



مروری بر روش‌های نوین ذخیره، انجماد و استفاده از رقیق‌کننده‌های اسپرم: مکانیسم،

چالش‌ها و چشم‌انداز

زهرا بلوکی^۱، آیتک بخشایش خیابانی^{۲*}، عباس ذاکری بازمانده^۳، غلامعلی مقدم^۴، محمدرضا جعفرزاده

شیرازی^۵، علی‌داد بوستانی^۶

۱- دکتری فیزیولوژی دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۲- دکتری فیزیولوژی دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- دانشجو دکتری نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین، دانشگاه پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

۴- استاد تمام بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۵- استاد تمام بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۶- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس.

[*Aytakbkh7030@gmail.com](mailto:Aytakbkh7030@gmail.com)

خلاصه

تولید مثل برای همه موجودات زنده اساسی است زیرا ادامه حیات یک گونه و بهبود اقتصاد در دامپروری را تضمین می‌کند. تولید مثل از زمان تاریخ توسعه یافته است و فرآیندهای متنوعی مانند تلقیح مصنوعی و لقاح آزمایشگاهی توسعه یافته‌اند. رقیق‌کننده‌های اسپرم برای محافظت از اسپرم در برابر عوامل مضر مانند شوک انجماد و اسمزی، استرس اکسیداتیو و آسیب سلولی توسط کریستال‌های یخ کشف و توسعه داده شدند. رقیق‌کننده‌های اسپرم با تثبیت خواص آن، از جمله مورفولوژی اسپرم، تحرک و زنده ماندن و یکپارچگی غشاء، آکروزوم و DNA، اسپرم را حفظ می‌کنند. بنابراین، رقیق‌کننده‌های اسپرم باید pH مطلوب، آدنوزین تری فسفات، شوک ضد انجماد و ضد انجماد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را برای بهبود کیفیت اسپرم برای لقاح فراهم کنند. از این رو، این بررسی داده‌های دقیقی در مورد رقیق‌کننده‌های مختلف اسپرم، مکانیسم‌های نگهدارنده و افزودنی‌های ضروری برای رقیق‌کننده‌های اسپرم در حیوانات مختلف ارائه می‌دهد. انجماد ابزاری ضروری برای حفظ سلول‌های اسپرم برای مدیریت حیوانات و اهداف تلقیح مصنوعی است. انجماد با آسیب اسپرم از طریق سطوح مختلف آسیب غشای پلازما و استرس اکسیداتیو همراه است. نانوذرات اغلب برای دفاع در برابر رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو ایجاد شده در کل فرآیند انجماد استفاده می‌شوند. اخیراً، نانوزیکول‌های مصنوعی یا طبیعی شامل لیپوزوم‌ها و اگزوزوم‌ها، به ترتیب، قابلیت‌های احیاکننده‌ای برای ترمیم اسپرم آسیب‌دیده در طول فرآیند انجماد-ذوب نشان داده‌اند. اگزوزوم‌ها دارای اثر پلیوتروپیک بالقوه هستند زیرا حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها، لیپیدها و سایر مولکول‌های زیست فعال تنظیم‌کننده و ترمیم‌کننده اسپرم هستند. در این بررسی، ما استراتژی‌های فعلی استفاده از نانوذرات و نانوزیکول‌ها (لیپوزوم‌ها و اگزوزوم‌ها) را برای مقابله با آسیب‌های انجمادی مرتبط با انجماد مایع منی برجسته می‌کنیم.

کلمات کلیدی: رقیق‌کننده، اسپرم، مکانیسم، چالش‌ها



مقدمه

اهمیت حفظ کیفیت اسپرم در بیوتکنولوژی تولیدمثل دام

کیفیت اسپرم، سنگ بنای موفقیت در تکنیک‌های تولیدمثل مانند تلقیح مصنوعی و انتقال جنین است و نقشی اساسی در پیشبرد برنامه‌های اصلاح نژادی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ارزشمند دام ایفا می‌کند. اسپرم با کیفیت، علاوه بر انتقال اطلاعات ژنتیکی دست‌نخورده، انرژی لازم برای رشد یک جنین سالم را فراهم می‌آورد که نتیجه آن، نسلی از دام‌های سالم‌تر، پربازده‌تر و مقاوم‌تر خواهد بود [۱]. حفظ کیفیت اسپرم، به‌ویژه در روش‌های انجماد و نگهداری طولانی‌مدت، امکان حفظ و استفاده از ذخایر ژنتیکی ارزشمند دام‌ها را در طول زمان فراهم می‌کند. این امر برای حفظ تنوع زیستی و جلوگیری از انقراض نژادهای خاص اهمیت دارد. استفاده از اسپرم با کیفیت، منجر به افزایش نرخ باروری، کاهش هزینه‌های تولید و بهبود بهره‌وری کلی صنعت دامپروری می‌شود [۲]. به طور خلاصه، درک عمیق عوامل موثر بر کیفیت اسپرم و پیاده‌سازی روش‌های نوین نگهداری آن، نه تنها موجب جهش‌های قابل توجه در حوزه تولیدمثل دام می‌شود، بلکه مسیر دستیابی به اهداف کلیدی صنعت دامپروری، نظیر ارتقاء سطح تولید، بهبود چشمگیر کیفیت محصولات و حفاظت موثر از تنوع زیستی را نیز هموارتر می‌سازد.

هدف و ضرورت توسعه نسل جدید رقیق‌کننده‌ها

نسل‌های اولیه رقیق‌کننده‌ها، که عمدتاً بر پایه شیر یا زرده تخم‌مرغ استوار بودند، نقش مؤثری در حفظ تحرک و زنده‌مانی اسپرم در نگهداری کوتاه‌مدت و تلقیح ایفا کردند. با این حال، با پیشرفت درک ما از فیزیولوژی اسپرم و چالش‌های ناشی از فرآیندهای پیچیده‌تر مانند انجماد و نگهداری طولانی‌مدت، نیاز به توسعه نسل جدیدی از رقیق‌کننده‌ها که قادر به محافظت بهتر در برابر استرس‌های سلولی، آسیب‌های اکسیداتیو و نوسانات دما باشند، بیش از پیش احساس می‌شود. توسعه رقیق‌کننده‌های نسل جدید، با هدف دستیابی به حفاظت سلولی بهینه، افزایش طول عمر نگهداری اسپرم، و بهبود نرخ باروری پس از فرآیندهای انجماد و ذوب، ضرورتی انکارناپذیر است. نسل جدید از رقیق‌کننده‌ها، با بهره‌گیری از افزودنی‌های نوین مانند آنتی‌اکسیدان‌های قوی‌تر، پپتیدهای محافظ سلولی، یا مواد نانو، و همچنین بهینه‌سازی ترکیبات کلاسیک، قادرند عملکرد اسپرم را در شرایط تنش‌زای انجماد به طرز چشم‌گیری بهبود بخشند [۲]. این نوآوری‌ها نه تنها به حفظ ذخایر ژنتیکی ارزشمند کمک می‌کنند، بلکه کارایی اقتصادی برنامه‌های تولیدمثل دام را نیز ارتقا می‌دهند.

آنتی‌بیوتیک‌ها

برای پیشگیری از آلودگی‌های میکروبی، باید وسایل و ابزار مورد استفاده در گامه‌های گوناگون اسپرم‌گیری و فرآوری اسپرم کاملاً استرون باشند. انواع زیادی از میکروب‌ها از منی جدا شده است. بسیاری از این میکروب‌ها بیماری‌زا نیستند ولی برای کسب مواد مغذی با اسپرم رقابت نموده و محصولات فرعی متابولیکی تولید می‌کنند که تاثیر منفی روی قدرت زنده ماندن اسپرم دارند. هدف طولانی مدت سازمان‌های تجارتی تلقیح‌مصنوعی عاری نمودن دام‌ها از بیماری‌هایی است که می‌توانند از طریق منی منتقل شوند. تاثیرات مفید آنتی‌بیوتیک‌های اضافه شده به رقیق‌کننده‌های منی در سال ۱۹۴۶ کشف گردید [۲]. گروه وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل قارچ‌کش به‌طور آزمایشی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه برخی از عوامل قارچ‌کش برای اسپرم بسیار سمی هستند. عوامل ضد میکروبی دیگر نیز در سطوحی که برای اسپرم مضر نباشند در کنترل آلودگی‌های میکروبی چندان موثر نیستند. برای جلوگیری از رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها باید آنتی‌بیوتیک به رقیق‌کننده اضافه شود که معمولاً از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین استفاده می‌شود [۳].



افزودنی‌های محافظت‌کننده سلولی: زرده تخم‌مرغ و جایگزین‌های مصنوعی آن (لیپوزوم‌ها)

در مسیر حفظ و بقای اسپرم در محیط‌های برون‌تنی، برخی افزودنی‌ها نقش حیاتی و چندوجهی ایفا می‌کنند که از میان آن‌ها، زرده تخم‌مرغ و نسل جدیدتر جایگزین‌های مصنوعی آن، یعنی لیپوزوم‌ها، برجسته هستند. این ترکیبات نه تنها به عنوان یک منبع غذایی عمل می‌کنند، بلکه مهم‌تر از آن، به عنوان سپری در برابر تنش‌های محیطی، به ویژه در فرآیندهای حساس انجماد و ذوب، عمل می‌نمایند [۴].

زرده تخم‌مرغ

زرده تخم‌مرغ، به ویژه زرده تخم‌مرغ تازه یا فیلتر شده، قرن‌هاست که به عنوان یک افزودنی ضروری در بافرها و محیط‌های کشت سلولی، از جمله رقیق‌کننده‌های اسپرم، مورد استفاده قرار می‌گیرد. از زمانی که زرده تخم‌مرغ توسط فیلپس و لاردی به عنوان حفاظت‌کننده از انجماد معرفی شد به طور معمول در رقیق‌کنندگی بسیاری از گونه‌ها به عنوان یک پروتوکل حفاظت‌کننده از انجماد استفاده می‌شود. ترکیبات فعال زرده‌ی تخم‌مرغ لیپوپروتئین‌های با چگالی کم می‌باشند که مسئول حفاظت اسپرم در برابر شوک سرمایی می‌باشند [۵]. یکی از اجزای مهم محیط انجماد و خشک‌سازی برای انجماد اسپرم چندین گونه از جمله قوچ زرده‌ی تخم‌مرغ می‌باشد. از اثرات مفید زرده در انجماد اسپرم به عنوان یک فاکتور مقاومتی در برابر شوک سرمایی، عامل ذخیره که به نگهداری قابلیت زیست کمک می‌کند. زرده حاوی فسفولیپید، کلسترول و لیپوپروتئین‌های با دانسیته‌ی پایین که از اجزای اصلی حفاظت هستند می‌باشد [۶]. زرده تخم‌مرغ موجب کاهش تغییرات غشای سر و ناحیه‌ی میانی که در تحرک و باروری مهم است می‌شود. مکانیسم اصلی حفاظت اسپرم با زرده تخم‌مرغ از طریق واکنش لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین موجود در زرده با پروتئین‌های متصل شونده به لیپید* (BSP) می‌باشد، که این BSP ها در منی وجود دارد و موجب حذف لیپیدهای غشا می‌شوند. دلایل اثربخشی زرده تخم‌مرغ در سه نقش کلیدی خلاصه می‌شود:

۱. **منبع لیپیدی و پروتئینی:** زرده سرشار از فسفولیپیدها (مانند لسیترین)، کلسترول و پروتئین‌هاست. این اجزا در سطح غشاء سلولی اسپرم جذب شده و با ایجاد یک لایه محافظ، نفوذپذیری غشاء را در برابر مولکول‌های مضر و تغییرات ناگهانی دما کاهش می‌دهند. این مکانیسم، به ویژه در برابر شوک سرما که می‌تواند منجر به آسیب برگشت‌ناپذیر غشاء شود، بسیار مؤثر است [۷].

۲. **کاهش سمیت:** برخی از اجزای زرده، مانند لیپوپروتئین‌ها، می‌توانند به سموم موجود در محیط رقیق‌کننده (مانند برخی آنتی‌بیوتیک‌ها یا محصولات جانبی متابولیکی) متصل شده و اثر سمی آن‌ها را خنثی کنند. این امر به ویژه در حفظ طولانی‌مدت اسپرم و جلوگیری از کاهش زنده‌مانی و تحرک آن اهمیت دارد [۸].

۳. **تأمین انرژی (جزئی):** در حالی که کربوهیدرات‌ها منبع اصلی انرژی محسوب می‌شوند، برخی لیپیدهای موجود در زرده نیز می‌توانند به صورت جزئی در متابولیسم انرژی سلول نقش داشته باشند.

با این حال، استفاده از زرده تخم‌مرغ بدون چالش نیست. وجود پروتئین‌های ناخواسته، احتمال انتقال عوامل بیماری‌زا (در صورت عدم فرآوری صحیح)، ایجاد پراکندگی ناهمگن در محلول، ایجاد آگلوتیناسیون (چسبندگی) در اسپرم و القا پیش‌کاپاسیتاسیون از جمله محدودیت‌های آن محسوب می‌شوند که همگی می‌توانند بر باروری منی تأثیر بگذارند [۸].

لیپوزوم‌ها: نوآوری در حفاظت سلولی

یک فناوری پیشرفته در توسعه رقیق‌کننده‌های انجمادی مناسب، استفاده از لیپوزوم‌ها در رقیق‌کننده است. برای تهیه لیپوزوم‌ها، از ترکیب و غلظت بهینه فسفولیپیدها، جزء فعال زرده تخم‌مرغ که محافظت از سلول را در طول انجماد تضمین

* lipid-binding proteins



می‌کند، استفاده می‌شود [۹]. بنابراین، لیپیدهایی که لیپوزوم‌ها را تشکیل می‌دهند، برخلاف پروتئین حیوانی در زرده تخم‌مرغ، ناقل عوامل عفونی نیستند. افزودن لیپوزوم‌ها به رقیق‌کننده‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا از نظر ترکیب و ساختار به طور دقیق تعریف می‌شوند و می‌توان با تنظیم ترکیب و اندازه فسفولیپیدها، آنها را بهینه کرد. لیپوزوم‌ها، وزیکول‌های کروی کوچکی هستند که از یک یا چند لایه لیپیدی (معمولاً فسفولیپیدها) تشکیل شده‌اند و می‌توانند مواد فعال را در فضای داخلی خود محصور کنند [۱۰]. این ساختارهای نانو-مهندسی‌شده، به‌عنوان جایگزین‌های مصنوعی و پیشرفته زرده تخم‌مرغ ظهور کرده‌اند و مزایای قابل توجهی را ارائه می‌دهند:

۱. **قابلیت حمل مواد فعال:** لیپوزوم‌ها می‌توانند ترکیبات محافظتی ارزشمندی مانند ویتامین‌ها (مانند ویتامین E و C به‌عنوان آنتی‌اکسیدان)، کوآنزیم‌ها، داروها یا حتی DNA را در خود جای داده و به صورت هدفمند به سلول اسپرم برسانند. این امر امکان ارائه دوز دقیق و کنترل‌شده‌ای از مواد مغذی یا محافظتی را فراهم می‌کند [۱۱].

۲. **بهبود پایداری غشاء:** فسفولیپیدهای تشکیل‌دهنده لیپوزوم‌ها، به دلیل شباهت ساختاری با غشاء سلولی اسپرم، می‌توانند به راحتی با آن ادغام شده و ساختار و پایداری غشاء را در برابر تنش‌های فیزیکی و شیمیایی تقویت کنند. این توانایی در حفظ یکپارچگی غشاء در حین انجماد و ذوب، بسیار حیاتی است [۱۱].

۳. **کاهش سمیت و واکنش‌های ناخواسته:** برخلاف زرده تخم‌مرغ، لیپوزوم‌ها را می‌توان با خلوص بالا تولید کرد و از ورود پروتئین‌ها یا سایر اجزای ناخواسته که ممکن است باعث واکنش‌های ایمنی یا سمیت شوند، جلوگیری نمود. همچنین، اندازه و ساختار لیپوزوم‌ها قابل کنترل است که امکان بهینه‌سازی تعامل آن‌ها با سلول اسپرم را فراهم می‌آورد [۹].

۴. **تحویل کنترل‌شده:** با طراحی مناسب ساختار لیپوزوم‌ها (مانند اندازه، تعداد لایه‌ها و نوع لیپیدها)، می‌توان زمان و نحوه آزادسازی مواد فعال درون آن‌ها را کنترل کرد، که این امر به حفظ طولانی‌مدت اثر محافظتی کمک می‌کند [۹]. توسعه لیپوزوم‌ها به‌عنوان جایگزین زرده تخم‌مرغ، گامی مهم در جهت ایجاد رقیق‌کننده‌های اسپرم با کارایی بالاتر، ایمنی بیشتر و قابلیت سفارشی‌سازی برای گونه‌ها و اهداف مختلف تولیدمثلی است.

پروتئین‌های سرمی (BSA و FBS)

آلبومین سرم گاوی (BSA):* بررسی ترکیباتی که می‌توانند ساختار غشا را در طول یخ‌زدایی و انکوباسیون بعدی حفظ کنند، برای بهبود کیفیت اسپرم پس از یخ‌زدایی بسیار مهم است. آلبومین سرم گاوی با توجه به اثر محافظتی شناخته شده‌اش بر سلامت غشا، به‌عنوان یک کاندیدای بالقوه برای ارزیابی مطرح می‌شود. BSA تعامل خاصی با فسفولیپیدها دارد و آسیب غشا را در طول نگهداری در یخچال، فرآیند انجماد و هیپوترمی کاهش می‌دهد [۱۲]. BSA عملکردهای فیزیولوژیکی ضروری فراوانی از جمله حفظ فشار انکوتیک و انتقال مولکول‌های درون‌زا و برون‌زا مانند داروها، اسیدهای چرب، اسیدهای صفراوی، هورمون‌ها، ویتامین‌ها و کاتیون‌های متابولیکی را بر عهده دارد. علاوه بر این، در میان سایر فرآیندها، در حذف رادیکال‌های آزاد و تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش دارد [۱۳]. علاوه بر این، مشاهده شده است که از طریق تعاملات خاص با فسفولیپیدها غشای پلاسما، اثرات محافظتی اعمال می‌کند و در نتیجه آسیب‌های احتمالی را در طی فرآیندهایی مانند انجماد کاهش می‌دهد. آلبومین سرم گاوی به‌عنوان یک جزء حیاتی در رقیق‌کننده‌های اسپرم، نقش‌های چندگانه‌ای در حفظ قابلیت حیات و عملکرد اسپرم، به‌ویژه در طول فرآیندهای انجماد-ذوب، ایفا می‌کند. یکی از مکانیسم‌های کلیدی عملکرد BSA، توانایی آن در اتصال به یون‌های کلسیم (Ca^{2+}) و بهینه‌سازی تنظیم ورود و خروج Ca^{2+} به داخل سلول اسپرم است. این خاصیت برای جلوگیری از تجمع غیرفیزیولوژیک Ca^{2+} درون سلولی در طی استرس‌های ناشی از انجماد حائز اهمیت است، زیرا افزایش کنترل‌نشده Ca^{2+} می‌تواند منجر به آسیب سلولی و کاهش کیفیت اسپرم شود (۱۴). علاوه بر این،

*Bovine Serum Albumin



BSA فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد. این ویژگی به توانایی BSA در اتصال سریع به غشای پلاسمایی اسپرم در طول دوره نگهداری نسبت داده می‌شود. با ایجاد یک پوشش محافظ بر روی غشاء، BSA از تماس مستقیم غشاء با رادیکال‌های آزاد و سایر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که می‌توانند باعث پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب‌های اکسیداتیو شوند، جلوگیری می‌کند [۱۴]. این مکانیسم حفاظتی به خوبی با مشاهدات مرتبط با افزایش سطح ROS در نمونه‌های اسپرم پس از فرآیند ذوب، به‌ویژه در محیط‌هایی مانند BTS که فاقد عوامل آنتی اکسیدانی هستند، همخوانی دارد [۱۵]. به طور خلاصه، BSA از طریق مکانیسم‌های دوگانه تنظیم کلسیم و فعالیت آنتی اکسیدانی، به عنوان یک عامل محافظتی مهم در رقیق‌کننده‌های اسپرم عمل می‌کند. این نقش‌های چندگانه به حفظ یکپارچگی ساختاری و عملکردی اسپرم در شرایط استرس‌زا کمک شایانی می‌کند.

سرم جنین گاوی (FBS)*

FBS ترکیبی پیچیده از عناصر مختلف مانند فاکتورهای رشد، اسیدهای آمینه، قندها، چربی‌ها، ویتامین‌ها، عناصر کمیاب و هورمون‌ها است که برای رشد و نگهداری بیشتر انواع سلول‌ها و بافت‌های کشت شده اهمیت دارند [۱۶]. این مکمل مقرون به صرفه، به آسانی در دسترس است، قابلیت انجماد دارد، کار با آن آسان است و تحت آزمایش‌های جامع تضمین کیفیت قرار می‌گیرد (خاصیتی که در سایر افزودنی‌های رقیق‌کننده مانند زرده تخم مرغ یا شیر خشک مشاهده نمی‌شود). در انجماد اسپرم، FBS به دلیل خواص بافری و پروتئین‌هایش که محافظت مکانیکی از غشای پلاسمایی ایجاد می‌کنند، مورد پذیرش قرار گرفته است. این محافظت ظاهراً خطرات ناشی از تشکیل کریستال، تبلور مجدد یا ذوب یخ را در طول فرآیند انجماد-ذوب کاهش می‌دهد [۱۶]. همچنین، قابلیت آنتی اکسیدانی آن در اسپرم خرگوش که در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود، نشان داده شده است؛ زیرا تولید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) را کاهش داده و فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) را افزایش داد [۱۷]. به طور مشابه، FBS در افزایش سطوح بیان ژن‌های آنتی اکسیدانی و کاهش گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در جنین‌های خوک که درون شیشه کشت شده بودند، مؤثر بود [۱۷].

آنتی اکسیدان‌ها و انواع آن‌ها

فرآیند انجماد اسپرم که شامل کاهش دما می‌باشد، موجب تنش اکسایشی بر غشای اسپرم و موجب آسیب‌های برگشت ناپذیر به اسپرم و تغییرات در فعالیت آنزیمی همراه با کاهش تحرک اسپرم، از بین رفتن یکپارچگی غشاء و عدم توانایی باروری اسپرم می‌شود. صدمات تنش‌های اکسایشی را می‌توان با وارد کردن آنتی اکسیدان‌ها به رقیق‌کننده اسپرم قوچ قبل از فرآیند انجماد کاهش داد. متناوباً، ممکن است ذخیره کوتاه مدت یا بلندمدت اسپرم موجب زوال غشاء شود (۱۸) ساز و کارهای متفاوتی برای مهار تنش اکسیداتیو و کاهش آسیب‌های ناشی از ROS وجود دارد که یکی از آن‌ها سیستم آنتی اکسیدان است. وجود آنتی اکسیدان‌ها وضعیت ثابتی از سطح ROS را در پلاسمای منی ایجاد می‌کند. آن‌ها به عنوان پاک‌سازی‌کننده رادیکال‌های آزاد، اسپرم را در برابر ROS حفاظت می‌کنند. آنتی اکسیدان‌ها شامل دو گروه آنزیمی و غیرآنزیمی هستند [۱۸].

آنتی اکسیدان‌های آنزیمی

- سوپراکسید دیسموتاز

سوپراکسید دیسموتاز پاک‌سازی آنیون سوپراکسید داخلی و خارج سلولی را بر عهده دارد. همچنین از بیش فعال شدن قبل از بلوغ اسپرم و ظرفیت‌دار شدن آن پیش از انزال که با حضور رادیکال سوپراکسید صورت می‌گیرد، جلوگیری می‌کند. این آنزیم در برابر سمیت خود به خودی اکسیژن، پراکسیداسیون لیپید و اثرات مخرب آن، از اسپرم محافظت می‌کند. در واقع،

* fetal bovine serum



سوپراکسید دیسموتاز با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم، موجب کاهش تولید مالون دی آلدئید و در نهایت افزایش حرکت اسپرم می‌شود [۱۹] نشان داده شده است که افزودن مکمل‌هایی مانند SOD به اسپرم اسب، اسپرم گاو و منی گاو میش از اسپرم در برابر اثرات زیان‌بار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) محافظت کرده و کیفیت‌های اسپرم (SQPs) را در طول نگهداری اسپرم بهبود می‌بخشد. سوپراکسید دیسموتاز یک آنتی‌اکسیدان بالقوه است که تجزیه سوپراکسید به اکسیژن و هیدروژن پراکسید را کاتالیز می‌کند [۲۰].

- کاتالاز

کاتالاز هم پراکسید هیدروژن را پاک‌سازی کرده و در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و حفاظت اسپرم نقش مهمی ایفا می‌کند. کاتالاز در برابر اثرات سمی پراکسید هیدروژن از اسپرم محافظت می‌کند. این آنزیم به همراه سوپراکسید دیسموتاز، آنیون سوپراکسید تولیدشده توسط NADPH اکسیداز در نوتروفیل‌ها را برداشته و ممکن است در طول التهاب دستگاه تناسلی، نقش مهمی در کاهش پراکسیداسیون لیپید غشا و حفاظت از اسپرم داشته باشد. در واقع کاتالاز، پراکسید هیدروژن تولیدشده توسط سوپراکسید دیسموتاز را تجزیه کرده و مانع تشکیل رادیکال فوق‌العاده سمی هیدروکسیل می‌شود. بدین ترتیب قادر است از اسپرم در برابر اثرات مخرب رادیکال هیدروکسیل حفاظت نماید [۱۹]. افزودن کاتالاز به اسپرم گاو، نر، گاو میش، قوچ و گراز اسپرم را در برابر اثرات مضر ROS محافظت کرده و کیفیت مایع منی را در طول نگهداری اسپرم بهبود بخشید. کاتالاز یک تترامر با چهار زنجیره پلی پپتیدی آنتی‌اکسیدان است که تقریباً در تمام موجودات زنده در معرض اکسیژن یافت می‌شود. این آنزیم از اپیدیدیم و کیسه منی مشتق شده است. این آنزیم با کاهش H_2O_2 به H_2O و O_2 ، پراکسید هیدروژن داخل سلولی و خارج سلولی را سم‌زدایی می‌کند و سمیت بالقوه ROS را از بین می‌برد. کاتالاز همچنین از بیش‌فعالی زودرس و ظرفیت‌سازی ناشی از رادیکال‌های سوپراکسید قبل از انزال جلوگیری می‌کند [۲۱].

- گلوتاتیون پراکسیداز

گلوتاتیون پراکسیداز به همراه گلوتاتیون به‌عنوان دهنده الکترون، پراکسیدهای گوناگونی را حذف می‌کند. گلوتاتیون پراکسیداز شدیداً به وجود سلنیوم در جایگاه فعال آنزیم وابسته است این آنزیم نیز مانند سوپراکسید دیسموتاز، با ممانعت از پراکسیداسیون لیپید غشای اسپرم و در نهایت، از طریق بهبود حرکت اسپرم بر عملکرد اسپرم تأثیر می‌گذارد. گلوتاتیون پراکسیداز نقش مهمی را در بلوغ اسپرم، از زمان تولید تا هنگامی که اسپرم ظرفیت باروری می‌یابد بازی میکند و عدم وجود آن منجر به کاهش ظرفیت بارورسازی اسپرم می‌گردد [۱۹]. گلوتاتیون فراوان‌ترین تیول غیرپروتئینی در سلول‌های پستانداران است و عمدتاً به شکل احیا شده (GSH) وجود دارد و تنها مقدار کمی از آن به شکل اکسید شده است. سیستم گلوتاتیون شامل گلوتاتیون احیا شده، گلوتاتیون اکسید شده، گلوتاتیون ردوکتاز (GRD) و گلوتاتیون-S-ترانسفراز و گلوتاتیون پراکسیداز است. گلوتاتیون از خروج کلسترول از غشای پلاسمایی اسپرم جلوگیری می‌کند و تولید مالون دی آلدئید در رقیق‌کننده‌های مایع منی نشان می‌دهد که از واکنش و ظرفیت‌یابی زودرس آکروزومی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان بالقوه جلوگیری می‌کند [۲۱].

آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی

- ویتامین E



ویتامین E جز انواع آنتی اکسیدان های غیرآزمی است که بسته به دوز مشخصی اثرات حفاظتی خود را نشان می دهد. ویتامین E یک تثبیت کننده سلولی لیپیدهای غیراشباع در برابر زوال اکسیداتیو است و از این رو، یکپارچگی ساختاری و عملکردی را در سطح زیر سلولی حفظ می کند. به طور کلی، ویتامین E جزء اصلی سیستم آنتی اکسیدانی در سلول های اسپرم است. علاوه بر این، افزودن ویتامین E به رقیق کننده های تریس-زرده تخم مرغ، یکپارچگی بالاتری را در غشای پلازما، میتوکندری و پارامترهای سینماتیکی سلول های اسپرم قوچ ها، خروس ها و گاوهای نر پس از انجماد فراهم می کند [۲۲].

- ویتامین C

ویتامین C مهم ترین آنتی اکسیدان در مایع منی است. محققان دریافتند که ویتامین C، طول عمر و کیفیت اسپرم منجمد شده در منی قوچ که در دمای ۵ درجه سانتی گراد نگهداری می شود را بهبود می بخشد. علاوه بر این، به عنوان جایگزینی برای گلوکاتیون، ویتامین C در محافظت از زنده ماندن اسپرم قوچ و سلامت آکروزومی نسبت به ویتامین E کارآمدتر در نظر گرفته می شود، زیرا ویتامین C می تواند تولید H_2O_2 را در یک محیط آب دوست خنثی کند و از تشکیل پراکسید جلوگیری کند. با این حال، غلظت های بالاتر ویتامین C برای تحرک اسپرم در منی گاو نر منجمد-یخ گشایی شده مضر است [۲۲].

- تائورین

تورین یکی از اسیدهای آمینه سولفونیک و یک جاذب غیرآزمی است که به طور قابل توجهی از اسپرم ها در برابر پراکسید لیپید در شرایط ذخیره سازی مایع (۴ درجه سانتی گراد) یا در انجماد محافظت می کند. در سال های اخیر، تائورین در رقیق کننده های منی برای انجماد اسپرم گراز، گاو نر، قوچ و بز استفاده می شود تا با مهار پراکسیداسیون لیپید و محافظت از سلول های اسپرم در برابر تجمع ROS، پارامترهای کیفیت منی و باروری را بهبود بخشد. افزودن تورین به رقیق کننده های منی، پارامترهای کیفیت منی، سطح آنتی اکسیدان ها و کلسترول تام اسپرم را بهبود بخشید و نشت آنزیم های درون سلولی، تشکیل رادیکال های آزاد و ناهنجاری های مورفولوژیکی و هسته ای اسپرم را در می توان کاهش داد. بنابراین، ساختارها و عملکردهای اسپرم را به طور مؤثر محافظت کرد. اثرات مفید تورین در انجماد اسپرم به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی آن است. اسید آمینه تورین، که هم در مایع اپیدیدیم و هم در مایع لوله رحم وجود دارد، محافظ مهمی برای سلول ها در برابر ROS در هنگام قرار گرفتن در معرض شرایط هوازی است [۲۳].

- سیستتامین

سیستتامین یا ۲-مرکاپتواتیل آمین، یک آمینوتیول است که توسط سلول های بدن در طول متابولیسم کوآنزیم A تولید می شود. در غلظت های پایین، سیستتامین باعث ورود سیستتامین به سلول ها و تولید گلوکاتیون می شود که به عنوان یک آنتی اکسیدان درون سلولی عمل می کند. از سوی دیگر، گروه تیول آن با پیوندهای دی سولفیدی پپتیدها و پروتئین ها واکنش می دهد و عملکرد آن ها را مختل می کند. علاوه بر این، سیستتامین باعث تولید پراکسید هیدروژن و استرس اکسیداتیو می شود که در غلظت های بالا فعالیت گلوکاتیون پراکسیداز را کاهش می دهد. افزودن سیستتامین به محیط انجماد اسپرم به عنوان یک آنتی اکسیدان مؤثر شناخته شده است که باعث بهبود حرکت پیشرونده، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و کاهش محتوای MDA می شود [۲۴].

حفاظت کننده ها

حفاظت کننده های انجمادی به طور گسترده به دو دسته نفوذپذیر و نفوذناپذیر طبقه بندی می شوند. حفاظت کننده های نفوذپذیر مولکول های کوچک غیر یونی (گلیسرول، دی متیل سولفوکسید، پروپیلن گلیکول، اتیلن گلیکول، متیل فورمامید) با



حلالیت بالا در آب می‌باشند، در حالی که حفاظت‌کننده‌های نفوذناپذیر پلی‌مرهای با زنجیر طولانی و یا قند (مثل سلولز، سوکروز، رافینوز، ترهالوز) می‌باشند. یکی از علل اصلی تخریب و مرگ سلولی در طی انجماد تشکیل یخ داخل و خارج سلولی می‌باشد. عمل اولیه‌ی حفاظت‌کننده‌ها کاهش سرعت تشکیل یخ و اندازه کریستال یخ می‌باشد. با مقدار کافی حفاظت‌کننده تخریب انجمادی می‌تواند حداقل شود. در حالی که غلظت بالای آن می‌تواند موجب تخریب و مسمومیت اسمزی شود [۱۹]. فاکتورهای مؤثر بر زنده ماندن اسپرم منجمد-ذوب شده قوچ شامل انواع و غلظت‌های تشکیل دهنده‌ی حفاظت‌کننده‌ها در رقیق‌کننده منی و کیفیت منی استفاده شده برای انجماد می‌باشد. با این حال حتی حضور حفاظت‌کننده‌هایی مثل گلیسرول و زرده‌ی تخم‌مرغ و فرایند انجماد و ذوب موجب تخریب غشای پلاسمایی اسپرم و کاهش تحرک و توانایی باروری اسپرم می‌شود. نقص در ظرفیت آنتی اکسیدانی همراه با نسبت بالای اسیدهای چرب غیر اشباع نسبت به اسیدهای چرب اشباع و کلسترول پایین غشای پلاسمایی اسپرم تأثیر بزرگی بر تخریب اسپرم قوچ در حین انجماد می‌شود [۱۴].

حفاظت‌کننده‌های نفوذی

- گلیسرول

خاصیت حفاظت‌کنندگی گلیسرول در سال ۱۹۴۹ توسط پولز و همکاران کشف شد. این کشف یک انگیزه‌ی بزرگ برای انجماد منی پستانداران ایجاد کرد. گزارش شده گلیسرول به تنهایی تأثیر کمتری نسبت به ترکیب با قند دارد [۲۵]. برای کاهش اثرات زیان آور گلیسرول در قوچ می‌توان از ترکیب گلیسرول با قند و افزایش فشار اسمزی رقیق‌کننده استفاده کرد. گلیسرول با قندهایی مانند ترهالوز و رافینوز اثر سینرژیسم دارد. در میان عوامل نفوذکننده، گلیسرول رایج‌ترین ماده مورد استفاده به‌عنوان محافظ انجماد برای انجماد اسپرم پستانداران با غلظت بین ۴ تا ۸ درصد است [۲۶]. دهیدراسیون (کم‌آبی) سلولی نتیجه نفوذ گلیسرول به سلول‌های اسپرماتوزو است که سپس آب درون سلولی را جا به جا می‌کند. علاوه بر این، گلیسرول با اتصال به آب درون سلولی، از تشکیل یخ درون سلولی جلوگیری می‌کند و فرض بر این است که گلیسرول با افزایش سیالیت (روانی) غشای اسپرماتوزو، آسیب سلولی را کاهش می‌دهد. اثرات مضر گلیسرول بر اسپرماتوزو نیز مورد توجه قرار گرفته است و شامل استرس اسمزی، تغییرات در سازمان‌دهی لیپید غشا، سیالیت و نفوذپذیری آن می‌شود. سمیت گلیسرول بسته به نحوه افزودن آن، سرعت سرد شدن و انجماد آن و نوع رقیق‌کننده‌ای که از آن تشکیل شده است، متفاوت است. توصیه می‌شود برای محافظت بهینه در برابر سرما و کاهش سمیت، از افزودن تدریجی دو مرحله‌ای گلیسرول در دمای ۲.۵ تا ۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شود، نه اینکه در دمای نزدیک به صفر درجه سانتی‌گراد اضافه شود [۲۷].

- اتیلن گلیکول

اتیلن گلیکول به‌عنوان یک ماده محافظ انجماد با جرم مولکولی کوچک، نسبت به گلیسرول، استرس کمتری بر اسپرم‌ها وارد می‌کند، زیرا وزن مولکولی پایین آن، عبور آسان از غشای اسپرم را تسهیل کرده و آسیب غشای اسپرم را از طریق کاهش تشکیل کریستال یخ به حداقل می‌رساند. علاوه بر این، اتیلن گلیکول به دلیل کاهش آسیب اسمزی، تحرک اسپرم گاو نر پس از انجمادزدایی را نسبت به دی متیل سولفوکسید و گلیسرول افزایش داده است [۲۸]. یک جایگزین مناسب برای گلیسرول می‌تواند اتیلن گلیکول با غلظت ۳-۵٪ باشد. نشان داده شده است که این مقدار اتیلن گلیکول همان اثرات انجمادی گلیسرول را در رقیق‌کننده‌های مبتنی بر لیسیتین سویا ایجاد می‌کند [۸]. در یک مطالعه‌ی دیگر، ترکیبی از ۱/۵ تا ۵ درصد اتیلن گلیکول و ۱۰۰+ میلی‌مولار ترهالوز در رقیق‌کننده‌ی مبتنی بر تریس، محافظت بهتری نسبت به ترکیبات گلیسرول ۳ تا ۵ درصد و گروه‌های ترهالوز ارائه داد [۲۹]. همچنین نشان داده شد که اتیلن گلیکول جایگزین خوبی برای گلیسرول در رقیق‌کننده‌های مبتنی بر زرده‌ی تخم‌مرغ است؛ حتی این مورد اخیر نیز محافظت بهتری برای غشای پلازما فراهم کرد [۸].



- دی متیل سولفو کساید (DMSO)

دی متیل سولفو کساید به عنوان یک محافظ انجماد با نفوذپذیری سریع، وزن مولکولی کمتری نسبت به گلیسرول دارد. قابلیت نفوذ بالا به آن اجازه می دهد تا به داخل سلول اسپرم برود و در فضای درون سلولی، اثرات محافظتی خود را اعمال کند. همانند گلیسرول، نقش اصلی DMSO نیز در ممانعت از تشکیل کریستال های یخ بزرگ و مخرب در داخل سلول است. این کار را با: کاهش نقطه انجماد، افزایش ویسکوزیته و حفظ آب درون سلولی انجام می دهد. دی متیل سولفو کساید با پر کردن فضای درون سلولی و اتصال به آب، به حفظ ساختار و یکپارچگی ارگانل ها و پروتئین ها در طول فرآیند یخ زدن و ذوب کمک می کند. اگرچه خود می تواند باعث استرس اسمزی شود، اما در غلظت های مناسب می تواند با تنظیم جریان آب، به مدیریت استرس اسمزی ناشی از تغییرات غلظتی در طول انجماد کمک کند [۸]. DMSO می تواند در غلظت های بالا یا زمان های طولانی، سمی باشد. این سمیت می تواند منجر به آسیب به غشای پلاسمایی (تغییر در سیالیت و یکپارچگی غشا، شبیه به آنچه در مورد گلیسرول اشاره شد). آسیب به میتوکندری (که می تواند بر تولید انرژی و زنده ماندن اسپرم تأثیر بگذارد). القای آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلولی). ورود و خروج سریع DMSO از سلول می تواند باعث تغییرات حجمی شدید و استرس اسمزی شود، به خصوص در طول مراحل اضافه کردن یا حذف آن از محیط. DMSO می تواند بر فعالیت آنزیم ها و فرآیندهای متابولیکی درون سلولی تأثیر بگذارد که ممکن است در درازمدت بر عملکرد اسپرم پس از ذوب اثر بگذارد. مطالعات نشان داده اند که غلظت های نامناسب DMSO می تواند منجر به کاهش تحرک اسپرم، کاهش زنده ماندن، و حتی آسیب به DNA شود [۳۰]. با توجه به جنبه های مثبت و منفی، DMSO اغلب به صورت تنها یا (بیشتر اوقات) در ترکیب با سایر محافظت کننده ها (مثل گلیسرول) و در غلظت های بهینه مورد استفاده قرار می گیرد. انتخاب DMSO یا گلیسرول یا ترکیبی از آنها، به نوع گونه حیوانی، پروتکل انجماد، و اهداف پس از ذوب (مثلاً استفاده در لقاح مصنوعی یا IVF) بستگی دارد. برخی از گونه ها حساسیت بیشتری به DMSO نشان می دهند، در حالی که برای برخی دیگر، DMSO ممکن است کارایی بهتری در حفظ کیفیت اسپرم داشته باشد [۳۰].

حفاظت کننده های غیر نفوذی

حفاظت کننده های خارج سلولی عمدتاً با تشکیل یک پوشش در اطراف سلول عمل کرده و بنابراین تأثیر دهیدراتاسیون در نتیجه ی فرایند انجماد را کاهش می دهند. دی ساکاریدهایی مانند سوکروز و ترهالوز به طور گسترده به عنوان حفاظت کننده ی طبیعی و برای انجماد خشک و تثبیت کننده در طی دهیدراتاسیون استفاده می شوند [۳۱]. حفاظت کننده های نفوذناپذیر به طور رایج مونو، الیگو و پلی ساکاریدها می باشند. بعضی از این قندها توسط گیاهان و حیوانات مختلف در طبیعت برای حفاظت از آب و هوای سرد استفاده می شوند. برای همین کاربردها در انجماد آزمایشگاهی منطقی به نظر می رسد. مونوساکاریدها نسبت به دی ساکاریدها سریعاً در محلول حل شده و در دمای پایین کریستاله می شوند. چون مونوساکاریدها مستعد گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی بوده و نتیجه ی آن واکنش با پروتئین می باشد، بسیاری از حفاظت کننده های دی و پلی ساکاریدی استفاده می شوند. باید توجه کرد که قندهای مختلف در طی انجماد سطوح مختلف حفاظتی را فراهم می کنند. و این بستگی به ترکیبات محیط و شرایط خنک سازی متغیر می باشد [۳۱].

- فروکتوز

فروکتوز قندی بوده که به راحتی به انرژی تبدیل می شود. اضافه کردن فروکتوز می تواند یک منبع انرژی اصلی برای اسپرم باشد [۳۲]. فروکتوز اصلی ترین ساکارید موجود در سمینال پلاسمای نشخوارکنندگان است فروکتوز از گلوکز خون سنتر میشود که توسط غدد ضمیمه جنسی در وزیکول های خاص سمینال توسط تستسترون تحریک می شوند. سمینال پلاسمای



ترشح شده از غدد ضمیمه، دارای مقدارهای متفاوتی از فروکتوز می باشد که این قند ساده برای تامین انرژی جهت حرکت اسپرم در دستگاه تناسلی ماده ضروری می باشد. عملکردهایی که قندها در رقیق کننده منی ممکن است بر عهده داشته باشند عبارتند از ۱- تامین سوسترایی که به آسانی قابل متابولیسم می باشد ۲- کمک به متابولیسم فروکتوز ۳- نگهداری تعادل اسمزی ۴- اثر بر روی ساختار اسپرم و کاهش نسبتی که اسپرم توسط رقیق کننده و دمای پایین آسیب دیده. قندها در رقیق کننده نقش های مختلفی بر عهده دارند از جمله فراهم کردن انرژی در طی انکوباسیون، نگهداری فشار اسمزی رقیق کننده و نیز محافظت کننده ی انجماد عمل می کنند. اثر حفاظت کنندگی قندها بستگی به وزن ملکولی قند و نوع بافر استفاده شده در رقیق کننده دارد انتشار قندها از غشای پلاسمایی اسپرم به قندهای با وزن مولکولی پایین محدود می شود [۲۸].

- ترهالوز

ترهالوز یک دی ساکارید تشکیل شده از دو مولکول گلوکز می باشد که از طریق یک پیوند آلفا، آلفا-۱،۱ بهم متصل شده اند. از آنجاییکه گلیکوزیل احیا شده با دیگر گلیکوزیل های احیا شده متصل شده ترهالوز قدرت احیا ندارد. ترهالوز به طور گسترده در طبیعت وجود دارد، و یکی از منابع انرژی شناخته شده در بدن اکثر ارگانیسم های زنده بوده و می تواند در بسیاری از ارگانیسم ها از جمله باکتری ها، قارچ ها، حشرات، گیاهان و بی مهرگان یافت می شود. ترهالوز از بدن موجودات زنده در برابر تنش های مختلف مانند خشکی، انجماد و فشار اسمزی حفاظت می کند. موجودات غیر آبی از طریق تولید مقدار زیادی ترهالوز قادر به تحمل کمبود آب می باشند، و ترهالوز در ثبات غشا و دیگر مجموعه های ماکرو مولکولی تحت شرایط حاد زیست محیطی نقش کلیدی دارد (۳۳). ترهالوز دی ساکاریدی شناخته شده برای تثبیت پروتئین ها و غشای بیولوژیکی در طی فرایندهایی مثل انجماد می باشد. نمونه هایی از توانایی ترهالوز حفظ ساختار زیستی سلول های قرمز خون لیوفیلیز شده، انجماد پوست جنین، اووسیت انسان، سلول های هماتوپویتیکی، جنین موش و اندام های برنامه ریزی شده برای پیوند می باشد. ترهالوز توسط موجودات مختلف در پاسخ به شرایط استرس مانند دهیدراسیون تولید می شود [۳۳].

ترهالوز نقش حفاظت کنندگی در برابر اثرات اسمزی و اشکال خاص واکنش با فسفولیپیدهای غشا، ایجاد محیط های پرتونیک، دهیدراسیون اسمزی سلول قبل از انجماد شده و از این رو آسیب سلول را توسط کریستال یخ کاهش می دهد و در بسیاری از گونه های غیر آبی در غلظت بالا یافت می شود [۳۱]. این ترکیب نسبت به دیگر قندها حفاظت بهتری را در برابر خشکی ایجاد می کند زیرا توانایی بالایی برای جایگزینی آب و کریستاله شدن دارد. سه مکانیسم برای ترهالوز در رابطه با عمل پایداری غشا ذکر شده است ۱- واکنش با فسفولیپید و افزایش سطح این مولکول ها در یک لایه ی فسفولیپید. ۲- افزایش سیالیت غشا. ۳- کاهش شرکت در فاز انتقال ژل به مایع در محلول های حجیم.

- رافینوز

رافینوز تری ساکارید متشکل از گالاکتوز، گلوکز، و فروکتوز است. این را می توان در لوبیا، کلم پیچ، کلم بروکسل، بروکلی، مارچوبه، سایر سبزیجات، و غلات سبوس دار یافت می شود. رافینوز برای جلوگیری از تشکیل یخ خارج سلولی، فراهم کردن هایپرتونیسیت و افزایش تشکیل حالت میکروکریستال استفاده می شود [۳۴]. رافینوز تری ساکاریدی شبیه دیگر قندهاست که از طریق واکنش با غشای لیپیدی و پروتئین ها خطر تشکیل کریستال یخ را کاهش داده که موجب دهیدراسیون اسمزی در طول حفاظت انجمادی می شود. رافینوز در اکثر فرایندها برای مسدود کردن مقدار یخ خارج سلولی، فراهم کردن هایپرتونیسیت و افزایش تشکیل یخ های کم پایدار و یا حالت های کریستالی ریز استفاده می شود و همچنین موجب حفاظت DNA در برابر آسیب های انجمادی می شود. ساری اوزکان و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که استفاده از قندها اثر مفیدی روی نگهداری تحرک، مورفولوژی سالم و تمامیت DNA اسپرم موش صحرایی در برابر آسیب خنک سازی می گذارد و رافینوز



اثر محافظتی قوی تری نسبت به ترهالوز و فروکتوز در حفظ تحرک اسپرم دارد. رافینوز یک ترکیب تری ساکارید نفوذناپذیر بوده که در نگهداری فشار اسمزی مهم بوده و بنابراین به عنوان حفاظت کننده عمل می کند. تأثیر حفاظتی تری ساکاریدها نسبت به مونو و دی ساکاریدها گزارش شده است. درجه بندی تأثیرگذاری قندها در تثبیت پروتئین و لپید غشای سلول به ترتیب زیر می باشد: رافینوز < ساکاروز < لاکتوز < فروکتوز < گلوکز [۳۴].

نسل جدید رقیق کننده ها: ترکیبات و نوآوری ها

بیومواد و نانوفناوری

- نانوذرات (NPs)

عوامل متعددی بر کیفیت اسپرم و توانایی لقاح تأثیر می گذارند، از جمله ژنتیک، سلامت، تغذیه، فصل، استرس ها و انجماد اسپرم [۵۹،۶۰]. عوامل متعددی منجر به کیفیت پایین اسپرم می شوند [۳۵]. تولید ROS توسط سلول های اسپرم غیرزنده در نمونه های اسپرم، عملکرد اسپرم را مختل می کند [۳۶]. برای دستیابی به تولید مثل خوب در مردان، حذف سلول های اسپرم غیرزنده یا تخریب شده و ROS های جاذب از نمونه های اسپرم مهم است. فناوری های نانو اخیر، چشم اندازهای جدیدی را برای توسعه تکنیک های جدید و غیرتهاجمی برای دستکاری اسپرم نشان می دهند [۳۷].

- تعریف و توصیف نانوذرات

NPs مولکول هایی با قطر کمتر از ۱۰۰ نانومتر هستند و می توانند برای کاربردهای زیستی مختلف از جمله زیست شناسی تولید مثل به کار روند زیرا خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی دارند [۳۸]. در مقایسه با مولکول ها یا جامدات توده ای، تفاوت های متعددی در خواص ساختاری نانوذرات وجود دارد. عامل کلیدی فعالیت نانوذرات، ویژگی های سطح آنها، مانند اندازه، چگالی بار و آگریزی است. دستکاری به شکل نانو می تواند جذب و فراهمی زیستی مواد تشکیل دهنده عملکردی را افزایش دهد. اندازه ذرات می تواند بر خواص ماده اصلی تأثیر بگذارد یا آنها را تغییر دهد [۳۹]. پیشرفت سریع در فناوری نانو، پتانسیل زیادی را برای کاربرد در علوم پزشکی و تغذیه نشان می دهد، زیرا نانوذرات دارای خواص غیرمعمول و مفیدی هستند که از نظر اندازه و واکنش پذیری بالای سطح، با مواد معمولی یا میکرومقیاس متفاوت هستند. نانوذرات در داروسازی گنجانده شده اند تا فراهمی زیستی داروها را افزایش دهند و بافت ها/اندام های خاصی را هدف قرار دهند. علاوه بر این، نانوذرات جذب سلولی، خواص اتصال و واکنش پذیری بیشتری را نشان می دهند. علاوه بر این، خواص آنتی اکسیدانی نانوذرات اخیراً به بهینه سازی پروتکل های انجماد کمک کرده است. اندازه های کوچک نانوذرات، امکان ادغام بهتر در فرآیندهای سلولی و مسیرهای فیزیولوژیکی را بدون تداخل با سیستم بیولوژیکی طبیعی نشان داده اند. نانومواد مورد استفاده در داروسازی، پتانسیل زیادی برای حمل مقادیر زیاد و انواع مختلف محموله های بیولوژیکی دارند. این نانوسیستم، دارو را از تخریب سریع و پاکسازی از طریق سیستم رتیکیولاندوتلیال باز می دارد. سطح آن را می توان طوری اصلاح کرد که با عوامل محیطی واکنش نشان دهد و دارو را به صورت واکنشی آزاد کند. انواع مختلف نانوذرات، اشکال جدیدی از مواد با خواص بیولوژیکی امیدوارکننده و سمیت کم هستند و به نظر می رسد پتانسیل بالایی برای عبور از موانع فیزیولوژیکی و دسترسی به بافت های هدف خاص دارند [۳۸].

- نانوذرات فلزی و انجماد اسپرم



آپوپتوز، کاهش متابولیسم سلولی و واکنش آکروزومی معیوب معمولاً در اثر افزایش سطح ROS ایجاد می‌شوند [۳۵]. محققین از نانوذرات مغناطیسی مزدوج برای انتخاب مولکولی اسپرم گراز استفاده کردند و نتایج نشان داد که اسپرم‌های انتخاب‌شده با نانوذرات، ویژگی‌های حرکتی بهبود یافته‌ای با نسبت بالاتری از اسپرم‌های پیشرونده و صافی دارند. گزارش‌های دیگر [۴۰] از نانوذرات Fe_3O_4 کونژوگه شده با آنکسین V برای تعیین آپوپتوز اولیه سلول‌های اسپرم خوک و گاو به ترتیب استفاده کردند.

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها، مانند نانوآکسید روی، می‌تواند در کاهش تولید ROS و افزایش بقای اسپرم مهم باشد. استفاده از نانوذرات روی (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) یا نانوذرات سلنیوم (۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) در رقیق‌کننده SHOTOR، ویژگی‌های مورفولوژیکی و فراساختار اسپرم اپیدیدیم شتر را پس از انجماد از طریق کاهش آپوپتوز و پراکسیداسیون لیپید افزایش داد [۴۱].

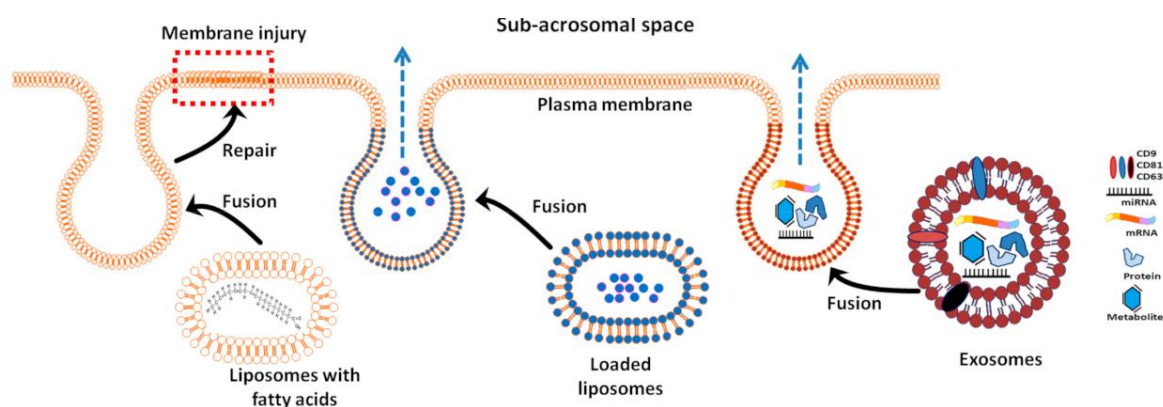
افزودن نانوذرات طلای سنتز شده سبز (GSGNPs) (۱۰ ppm) به یک رقیق‌کننده مبتنی بر تریس، انجماد اسپرم بز را با حفظ غشای اسپرم و سلامت آکروزومی پس از ذوب بهبود بخشید. علاوه بر این، GSGNPs ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید و در نتیجه ROS را در رقیق‌کننده اسپرم بز جمع‌آوری کرد [۴۲]. GSGNPs غیرسمی هستند و کاربردهای پزشکی متعددی دارند [۴۲]. در حالی که نانوذرات طلا و نقره می‌توانند به غشای پلازما نفوذ کنند و در داخل هسته اسپرم انسان قابل تشخیص باشند [۴۳]. هیچ مدرکی در مورد سمیت اسپرم آن‌ها گزارش نشده است. آنتی‌اکسیدان‌ها مانع فعالیت رادیکال‌های آزادشده و از اکسیداسیون آن‌ها جلوگیری می‌کنند و با غیرفعال کردن آن‌ها سلول‌های بدن را از اثرات مخرب این ترکیبات مصون نگاه می‌دارند. و به‌عنوان ترکیبات خوبی برای بهبود زنده‌مانی و تحرک سلول‌های اسپرم منجمد شناخته‌شده‌اند. سلنیوم به‌عنوان آنتی‌اکسیدانی است که وجود آن برای عملکرد طبیعی و انجام فرایند اسپرماتوزن ضروری می‌باشد. این ماده به‌عنوان کوفاکتور آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، منجر به کاهش رادیکال‌های آزاد و افزایش باروری اسپرم می‌گردد. سلنیوم یک آنتی‌اکسیدان قوی است که جزء ضروری آنزیم گلووتاتیون پراکسیداز می‌باشد [۴۴].

وزیکول‌های مصنوعی شبیه آگروزوم (لیپوزوم‌ها) برای انجماد اسپرم

لیپوزوم یک نانوزیکول کروی با یک لایه لیپیدی منفرد است که به صورت مصنوعی از طریق تخریب غشاهای پلاسمایی از طریق امواج فراصوت تولید می‌شود [۴۵]. لیپوزوم‌ها می‌توانند به‌عنوان وسیله‌ای برای رساندن مواد مغذی و داروها به بافت‌های هدف استفاده شوند. لیپوزوم‌ها را می‌توان با آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند لیکوپن و کوئرستین بارگذاری کرد و منجر به افزایش قابل توجه در کل اسپرم و تحرک پیشرونده و همچنین افزایش زنده‌مانی، یکپارچگی غشای پلازما و فعالیت میتوکندری در اسپرم خروس شد. علاوه بر این، لیپوزوم‌ها را می‌توان با محتوای مرتبط با لیپید (مانند لسیتین) بارگذاری کرد تا اثربخشی بازسازی غشای پلاسمایی را در طول فرایند انجماد-ذوب اسپرم قوچ بهبود بخشد. لیپوزوم‌ها به‌عنوان افزودنی‌های محافظ انجمادی در چندین گونه حیوانی از جمله اسب، گاو میش، گوسفند، خوک و گاو مورد استفاده قرار گرفته‌اند و بهبود باروری پس از تلقیح مصنوعی گزارش شده است [۴۶]. پیشنهاد شده است که لیپوزوم‌ها با محتوای فسفولیپیدها (فسفاتیدیل سرین، دی‌اولئوئیل فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل کولین، دی‌پالمیتوئیل فسفاتیدیل کولین و دی‌میرستوئیل فسفو کولین) و اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع می‌توانند با غشای پلاسمایی اسپرم ترکیب شوند و آسیب به اسپرم ناشی از فرایند انجماد-ذوب را کاهش دهند [۴۵ و ۴۶] (شکل ۱). برای مثال، در قوچ‌ها، لیپوزوم‌های حاوی فسفاتیدیل کولین تخم‌مرغ و دی‌پالمیتوئیل فسفاتیدیل کولین که به‌عنوان مکمل با اسپرم‌های شسته شده استفاده شدند، محافظت فوری در برابر شوک سرمایی ایجاد کردند، همانطور که با حفظ تحرک نشان داده شده است [۴۶]. به طور مشابه، در اسب‌های نر، لیپوزوم‌های حاوی مخلوطی از فسفاتیدیل کولین تخم‌مرغ و فسفاتیدیل اتانول آمین (به نام لیپوزوم‌های E80) در حفظ تحرک اسپرم



پس از یخ‌زدایی کارآمد بودند [۴۵]. در مقابل، در گاوها، لیپوزوم‌های متشکل از دی‌اولئوئیل-گلیسرول-فسفوکالین و دی‌اولئوئیل-گلیسرول-فسفوکالین منجر به بقای بیشتر پس از یخ‌زدایی، تحرک پیش‌رونده و واکنش آکروزومی در مقایسه با دی‌اولئوئیل-گلیسرول-فسفوکالین به تنهایی شدند. انتقال فاز لیپید به ژل در طول سرد شدن و انجماد به شدت به ترکیب لیپیدی غشاها وابسته است و بنابراین ادغام لیپوزوم انتقال لیپید و کلسترول را تسهیل می‌کند که منجر به بازآرایی اجزای غشای سلولی و اصلاح خواص فیزیکوشیمیایی غشا می‌شود و در نتیجه پایداری انجمادی اسپرم را بهبود می‌بخشد. OptiXcell® یکی از این محصولات تجاری است که از رقیق‌کننده تجاری مبتنی بر لیپوزوم استفاده می‌کند و در حال حاضر برای چندین گونه حیوانی استفاده می‌شود [۴۷].



شکل ۱. مکانیسم پیشنهادی محافظت از اسپرم از طریق آگزوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها. لیپوزوم‌ها با محتوای اسید چرب خود می‌توانند غشای پلاسمایی آسیب‌دیده اسپرم ناشی از انجماد/ذوب را ترمیم کنند. لیپوزوم‌ها هنگامی که به صورت مصنوعی با مواد شیمیایی خاص بارگذاری می‌شوند و آگزوزوم‌ها با محتوای mRNA، miRNA، پروتئین‌ها و متابولیت‌های خود می‌توانند با هم ترکیب شده و محموله خود را به فضای زیر آکروزومی و داخل اسپرم منتقل کنند [۴۵].

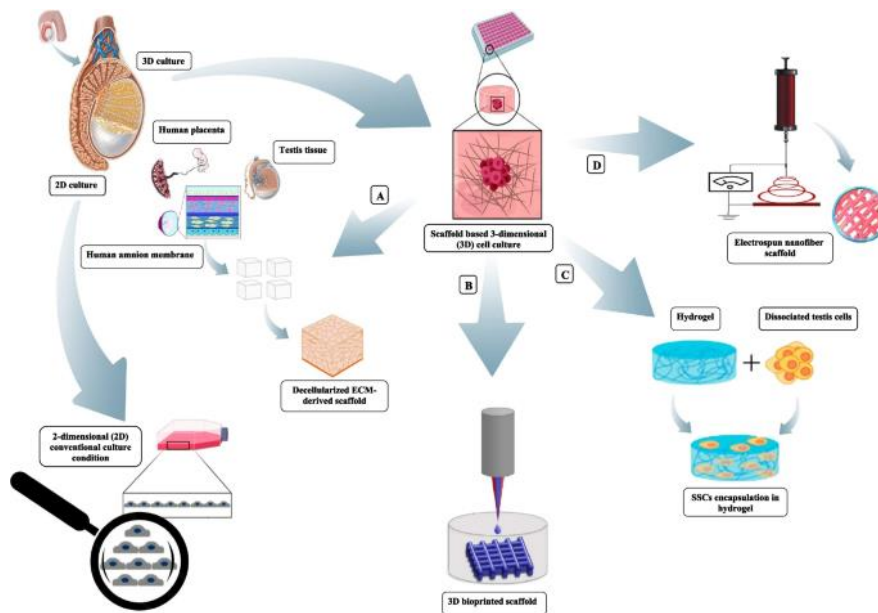
هیدروژل‌ها و سیستم‌های زیست‌تقلیدی برای محیط کشت سه‌بعدی

اعتقاد بر این است که از بین رفتن سلول‌های زایا و نارسایی اسپرماتوژنیک در آواسپرمی غیر انسدادی، از علل اصلی ناباروری مردان است. مطالعات آزمایشگاهی در دهه‌های اخیر از مدل‌های بیضه‌ای آزمایشگاهی و سیستم‌های کشت سه‌بعدی مختلف (3D) برای حفظ، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی (SSCs) استفاده کرده‌اند. ایجاد ساختارهای شبه‌بیضه، مطالعه غربالگری دارو و سمیت، مکانیسم‌های پاتولوژیک و تمایز آزمایشگاهی SSCها را تسهیل می‌کند که منجر به درمان احتمالی ناباروری مردان می‌شود. سیستم‌های کشت مختلف با استفاده از تجمع سلولی با قابلیت خودآرایی، استفاده از مواد زیستی طبیعی و مصنوعی مختلف و روش‌های مختلف ساخت داربست، جایگاه سه‌بعدی مناسبی را برای توسعه سلول‌های بیضه فراهم کرده است. اخیراً، مدل‌های کشت سه‌بعدی به دلیل شباهت‌های معماری و عملکردی خود با ریزمحیط طبیعی، به طور قابل توجهی در تحقیقات مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۴۸].

سیستم‌های کشت دوعده‌ای و سه‌بعدی می‌توانند برای اسپرماتوژنز آزمایشگاهی (in vitro spermatogenesis) استفاده شوند. خلاصه‌ای از استراتژی‌های داربست‌بندی مورد استفاده برای کشت سلول‌های بیضه. الف: داربست مشتق‌شده از ECM سلول‌زدایی‌شده از بافت بیضه، جفت انسان و غشای آمیون انسان. داربست مشتق‌شده از ECM که با کشت سلول‌های بیضه، مجدداً سلول‌دار شده است. ب: داربست زیست‌چاپ سه‌بعدی: یک جوهر زیستی در چاپگر سه‌بعدی تولید شده توسط ترکیب سلول-هیدروژل محلول‌شده که برای ساخت داربست استفاده می‌شود. ج: داربست هیدروژل سلولی: سلول‌های بنیادی



اسپرماتوگونی (SSCs) که در هیدروژل‌های کلاژن، آلژینات و آگارز محصور شده‌اند تا یک داربست ایجاد کنند. داربست نانوفیبری الکتروریسی شده، یک میدان الکتریکی را با چرخش ترکیب می‌کند تا محلول‌های پلیمری را به میکرو یا نانوفیبرها تبدیل کند [۴۹] (شکل ۲).



شکل ۲. هیدروژل‌ها و سیستم‌های زیست‌تقلیدی برای محیط کشت سه‌بعدی مورد استفاده در اسپرماتوژنز [۱۴].

بسیاری از مطالعات، تولید داربست‌هایی را برای اتصال، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی گزارش کرده‌اند که می‌توانند ساختار و عملکرد بیضه را تقلید کنند. مطالعات کشت سه‌بعدی قبلی، فیزیولوژی و تکوین سلول‌های بیضه را ارزیابی کرده‌اند، اما نتوانسته‌اند ساختارهای شبه‌بیضه و اندام‌زایی بیضه را القا کنند. با این حال، ارگانوئیدهای بیضه از طریق تجمع سلول‌های بیضه با ECM (به‌ویژه با استفاده از تکنیک قطره معلق و کشت میکرو-ول) می‌توانند ریزمحیط SSCها را حفظ کنند، اسپرم‌زایی آزمایشگاهی و تولید هورمون‌های بیضه را القا کنند. توسعه ساختارهای شبه‌بیضه با عملکرد مشابه بیضه برای درمان ناباروری مردان با استفاده از پیوند و تولید اسپرم هاپلوئید ضروری است. همچنین، این سیستم‌ها می‌توانند برای مدل‌سازی ناهنجاری‌ها و بدخیمی‌های مختلف بیضه استفاده شوند که می‌توانند مداخلات درمانی را تسهیل کنند. تا به امروز، اسپرماتوژنز آزمایشگاهی با استفاده از داربست‌های چاپ زیستی، ارگانوئیدهای بیضه و توسعه ساختارهای شبه بیضه در مقیاس کوچک، یک استراتژی امیدوارکننده بوده است. استفاده از میکروفلوئیدیک در مدل‌های ارگانوئید بیضه، اسپرماتوژنز آزمایشگاهی و رگ‌زایی جدید ارگانوئیدهای بیضه را ارتقا داده است [۵۰]. ارگانوئیدهای بیضه قادر به ادغام در تحقیقات اندام‌های چند بافتی روی تراشه‌های سیستم تولید مثلی مردان و فرآیندهای فیزیولوژیکی هستند. کاربرد سلول‌های مشتق شده از iPSC در مهندسی بافت بیضه، نقطه عطفی در مطالعات اسپرماتوژنز انسانی در آینده است. اگرچه، طراحی معماری پیچیده بافت بیضه و ارزیابی تعاملات بیولوژیکی در اندام‌زایی بیضه به طور کامل نشان داده نشده است [۵۱].



چالش‌ها

علیرغم پیشرفت‌های انجام شده در زمینه رقیق‌کننده‌ها، ذخیره‌سازی طولانی‌مدت اسپرم به ناچار کیفیت اسپرم را به خطر می‌اندازد و نیاز به بهبود بیشتر دارد. علاوه بر این، مکانیسم اساسی آسیب‌ها در طول این روش همچنان جامع است که ممکن است اطلاعات مهمی را برای بهبود اثر حفاظتی ارائه دهد. اخیراً، چشم‌اندازهای دلگرم‌کننده و تلاش‌های فنی پیشرفته‌ای برای ارتقای ذخیره‌سازی مایع انجام شده است که در میان آنها فناوری نانو و فناوری اومیکس امیدوارکننده‌ترین هستند و مزایای قابل توجهی را نشان می‌دهند [۵۲]. حفظ تحرک اسپرم پس از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد رقیق شده با شیر، با تفاوت‌هایی در پروتئوم پلاسمای منی مرتبط است و چندین پروتئین غشای اسپرم و پروتئین‌های مرتبط با ظرفیت‌پذیری ممکن است در تأثیر ذخیره‌سازی مایع نقش داشته باشند [۵۳]. علاوه بر این، پروفایل‌های متابولیتی اسپرم و پلاسمای منی که با رویکردهای متابولومیک، مانند طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای تعیین می‌شوند، می‌توانند برخی از محصولات نهایی کلیدی مرتبط با مقاومت در برابر انجماد را مشخص کنند [۵۲]. متابولوم پلاسمای منی بین انزال‌های با قابلیت انجماد بالا و پایین گراز با استفاده از آنالیز UHPLC-qTOF-MS آشکار شد. اسید D-آسپارتیک، N-استیل-L-گلوتامات و اینوزین به‌عنوان کاندیداهایی برای ارزیابی مقاومت در برابر انجماد اسپرم عمل کردند [۵۳]. علاوه بر این، پروفایل متابولیتی اسپرم خوک پس از نگهداری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد از طریق آنالیز NMR شناسایی و تعیین مقدار شد. مشخص شد که لوسین، هیپوتائورین، کارنیتین و ایزولوسین با توانایی مقاومت در برابر ذخیره‌سازی مایع مرتبط هستند، که نشان می‌دهد این مولکول‌ها پتانسیل پیش‌بینی مقاومت اسپرم در برابر ذخیره‌سازی مایع را دارند [۵۴]. با این حال، نشانگرهای زیستی فرضی شناسایی شده بین انجماد و ذخیره‌سازی مایع در یک حیوان، اختلافات آشکاری را نشان دادند. با این وجود، این یافته‌ها راه را برای فناوری‌های اومیکس اعمال شده در ذخیره‌سازی مایع اسپرم انسان هموار می‌کند [۵۳]. اگرچه این تکنیک‌های جدید در ذخیره‌سازی اسپرم عمدتاً در انجماد اسپرم حیوانات استفاده می‌شوند، اما نتایج مفیدی را در ذخیره‌سازی مایع آزمایش‌های حیوانی نشان داده‌اند، که آن‌ها الهام‌بخش بزرگی در ذخیره‌سازی مایع اسپرم انسان نیز خواهند بود.

چشم‌انداز آینده و نتیجه‌گیری

انجماد اسپرم حیوانات اهلی یک روش پیچیده است که شامل تنظیم عوامل بسیاری برای دستیابی به نتایج مطلوب است. برای اطمینان از حتی حداقل موفقیت، رقیق‌کننده‌های مناسب، نرخ رقیق‌سازی اسپرم، نرخ خنک‌سازی و نرخ ذوب مورد نیاز است. علاوه بر این، دانش کامل از فیزیولوژی پیچیده اسپرم برای هر گونه برای به حداکثر رساندن بازیابی اسپرم پس از ذوب و در نتیجه، باروری مورد نیاز است. اگرچه اولین انجماد اسپرم موفق بیش از ۶۰ سال پیش بود، اما روش‌های فعلی منجر به اسپرم‌های پس از ذوب با حدود ۵۰٪ زنده‌مانی پس از ذوب برای اکثر گونه‌ها می‌شوند. احتمالاً به دلیل تنوع گسترده در اسپرم گونه‌ها، یک فرآیند انجماد استاندارد ایجاد نشده است. برخی اقدامات، از جمله محافظ‌های انجماد خاص، برای بهبود بقا و باروری اسپرم منجمد حیوانات اعمال شده است. عواملی که منجر به آسیب انجماد اسپرم می‌شوند پیچیده هستند و به طور کامل بررسی نشده‌اند و آسیب انجماد گسترده و شدید به ساختار و عملکرد فیزیولوژیکی اسپرم حیوانات اهلی تأیید شده است. در حال حاضر، مکانیسم‌های آسیب انجمادی در اسپرم پستانداران و پرندگان مورد توجه قابل توجهی در زمینه زیست‌شناسی انجمادی و علوم تولید مثل قرار گرفته است [۵۲]. از آن‌جا که نقش عملکردی اسپرم توسط پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک تنظیم می‌شود، ممکن است توضیح مولکولی آن ضروری باشد. تحقیقات مربوط به انجماد اسپرم حیوانات اهلی در سال‌های اخیر پیشرفت زیادی داشته است. با این حال، هنوز جای پیشرفت قابل توجهی وجود دارد. پیشرفت‌های تکنولوژیکی فعلی، مانند انجماد شیشه‌ای، خشک کردن انجمادی و فناوری‌های توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا، می‌توانند دیدگاه جدیدی را برای بهبود راندمان انجماد اسپرم حیوانات فراهم کنند.



۷. تضاد منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تضاد منافع ندارند

۸. مراجع

1. Ciornei SG, Lopes G, Cenariu M. Reproductive biotechnologies and challenges in their application. *Frontiers in Veterinary Science*. 2025 Feb 4;12:1558641.
2. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier NA. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of andrology*. 2000 Jan 1;21(1):1-7.
3. Flowers WL. Reproductive management of swine. In *Animal Agriculture 2020* Jan 1 (pp. 283-297). Academic Press.
4. Mafolo KS, Pilane CM, Chitura T, Nedambale TL. Use of phosphatidylcholine in Tris-based extender with or without egg yolk to freeze Bapedi ram semen. *S Afr J Anim Sci*. 2020;50(3):389-96. <http://doi.org/10.4314/sajas.v50i3.5>.
5. Priyadharsini R, Jindal S K, Sharma D, Ramachandran N, Karche S D, and Goel A K. 2011. Effect of different egg yolk level on the cryopreservation capability of Jakhrana goat semen. *Journal of Animal Science Advances*. 1(1), 28-37.
6. Gholami M, Faraji Z, and Zamiri M J. 2012. Effect of egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. *Iranian Journal Of Veterinary Research*. 13 (1), 23-27.
7. Murphy, EM; O'Meara, C; Eivers, B; Lonergan, P and Fair, S (2018). Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 191: 70-75.
8. Najafi A, Daghigh-Kia H, Dodaran HV, Mehdipour M, Alvarez-Rodriguez M. Ethylene glycol, but not DMSO, could replace glycerol inclusion in soybean lecithin-based extenders in ram sperm cryopreservation. *Anim Reprod Sci*. 2017;177:35-41. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.004>. PMID:28011116.
9. Kumar P, Saini M, Kumar D, Balhara AK, Yadav SP, Singh P, Yadav PS. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal reproduction science*. 2015 Aug 1;159:38-45.
10. Pillet E, Labbe C, Batellier F, Duchamp G, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*. 2012;77(2):268-79. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.001>. PMID:21924469.
11. Almeida Filho RA, Silva LS, Lima LG, Lourencetti FA, Freitas-Dell' Aqua C, Ferreira JC, Oba E. (2025). Egg-yolk-and a liposome-based extenders: refrigeration time and effects on ram semen quality. *Animal Reproduction*. May 9;22(2):e20240052.
12. Yang, D., Yu, X., Li, X., Yu, B., & Peng, H. (2024). Protective effects of l-cysteine and N-acetyl-l-cysteine on boar sperm quality during hypothermic liquid storage with bovine serum albumin as a protectant. *Theriogenology*, 216, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.12.030>
13. Xu, X., Hu, J., Xue, H., Hu, Y., Liu, Y.-N., Lin, G., Liu, L., & Xu, R.-A. (2023). Applications of human and bovine serum albumins in biomedical engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253(Pt 3), 126914. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126914>



14. Zhang, X.-G., Yan, G.-J., Hong, J.-Y., Su, Z.-Z., Yang, G.-S., Li, Q.-W., & Hu, J.-H. (2015). Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals*, **50**(2), 263–269. <https://doi.org/10.1111/rda.12481>
15. Arranz-Virseda, L., Tomas-Almenar, C., Jose Ciruelos, J., Gomez-Izquierdo, E., & de Mercado, E. (2021). Use of antioxidants in the freezing and thawing extender in Iberian pig sperm. *ITEA-Informacion Tecnica Economica Agraria*, **117**(5), 544–556. <https://doi.org/10.12706/itea.2021.010>
16. Blank MH, Silva VC, Rui BR, Novaes GA, Castiglione VC, Pereira RJ. (2020). Beneficial influence of fetal bovine serum on in vitro cryosurvival of chicken spermatozoa. *Cryobiology*. Aug 1;**95**:103-9.
17. Sariözkan, G. Türk, F. Cartürk, A. Yay, A. Eken, A. Akçay. (2013). The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen *Cryobiology*, **67**, pp. 1-6, 10.1016/j.cryobiol.2013.04.002
18. Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S., 2010. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*. (1):1-7.
19. Das S, Nandi PR, Sarkar P, Tudu KC, Rai S, Behera R, Mandal A, Mondal M, Karunakaran M. (2021). Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione reductase supplementation on cryopreservation of Black Bengal buck semen. *Tropical Animal Health and Production*. Dec;**53**(6):552.
20. Moreira SS, dos Santos RP, da Silva AM, Matos TM, Brazil AV, Souza-Júnior JB, de Paiva Cavalcanti JR, Pereira AF, Silva AR. (2024). Catalase and superoxide dismutase supplementation to the diluent for cryopreservation of collared peccary semen. *Reproduction in Domestic Animals*. Feb;**59**(2):e14536.
21. Perumal P, De AK, Vikram R, Mishra PC, Khan MH. (2022). Inclusion of catalase in semen extender modulates the post thaw semen quality and oxidative stress profiles in mithun spermatozoa. *Indian Journal of Animal Sciences*.**92**(12):1391-8.
22. Bustani GS, Baiee FH. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*. **14**(5):1220.
23. Ponraj P, Khate K, Vupru K. (2022). Taurine in semen extender modulates post-thaw semen quality, sperm kinematics and oxidative stress status in mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*.**11**(1):35-43.
24. Salimi T, Hajarian H, Karamishabankareh H, Soltani L. (2024). Effects of sodium selenite, cysteamine, bacterially synthesized Se-NPs, and cysteamine loaded on Se-NPs on ram sperm cryopreservation. *Scientific Reports*. **14**(1):852.
25. Tuncer P B, Sariözkan S, Bucak M N, Ulutaş P A, Akalın P P, Büyükleblebici S, and Canturk F. (2011). Effect of glutamine and sugars after bull spermatozoa cryopreservation. *Theriogenology*. **75**(8), 1459-1465.
26. Saha, A., Asaduzzaman, M., & Bari, F. Y. (2022). Cryopreservation techniques for ram sperm. *Veterinary Medicine International*, **2022**(1), Article 7378379. <https://doi.org/10.1155/2022/7378379>
27. Paul, R. K., Kumar, D., & Singh, R. (2021). Carboxymethyl cellulose and glycerol act synergistically as cryoprotectant during cryopreservation of ram semen. *Cryobiology*, **101**, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol>.
28. Ahmadi, E., Shams E.N., Nazari, H., Davoodian, N. and Kadivar, A. Ram epididymal sperm frozen in an extender containing ethylene glycol have higher post-thaw longevity and in vitro fertility. *Andrology*, **10**(3), 604-613 (2022).



29. Keskin, N., Erdogan, C., Bucak, M. N., Ozturk, A. E., Bodu, M., Ili, P., Baspinar, N., & Dursun, S. (2020). Cryopreservation effects on ram sperm ultrastructure. *Biopreservation and Biobanking*, **18**(5), 441–448. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0056>
30. Saberivand A, Pashapour S, Noghani AE, Namvar Z. (2022). Synergistic effect of royal jelly in combination with glycerol and dimethyl sulfoxide on cryoprotection of Romanov ram sperm. *Cryobiology*. **104**:87-97.
31. Motta J P R, Paraguassú-Braga F H, Bouzas L F, and Porto L C. 2014. Evaluation of intracellular and extracellular trehalose as a cryoprotectant of stem cells obtained from umbilical cord blood. *Cryobiology*. **68**(3), 343-348.
32. Rasad S D, and Simanjuntak L C. (2011). The Effect of Fructose Addition in Semen Extender on Quality of Separation of Garut Ram Sperm in Several Storage Length. *Animal Production*. **11**(3).
33. Khalil WA, El-Deghaidy RM, Sakr AM, Swelum AA, Abdelnour SA, El-Harairy MA. (2025). Impacts of adding sucrose or trehalose to extenders with different glycerol concentrations on freezability and fertility of buffalo bull semen. *Veterinary Research Communications*. **49**(1):22.
34. Sariözkan S, Bucak M N, Canturk F, Özdamar S, Yay A, Tuncer P B, Ozkan S, Sorgucu N, and Caner, Y. (2012). The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4° C. *Cryobiology*. **65**(2), 93-97.
35. Feugang, J. M. (2017). Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. *Molecular Reproduction and Development*, **84**(9), 832-841.
36. Broekhuijse, M. L. W. J., Gaustad, A. H., Bolarin Guillén, A., & Knol, E. F. (2015). Efficient boar semen production and genetic contribution: The impact of low-dose artificial insemination on fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, **50**, 103-109.
37. Gessner, A., Lieske, A., Paulke, B. R., & Müller, R. H. (2002). Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, **54**(2), 165-170.
38. Hashem, N. M., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). State-of-the-art and prospective of nanotechnologies for smart reproductive management of farm animals. *Animals*, **10**(5), 840.
39. Huber, D. L. (2005). Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, **1**(5), 482-501.
40. Albrecht, M. A., Evans, C. W., & Raston, C. L. (2006). Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green chemistry*, **8**(5), 417-432.
41. Shahin, M. A., Khalil, W. A., Saadeldin, I. M., Swelum, A. A. A., & El-Harairy, M. A. (2020). Comparison between the effects of adding vitamins, trace elements, and nanoparticles to shotor extender on the cryopreservation of dromedary camel epididymal spermatozoa. *Animals*, **10**(1), 78.
42. Ismail, A. A., Abdel-Khalek, A. E., Khalil, W., & El-Harairy, M. A. (2020). Influence of adding green synthesized gold nanoparticles to tris-extender on sperm characteristics of cryopreserved goat semen. *Journal of Animal and Poultry Production*, **11**(2), 39-45.
43. Moretti, E., Terzuoli, G., Renieri, T., Iacoponi, F., Castellini, C., Giordano, C., & Collodel, G. (2013). In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. *Andrologia*, **45**(6), 392-396.
44. Abedin, S. N., Baruah, A., Baruah, K. K., Kadirvel, G., Katiyar, R., Khargharia, G., ... & Deori, S. (2023). In vitro and in vivo studies on the efficacy of zinc-oxide and selenium nanoparticle in cryopreserved goat (*Capra hircus*) spermatozoa. *Biological Trace Element Research*, **201**(10), 4726-4745.
45. Saadeldin, I. M., Khalil, W. A., Alharbi, M. G., & Lee, S. H. (2020). The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation. *Animals*, **10**(12), 2281.



46. Mortazavi, S. H., Eslami, M., & Farrokhi-Ardabili, F. (2020). Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. *Animal reproduction science*, **219**, 106533.
47. Ansari, M. S., Rakha, B. A., & Akhter, S. (2017). Cryopreservation of bull semen in OptiXcell® and conventional extenders: Comparison of semen quality and fertility. *Animal Science Papers & Reports*, **35**(3).
48. Salem, M., Khadivi, F., Javanbakht, P., Mojaverrostami, S., Abbasi, M., Feizollahi, N., ... & Rezaei Yazdi, F. (2023). Advances of three-dimensional (3D) culture systems for in vitro spermatogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*, **14**(1), 262.
49. Sakib, S., Goldsmith, T., Voigt, A., & Dobrinski, I. (2020). Testicular organoids to study cell-cell interactions in the mammalian testis. *Andrology*, **8**(4), 835-841.
50. Salem, M., Khadivi, F., Javanbakht, P., Mojaverrostami, S., Abbasi, M., Feizollahi, N., ... & Rezaei Yazdi, F. (2023). Advances of three-dimensional (3D) culture systems for in vitro spermatogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*, **14**(1), 262.
51. Wang, J., Wang, J., Wang, M., Hong, R., Tang, S., Xu, Y., ... & Huang, S. (2021). Quantitative phosphoproteomics reveals GSK3A substrate network is involved in the cryodamage of sperm motility. *Bioscience Reports*, **41**(10), BSR20211326.
52. Zhang, Y., Liang, H., Liu, Y., Zhao, M., Xu, Q., Liu, Z., & Weng, X. (2021). Metabolomic analysis and identification of sperm freezability-related metabolites in boar seminal plasma. *Animals*, **11**(7), 1939.
53. Bezerra, L. G. P., Oliveira, R. E. M. D., Comizzoli, P., & Silva, A. R. (2024). Collection, handling, and preservation of wild bird semen: Current status, challenges, and perspectives. *Biopreservation and Biobanking*, **22**(3), 191-210.
54. Umer, m., jameel, m., baseer, a., ahmed, z., & ghotia, a. G. (2023). An overview of semen extenders and future challenges to development of artificial insemination in camel. *Advances in agriculture and animal science*, **39**(2), 114-123.