مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۹، شماره ۱، فروردین ۱۴۰۱
http://rjms.iums.ac.ir
مقاله پژوهشی

بررسی اثرپارامترهای تاثیرگذار بر اسپرم‌های انسانی کپسوله شده در هیدروژل آلجینات در طی روند انجماد

سمیه فیض منش: کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
نفیسه بحیرائی: دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
ایمان حلوایی: استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) ihalvaei@modares.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: انجماد اسپرم فرایند اجتناب ناپذیری است که در مراکز درمان ناباروری انجام می‌شود و می‌تواند منجر به ایجاد آسیب‌هایی در اسپرم گردد و هنوز روش بهینه‌ای برای انجماد اسپرم معرفی نشده است. راهکارهای مختلفی در جهت حفظ سلول اسپرم برای مقابله با صدمات ناشی از انجماد وجود دارد که یکی از آن‌ها استفاده از کپسوله کردن سلول اسپرم با کمک آلجینات می‌باشد. هدف اصلی این مطالعه یافتن یک روش بهینه برای کپسوله کردن اسپرم برای استفاده در انجماد اسپرم می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه در چهار مرحله اثر غلظت‌های مختلف آلجینات، کلراید کلسیم، و نحوه افزودن مواد محافظ انجماد در روند کپسوله کردن اسپرم توسط آلجینات بررسی شد. در هر مرحله اسپرم‌ها بعد از کپسوله شدن با روش انجماد سریع منجمد شدند. بعد از ذوب و باز شدن آلجینات، حرکت و زنده‌مانی اسپرم بین گروه‌های مختلف بررسی شد. از روش رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین برای بررسی سلامت غشاء و زنده‌مانی اسپرم استفاده شد. فراساختار هیدروژل آلجینات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی بررسی گردید.

یافته‌ها: حرکت و زنده‌مانی اسپرم در گروه آلجینات ۱/۵٪ در مقایسه با آلجینات ۱٪ کاهش داشت. حرکت و زنده‌مانی اسپرم در گروه ۱۵۰ میکرولیتر نسبت به گروه ۱۰۰ میکرولیتر کلراید کلسیم روند کاهشی نشان داد. حرکت پیشرونده و تام اسپرم بین گروه افزودن محیط محافظ انجماد قبل از کپسوله کردن و بعد از کپسوله کردن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. گروهی که مواد محافظ انجماد را قبل از کپسوله کردن دریافت نکرده بود نسبت به همه گروه‌ها کاهش معنی‌داری را در میزان زنده‌مانی اسپرم نشان داد. میزان حرکت تام و زنده‌مانی در گروهی که قبل از کپسوله کردن زمان داشت در مقایسه با گروهی که زمان نداشت به طور معنی‌داری بیشتر بود. ساختار متخلخل هیدروژل آلجینات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی تایید شد.

نتیجه‌گیری: آلجینات ۱٪ به همراه ۱۰۰ میکرولیتر کلراید کلسیم و استفاده از مواد محافظ انجماد قبل و بعد از کپسوله کردن روش مناسبی برای کپسوله کردن اسپرم انسان توسط آلجینات به منظور انجماد می‌باشد. این مطالعه نشان داد که آلجینات می‌تواند برای کپسوله کردن اسپرم انسان مورد استفاده قرار بگیرد و مطالعات آینده باید تأثیر آلجینات در انجماد اسپرم را مورد بررسی قرار دهند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها
اسپرم انسان،
کپسول‌های آلجینات،
انجماد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹
تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۱/۱۴

شیوه استناد به این مقاله:
Feyzmanesh S, Baheiraei N, Halvaei I. Evaluation of Parameters Affecting Encapsulated Human Spermatozoa in Alginate Hydrogel during Cryopreservation. Razi J Med Sci. 2022;29(1):70-83.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

Razi Journal of Medical Sciences. 2022;29(1):70-83. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of Parameters Affecting Encapsulated Human Spermatozoa in Alginate Hydrogel during Cryopreservation

Somayeh Feyzmanesh: MSc, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Nafiseh Baheiraei: PhD, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Iman Halvaei: PhD, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (* Corresponding author) ihalvaei@modares.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Today, sperm cell cryopreservation, as a suitable method, is widely used in infertility clinics to maintain sperm cell fertility potential. But sperm cryopreservation has deleterious effects on sperm parameters. For this purpose, there are various ways to protect sperm cells during cryopreservation like sperm cell encapsulation with alginate (ALG). Sodium ALG (C6H7O6Na) is sodium salt of alginic acid, which is a natural anionic and hydrophilic polysaccharide and is mainly extracted from the cell wall of brown seaweed (7). Due to its non-toxicity and high biocompatibility, ALG hydrogel can create semi-permeable membranes around the sperm cells (8). To the best of our knowledge, no study has been performed to optimize the method of encapsulation of sperm with ALG in human sperm for clinical use. The main purpose of this study was to find an optimal method for encapsulating human sperm for use in cryopreservation.
Methods: In this study, in four stages, the effect of different concentrations of ALG, calcium chloride, and how to add cryoprotectant agent (CPA) in the process of encapsulation of sperm by ALG were investigated. In this study, the direct swim-up method was used to prepare sperm samples. ALG hydrogels were prepared by dissolving sodium ALG powder in a water solvent (12). To evaluate the optimal concentration, the solutions were well homogenized at concentrations of 1 and 1.5% by volume (W/V) at room temperature. Calcium chloride was selected as a cross-linker for cross-linking and final hydrogel formation and was used with a concentration of 102 mM/L. For evaluation of the effects of ALG concentration, twelve normozoospermic samples were divided into the following groups after preparation and subjected to freezing and thawing: 1- ALG 1% + CPA, 2- ALG 1.5% + CPA, 3- control. To determine the best concentration of calcium chloride, which was used as a crosslinker to form ALG hydrogels, twelve normozoospermic samples after preparation were divided into the following groups and then subjected to freezing and thawing: 1- ALG + CPA + CaCL2 (100µL), 2- ALG + CPA + CaCL2 (150µL): 3- control. For evaluation of addition of CPA before encapsulation, twelve normozoospermic samples, were prepared and divided into the following groups and then subjected to freezing and thawing: 1- ALG + CPA, 2- ALG, 3- control. To investigate the effects of giving time before encapsulation twelve normozoospermic samples were divided into the following groups and then subjected to freezing and thawing: 1- ALG + (CPA + NaCl), 2- ALG + group (CPA + NaCl) 3 Min, 3- control. At each stage, the sperm samples were frozen by rapid freezing after encapsulation. To freeze the samples in the cryotube, they were first placed horizontally at a distance of three cm above the level of liquid nitrogen in the nitrogen vapor for thirty minutes and then immersed in the liquid nitrogen. During thawing, the cryotubes were placed at 35 °C for two minutes after leaving the liquid nitrogen. The samples were then transferred to a laminar hood and placed in the medium containing 150 µL of sodium citrate 119 mM/L solution at pH = 7.5. After 30 seconds, the pre-warmed Ham's F10 with human serum albumin was added dropwise and after complete washing of the cryotube with the medium, the samples were centrifugated for 10 minutes at 300 g. After removing the

Keywords
Cryopreservation,
Alginate Capsules,
Human Spermatozoa

Received: 29/01/2022
Published: 03/04/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

supernatant, the final pellet was used for analysis. After thawing and dissolving ALG, sperm motility and viability were assessed for all groups. Eosin-nigrosin staining method was used to evaluate membrane integrity and sperm viability. The ultrastructure of ALG hydrogel was examined by scanning electron microscopy (SEM).

Results: SEM showed that the prepared ALG hydrogel had a porous structure with interconnected porosity that could act as a semi-permeable membrane. The progressive motility in the 1.5% ALG group was zero. There was also a significant difference between total (progressive + non-progressive) motility of sperm between the 1% and 1.5% ALG groups (P<0.001). Total sperm motility in ALG groups showed a significant decrease compared to the control group. Sperm viability rate in the 1% ALG group was significantly higher than the 1.5% ALG group (P<0.01) and both ALG groups showed a significant decrease in viability rate compared to the control group. Progressive and total motility of sperm in the 150 µL calcium chloride group compared to the 100 µL group showed a decreasing trend while total motility in the 150 µL group compared to the control group showed a significant decrease (P <0.05). The rate of sperm viability in the 150 µL group compared to the 100 µL group of calcium chloride and the control group showed a decreasing trend. Regarding the adding CPA before encapsulation on sperm parameters, progressive and total sperm motility in the different ALG groups showed a significant decrease compared to the control group and there was no significant difference between the groups of adding CPA before encapsulation and after encapsulation. The rate of sperm viability after thawing in the group that received CPA before encapsulation showed a significant increase compared to the group that received before cryopreservation, but there was no significant difference compared to the control group. The group that did not receive CPA before encapsulation showed a significant reduction in sperm viability compared to all groups (P <0.001). Regarding the effects of giving time before encapsulation, progressive motility in both groups that used ALG for cryopreservation showed a significant decrease compared to the control group. However, the total motility in the group that had time was significantly higher than the group that did not have time (P <0.05). Sperm viability rate in the group without time did not show a significant difference compared to the group that had three minutes, but there was a significant decrease compared to the control group.

Conclusion: Encapsulation of sperm with ALG is a promising method that can prevent the side effects of cryopreservation. It seems that 1% ALG with 100 µL of calcium chloride and the use of CPA before and after encapsulation is a good way to encapsulate human sperm by ALG for freezing.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Feyzmanesh S, Baheiraei N, Halvaei I. Evaluation of Parameters Affecting Encapsulated Human Spermatozoa in Alginate Hydrogel during Cryopreservation. Razi J Med Sci. 2022;29(1):70-83.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

مقدمه

انجماد اسپرم روشی مناسب برای حفظ باروری در مردان می‌باشد. از کاربردهای انجماد اسپرم می‌توان به حفظ باروری مردان قبل از پرتو درمانی یا شیمی درمانی و برای بیماران مبتلا به دیابت و اختلالات خود ایمنی اشاره کرد (۱). همچنین انجماد اسپرم را می‌توان برای افراد مبتلا به آزواسپرمی و کریپتواسپرمی که برای دست یابی به اسپرم از روش‌های جراحی و تهاجمی مانند نمونه‌برداری از بیضه و آسپیراسیون مکرر اپیدیدیم در این افراد استفاده می‌شود به کار برد (۲). همچنین، برای افرادی که تمایل به وازکتومی دارند و همچنین بیمارانی که نیاز به شروع درمان با فناوری کمک باروری دارند انجماد اسپرم روش مناسبی می‌باشد. اما انجماد با وجود مزایای فراوان، اثرات مخربی هم به همراه دارد. از عوامل آسیب‌رسان شناخته شده در انجماد اسپرم می‌توان به شوک سرمایی، تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی و خارج سلولی، شوک اسمزی و وجود گونه‌های واکنشگر اکسیژنی (Reactive Oxygen Species, ROS) که در مقادیر بالا منجر به تنش اکسایشی می‌شود، اشاره کرد (۳). افزایش ROS سبب بر هم خوردن نظم پروتئین‌های ساختاری مانند پمپ‌های یونی وابسته به ATP شده و همچنین منجر به فسفریلاسیون پروتئین آکسونم، که عامل حرکت اسپرم می‌باشد، شده و در نتیجه منجر به کاهش حرکت شده و اثرات مخربی نیز بر مورفولوژی و DNA اسپرم دارد (۴-۶).

امروزه برای مقابله با صدمات ناشی از انجماد از روش‌های پیشرفته‌تری مانند کپسوله کردن با آلجینات استفاده می‌شود. سدیم آلجینات نمک سدیمی اسید آلجینیک است که به صورت پلی ساکارید آنیونی و هیدروفیلیک طبیعی می‌باشد و عمدتاً از دیواره‌ی سلولی جلبک قهوه‌ای دریایی به صورت پودری به نام سدیم آلجینات ($C_6H_7O_6Na$) استخراج می‌شود (۷). هیدروژل آلجینات با توجه به غیرسمی بودن و زیست سازگاری بالایی که دارد می‌تواند به کمک پلی آمین‌های چند ظرفیتی در اطراف سلول اسپرم غشاء نیمه تراوایی ایجاد کند که منجر به حفظ سطح مطلوب اسپرم در شرایط درون تنی و برون تنی شده و خود عامل افزایش باروری خواهد بود (۸، ۹). آلجینات به عنوان داربست نیز در بهبود اسپرماتوژنزیس برون تنی مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). همچنین هیدروژل آلجینات می‌تواند از ظرفیت پذیری و واکنش آکروزومی زودرس اسپرم جلوگیری کند (۱۱، ۱۲). اخیرا تأثیر مثبت کپسوله کردن اسپرم انسان با آلجینات بر پایداری غشاء و حفظ یکپارچگی DNA در شرایط نگهداری طولانی مدت اسپرم در دمای ۳۷C° نیز نشان داده شده است (۱۳). Perteghella و همکارانش نشان دادند که کپسوله کردن با آلجینات پارامترهای کیفی (یکپارچگی غشاء، حرکت پیش رونده و سرعت حرکت) و توانایی لقاح اسپرم‌های بوفالو و گاو را به دنبال انجماد حفظ می‌کند (۱۴). مراحل مختلفی طی می‌شود تا هیدروژل آلجینات اطراف سلول‌های اسپرم تشکیل شود که نحوه انجام هر مرحله می‌تواند بر کیفیت هیدروژل نهایی تأثیر بگذارد. مطالعات زیادی در مورد بررسی اثر کپسوله کردن اسپرم گونه‌های مختلف با آلجینات انجام شده است اما در تعداد معدودی از آن‌ها روش یکسانی به کار برده شده است (۱۵، ۱۶). به نظر می‌رسد شیوه کپسوله کردن اسپرم یک گونه با گونه دیگر متفاوت باشد به نحوی که روش مناسب برای کپسوله کردن اسپرم گاو برای کپسوله کردن اسپرم‌های گراز نامناسب به نظر می‌رسد (۱۷). Herrler و همکارانش روش کپسوله کردن اسپرم در آلجینات که بعد از ذوب می‌توانند برای بازیابی اسپرم‌ها مایع شوند را پیشنهاد کردند. نتایج بدست آمده نشان داد که اگرچه میکروکپسوله کردن با آلجینات می‌تواند از نظر مکانیکی روی حرکت اسپرم‌ها اثر گذاشته و آن را مهار کند، اما روی زنده‌مانی تأثیر منفی نگذاشته و حتی میزان زنده‌مانی بالایی در اسپرم‌های بی حرکت در مقایسه با گروه کنترل گزارش گردید. این محققین، همچنین، اظهار کردند که کپسوله کردن اسپرم با کمک آلجینات یک روش مناسب برای حفاظت اسپرم در مقابل آلودگی مواد خارجی و ژنتیکی نسبت به روش زونا پلاسیدا می‌باشد و به کمک این روش برای افرادی که مبتلا به الیگواسپرمیا می‌باشند، می‌توان نمونه‌های اسپرم بدست آمده را به چندین نمونه کوچک تقسیم کرده و برای تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم در مراحل بعدی منجمد کرد (۱۵). یکی از نکاتی که در موفقیت کپسوله کردن اسپرم با آلجینات مورد توجه است، درصد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

آلجینات مورد استفاده است. در مطالعات گذشته غلظت‌های مختلف آلجینات مورد استفاده قرار گرفته و نتایج متفاوتی گرفته شده است (۱۵، ۱۸). نکته دیگری که می‌تواند در کیفیت کپسوله کردن آلجینات تأثیرگذار باشد میزان کراس لینک می‌باشد. کلسیم کلراید به عنوان مهم‌ترین کراس لینک کننده در آلجینات مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات گذشته نشان داده است که غلظت‌های مختلف آلجینات می‌تواند منجر به تأثیر بر کیفیت کپسول‌های آلجینات از جمله وزن و حجم کپسول‌های تشکیل شده داشته باشد (۱۹). مورد نکته دیگری که باید مد نظر قرار گیرد نحوه افزودن مواد محافظ انجماد در روند کپسوله کردن اسپرم توسط آلجینات می‌باشد. مواد محافظ انجماد قبل از انجماد به اسپرم اضافه می‌شوند تا با تخلیه آب داخل سلول و جلوگیری از تشکیل یخ داخل و خارج سلولی منجر به کاهش آسیب‌های انجماد شوند (۳). در مورد نحوه افزودن مواد محافظ انجماد تاکنون مطالعه جامعی صورت نگرفته است. در مطالعه Herrler و همکاران مواد محافظ انجماد از قبل اضافه شد و هیچ‌گونه زمانی برای تعامل بین آن و اسپرم در نظر گرفته نشد (۱۵). با توجه به اینکه برای تأثیرات مثبت مواد محافظ انجماد نیاز به زمان هست و این‌که آیا هیدروژل از رسیدن مواد محافظ انجماد به اسپرم جلوگیری می‌کند یا خیر نیاز به انجام مطالعات بیشتری هست. تا آنجا که نویسندگان این مقاله بررسی نمودند تاکنون مطالعه‌ای برای بهینه کردن روش کپسوله کردن اسپرم با آلجینات در اسپرم انسانی به منظور استفاده در کلینیک انجام نشده است. هدف از این مطالعه استفاده از آلجینات برای انجماد اسپرم و دست یابی به یک روش بهینه برای کاهش اثرات مخرب انجماد بر پارامترهای اسپرم می‌باشد.

روش کار

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه: در این مطالعه از باقیمانده دور ریز (۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر) مایع سیمن افرادی که طبق معیارهای سازمان بهداشت جهانی دارای پارامترهای طبیعی با تعداد اسپرم بالای ۵۰ میلیون در میلی‌لیتر بودند و به مرکز درمان ناباروری گاندی و آزمایشگاه نور مراجعه کردند استفاده شد. در این مطالعه از روش Direct Swim-up برای آماده‌سازی اسپرمها استفاده شد. به این صورت که یک میلی‌لیتر سیمن داخل لوله ریخته و روی آن ۱/۵ میلی‌لیتر محیط Ham's F10 با دمای ۳۷C° دارای سرم آلبومین (۱۰٪) اضافه و در داخل انکوباتور ۳۷C° به مدت یک ساعت با زاویه ۴۵ درجه گذاشته شد. سپس محیط رویی جدا و با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در آخر، محیط رویی دور ریخته شد و ته‌مانده لوله برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت (۲۰). این مطالعه توسط کمیته اخلاق مورد تایید قرار گرفته است (IR.MODARES.REC.1397.198).

تهیه هیدروژل آلجینات و کراس لینک کردن: هیدروژل آلجینات مطابق تحقیقات پیشین با حل کردن پودر سدیم آلجینات (Sigma-Aldrich, U.S.A) در حلال آب تهیه گردید (۱۵). جهت بررسی غلظت بهینه، محلول‌ها با غلظت‌های ۱ و ۱/۵ درصد وزنی حجمی (W/V) در دمای اتاق به خوبی همگن شدند. محلول‌های آماده شده با استفاده از فیلتر سرنگی ۰/۲۲میکرومتر در شرایط کاملاً استریل در زیر هود لامینار استریل شده و در فالکونهای جدا و استریل در دمای مناسب ۴ درجه سلسیوس برای بررسی‌های بعدی نگهداری شدند.

جهت ایجاد اتصالات عرضی و تشکیل هیدروژل نهایی نمک کلریدکلسیم (Sigma-Aldrich, Germany) به عنوان کراس لینکر انتخاب و با غلظت ۱۰۲ mM/L (در حلال آب مقطر) استفاده گردید (۲۱).

بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی (Scanning Electron Microscopy, SEM): این آزمون به منظور بررسی مورفولوژی هیدروژلهای تهیه شده استفاده گردید. هیدروژلهای آلجینات بعد از تهیه، به دستگاه فریز درایر (ALPHA1-2LD, UK) منتقل شده تا خشک شوند. جهت انجام تست SEM، نمونه‌ها با طلا پوشش داده شدند و سپس در بزرگ‌نمایی‌های مختلف روبش شده و از آن‌ها عکس گرفته شد.

بررسی تأثیرات دوز آلجینات: این بخش برای به دست آوردن دوز مناسب آلجینات مورد استفاده قرار گرفت. ۱۲ عدد نمونه سیمن نرمال بعد از آماده‌سازی به گروه‌های زیر تقسیم شدند. این روش با کمی تغییر از مطالعات گذشته گرفته شد (۱۵). نمونه‌ها به ترتیب زیر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

نام‌گذاری و تهیه گردیدند و تحت انجماد و ذوب قرار گرفتند:

۱- گروه ALG %1+ CPA: این گروه شامل نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۵ دقیقه) + آلجینات (۱٪) ۱۰۰ میکرولیتر + کلراید کلسیم (۱۰۲ میلی مولار) ۱۰۰ میکرولیتر + یک بار شستشو با کلراید سدیم (۰/۹٪) ۵۰ میکرولیتر + (محیط محافظ انجماد+ کلراید سدیم ۰/۹ ٪) ۱۰۰ میکرولیتر بدون زمان

۲- گروه ALG%1.5+CPA: این گروه شامل نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۵ دقیقه) + آلجینات (۱/۵٪) ۱۰۰ میکرولیتر + کلرایدکلسیم (۱۰۲ میلی مولار) ۱۰۰ میکرولیتر + یک بار شستشو با کلراید سدیم (۰/۹٪) ۵۰ میکرولیتر + (محیط محافظ انجماد + کلراید سدیم ۰/۹٪) ۱۰۰ میکرولیتر بدون زمان

۳- گروه کنترل (CTRL): نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۵ دقیقه)

بررسی تأثیرات میزان کلراید کلسیم: جهت تعیین بهترین غلظت کلراید کلسیم که به عنوان کراس لینک جهت تشکیل هیدروژل آلجینات استفاده می‌شود، تعداد ۱۲ نمونه سیمن نرمال بعد از آماده‌سازی در گروه های زیر تقسیم و نام‌گذاری شدند و سپس تحت انجماد و ذوب قرار گرفتند:

۱- گروه ALG+CPA+$CaCl_2$ (100µL): این گروه شامل نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۳ دقیقه) + آلجینات (۱ ٪) ۱۰۰ میکرولیتر + کلراید کلسیم (۱۰۲ میلی مولار) ۱۰۰ میکرولیتر (یک دقیقه) + یک بار شستشو با کلراید سدیم (۰/۹٪) ۵۰ میکرولیتر + (محیط محافظ + کلراید سدیم ۰/۹٪) ۱۰۰ میکرولیتر بدون زمان

۲- گروه ALG+CPA+$CaCl_2$(150 µL): این گروه شامل نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۳ دقیقه) + آلجینات (۱٪) ۱۰۰ میکرولیتر + کلراید کلسیم (۱۰۲ میلی مولار) ۱۵۰ میکرولیتر (یک دقیقه) + یک بار شستشو با کلراید سدیم (۰/۹٪) ۵۰ میکرولیتر + (محیط محافظ + کلراید سدیم) ۱۰۰ میکرولیتر بدون زمان

۳- گروه کنترل (CTRL): نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۳ دقیقه)

بررسی افزودن محیط محافظ انجماد قبل از کپسوله کردن: در این بخش تأثیر افزودن محیط محافظ انجماد قبل از کپسوله کردن بررسی شد. تعداد ۱۲ نمونه سیمن نرمال بعد از آماده‌سازی به سه گروه زیر تقسیم شدند و سپس انجماد و ذوب صورت گرفت:

۱- گروه ALG+CPA: این گروه شامل نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (بدون زمان) + آلجینات (۱٪) ۱۰۰ میکرولیتر + کلراید کلسیم (۱۰۲ میلی مولار) ۱۰۰ میکرولیتر + (محیط محافظ انجماد + کلراید سدیم ۰/۹٪) ۱۰۰ میکرولیتر بدون زمان

۲- گروه ALG: نمونه اسپرم + آلجینات (۱٪) ۱۰۰ میکرولیتر + کلراید کلسیم (۱۰۲ میلی مولار) ۱۰۰ میکرولیتر+ (محیط محافظ انجماد + کلراید سدیم ۰/۹٪) ۱۰۰ میکرولیتر بدون زمان

۳- گروه کنترل (CTRL): نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر بدون زمان

بررسی تأثیرات زمان قبل از کپسوله کردن: در این بخش جهت تأثیر مخلوط محیط محافظ انجماد و کلراید سدیم ۰/۹٪ همراه با زمان بر پارامترهای حرکت و زنده‌مانی نمونه‌ها به ۳ گروه تقسیم شدند و سپس تحت انجماد و ذوب قرار گرفتند:

۱- گروه ALG + (CPA + NaCl): این گروه شامل نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۳ دقیقه) + آلجینات (۱٪) ۱۰۰ میکرولیتر + کلراید کلسیم ۱۰۰ میکرولیتر (یک دقیقه) + یک بار شستشو با کلراید سدیم (۰/۹٪) ۵۰ میکرولیتر + (محیط محافظ انجماد + کلراید سدیم ۰/۹٪) ۱۰۰ میکرولیتر بدون زمان

۲- گروه ALG +(CPA + NaCl) 3Min: این گروه شامل نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۳ دقیقه) + آلجینات (۱٪) ۱۰۰ میکرولیتر + کلرایدکلسیم (۱۰۲ میلی مولار) ۱۰۰ میکرولیتر (یک دقیقه) + یک بار شستشو با کلراید سدیم (۰/۹٪) ۵۰ میکرولیتر + (محیط محافظ انجماد + کلراید سدیم) ۱۰۰ میکرولیتر ۳ دقیقه زمان

۳- گروه کنترل (CTRL): نمونه اسپرم + محیط محافظ انجماد ۱۰۰ میکرولیتر (۳ دقیقه)

انجماد و ذوب میکروکپسول‌های حاوی اسپرم:

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

در این پژوهش نمونه‌ها با استفاده از روش انجماد سریع منجمد شدند (۲۲). نوع ماده محافظ استفاده شده در این مطالعه Advantage Sperm Freeze, SAGE, (Quinn's USA) بود. برای انجماد نمونه‌های درون کرایوتیوب ابتدا در فاصله ۳ سانتی متر و به مدت ۳۰ دقیقه بالاتر از سطح نیتروژن مایع در بخار نیتروژن به حالت افقی قرار گرفتند و پس از آن در نیتروژن مایع غوطه‌ور شدند. در هنگام ذوب پس از خروج کرایوتیوب‌ها از تانک ازت به مدت ۲ دقیقه در بن ماری ۳۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به هود لامینار منتقل شدند و در مجاورت ۱۵۰ میکرولیتر محلول سدیم سیترات ۱۱۹ mM/L با pH = ۷/۵ قرار گرفتند. بعد از گذشت ۳۰ ثانیه محیط Ham's F_{10} سرم دار که از قبل گرم شده است به صورت قطره قطره اضافه شده و بعد از شستشو کامل کرایوتیوب با محیط، نمونه‌ها به سانتریفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰g) منتقل گردید. بعد از خروج نمونه‌ها از دستگاه مایع رویی دور ریخته شده و پلت نهایی جهت آنالیز استفاده شد.

بررسی حرکت و زنده‌مانی اسپرم: حرکت اسپرم با میکروسکوپ، لنز فاز کنتراست و بزرگنمایی ۴۰۰× طبق دستورالعمل‌های WHO بررسی شد (۲۰). در هر لام ۲۰۰ اسپرم در ۳ میدان دید شمارش و در نهایت به صورت حرکت پیشرونده، حرکت غیر پیشرونده و غیر متحرک درصد گرفته شد. مجموع حرکت پیشرونده و حرکت غیرپیشرونده (درجا) به عنوان حرکت تام گزارش شد. هر بار نمونه توسط دو کارشناس زبده بررسی و میانگین به صورت درصد گزارش می‌شد. زنده‌مانی اسپرم از طریق ارزیابی سلامت غشاء سلول اسپرم با استفاده از رنگ ائوزین -نیگروزین بود. برای تهیه استوک، ۰/۶۷ گرم پودر ائوزین، ۱۰ گرم پودر نیگروزین و ۰/۹ گرم کلراید سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین - نیگروزین مخلوط و بعد از گذشت ۳۰ ثانیه ۱۰ میکرو لیتر برداشته و بر روی لام گسترش تهیه گردید. برای بررسی زنده‌مانی اسپرم‌ها از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰× با کمک دستگاه شمارشگر استفاده شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش گردید و تعداد سلول های رنگ شده (مرده) و رنگ نشده (زنده) محاسبه و به صورت درصد گزارش شد (۲۰).

آنالیز آماری: داده های کمی بدست آمده در این مطالعه به صورت انحراف معیار ± میانگین و در برخی موارد میانه (بیشینه – کمینه) گزارش شد. از آزمون Shapiro-Wilk برای سنجش نرمال بودن توزیع داده ها استفاده گردید. برای آنالیز داده ها از آزمون ANOVA یک طرفه همراه با آزمون متعاقب Tukey استفاده شد و در مواردی که توزیع نرمال نبود از آزمون Kruskal-Wallis با آزمون متعاقب Dunn استفاده شد. فرضیه یک دامنه و سطح معنی‌دار P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

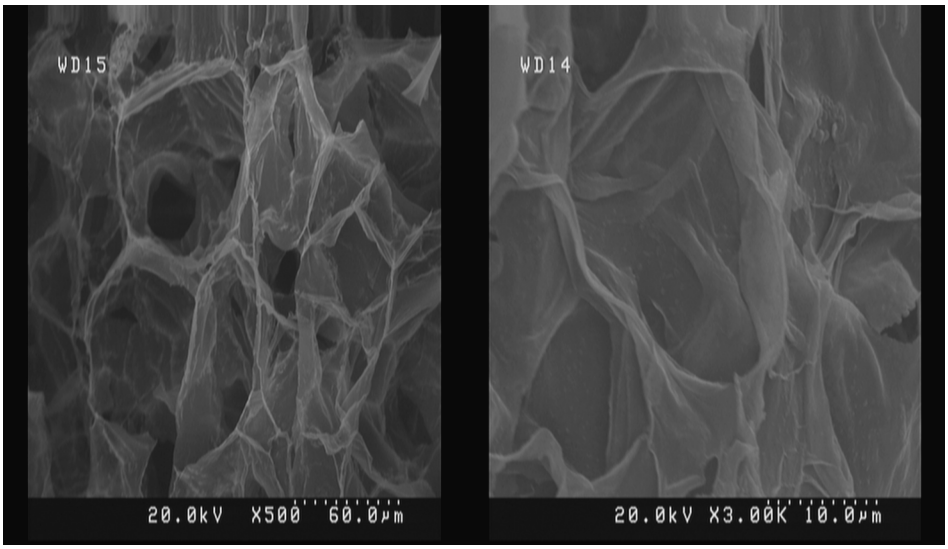
بررسی با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): آزمون SEM جهت بررسی ساختار هیدروژل‌های آلجیناتی تهیه شده انجام گرفت. شکل ۱ تصاویری از هیدروژل آلجینات با بزرگنمایی‌های مختلف را نمایش می‌دهد. همان گونه که در تصاویر مشاهده می‌شود، هیدروژل تهیه شده دارای ساختاری متخلخل با تخلخل‌های به هم پیوسته می‌باشد که می‌تواند مانند یک غشاء نیمه تراوا عمل کند.

تأثیرات دوزهای مختلف آلجینات بر پارامترهای اسپرم: همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، حرکت پیشرونده در گروه آلجینات ۱/۵٪ آلجینات به صفر رسید. همچنین اختلاف معنی‌داری بین حرکت تام (پیشرونده+درجا) اسپرم بین گروه ۱٪ و ۱/۵٪ آلجینات وجود داشت (P<۰/۰۰۱). حرکت تام اسپرم در گروه‌های آلجیناتی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد. درصد زنده‌مانی اسپرمهای گروه آلجینات ۱٪ نیز به طور معنی‌داری از گروه آلجینات ۱/۵٪ بیشتر بود (P<۰/۰۱) و هر دو گروه آلجیناتی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند.

تأثیرات غلظت‌های مختلف کلراید کلسیم بر پارامترهای اسپرم: حرکت پیشرونده و تام اسپرم در گروه ۱۵۰ میکرولیتر نسبت به گروه ۱۰۰ میکرولیتر کلراید کلسیم روند کاهشی نشان داد در حالی که حرکت تام در گروه ۱۵۰ میکرولیتر نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). درصد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی تهیه شده از هیدروژل آلجیناتی با بزرگنمایی مختلف با استفاده از SEM (سمت راست ۵۰۰ برابر و سمت چپ ۳۰۰۰ برابر)

زنده‌مانی اسپرمها در گروه ۱۵۰ میکرولیتر نسبت به گروه ۱۰۰ میکرولیتر کلراید کلسیم و گروه کنترل روند کاهشی را نشان داد (شکل ۳).

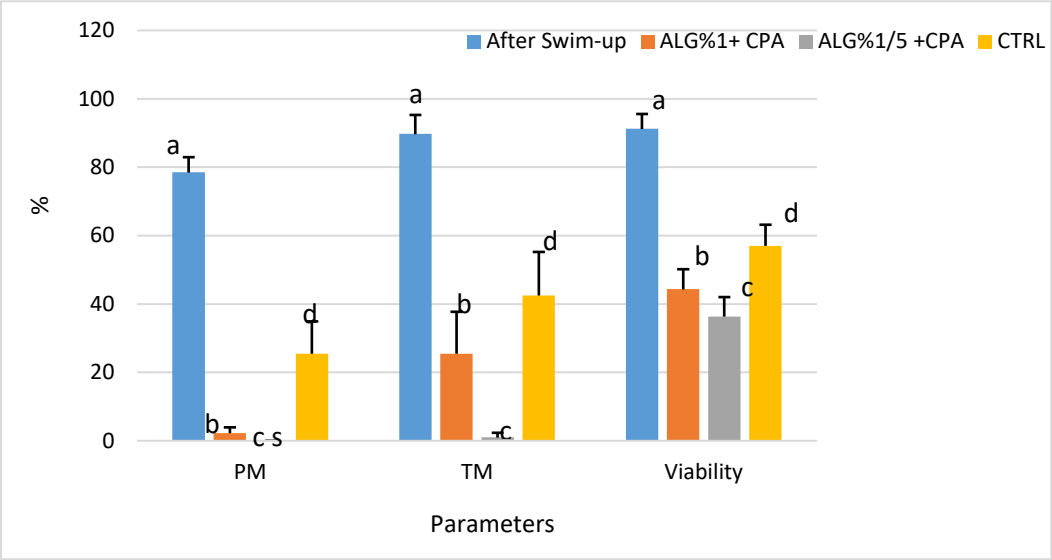
تأثیرات افزودن محیط محافظ انجماد قبل از کپسوله کردن بر پارامترهای اسپرم: حرکت پیشرونده و تام اسپرم در گروه‌های مختلفی که از آلجینات استفاده کرده بودند نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد و بین گروه افزودن محیط محافظ انجماد قبل از کپسوله کردن و بعد از کپسوله کردن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. درصد زنده‌مانی اسپرم بعد از ذوب در گروهی که مواد محافظ انجماد را قبل از کپسوله کردن دریافت کرده بود نسبت گروهی که قبل از انجماد دریافت کرده بود، افزایش معنی‌داری را نشان داد اما در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت در حالی که گروهی که مواد محافظ انجماد را قبل از کپسوله کردن دریافت نکرده بود نسبت به همه گروهها کاهش معنی‌داری را در میزان زنده‌مانی اسپرم نشان داد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۴).

تأثیرات زمان قبل از کپسوله کردن: حرکت پیشرونده در هر دو گروهی که از آلجینات برای انجماد استفاده شده بود کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد اما بین گروهی که بعد از دریافت مواد محافظ انجماد قبل از کپسوله کردن به آن زمان داده شده بود در مقایسه با گروهی که زمان نداشت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اگرچه روند افزایشی در گروهی که زمان داشت دیده شد. هر چند میزان حرکت تام در گروهی که زمان داشت در مقایسه با گروهی که زمان نداشت به طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). درصد زنده‌مانی اسپرمها در گروهی که زمان در اختیار نداشت در مقایسه با گروهی که ۳ دقیقه زمان داشت اختلاف معنی‌داری نشان نداد اما در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۵).

بحث

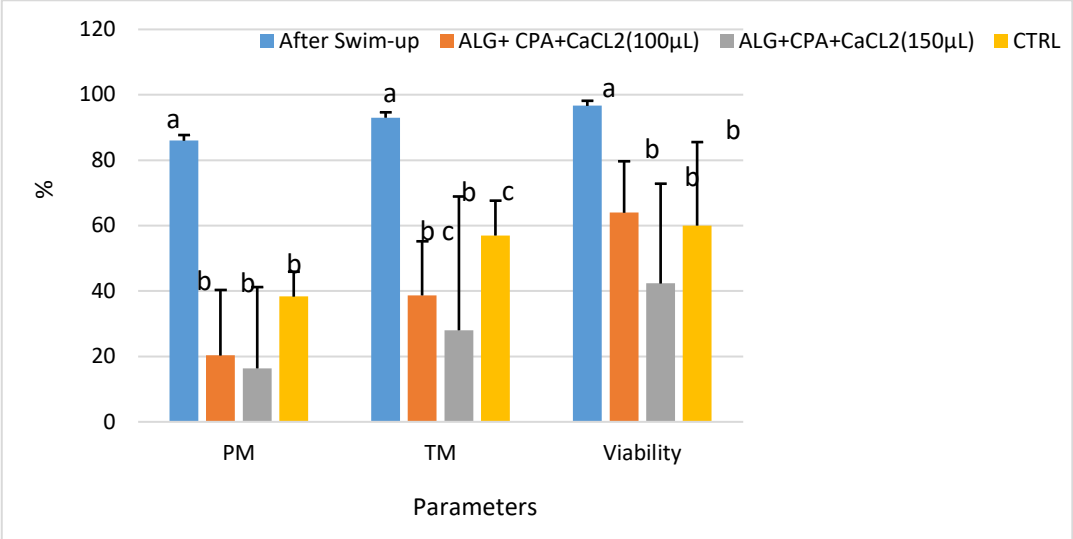
آلجینات به طور گسترده‌ای برای کشت و پیوند سلول ها، بافت و جنین استفاده می‌شود زیرا غیر سمی، بسیار نفوذپذیر و زیست-تخریب پذیر است و همچنین پشتیبانی سه بعدی را فراهم می‌کند (۲۳). از آنجا که کل میکرو کپسول ها تحت کنترل میکروسکوپی مایع می‌شوند، از دست دادن تعدادی از اسپرمها به دلیل چسبیدن به دیواره حامل انجماد امکان‌پذیر نیست و می‌توانند به طور ۱۰۰٪ اسپرمها را از نظر تعداد، از انجماد برگرداند. این از دست دادن در اثر چسبندگی به دیواره حامل، مشکل اساسی در روش‌های انجماد معمول است. میکرو کپسول‌های هر بیمار را می‌توان به صورت جداگانه در کرایو ویال های مهر و موم شده ذخیره کرد. این امر می‌تواند از اسپرم در برابر آلودگی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]



شکل ۲- اثرات دوز بهینه آلجینات بر پارامترهای حرکت و زنده مانی اسپرم. میانگین (٪) ± انحراف معیار، حروف غیر یکسان اختلاف معنی داری دارند (P<۰/۰۵).

PM: Progressive motility, TM: Total motility (PM+NP), ALG: Alginate, CPA: Cryoprotectant, CTRL: Control



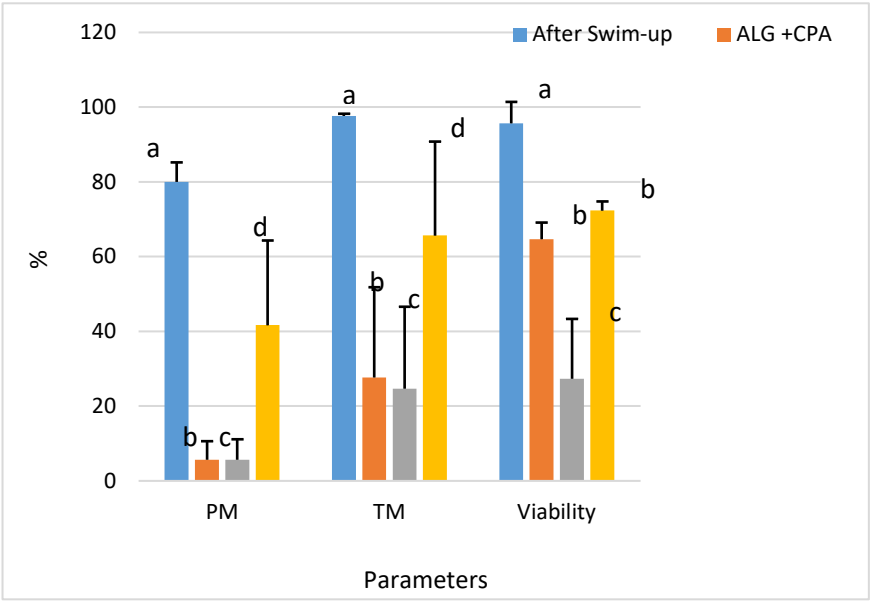
شکل ۳- تعیین بهترین غلظت کلراید کلسیم. میانگین (٪) ± انحراف معیار،حروف غیر یکسان اختلاف معنی داری دارند. (P<۰/۰۵)

PM: Progressive motility, TM: Total motility (PM+NP), ALG: Alginate, CPA: Cryoprotectant, CTRL: Control

متقابل محافظت می‌کند. اسپرم‌های منجمد شده در میکرو کپسول‌های آلجینات کاملاً در برابر آلودگی، همچنین در برابر آلودگی اسپرم به مواد ژنتیکی خارجی محافظت می‌شوند (۱۵). در حقیقت، کپسوله کردن اسپرم با آلجینات یک روش امیدوارکننده است که از اثرات ناخواسته‌ی انجماد جلوگیری می‌کند. چندین مطالعه در مورد کپسوله سازی اسپرم در میکرو کپسول‌های آلجیناتی انجام شده است (۱۱، ۱۸، ۲۴).

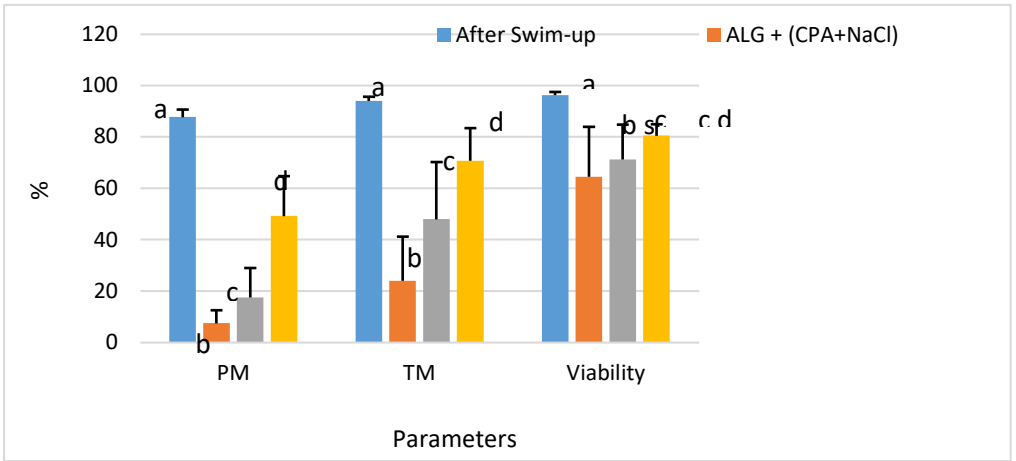
Nebel و همکاران اولین بار روش کپسوله کردن اسپرم را در گاو با آلجینات ۱٪ معرفی کردند و اثرات مخرب خفیفی بر پارامترهای اسپرم مشاهده کردند (۱۸). مطالعات دیگری بر اثرات استفاده از آلجینات بر پارامترهای اسپرمی برای استفاده در تلقیح مصنوعی بر گونه‌های مختلف جانوری از جمله گربه (۱۱)، گوسفند (۲۵)، گراز (۱۲)، گاو (۲۶) و بوفالو (۲۷) انجام شده است. علی رغم اینکه به نظر می‌رسد در گونه‌های دیگر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]



شکل ۴- بررسی تاثیرات افزودن محیط محافظ انجماد قبل از کپسوله کردن بر پارامترهای حرکت و زنده مانی اسپرم، میانگین (٪) ± انحراف معیار، حروف غیر یکسان اختلاف معنی داری دارند. (P<۰/۰۵)

PM: Progressive motility, TM: Total motility (PM+NP), ALG: Alginate, CPA: Cryoprotectant



شکل ۵- تاثیرات دادن زمان قبل از کپسوله کردن. میانگین (٪) ± انحراف معیار،حروف غیر یکسان اختلاف معنی داری دارند. (P<۰/۰۵)

PM: Progressive motility, TM: Total motility (PM+NP), ALG: Alginate, CPA: Cryoprotectant, CTRL: Control

روش کپسوله کردن اسپرم استاندارد شده باشد اما در انسان این شیوه با تاخیر شروع شده و نیازمند بهینه‌سازی است.

در مطالعه حاضر قبل از بررسی تأثیرات آلجینات بر پارامترهای نمونه اسپرم انسانی، ساختار و مورفولوژی کپسول های تهیه شده با استفاده از آزمون SEM بررسی گردید. تصاویر به دست آمده از هیدروژل نشان دهنده ساختار متخلخل به هم پیوسته می‌باشد که این نتایج منطبق بر مطالعات قبلی بوده است (۱۹). در واقع این ویژگی هیدروژل از اهمیت بالایی برخوردار است چون باعث ایجاد شرایط مطلوب جهت افزایش سطح بقاء و زنده‌مانی سلول کپسوله شده داخل هیدروژل می‌شود. همچنین ساختار متخلخل آلجینات این امکان را فراهم می‌کند که مواد محافظ انجماد نیز به راحتی خود را به اسپرم برسانند و بستری مناسب در انجماد اسپرم می‌باشد.

در مطالعه حاضر در تمام مراحل نشان داده شد که پس از فرایند انجماد–ذوب، درصد تحرک پیش رونده اسپرم‌ها به طور معنی‌داری کاهش داشته است. این کاهش در گروه‌های حاوی آلجینات نسبت به گروه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

کنترل بیشتر و تفاوت معنی‌داری داشته است. در مقایسه بین غلظت‌های مختلف آلجینات، یافته‌های ما نشان داد آلجینات ۱٪ نسبت به ۱/۵٪ نتایج بهتری داشته و کاهش حرکت آن کمتر است که می‌تواند در طراحی انجماد اسپرم مد نظر قرار گیرد. استفاده از آلجینات ۱٪ قبلا نیز در مطالعات حیوانی توصیه شده بود (۱۴، ۲۸). در مطالعه‌ای که از آلجینات mg/mL ۷/۳ جهت کپسوله کردن اسپرم انسانی در شرایط برون تنی تحت انجماد آهسته استفاده شده بود نیز کاهش ۱۸٪/۳ در حرکت اسپرم نسبت به گروه کنترل گزارش گردید که از نظر آماری نیز معنی‌دار بود (۱۵). همچنین کاهش حرکت اسپرم به دنبال کپسوله کردن با آلجینات در گونه‌های دیگر از جمله سگ، خوک، گاو و بوفالو نیز گزارش شده است (۱۴، ۱۹، ۲۸). یکی از عوامل کاهش حرکت اسپرم به دنبال استفاده از آلجینات ممکن است باقی ماندن ذرات آلجینات روی غشاء و دم اسپرم باشد. ساختار اسکلت سلولی تاژک اسپرم از غلاف رشته ای شکل گرفته است، که نقش فعالی در حرکت اسپرم ایفا می‌کند (۲۹، ۳۰). زمانی که باقی مانده آلجینات روی این غلاف قرار می‌گیرد باعث اختلال در حرکت فعال اسپرم و کاهش حرکت می‌شود. Torre و همکارانش در مطالعه‌ای که سیمن خوک را با آلجینات ۰/۵٪ کپسوله کردند، علت کاهش حرکت اسپرم را احتمال وجود باقیمانده ذرات آلجینات روی اسپرم دانسته اند که باعث اختلال در فعالیت‌های جنبشی اسپرم می‌شود (۱۹). همچنین پیشنهاد شده است حضور و باقی ماندن آلجینات اطراف اسپرم از نظر فیزیکی هم می‌تواند مانعی برای حرکت اسپرم باشد (۲۸). در مطالعه حاضر دیده شد که افت حرکت در گروه آلجینات ۱/۵٪ نسبت به ۱٪ بیشتر است که منطبق با نتیجه تحقیق قبلی است که در آن در فرایند کپسوله کردن اسپرم گاو با آلجینات مشاهده گردید که هر چه غلظت آلجینات بیشتر باشد، افت حرکت نیز بیشتر خواهد بود (۱۵). در حقیقت به نظر می‌رسد هر چه غلظت آلجینات بیشتر باشد به دلیل امکان اتصال بیشتر به دم اسپرم بیشتر می‌تواند در کاهش حرکت موثر باشد. همچنین رابطه مستقیمی بین غلظت آلجینات مورد استفاده و مدت زمان لازم برای مایع شدن هیدروژل آلجینات در سدیم سیترات دیده شده است (۱۵). در نتیجه استفاده از غلظت‌های پایین‌تر آلجینات می‌تواند یک اولویت باشد. در مواردی که انجماد اسپرم انجام می‌شود به دلیل اینکه بعد از ذوب از روش تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم برای بارور کردن تخمک استفاده می‌شود، حرکت اسپرم اهمیتی نداشته و زنده‌مانی و کیفیت اسپرم از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. لازم به ذکر است که عوامل مختلفی بر انتخاب دوز بهینه آلجینات می‌تواند تأثیر بگذارد. از جمله نوع آلجینات، نوع کراس لینک، تعداد اسپرم و دیگر عوامل می‌توانند موثر باشند. یکی از عوامل موثر بر حرکت و زنده‌مانی اسپرم بعد از کپسوله شدن به کیفیت اسپرم قبل از کپسوله کردن برمی‌گردد. در این مطالعه از اسپرمهای با تعداد و کیفیت بالا استفاده شد. در واقع حرکت و زنده‌مانی اسپرم قبل از انجماد می‌تواند نتایج انجماد و میزان بقاء بعد از ذوب را پیش‌گویی کند (۳۱). پیشنهاد می‌شود برای نمونه‌های با کیفیت پایین نیز این روش آزموده و بهینه شود چرا که نیاز است برای هر نوع نمونه روش استاندارد آن به دست آید.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، اگر شرایط استفاده از آلجینات بهینه شود می‌تواند زنده‌مانی را مانند گروه کنترل حفظ کند که مشابه نتایج مطالعه Herrler و همکاران بود که توانستند علی رغم کاهش حرکت به دنبال استفاده از آلجینات، ۱۹/۹٪ زنده‌مانی را بیشتر نسبت به گروه کنترل حفظ نمایند (۱۵). همان طور که قبلا اشاره شد آلجینات یک نوع پلیمر زیست تخریب پذیر با سازگاری زیستی بالا می‌باشد، که از ویژگی‌های برجسته‌ی آلجینات به تشکیل یک نوع ماتریکس سه بعدی در اطراف سلول که مشابه ماتریکس خارج سلولی می‌باشد می‌توان اشاره کرد. این نوع ماتریکس ساختار متخلخلی داشته که می‌تواند موجب حفظ سطح بقاء سلول ها در شرایط محیط برون تنی و درون تنی شود (۳۲). همچنین نتایج ما در راستای مطالعه Shah و همکاران بود که اثرات مثبتی روی زنده‌مانی اسپرم به دنبال کپسوله کردن با آلجینات گزارش کردند و معتقد بودند کپسوله کردن می‌تواند محیط بهتری برای اسپرم فراهم نموده و از آن حفاظت نماید و همچنین منجر به تبادل مواد مورد نیاز اسپرم گردد (۲۸). در واقع این ترکیب ساختار منحصر به فردی ایجاد می‌کند که باعث

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

تسهیل انتقال مولکولهای سیگنالینگ، مواد مغذی مانند گلوکز و اکسیژن می‌شود که می‌تواند مانع نفوذ سلولهایی مانند لکوسیت ها گردد. با این وجود براساس مطالعه Pirnia و همکارانش زنده‌مانی سلول های بنیادی اسپرماتوگونی گروه حاوی آلجینات نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش داشته است. طبق گزارش این مطالعه، علت این کاهش زنده‌مانی در مرحله ذوب بعد از حذف هیدروژل آلجینات و در معرض ROS قرار گرفتن سلول می‌باشد (۳۳). در مطالعه حاضر هم علت روند کاهشی زنده‌مانی اسپرم در گروه آلجینات نسبت به کنترل می‌تواند به علت وجود ROS در مرحله ذوب که بیشترین آسیب را بر اسپرم دارد باشد. یکی از مشکلات انجماد اسپرم کاهش زنده‌مانی به دنبال انجماد می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از آلجینات می‌تواند نزدیک به گروه کنترل زنده‌مانی را حفظ نماید. البته آزمونهای بررسی عملکرد اسپرم به دنبال استفاده از آلجینات باید مورد بررسی قرار گیرد تا بتواند عملکرد آلجینات در انجماد اسپرم را تایید نماید. همچنین در مطالعه‌ای که توسط Kumar و همکارانش انجام گردید دیده شد که افزودن آلجینات به محیط محافظ انجماد اسپرم بوفالو در شرایط برون تنی باعث حفظ تمامیت غشاء و افزایش زنده‌مانی سلول اسپرم می‌شود. در واقع این مطالعه یکی از علت های حفظ زنده‌مانی اسپرم را خاصیت ضد باکتریایی آلجینات می‌داند (۲۷). Gosálvez و همکاران اخیرا نشان دادند که کپسوله کردن اسپرم انسان با آلجینات می‌تواند زنده‌مانی اسپرم را در شرایط انکوبه کردن در دمای ۳۷°C نسبت به گروه کنترل بیشتر حفظ نماید (۱۳).

مطالعه حاضر نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرولیتر کلراید کلسیم تأثیرات مطلوب تری نسبت به ۱۵۰ میکرولیتر کلراید کلسیم دارد، که علت آن می‌تواند تأثیر در فرایند ذوب باشد. در واقع در مرحله ذوب، به خوبی داربست هیدروژل آلجینات با غلظت ۱۵۰ میکرولیتر کلرایدکلسیم باز نشده است و رهایش اسپرم به طور کامل صورت نگرفته است که می‌تواند منجر به کاهش حرکت اسپرم گردد. از طرفی افزایش غلظت کراس لینک زمان باز شدن هیدروژل با سدیم سیترات را افزایش می دهد و همچنین میزان سدیم سیترات بیشتری را باید استفاده کرد که همه این عوامل می‌تواند تأثیرات نامطلوبی بر پارامترهای اسپرمی بر جا گذارد. باید در نظر گرفت که میزان کلراید کلسیمی که استفاده می‌شود باید متناسب با آلجینات مورد استفاده باشد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که برای اسپرم انسان برای آلجینات ۱٪، کلراید کلسیم ۱۰۰ میکرولیتر متناسب تر است. یکی دیگر از متغیرهایی که در این مرحله تاثیرگذار است زمان مواجهه با کراس لینک است. مطالعه‌ای که تأثیر زمان کراس لینک را بر پارامترهای اسپرم گاو مورد ارزیابی قرار داد نشان داد که زمان ۳۰ ثانیه در مقایسه با زمان ۱۰ ثانیه بهتر توانسته حرکت و زنده‌مانی اسپرم را حفظ کند گرچه که این اختلاف معنی‌دار نبوده است (۱۵). زمان مواجهه با کراس لینک در مطالعه حاضر ثابت در نظر گرفته شد. نتایج ما نشان داد نیازی به استفاده از غلظت‌های بالای کلراید کلسیم برای استفاده از آلجینات ۱٪ نیست.

در مطالعه حاضر تأثیر برای اولین بار شرایط افزودن مواد محافظ انجماد بر نتایج انجماد اسپرم با کپسول‌های آلجیناتی نیز بررسی شد. در مطالعه Herrler و همکاران اسپرم بعد از کپسوله شدن با آلجینات در معرض مواد محافظ انجماد قرار گرفت (۱۵) در حالی که در مطالعه حاضر تأثیر مواجهه اسپرم قبل از کپسوله شدن نیز بررسی شد که با نتایج بهتری نیز همراه بود. از تفاوتهای ۲ مطالعه می‌توان به نوع انجماد اشاره کرد که در مطالعه حاضر از انجماد سریع استفاده شد که کاربرد بیشتری در بالین دارد. علت نتایج بهتر در مورد افزودن مواد محافظ انجماد قبل از کپسوله کردن این است که اسپرم قبل از اینکه توسط آلجینات در بر گرفته شود نیاز است که با مواد محافظ انجماد مواجهه داشته باشد و به نظر می‌رسد وقتی اسپرم در کپسولهای آلجیناتی قرار می‌گیرد به طور کامل آبگیری اسپرم و نفوذ مواد محافظ انجماد به داخل آن انجام نمی‌شود و نیاز دارد که قبل از کپسوله کردن این کار انجام شود. همچنین در این مطالعه نشان داده شد که بعد از تشکیل هیدروژل و قبل از شروع انجماد نیز بهتر است یک بار دیگر اسپرم، این بار زمانی که توسط آلجینات کپسوله شده است، در معرض مواد محافظ انجماد قرار گیرد. به نظر می‌رسد استفاده از روش کپسوله کردن اسپرم با آلجینات روند طبیعی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

آبگیری اسپرم توسط مواد محافظ انجماد را به هم زده و نیاز دارد که این کار بیشتر از زمانی که اسپرم بدون واسطه و مستقیما در معرض این مواد قرار می‌گیرد صورت پذیرد. توصیه می‌شود تأثیر روش معرفی شده در این مطالعه از طریق بررسی میزان شکست DNA مورد ارزیابی قرار گیرد. یکی از محدودیتهای این روش پیچیده تر و زمانبر تر کردن روش انجماد اسپرم می‌باشد. از محدودیتهای مطالعه حاضر می‌توان به این اشاره کرد که پارامترهای عملکردی اسپرم مورد ارزیابی قرار نگرفته اند. احتمالا رویکردهای جدیدی مانند کپسوله کردن اسپرم با آلجینات ممکن است قابلیت زنده ماندن اسپرم پس از انجماد را حفظ کند و در نهایت می‌تواند بخشی از روش استاندارد انجماد اسپرم باشد. پیشنهاد می‌شود اثرات احتمالی کپسوله کردن اسپرم با آلجینات بر پارامترهای مختلف اسپرم در انجماد و همچنین روی نمونه‌های غیر طبیعی اسپرم نیز مورد ارزیابی قرار گیرد تا بتوان در مورد تأثیرات استفاده از این روش در انجماد بهتر نتیجه گیری کرد.

نتیجه‌گیری

کپسوله کردن اسپرم با آلجینات یک روش امیدوارکننده است که می‌تواند از اثرات ناخواسته‌ی انجماد جلوگیری کند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن مواد محافظ انجماد قبل و بعد از کپسوله کردن اسپرم توسط آلجینات و همچنین استفاده از آلجینات ۱٪ و ۱۰۰ میکرولیتر کلراید کلسیم روش مناسبی برای کپسوله کردن اسپرم انسان توسط آلجینات می‌باشد. به نظر می‌رسد آلجینات با ساختار متخلخلی که دارد می‌تواند ارتباط اسپرم با محیط پیرامون را حفظ کند در عین حالی که می‌تواند اسپرم را در برابر صدمات ناشی از انجماد محافظت نماید. مطالعات بیشتری با تاکید بر بررسی پارامترهای عملکردی اسپرم روی انواع مختلف نمونه‌های اسپرم باید انجام شود تا روش کپسوله کردن اسپرم با آلجینات بتواند یکی از روش‌های مورد استفاده در بالین گردد و بتواند مشکلات فعلی روش‌های انجماد اسپرم را مرتفع سازد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد سمیه فیض منش می‌باشد. از دانشگاه تربیت مدرس برای حمایت از این پروژه تقدیر به عمل می آید.

References

1. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. Adv UROL. 2011;2012.
2. Gholamitabar M, Jorsaraei S, Yousefnia Y. Methods of Cryopreserving Sperm in Infertile Men with Oligospermia and Cryptospermia Patterns. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(11):35-43.
3. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, et al. Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Reprod Biomed Online. 2018;37(3):327-39.
4. O'connell M, McClure N, Lewis S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod. 2002;17(3):704-9.
5. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. J Assist Reprod Genet. 2008;25(8):403-11.
6. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. Reprod Biomed Online. 2010;21(4):456-62.
7. Sun J, Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. Materials. 2013;6(4):1285-309.
8. Nebel R, Vishwanath R, McMillan W, Pitt C. Microencapsulation of bovine spermatozoa: effect of capsule membrane thickness on spermatozoal viability and fertility. Animal Reprod Sci. 1996;44(2):79-89.
9. Zhao Y, Zhang P, Ge W, Feng Y, Li L, Sun Z ,et al. Alginate oligosaccharides improve germ cell development and testicular microenvironment to rescue busulfan disrupted spermatogenesis. Theranostics. 2020;10(7):3308-24.
10. Baert Y, Dvorakova-Hortova K, Margaryan H, Goossens E. Mouse in vitro spermatogenesis on alginate-based 3D bioprinted scaffolds. Biofabrication. 2019;11(3):035011.
11. Munkittrick T, Nebel R, Saacke R. Accessory sperm numbers for cattle inseminated with protamine sulfate microcapsules. J Dairy Sci. 1992;75(3):725-31.
12. Torre M, Faustini M, Norberti R, Stacchezzini S, Maggi L, Maffeo G, et al. Boar semen controlled delivery system: storage and in vitro spermatozoa release. J controll Release. 2002;85(1-3):83-9.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]

13. Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL, Johnston S. Microencapsulation of human spermatozoa increases membrane stability and DNA longevity. Andrologia. 2021;53(2):e13924.
14. Perteghella S, Gaviraghi A, Cenadelli S, Bornaghi V, Galli A, Crivelli B, et al. Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of Mediterranean Italian water buffalo (Bubalus bubalis) and Holstein Friesian (Bos taurus) spermatozoa after cryopreservation. J Vet Sci. 2017;18(1):81.
15. Herrler A, Eisner S, Bach V, Weissenborn U , Beier HM. Cryopreservation of spermatozoa in alginic acid capsules. Fertil Steril. 2006;85(1):208-13.
16. Shah S, Otsuki T, Fujimura C, Yamamoto N, Yamashita Y, Higaki S, et al. Cryopreservation of microencapsulated canine sperm. Theriogenology. 2011;75(4):679-86.
17. Nebel R, Saacke R. Spermatozoal microencapsulation and capsule behavior in the female tract. Reprod Domest Animals. 1995;31(1):75-85.
18. Nebel RL, Bame J, Saacke R, Lim F. Microencapsulation of bovine spermatozoa. J Animal Sci. 1985;60(6):1631-9.
19. Torre M, Maggi L, Vigo D, Galli A, Bornaghi V, Maffeo G, et al. Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads. Biomaterials. 2000;21(14):1493-8.
20. Organization WH. World Health Organization Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva. Switzerland: World Health Organization. 2010.
21. Yu J, Christman KL, Chin E, Sievers RE, Saeed M, Lee RJ. Restoration of left ventricular geometry and improvement of left ventricular function in a rodent model of chronic ischemic cardiomyopathy. J Thoracic Cardiovasc Surg. 2009;137(1):180-7.
22. Najafi L, Halvaei I, Movahedin M. Canthaxanthin protects human sperm parameters during cryopreservation. Andrologia. 2019;51(10):e13389.
23. Zimmermann U, Mimietz S, Zimmermann H, Hillgärtner M, Schneider H, Ludwig J, et al. Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy. Biotechniques. 2000;29(3):564-81.
24. Vishwanath R, Nebel R, McMillan W, Pitt C, Macmillan K. Selected times of insemination with microencapsulated bovine spermatozoa affect pregnancy rates of synchronized heifers. Theriogenology. 1997;48(3):369-76.
25. Maxwell W, Nebel R, Lewis G. Survival and fertility of micro-encapsulated ram spermatozoa stored at 5 degrees. Reprod Domest Animals (Germany). 1996.
26. Weber W, Rimann M, Schafroth T, Witschi U, Fussenegger M. Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa. J Biotechnol. 2006;123(2):155-63.
27. Kumar P, Pawaria S, Dalal J, Ravesh S, Bharadwaj S, Jerome A, et al. Sodium alginate potentiates antioxidants, cryoprotection and antibacterial activities of egg yolk extender during semen cryopreservation in buffalo. Animal Reprod Sci. 2019;209:106166.
28. Shah S, Nagano M, Yamashita Y, Hishinuma M. Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4 C. Theriogenology. 2010;73(5):560-7.
29. Baccetti B, Collodel G, Gambera L, Moretti E, Serafini F, Piomboni P. Fluorescence in situ hybridization and molecular studies in infertile men with dysplasia of the fibrous sheath. Fertil Steril. 2005;84(1):123-9.
30. Akbari A, Anvar Z, Jaafarinia M, Totonchi M. Genetic etiology of Asthenozoospermia: A review. KAUMS J (FEYZ). 2019;23(3):318-33.
31. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JR. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. Cell Transplant. 2021;30.
32. Ghidoni I, Chlapanidas T, Bucco M, Crovato F, Marazzi M, Vigo D, et al. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. Cytotechnology. 2008;58(1):49-56.
33. Pirnia A, Parivar K, Hemadi M ,Yaghmaei P, Gholami M. Stemness of spermatogonial stem cells encapsulated in alginate hydrogel during cryopreservation. Andrologia. 2017;49(5):e12650.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-18]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1401.29.1.10.1]