونه هایی که به شدت خراب بوده و از پارامترهای مناسبی برخوردار نیستند، به دلیل اینکه احتمال چسبیدن اسپرم به دیواره پیپت وجود داشته و باعث از دست دادن نمونه ها می شود، چندان مناسب نیست (۵۴و۱۴).

۶- استفاده از سوزن میکرو اینجکشن (ICSI pipette): برای بیمارانی که اولیگواسپرمیای شدید داشته و یا کریپتواسپرمیا هستند، پیشنهاد گردیده تا از سوزن های مخصوص میکروایجکشن استفاده کنند. از هر دو روش انجماد آهسته و انجماد شیشه ای می توان استفاده نموده و اسپرم ها را داخل آن نگه داشت (۱۵و۵۵). از مزایای آن استریل، راحت و ساده بودن آن می باشد. معایب آن این است که برای مدت طولانی کاربرد نداشته و احتمال آلودگی آن نیز وجود دارد. ضمنا باید در نظر داشت که سوزن های میکرواینجکشن بسیار شکننده هستند(۵۶).

۷- Micro droplet: انجماد اسپرم در قطره های کوچکی بین ۱ تا ۴۰ میکرولیتر صورت می پذیرد. این قطره ها حاوی اسپرم و ماده انجماد بوده و روی یک سطح سرد قرار گرفته و یا مستقیما در داخل مایع نیتروژن فرو برده می شوند (۵۷و۵۳). قطره های کوچک داخل ظروف مخصوص کشت قرار گرفته و با روغن معدنی پوشیده می شوند (۶۰-۵۸). در این روش، احتمال چسبیدن اسپرم ها به سطوح وسیله انجماد بسیار کم است. از معایب آن احتمال خطر آلودگی و همچنین شکل و اندازه ظروف کشت می باشد که ممکن است مشکلاتی در کار برد و ذخیره اسپرم در مایع نیتروژن ایجاد کند.

۸- Microspheres Agarose: نگهداری اسپرم روی رشته های بسیار ظریف آگارز بوده و از مزایای آن، غیر بیولوژیک بودن آن می باشد. ولی از نظر بالینی و کلینیکی، هنوز ارزیابی نشده است (۴۷).

بحث و نتیجه گیری

بعضی از محققین به این نتیجه دست یافتند که در روش انجماد اسپرم، مخصوصا در نمونه های اولیگو اسپرمیا و کریپتواسپرمیا، اگر از نی (straw)، استفاده شود، میزان حرکت، زنده ماندن و مورفولوژی اسپرم در نمونه هایی که پروسس شده و شسته شده باشند، بعد از ذوب، از نمونه هایی که در پروسه شستشو قرار نگرفتند، بهتر است. این موضوع اهمیت پروسس و شستشوی اسپرم را در نمونه‌های اولیگو اسپرمیا و کریپتواسپرمیا بیان می‌دارد (۶۱).

عده‌ای از پژوهشگران در پی آن هستند که به دلیل اینکه بعضی از مواد نگهدارنده، توکسیک هستند، از آن ها برای انجماد اسپرم استفاده نکنند. یک مطالعه نشان می‌دهد که حذف مواد نگهدارنده، این نیاز را به وجود می آورد تا از روش خاصی برای انجماد اسپرم استفاده شود. بهینه سازی روشهای انجماد اسپرم، می تواند در نمونه های طبیعی و همچنین در نمونه هایی مثل اولیگو اسپرمیا و کریپتواسپرمیا کاربرد داشته باشد. استفاده از خاصیت موبینگی پیپت ها کمک می کند تا بتوان بدون استفاده از مواد نگهدارنده، اسپرم را داخل پیپت های مخصوص (straw) قرار داده و در داخل نیتروژن مایع ذخیره نمود. روش دیگری که در مقایسه با روش قبلی توصیه گردید، استفاده از پیپت مخصوص بیوپسی است. شواهد حاکی از آن است که علی‌رغم اینکه استفاده از هر دو روش دارای ضریب اطمینان بالایی است، ولی شانس حفظ و نگهداری نمونه های اسپرم اعم از طبیعی، اولیگواسپرمیا و یا کریپتواسپرمیا، در پیپت های بیوپسی ارجح است (۶۲). یکی دیگر از مواردی که در انجماد اسپرم از اهمیت بسزایی برخوردار می باشد، خطر آلودگی نمونه ها است. سازمان نظارتی FDA تاکید بر حمایت ار روش هایی دارد که هیچگونه آلودگی را هنگام پروسه انجماد و یا در طول ذخیره سازی آن در داخل نیتروژن، ایجاد ننماید. لذا مشاهده شده است که قرار دادن اسپرم روی کرایوتیوپ و یا دیش‌های کشتی که بسته بندی محکمی نداشته و به

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]

اصطلاح مهر و موم نشده اند، خطر آلودگی را افزایش می دهد. به همین دلیل میزان بازیافت اسپرم های منجمد شده از ۵۹ تا ۱۰۰ درصد و میزان بقا آن بین ۸ تا ۸۵ درصد و همچنین میزان حرکت آن از ۰ تا ۱۰۰ درصد متفاوت است. گرچه علت گستردگی این تفاوت وابسته به جمعیت بیماران، کیفیت اولیه نمونه، تعداد اسپرم های منجمد شده، نوع دستگاه انجماد، نوع ماده اضافه شده برای انجماد و پروتکل انجماد و ذوب می باشد، ولی در کنار آنها خطر آلودگی اسپرم در زمان انجماد و یا ذوب را، نباید خالی از اشکال دانست (۶۳). حال این سئوال مطرح است که آیا هر نمونه ای را می توان در پروسه انجماد قرار داد. بدیهی است که پیدا کردن اسپرم زنده و متحرک پس از ذوب به ویژه در مواردی که الیگو اسپرمیای شدید و یا کریپتواسپرمیا باشد، کار بسیار سخت و دشواری است. شاید بتوان تنها چند نمونه از دهها نمونه ای که این مشکل را داشتند باشند، حرکت و بقاء اسپرم را پس از ذوب حفظ نمود. لذا درصد کمی از اینگونه نمونه ها برای روش های کمک باروری، قابل استفاده خواهند بود. باید در نظر داشت که پارامترهای اولیه اسپرم عامل اصلی و تعیین کننده ای برای پروسه انجماد و ذوب هستند. در حمایت از این فرضیه، باید گفت که پارامترهای پایه اسپرم به غیر از مورفولوژی، به شدت با حرکت اسپرم پس از انجماد مرتبط هستند. نمونه اسپرم هایی، که تعداد، حرکت و درصد زنده بودن آنها کمتر از صدک ۵ باشد، از نظر سازمان بهداشت جهانی، کمترین میزان حفظ حرکت و زنده ماندن را دارا هستند. لذا WHO، تاکید بر آن دارد تا نمونه های اسپرمی که پارامترهای آن و یا یکی از پارامترهای آن کمتر از صدک ۵ باشد، مشاوره لازم برای بیمار، صورت پذیرفته و امکان باروری او با دقت بیشتری سنجیده شود. در اینگونه مواقع استفاده از هر روشی نمی تواند پیامد خوبی را به همراه داشته باشد. لذا باید با دقت بیشتر و استفاده از یک روش مناسب، اسپرم ها را برای انجماد آماده نموده و برای برگشت بهینه آن در پروسه ذوب یک برنامه دقیقی را طراحی نمود. در این راستا، نمونه هایی مثل اولیگواسپرمیا، اولیگواسپرمیای شدید، کریپتواسپرمیا، سرطان بیضه و پارامترهای کمتر از صدک ۵، نیاز به ارزیابی دقیق تری دارند (۶۴).

در مواردی که تعداد اسپرم کمتر از یک میلیون در هر میلی لیتر مایع سیمن می‌باشد، مانند آنچه که در افراد که دچار اولیگواسپرمیای شدید بوده و یا اینکه مبتلا به کریپتواسپرمیا هستند، شاید نتوان هیچ اختلافی را بین پیامد لقاح تخمک بین استفاده از اسپرم های منجمد شده و یا نمونه تازه آن پیدا نمود. نتیجه مورد نظر، این نظریه را قوت می بخشد که نباید بدون ارزیابی دقیق در خصوص معیار و کارآیی اسپرم، اقدام به انجماد آن نمائیم (۶۵). عده ای از متخصصین بر این باورند که شاید بتوانیم در استفاده از اسپرم‌های منجمد شده ای که از افراد کریپتواسپرمیا و آزواسپرمیایی که اسپرم آنها به روش بیوپسی بدست آمده، میزان لقاح بالاتر و یا حتی جنین هایی با کیفیت بهتر داشته باشیم، اما در اینگونه افراد اگر از اسپرمهای تازه استفاده نماییم، لانه گزینی بهتری را تجربه خواهیم کرد. ارزیابی این نتیجه، باعث گردیده تا نظر بسیاری از متخصصین به طرف آن سوق پیدا کند و انجماد اسپرم را در اینگونه مواقع به عنوان یک راه حل جایگزین و اجتناب ناپذیر در نظر داشته باشند (۶۶). به نظر می رسد نمونه مایع سیمن افراد با میزان طبیعی اسپرم در مقایسه با نمونه سیمن در افراد اولیگو اسپرمیا، کریپتواسپرمیا و آستنواسپرمیا، دارای مقاومت بیشتری نسبت به آسیب ناشی از انجماد و ذوب باشند. گرچه بدست آوردن اسپرم به روش بیوپسی از بیضه و اپیدیدیم برای بیماران دلگرم کننده بوده و یک مولفه موثر در درمان ناباروری با علت مردانه است. ولی همچنان باید در زمینه انجماد اسپرم با میزان کم، از لحاظ بیولوژیکی و تکنیکی کارهای زیادی صورت گرفته و تحقیقات زیادی جهت معرفی تکنیک های مناسب برای استفاده بالینی آن انجام پذیرد. اسپرم انسان می‌تواند با موفقیت منجمد شده و دوباره مورد استفاده قرارگیرد.

انجماد اسپرم در حال حاضر نقش مهمی را در حفظ باروری زوجین تحت درمان ناباروری، بیماران مبتلا به سرطان تحت شیمی درمانی یا پرتودرمانی که احتمال صدمه به گنادها وجود دارد، جراحی لگن و یا بیضه، بیماران مبتلا به بیماری های دژنراتیو مانند دیابت، مالتیپل اسکلروزیس و یا آسیب نخاعی، مردان تحت جراحی عقیم سازی مانند وازکتومی، غربالگری و قرنطینه کردن نمونه دهنده، اولیگواسپرمیا و کریپتواسپرمیا، ایفا کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاران پژوهشکده سلامت جهت همکاری در این تحقیق، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]

Methods of Cryopreserving Sperm in Infertile Men with Oligospermia and Cryptospermia Patterns

M. Gholamitabar Tabari (MSc)[1], S.G.A. Jorsaraei (PhD)*[1], Y.R. Yousefnia Pasha (MD)[1]

1.Fatemeh-Zahra Infertility& Reproductive Health Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(11); Nov 2016; PP: 35-43
Received: May 23th 2016, Revised: Jul 27th 2016, Accepted: Sep 28th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Cryopreservation of sperm currently plays a significant role in maintaining the fertility of couples who undergo infertility treatment, particularly in patients with oligospermia and cryptospermia. To avoid recurrent biopsies, we need to dedicate a lot of time to sperm collection so that the patient is placed in infertility treatment cycles when the necessary conditions are provided. This study is dedicated to Cryopreservation of sperm in oligospermia and cryptospermia samples.

METHODS: For this study, we referred to NCBI database and selected articles related to various methods of cryopreserving sperm using certain keywords such as "oligospermia", "cryptospermia" and "cryopreservation of sperm" and articles that surveyed cryopreservation in terms of medical and functional views.

FINDINGS: To cryopreserve sperm, three methods are used; slow, fast and glass. Using several preservatives in culture medium is necessary for survival of sperm. Since cryopreservation may weaken sperm mobility in patients with severe spermatogenesis disorder, researchers seek to devise new methods to reduce these effects. Using zona pellucid, volvox globator algae, alginate-agarose, cryoloop, straw and microinjection needle are among the methods advised for preserving sperms and increasing their survival rate.

CONCLUSION: According to the results of this study, using different tools to achieve best results depends on the type of samples obtained from these patients.

KEY WORDS: *Oligospermia, Cryptospermia, Infertile.*

Please cite this article as follows:

Gholamitabar Tabari M, Jorsaraei SGA, Yousefnia Pasha YR. Methods of Cryopreserving Sperm in Infertile Men with Oligospermia and Cryptospermia Patterns. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(11):35-43.

***Corresponding author: S.G.A. Jorsaraei (PhD)**
Address: Fatemeh Zahra Infertility and Reproductive Health Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, I.R.Iran
Tel: +98 11 32274881
E-mail: alijorsara@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]

References

1.Mclachlan RI. Approach to the patient with oligozoospermia. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(3):873-80.
2. Jorsaraei SGA, Firoozjaee A, Yousofnia Pasha Y, Tahmasbpour Marzony E, Sarabi E. The effects of single dose treatment of diazinon on testes structure and spermatogenesis in rat. Yakhteh Med J. 2010;12(1):39-42.
3. Jorsaraei SGA, Shibahara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Tahmasbpour Marzony E, Suzuki M. The leptin concentrations in seminal plasma of normozoospermic, asthenozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its relationship to semen parameters. Iran J Reproduct Med. 2010;8(3):95-100.
4. Hosseinzadeh Colagar A, Tahmasbpour Marzony A, Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. Nut Res. 2009;29(2):82-8.
5. Hosseinzadeh Colagar A, Tahmasbpour Marzony E. Ascorbic acid levels in seminal plasma of fertile and idiopathic infertile men: determination and its relationship to sperm quality. J Clin Biochem Nutr. 2009; 45:144-9.
6. Hosseinzadeh Colagar A, Pouamir M, Tahmasbpour Marzony E,Jorsaraee GA. Relationship between seminal malondialdehyde and sperm parameters quality in the fertile and infertile men. Brazil Arch Biol Technol. 2009;52(6):1387-92.
7. Wong EW,Cheng CY. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. Trend Pharmacol Sci. 2011;32(5):290-9.
8.Jorsaraei Sg B A, Yosefnia Pasha Yr, Alizadeh Navaei R. The in vitro effects of Hinosan and Diazinon on human sperm parameters. J Babol Univ Med Sci. 2005;7(2):30-4.
9.Bendikson KA, Neri QV, Takeuchi T, Toschi M, Schlegel PN, Rosenwaks Z,et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection using occasional spermatozoa in the ejaculate of men with spermatogenic failure. J Urol. 2008;180(3):1060-4.
10. Corea M, Campagnone J, Sigman M. The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. Fertil Steril. 2005;83(4):920-2.
11.Tournaye H, Camus M, Goossens A, Liu J, Nagy P, Silber S, et al. Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. Hum Reprod. 1995;10(1):115-9.
12.Ron-El R, Strassburger D, Friedler S, Komarovski D, Bern O, Soffer Y, et al. Extended sperm preparation: an alternative to testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod. 1997;12(6):1222-6.
13.Jaffe TM, Kim ED, Hoekstra TH Lipshultz LI. Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis. J Urol. 1998;159(5):1548-50.
14.Koscinski I, Wittemer C, Lefebvre-Khalil V, Marcelli F, Defossez A, Rigot J M. Optimal management of extreme oligozoospermia by an appropriate cryopreservation programme. Hum Reprod. 2007;22(10):2679-84.
15.Abdelhafez F, Bedaiwy M, El-Nashar S A, Sabanegh E ,Desai N. Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. Hum Reprod Update. 2009;15(2):153-64.
16.Yavin S Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. Theriogenol. 2007;67(1):81-9.
17.Isachenko E, Isachenko V, Katkov Ii, Dessole S, Nawroth F. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. Reprod Biomed Online. 2003;6(2):191-200.
18.Donnelly ET, Steele EK, Mcclure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. Hum Reprod. 2001;6(16):1191-9
19.Vayena ERP. Griffin P. Current practices and controversies in Assisted Reproduction. WHO, Geneva. 2001:152-65.
20.Cross NL, Hanks SE. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. Hum Reprod. 1991;6(9):1279-83.
21.Peiravi T,marefat Gh, Soleimani Rad J, Farzadi L. Effect of vapor phase cryopreservation on human sperm acrosomes in fertile and subfertile men. Journal of reproduction and infertility.2004;5(3):208-16.
22.Alan O, Gardner DK. Handbook of Invitro Fertilization. 2nd ed. Chapter 16: Cryopreservation of oocytes and embryos. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Editors. CRC Press Inc. 2000.
23. Prins GS, Weidel L. A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. Fertil Steril. 1986;46(1):147-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]

24.Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. Fertil Steril. 2004;82(4):913-8.
25.Mahadevan M, Trounson AO. Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. Andrologia. 1983;15(4):355-66.
26.Jezek D, Schulze W, Kalanj-Bognar S, Vukelic Z, Milavec-Puretic V, Krhen I. Effects of various cryopreservation media and freezing-thawing on the morphology of rat testicular biopsies. Andrologia. 2001;33(6):368-78.
27.Talebian A, Sadeghi M R, Akhondi MM, Ardakani H, Bolorzadeh M. The assessment and comparison of different media and methods of sperm cryopreservation (Sperm banking). J Reproduct Infertil. 2005;6(2):140 -52. [In Persian]
28.Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. Fertil Steril. 1988;50(2):314-20.
29.Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. Hum Reprod. 2005;20(6):1676-87.
30.Nasri S, Amidi F, Rezaeian Z. Effect of Selenium on the motility, morphology and viability of sperm cells after freezing and thawing procedure. J Qazvin Univ Med Sci. 2014;18(1):11-7.[In Persian]
31.Nazm Bojnordi M. Movahedin M, Amanpour S, Ghasemi Hamidabadi H. Effect of antioxidants supplementation on human sperm parameters after freezing. J Mazandaran Univ Med Sci. 2008;18(63):20-27.[In Persian]
32.Brugnon F, Ouchchane L, Pons-Rejraji H, Artonne C, Farigoule M, Janny L. Density gradient centrifugation prior to cryopreservation and hypotaurine supplementation improve post-thaw quality of sperm from infertile men with oligoasthenoteratozoospermia. Hum Reprod. 2013;28(8):2045-57.
33.Mclaughlin EA, Ford WC,Hull MG. A comparison of the freezing of human semen in the uncirculated vapour above liquid nitrogen and in a commercial semi-programmable freezer. Hum Reprod. 1990;5(6):724-8.
34. Ramzani M K M A, Adib M. Effect of vitrification on apoptosis and some of parameter of sperm in infertile men. Feiz. 2010;14(1):18-25.
35. Darvishnia H, Shams Lahijani M, Akhoundi MM, Mobaraki M, Sadeghi MR. The Effects of cryopreservation by vitrification on motility, viability and spontaneous acrosome reaction of human spermatozoa. Iran J Biol. 2008;21(4):198.
36. Hauser R, Yogev L, Amit A, Yavetz H, Botchan A, Azem F, Lessing J B, Ben-Yosef D. Severe hypospermatogenesis in cases of nonobstructive azoospermia: should we use fresh or frozen testicular spermatozoa?. J Androl. 2005;26(6):772-8.
37.Walmsley R, Cohen J, Ferrara-Congedo T, Reing A, Garrisi J. The first births and ongoing pregnancies associated with sperm cryopreservation within evacuated egg zonae. Hum Reprod. 1998;13(4):61-70.
38.Cohen J, Garrisi G J, Congedo-Ferrara TA, Kieck KA, Schimmel TW, Scott RT. Cryopreservation of single human spermatozoa. Hum Reprod. 1997;12(5):994-1001.
39.Montag M, Rink K, Dieckmann U, Delacretaz G ,Van Der Ven H. Laser-assisted cryopreservation of single human spermatozoa in cell-free zona pellucida. Andrologia. 1999;31(1):49-53.
40.Liu J, Zheng X Z, Baramki T A, Compton G, Yazigi R A, Katz E. Cryopreservation of a small number of fresh human testicular spermatozoa and testicular spermatozoa cultured in vitro for 3 days in an empty zona pellucida. J Androl. 2000;21(3):409-13.
41.Borini A, Sereni E, Bonu ,Flamigni C. Freezing a few testicular spermatozoa retrieved by TESA. Mol Cell Endocrinol. 2000;169(1-2):27-32.
42.Hsieh Y, Tsai H, Chang C, Lo H. Cryopreservation of human spermatozoa within human or mouse empty zona pellucidae. Fertil Steril. 2000;73(4):694-8.
43.Levi-Setti PE, Albani E, Negri L, Cesana A, Novara P, Bianchi S. Cryopreservation of a small number of spermatozoa in yolk-filled human zonae pellucidae. Arch Ital Urol Androl. 2003;75(4):195-8.
44.Hassa H G F, Yildirim a, Can C, Sahinturk V ,Tekin B. A new protection solution for freezing small numbers of sperm inside empty zona pellucida :Osmangazi-Turk solution. Cell Preservat Technol. 2006;4(3):199-208.
45.Just A, Gruber I, Wober M, Lahodny J, Obruca A, Strohmer H. 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]

46.Herrler A, Eisner S, Bach V, Weissenborn U, Beier HM. Cryopreservation of spermatozoa in alginic acid capsules. Fertil Steril. 2006;85(1):208-13.
47.Isaev DA, Zaletov SY, Zaeva VV, Zakharova EE, Shafei RA, Krivokharchenko IS. Artificial microcontainers for cryopreservation of solitary spermatozoa. Hum Reprod. 2007;22(Suppl 1): i154.
48.Desai NN, Blackmon H, Goldfarb J. Single sperm cryopreservation on cryoloops: an alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa. Reprod Biomed Online. 2004;9(1):47-53.
49.Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, et al. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. Cryo Letters. 2002;23(2):93-102.
50.Schuster TG, Keller LM, Dunn RL, Ohl DA Smith GD. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. Hum Reprod. 2003;18(4): 788-95.
51.Desai N, Culler C, Goldfarb J. Cryopreservation of single sperm from epidydimal and testicular samples on cryoloops: preliminary case report. Fertil Sterilit. 2004;82(2):264.
52.Isachenko E, Isachenko V, Katkov, Ii, Rahimi G, Schondorf T, Mallmann P, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. Hum Reprod. 2004;19(4):932-9.
53.Isachenko V, Isachenko E, Montag M, Zaeva V, Krivokharchenko I, Nawroth F, Dessole S, Katkov, Ii, Van Der Ven H. Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. Reprod Biomed Online. 2005;10(3):350-4.
54.Desain G, Goldfarb J. A convenient technique for cryopreservation of micro quantities of sperm,. conference location, 1998. Conference
55.JO Sohn, SH Jun, LS. Park, EK Kim, TG. Chung, R. Lee. Comparison of recovery and viability of sperm in ICSI pipette after ultra rapid freezing or slow freezing,. Fertil Steril. 2003;80(3):127.
56.Gvakharia M, Adamson GD. A method of successful cryopreservation of small numbers of human spermatozoa. Fertility and Sterility. 2001;76(3):101.
57.Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A. Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Mol Cell Endocrinol. 2000;169(1-2):15-9.
58.Quintans CJ, Donaldson MJ, Asprea I, Geller M, Rocha M, Pasqualini RS. Development of a novel approach for cryopreservation of very small numbers of spermatozoa. Hum Reprod. 2000; 15: 99.
59.Sereni E, Bonu MA, Fava L, Sciajno R, Serrao L, Preti S ,Distratis V, et al. Freezing spermatozoa obtained by testicular fine needle aspiration: a new technique. Reprod Biomed Online. 2008;16(1):89-95.
60. Bouamama N, Briot P Testart J. Comparison of two methods of cryoconservation of sperm when in very small numbers. Gynecol Obstet Fertil. 2003;31(2):132-5.
61. Ghasemian FFR, Mohammadi Sardoo M, Bahadori Mh Evaluation of serial thawing-refreezing on human spermatozoa resistance using cryovials and straws. Int J Fertil Steril. 2012 6(3):157-64.
62. Kuznyetsov V, Moskovtsev SI, Crowe M, Lulat A G, Librach CL. Vitrification of a small number of spermatozoa in normozoospermic and severely oligozoospermic samples. Syst Biol Reprod Med. 2015;61(1):13-7.
63.Moskovtsev SI, Lulat AGM, Librachc L. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification vs. slow freezing: canadian experience. Canada: Intech Open Access Pub; 2012.
64. Degl'innocenti S, Filimberti E, Magini A, Krausz C, Lombardi G, Fino MG, et al. Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. Fertil Steril. 2013;100(6):1555-63.
65.Bessonnat J, Brouillet S, Sintzel S, Gillois P, Bergues U, Boutte-Busquet C, et al. In cryptozoospermia or severe oligozoospermia is sperm freezing useful?. Basic Clin Androl. 2014;24:15.
66. Hauser R, Bibi G, Yogev L, Carmon A, Azem F, Botchan A, et al. Virtual azoospermia and cryptozoospermia--fresh/frozen testicular or ejaculate sperm for better IVF outcome? J Androl. 2011;32(5):484-90.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1395.18.11.5.9]
[DOI: 10.22088/jbums.18.11.35]