مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۱۱، بهمن ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله مروری

خشکاندن انجمادی اسپرم؛ اثر بر پارامترها

الهه شاهمرادی: کارشناسی ارشد، 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

امروزه انجماد اسپرم به منظور حفظ آن در کلینیک‌های درمان ناباروری امری رایج است. یکی از روش‌های جایگزین در حفظ اسپرم، خشکاندن انجمادی است. این فرایند شامل سه مرحله است. مرحله اول، انجماد است که طی آن حلال از حل شونده جدا می‌شود و آب بلورهای یخ را شکل می‌دهد. مرحله دوم خشک شدن اولیه است، که در این مرحله فشار کاهش می‌یابد و گرما برای آغاز تصعید بلورهای یخ به کار می‌رود. در طول مرحله سوم که خشک شدن ثانویه است، جذب نهایی آب باقیمانده صورت می‌گیرد. برای استفاده مجدد از اسپرم، باید آبدهی انجام گردد. خشکاندن انجمادی مزایای زیادی دارد از جمله این که نیاز به نیتروژن مایع برای نگهداری طولانی مدت را مرتفع می‌نماید و این قابلیت را فراهم می‌آورد که نمونه خشک شده در دمای $4^{\circ}C$ یا دمای اتاق نگهداری شود. در حفظ اسپرم به روش خشکاندن انجمادی، فقدان کلی حرکت در نمونه‌های آبدهی شده دیده می‌شود. زنده مانی اسپرم به دنبال این روش می‌تواند حفظ شود. یکی از ناهنجاری‌هایی که به دنبال خشکاندن انجمادی در اسپرم رخ می‌دهد، ناهنجاری مورفولوژیک است به خصوص در ناحیه دم که دم‌های خمیده بیشترین نسبت این ناهنجاری‌ها را به خود اختصاص می‌دهند. آکروزوم بخشی از اسپرم است که در همه محیط‌های کشت بسیار تحت تاثیر خشکاندن انجمادی است که البته می‌تواند با این روش حفظ شود. برخی مطالعات حیوانی آسیب به DNA اسپرم به دنبال خشکاندن انجمادی را نشان می‌دهند اما مطالعاتی هم حفظ یکپارچگی DNA را نشان داده‌اند. استفاده از تری هالوز در خشکاندن انجمادی می‌تواند منجر به حفظ میکروتوبول‌ها گردد. در این مقاله مروری به مطالعات انجام شده در زمینه خشکاندن انجمادی اسپرم و اثرات آن بر پارامترهای اسپرم پرداخته می‌شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

خشکاندن انجمادی،

اسپرم،

حرکت اسپرم،

آکروزوم

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۱۲

تاریخ چاپ: ۹۹/۱۱/۰۵

شیوه استناد به این مقاله:

Shahmoradi E, Halvaei I. Sperm freeze-drying; Effects on parameters. Razi J Med Sci. 2021;27(11):90-100.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;27(11):90-100. http://rjms.iums.ac.ir

Review Article

Sperm freeze-drying; Effects on parameters

Elaheh Shahmoradi: MSc, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tehran, Iran
Iman Halvaei: Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author) ihalvaei@modarse.ac.ir

Abstract

Today, sperm cryopreservation is a routine practice in infertility clinics. There are many indications for sperm preservation including before starting chemo- and radiotherapy, orchiotomy, vasectomy, biopsies from epididymal and testicular tissues in azoospermic patients, gender change, following spinal cord injury, and hypogonadotropic hypogonadism. Routinely, spermatozoa are preserved in liquid nitrogen. This method has several limitations including a permanent need for liquid nitrogen, hazards related to working with liquid nitrogen like skin burning or eye damage, risk of liquid nitrogen evaporation and missing the samples, and risk of cross contamination between samples. Many researchers are trying to introduce an alternative method to overcome these limitations. Also, liquid nitrogen tanks need a suitable place to be placed in. One of the alternative methods to preserve sperm is freeze-drying. This process consists of three steps. The first step is sample freezing, during which the solvent is separated from the solvent. Water forms ice crystals and the solute is placed between the ice crystals. Freezing may be done in a separate device or in a freeze dryer. The second step is the primary drying, in which the pressure of the device is reduced and heat is used to begin sublimation of the ice crystals. During the third step, which is the secondary drying, the final absorption of the remaining water is usually done by increasing the temperature of the product and slightly reducing the water vapor pressure in the container (17). This method has many advantages, including that it eliminates the need for liquid nitrogen for long-term storage and the dried samples can be stored at 4˚C or room temperature. To use sperm, rehydration must be done in order to be used in assisted reproduction techniques. In the preservation of human sperm by freeze-drying, the general lack of movement in the dried specimens indicates severe damage to the plasma membrane of the sperm. The effect of the physical and chemical environments to which sperm are exposed and the subsequent swelling and shrinkage as a result of water flow cause damage to the organelles, the lipid structure of the cell plasma membrane, and the water channels in the membrane (9). After freeze-drying, sperm become immobile in all culture media including culture media or distilled water. Sperm viability has been reported following freeze-drying in various animal species (16). It was shown that freeze-drying has reduced the level of lipid peroxidation in comparison with vitrification and slow freezing. Also, freeze-drying induced mixture and lack of saturated and unsaturated fatty acid in plasma membrane. Freeze-drying of human spermatozoa has been related to complete loss of viability which indicates that sperm plasma membrane during this process is damaged. It seems that using distilled water in rehydration process may lead to damage of plasma membrane but sing culture media also showed the loss of viability concluding that plasma membrane damage has already been occurred and is not related to rehydration process. One of the anomalies that occurs after sperm freezing drying is morphological anomalies, especially in the tail, where curved tails have the highest proportion of these anomalies (9). When sperm returns to isotonic conditions after exposure to high osmolarity solutions, this causes the

Keywords
Freeze-Drying,
Sperm,
Sperm Motility,
Acrosome

Received: 03/10/2020
Published: 24/01/2021

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

tail to twist and bend around the sperm head. In addition, changes in water content during cell dehydration may lead to tail twisting. Culture of rehydrated spermatozoa after one day showed an increase in tail coiling of tail missing. Long period of incubation after rehydration showed that not only sperm morphology may change but also sperm factor relate to activation of oocyte may be impaired. It was shown that sperm head without increasing in vacuoles has been preserved in freeze-drying. The acrosome is the part of the sperm that is highly affected by freeze-drying in all culture media, regardless of semen status or storage temperature, which can be preserved in this technique (22). It was found that more than seventy percent of acrosome could be reserved after freeze-drying. Adding trehalose to freeze-drying medium also had beneficial effect on maintaining acrosome integrity. Trehalose can maintain the structure of spermatozoa in very low temperature leading to maintain acrosome integrity. Sperm DNA integrity is very important to be intact for successful fertilization and embryo development. Sperm DNA is evaluated in all studies evaluating different methods of sperm preservation. The effect of freeze-drying on DNA structure is contradictory. Animal studies have shown sperm DNA damage may be responsible for intracytoplasmic sperm injection after freeze-drying. Although DNA damage has been attributed to factors such as heat shock, ice crystal formation, and oxidative stress, it is suggested that damage to freeze-dried sperm DNA may be due to endonucleases released during such processes or to oxidative stress. It happens from watering. Numerous studies have shown that DNA integrity can be maintained following this method (9, 28). Also, a human study has shown that the amount of DNA fragmentation in the freeze-dried group increases compared to the fresh group, but this increase is not significant. Examination of sperm resistance to cryopreservation revealed that immature spermatozoa were damaged by this method more than mature ones. Adding trehalose to freeze-drying media help to maintain the sperm DNA integrity (36). Chromosomal integrity and fertility of sperm can be maintained after adding EDTA to the culture medium during freeze-drying. In a study on bear sperm, it was shown that adding trehalose to the environment improves the integrity of sperm DNA after the freeze-drying process, but does not promote fertility and subsequent evolution to the blastocyst stage (36). Trehalose in dog sperm also showed that it could lead to a reduction in sperm fragmentation, although this difference was not significant (21). Although the addition of trehalose led to the preservation of boar sperm DNA following freeze-drying, it could not increase fertility and blastocyst production (36). Trehalose appears to bind to DNA as well as to establish a viscous environment by binding hydrogen between its molecules and protecting sperm DNA following a decrease in temperature (37). Trehalose also preserves the structure of DNA by removing water from the cell and forming hydrogen bonds with DNA (38). Another factor recommended in studies to reduce the destructive effects on sperm DNA is the addition of rosmarinic acid to sperm before freezing (14, 39). In a recent study it was shown that the addition of melatonin led to the preservation of the morphology and DNA methylation status of rabbit sperm following cryopreservation. The use of trehalose in freeze-drying can also lead to the preservation of microtubules (23). This article reviews the studies on freeze-drying of sperm and its effects on sperm parameters.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Shahmoradi E, Halvaei I. Sperm freeze-drying; Effects on parameters. Razi J Med Sci. 2021;27(11):90-100.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

مقدمه

انجماد اسپرم تحولی بزرگ در زمینه روش‌های کمک باروری به عنوان یک روش کاربردی در مدیریت درمان ناباروری ایجاد کرده است و به طور رایج در تمام بخشهای آندرولوژی انجام می‌شود (۱). از موارد مصرف انجماد اسپرم می‌توان به قبل از اقداماتی که منجر به اختلال باروری می‌شود مثل انجام شیمی درمانی، پرتو درمانی، ارکیوتومی، وازکتومی، نمونه برداری از بیضه و اپیدیدیم در بیماران آزوسپرمی، تغییر جنسیت، آسیب طناب نخاعی و هیپوگنادتروپیک هیپوگنادیسم اشاره کرد (۲-۵). یکی از محدودیتهای انجماد اسپرم نیاز به یک منبع دائمی نیتروژن مایع هست و هم چنین ظروف نگهداری نیتروژن مایع ممکن است شکسته و یا آلوده شوند. از مهمترین دغدغه‌های پژوهشگران حذف این نیاز است چرا که علاوه بر هزینه های آن، خطراتی وجود دارد که می‌تواند فردی که انجماد انجام می دهد را تهدید نماید و اینکه نیتروژن مایع قابل تولید در داخل مراکز نیست و باید توسط تانکهای مخصوص از مراکز تهیه آن سفارش داده شود. معضلاتی مثل آلودگی‌های ویروسی و از دست دادن کیفیت اسپرم از دیگر مشکلات مربوطه می‌باشند (۶). خشکاندن انجمادی (Freeze–drying) می تواند این نیاز را مرتفع نماید به اضافه اینکه موجب حفظ تمامیت DNA شده و قابلیت نگهداری در دمای ۴ ˚C و یا دمای اتاق را نیز دارا می باشد (۷, ۸). در این روش به نیتروژن مایع برای نگهداری طولانی مدت نیازی نیست. علاوه بر این، ذخیره در دمای اتاق هزینه کمتری دارد و انتقال اسپرم از جایی به جای دیگر آسان تر صورت می گیرد. در این روش تمامیت ماده ژنتیکی برای یک دوره بیشتر از ۱/۵ سال در دمای ۴˚C حفظ می شود (۷، ۹-۱۲). هزینه زیاد دستگاه، زمان بر بودن این فرایند، مصرف انرژی زیاد از محدودیتهای این روش هستند. روند خشکاندن انجمادی باعث از دست دادن حرکت، زنده مانی، آسیب به غشای اسپرم و تا حدی موجب از دست دادن یکپارچگی DNA می‌شود (۷). در زمینه خشکاندن انجمادی مطالعات زیادی روی گونه‌های مختلف جانوری انجام شده است و حتی تولد نیز از اسپرمی که به این روش حفظ شده است گزارش شده است (۱۳). در مطالعه‌ای که به مقایسه دو روش انجماد و خشکاندن انجمادی می‌پردازد، تفاوتی بین تکوین جنین به دنبال تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) بین این دو روش دیده نشده است (۱۴). نگهداری اسپرم خشکانده شده موش بیش از یک سال در دمای اتاق و تولد نوزاد از آن نیز اخیرا گزارش شده است (۸). اما مطالعه روی اسپرم انسان کمتر صورت گرفته است. در این مقاله سعی شده است که مهم‌ترین اثرات این روش بر پارامترهای اسپرم مورد بحث قرار گیرد.

خشکاندن انجمادی

یکی از روش‌های حفظ اسپرم، خشکاندن انجمادی است که باعث حفظ ماده ژنتیکی می شود. در این روش مواد از طریق تصعید خشک می شوند و شامل عبور مستقیم از فاز جامد به بخار می باشد (۱۵، ۱۶). این فرایند شامل سه مرحله است. مرحله اول، انجماد است که طی آن حلال از حل شونده جدا می شود. آب (حلال) بلورهای یخ را شکل می دهد و حل شونده بین بلور های یخ قرار می گیرد. دمای مورد نیاز برای انجماد کامل به ماهیت حلال و دیگر اجزای نمونه بستگی دارد. انجماد ممکن است در یک دستگاه جداگانه و یا در خشکاننده انجمادی (Freeze dryer) انجام شود. مرحله دوم خشک شدن اولیه است، که در این مرحله فشار دستگاه کاهش می‌یابد و گرما برای آغاز تصعید بلورهای یخ به کار می رود. بخارات حاصل از تصعید هم از منافذ موجود در دریچه عبور می‌کنند. کامل شدن این مرحله وقتی اتفاق می افتد که تمام بلور های یخ از نمونه برداشته شوند و معادل حجم آن با ماتریکس یخ زده اشغال شود. به محض کامل شدن این مرحله، هنوز مقداری آب جذب نمونه هست. پایداری مطلوب از طریق کاهش رطوبت در نمونه از طریق جذب آب آن بدون کاهش حجم نمونه بینابینی به دست می آید. در طول مرحله سوم خشک شدن ثانویه جذب نهایی آب باقیمانده معمولا از طریق افزایش دمای محصول و کاهش جزئی فشار بخار آب در ظرف انجام می‌شود (۱۷).

خشکاندن انجمادی اسپرم

در سال ۱۹۴۹ این روش روی اسپرم انجام شد (۱۸) و درمورد اسپرم پستانداران به سال ۱۹۹۸ بر می گردد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

که روی موش انجام شد و اسپرم خشک شده بدون از دست دادن توانایی باروری منجر به تولید اولین نسل گردید (۱۹). در پی این نتیجه متوجه شدند که اسپرم مرده به معنی DNA مرده نیست، بنابراین اسپرم موش می تواند بدون از دست دادن توانایی اش برای فعال کردن تخمک و سپس تکامل جنینی از طریق ICSI، خشکانده شود. اگرچه ساختارهای اسپرم می توانند توسط خشکاندن انجمادی آسیب ببینند، اما DNA و فاکتورهای داخل سلولی که تخمک را فعال می کنند می توانند حفظ شوند (۲۰). وقتی اسپرم پستانداران تحت این فرایند قرار گرفت، توانایی حرکت را از دست داده و بنابراین نتوانست تخمک را در شرایط برون تنی (*In Vitro*) یا درون تنی (*In Vivo*) بارور کند، هرچند توانایی اسپرم خشکانده شده با استفاده از ICSI نشان داده شد (۲۱). ICSI به یک اسپرم غیرمتحرک اجازه می‌دهد تا تخمک را بارور سازد. ICSI نیاز به حرکت اسپرم برای اتصال به تخمک، نیاز اسپرم برای تحمل هایپراکتیویشن، اتصال به زونا پلوسیدا و واکنش آکروزومی را بر طرف می کند (۲۲). این فرایند در مورد گونه‌های حیوانی مختلفی انجام شد اما به جز در تعداد محدودی از آن‌ها مثل موش، خرگوش و اسب، تولید نسل زنده گزارش نشد. در گونه‌های دیگر، این فرایند تا مرحله بلاستوسیست بیشتر پیش نرفته است (۲۳).

یکی از متغیرهایی که موفقیت خشکاندن انجمادی اسپرم را تعیین می‌کند مدت زمان نگهداری اسپرم بعد از خشکاندن است. ارزیابی باروری روی اسپرم خشکانده شده موش صحرایی نشان داد که اسپرمهای حاصل که در دمای ۴°C و به مدت ۵ سال نگهداری شده بودند، توانایی باروری طبیعی داشتند و مدت زمان نگهداری موجب کاهش توانایی تکاملی تخمک‌های بارور شده نشد (۲۴). همین طور میزان نرخ تکوین بلاستوسیست حاصل از اسپرم‌های موش که به مدت ۶ ماه در دمای ۸۰- ℃ بعد از خشکانده شدن نگهداری شده بودند نسبت به آنهایی که در دمای ۴°C نگهداری شده بودند بیشتر بود. این مطالعه نشان داد که احتمالا حفظ موفق اسپرم خشکانده شده برای ۱۰۰ سال یا بیشتر به نگهداری در دماهای زیر ۸۰- ℃ نیاز دارد (۲۵). زمان فرایند خشکاندن انجمادی نیز می تواند در این زمینه موثر باشد. در مطالعه‌ای عنوان شد که طولانی شدن مدت خشکاندن انجمادی برای اسپرم خرس از ۴ به ۲۴ ساعت، توانایی اسپرم خشکانده شده را برای شرکت در تکامل جنین در شرایط برون تنی کاهش می دهد (۲۶). از دیگر موارد موثر بر موفقیت این روش می توان از میزان pH محلول خشکاندن انجمادی و اثر آن روی تمامیت کروموزومی هسته اسپرم نام برد. Kaneko و همکاران نشان دادند که کروموزوم اسپرم و توانایی تکاملی آن در pH:۸ (کمی قلیایی) محلول خشکاندن انجمادی، بهتر حفظ می شود (۱۱). دمای مکان نگهداری شده نیز بر موفقیت خشکاندن انجمادی تاثیر دارد. در مطالعه‌ای نشان داده شد که درصد ناهنجاری‌های کروموزومی در اسپرم‌هایی که پس از خشکاندن انجمادی در دمای اتاق نگهداری شده بودند نسبت به گروهی که در دمای ۴°C نگهداری شده بودند بیشتر بوده است (۱۳).

تاثیر خشکاندن انجمادی بر پارامترهای اسپرم

حرکت اسپرم

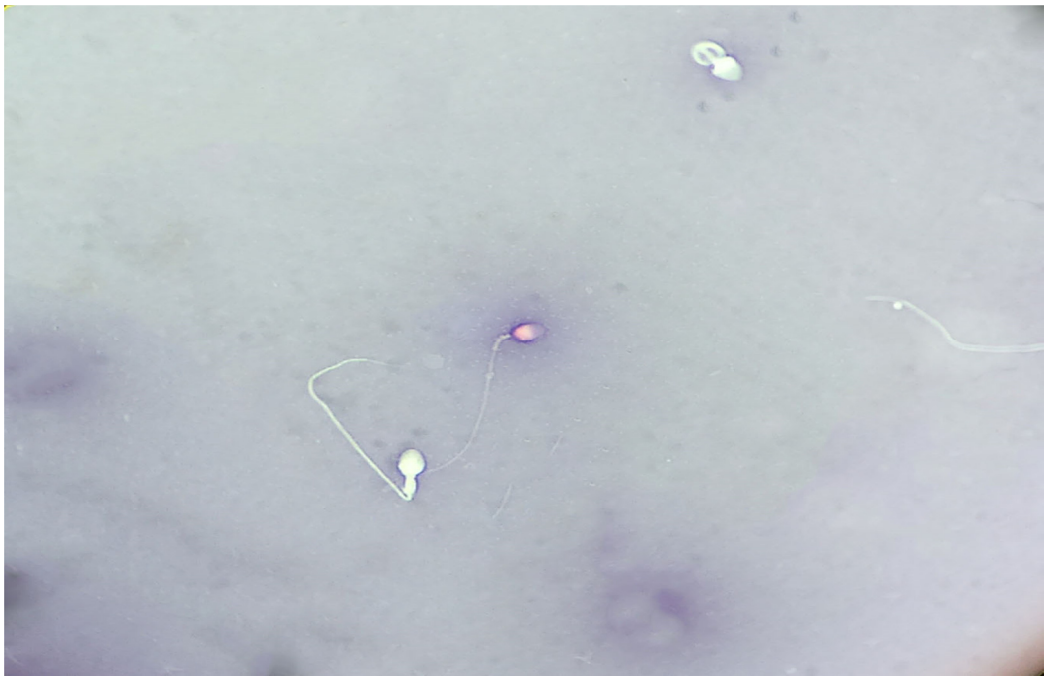
در حفظ اسپرم انسان به روش خشکاندن انجمادی، فقدان کلی حرکت در نمونه‌های آبدهی شده، نشان دهنده آسیب شدید به غشای پلاسمایی اسپرم می باشد. اثر محیط‌های فیزیکی و شیمیایی که اسپرم در معرض آن ها قرار گرفته و تورم و چروکیدگی پی در پی در نتیجه جریان آب باعث آسیب به اندامک ها، ساختار لیپیدی غشای پلاسمایی سلول، کانال‌های پروتئینی آب در غشاء و تغییر در اسمولاریتی می‌شود (۹). اسپرم بعد از خشکاندن انجمادی در همه محیط های کشت غیر متحرک می شود. در این رابطه غشای سلول به علت فقدان آب در طول دهیدراسیون به شدت مستعد آسیب است (۲۷). حرکت اسپرم پستانداران به طور طبیعی پس از خشکاندن انجمادی از دست می رود و به همین دلیل اسپرم نمی تواند تخمک را در محیط برون تنی و درون تنی بارور کند. خشکاندن انجمادی برای حفظ اسپرم‌های با پتانسیل غشای میتوکندریایی بالا موثر است. پراکسیداسیون لیپید با افزایش در نفوذپذیری غشاء و ناتوانی در تنظیم کردن غلظت های داخل سلولی یون‌های کنترل کننده حرکت اسپرم همراه است (۶). به دلیل بی حرکت شدن اسپرم به دنبال خشکاندن

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

انجمادی، باید از ICSI برای لقاح تخمک استفاده کرد.

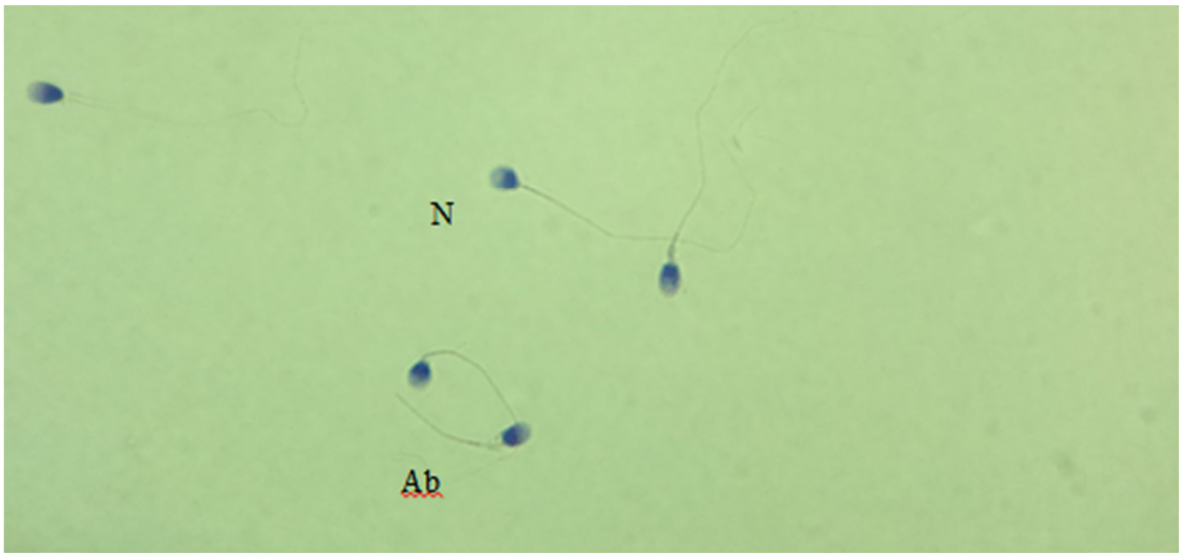
زنده مانی

مطالعه Kaneko و همکاران روی اسپرم گونه‌های حیوانات وحشی ازجمله شامپانزه، جاگوار، زرافه و راسو و سپس تزریق به تخمک موش، زنده مانی اسپرم جمع‌آوری شده از این گونه‌های حیوانی پس از خشکاندن انجمادی را نشان داد. در این مطالعه پس از نفوذ اسپرم به داخل تخمک موش، پیش هسته تشکیل شد (۱۶). زنده مانی اسپرم موش صحرایی و موش سوری با استفاده از بافر خشکاندن انجمادی حفظ و به اسپرم این امکان را می دهد که پس از خشکاندن انجمادی برای مدت طولانی نگهداری شود. pH و حجم کم EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) در این بافر برای حمایت اسپرم از آسیب های فیزیکی در طول خشکاندن انجمادی موثر هستند (۱۶). در مطالعه ای که اخیرا انجام شد، خشکاندن انجمادی نسبت به انجماد شیشه ای و انجماد آهسته باعث سطح کمتری از پراکسیداسیون همراه با جمعیت اسپرم‌های زنده در مقایسه با دو روش دیگر شد. این نتیجه با توجه به از دست دادن حرکت در اسپرم خشکانده شده متناقض است. با این وجود مشخص شد خشکاندن انجمادی ممکن است سبب ترکیب و فقدان اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در غشاهای زیستی شود که می‌تواند حضور کمتر لیپیدهای پراکسید شده را توضیح دهد. تغییر در تمامیت غشای پلاسمایی اسپرم می تواند با فقدان فاکتورهای سیتوزولی اسپرم درگیر در فعال سازی تخمک مرتبط باشد مثل فسفولیپاز C-Zeta که نوسانات کلسیم را در تخمک القاء می کند و بنابراین باعث فعال شدن آن می شود (۶). نتایج خشکاندن انجمادی روی اسپرم انسان شامل فقدان کلی زنده مانی در اسپرم آبدهی شده انسانی بود که نشان می‌داد غشای سلول از طریق این فرایند به شدت آسیب دیده است (۹). به نظر می رسد به دلیل اینکه در مرحله آبدهی از آب مقطر استفاده می‌شود کاهش زنده مانی امری بدیهی و قابل انتظار باشد. اما در مواردی که از محیط کشت هم برای آبدهی استفاده شده است نیز کاهش زنده مانی مشاهده شده است که بیانگر آن است که آسیب به اسپرم قبل از مرحله آبدهی ایجاد شده است (۹). شکل ۱ رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین را نشان می دهد که در آن به راحتی اسپرم زنده و مرده قابل تشخیص هستند (شکل ۱).



شکل ۱- رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین جهت بررسی زنده مانی اسپرم. -EN: سلول زنده و عدم نفوذ رنگ به غشای سلول که سر به رنگ سفید دیده می شود، +EN: سلول مرده و به دلیل نفوذ رنگ به غشای سلول، سر به رنگ صورتی دیده می شود (۱۰۰۰X).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]



شکل ۲- رنگ آمیزی پاپانیکولا جهت بررسی مورفولوژی طبیعی اسپرم. N: سلول با مورفولوژی طبیعی، Ab: سلول با مورفولوژی غیرطبیعی و دارای ناهنجاری گردن و دم (۱۰۰۰X).

مورفولوژی

یکی از ناهنجاری‌هایی که به دنبال خشکاندن انجمادی در اسپرم رخ می دهد ناهنجاری مورفولوژیک است. در یک مطالعه انسانی، اسپرم خشکانده شده در قسمت سر بدون افزایش در میزان واکوئل حفظ شده بود، هم چنین افزایش معنی‌داری در ناهنجاری‌های دم دیده شد که دم‌های خمیده بیشترین نسبت این ناهنجاری را به خود اختصاص داده بودند. وقتی اسپرم بعد از مواجه با محلول های با اسمولاریتی بالا به شرایط ایزوتونیک بر می گردد، این امر باعث پیچ خوردگی و خم شدن دم اسپرم می شود. علاوه بر این، تغییر در محتوای آب در طول آب گیری سلول ممکن است منجر به پیچ خوردگی دم شود که در اسپرم آبدهی شده مشخص است (۹). در مطالعه دیگری بررسی مورفولوژی اسپرم های خشکانده شده پس از آبدهی نشان داد که ۵۰٪ از اسپرم‌ها وقتی برای ۲۴ ساعت بعد از خشکانده شدن نگهداری شدند، دارای دم های خمیده بودند و یا دم های خود را از دست داده بودند. زمان طولانی خشکاندن انجمادی نه تنها ممکن است روی مورفولوژی یا ساختار اثر بگذارد بلکه هم چنین روی برخی مواد مسئول فعال سازی تخمک اثر می‌گذارد (۲۷). شکل ۲ رنگ آمیزی پاپانیکولا در اسپرم را نشان می دهد که ناهنجاری دم اسپرم به دنبال خشکاندن انجمادی را نشان می‌دهد (شکل ۲).

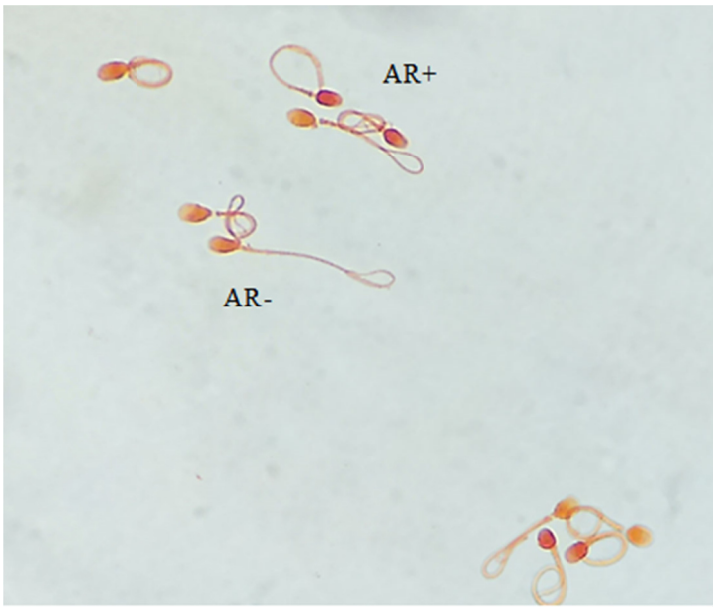
آکروزوم

آکروزوم بخشی از اسپرم است که در همه محیط‌های کشت بسیار تحت تاثیر خشکاندن انجمادی است. Martins و همکارانش گزارش کردند که محیط‌های خشکاندن انجمادی با وجود اختلافات کم، تمامیت آکروزوم را حفظ می‌کنند (۲۲). مطالعه‌ای که روی گونه ای از مارسوپیال‌ها انجام شد نشان داد که حدود ۸۰٪ از اسپرمها به دنبال خشکاندن انجمادی آکروزوم دست نخورده دارند (۲۸). همچنین مطالعه ای که روی اسپرم میمون انجام شد نیز نشان داد که استفاده از تری هالوز می‌تواند منجر به حفظ محتویات آکروزوم اسپرم به دنبال خشکاندن انجمادی شود (۲۹). اخیرا Wakayama و همکارانش نشان دادند که تری هالوز بر سازگاری اسپرم در برابر دماهای خیلی بالا و خیلی پایین تاثیر گذاشته و می‌تواند منجر به حفظ آکروزوم به دنبال خشکاندن انجمادی شود (۳۰). شکل ۳ روش رنگ آمیزی دوگانه برای بررسی واکنش آکروزومی به دنبال خشکاندن را نشان می‌دهد (شکل ۳).

ساختار DNA

مطالعات حیوانی نشان داده است که آسیب DNA که به دنبال خشکاندن انجمادی حاصل می شود می تواند منجر به کاهش نرخ تکوین جنین و نرخ تولد به دنبال ICSI در مقایسه با گروه کنترل شود (۲۰، ۳۱). اگرچه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

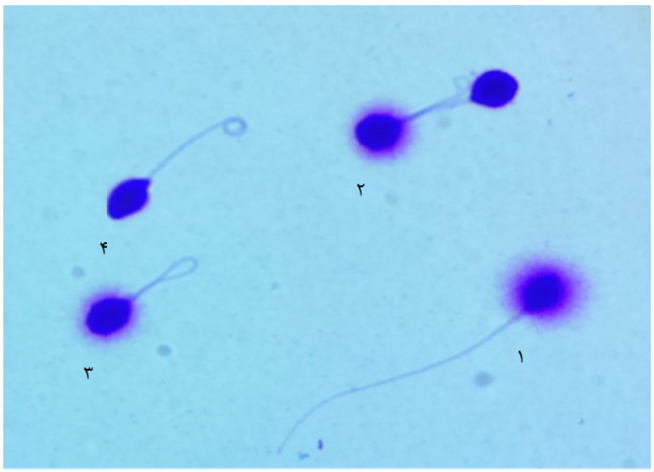


شکل۳- رنگ آمیزی دوگانه جهت بررسی واکنش آکروزومی. در این آزمون بر اساس رنگ آکروزوم و شکل سر، آکروزوم دست نخورده از آکـروزوم واکـنش داده شده تشخیص داده می شود. اسپرمی که دارای آکروزوم صورتی یا قهوه ای تیره است دارای آکروزوم واکنش داده و اسپرمی که دارای آکروزوم قهوه ای کم رنگ و سر بزرگتر است، واکنش آکروزومی را انجام نداده است. AR- : سلول با آکروزوم دست نخورده، AR+ : سلول با و واکنش آکروزومی انجام شده (X۱۰۰۰).

آسیب DNA به عواملی مثـل شـوک حرارتـی، تشـکیل بلور یخ و استرس اکسـیداتیو نسـبت داده شـده اسـت، گفته می شود کـه آسـیب در DNA اسـپرم خشـکانده شده ممکـن اسـت ناشـی از عمـل انـدونوکلئازهای آزاد شـده در طـی چنـین فراینـدهایی یـا در اثـر اسـترس اکسیداتیو باشد که بعد از آبدهی اتفاق می افتد. محیط خشکاندن انجمادی اسپرم شامل عوامـل شـلاته کننـده کلسـیم مثـل EDTA و EGTA (Ethyleneglycolbis tetraacetic acid) اسـت کـه از فعالیـت انـدونوکلئازها جلـوگیری مـی کننـد (۳۲-۳۴). در مطالعـات حیـوانی نشان داده شده است که خشکاندن انجمادی منجـر بـه آسیب DNA نمی شـود (۲۸). همچنـین یـک مطالعـه انسانی نشان داده است که میـزان قطعـه قطعـه شـدن DNA در گروه خشکاندن انجمادی نسبت به گروه تـازه افزایش می یابد اما این افزایش معنی دار نیست (۹). در بررسی مقاومت اسپرم به خشکاندن انجمادی، مشـخص شد اسپرم های نابالغ توسط این روش آسیب می بینند. درحالی کـه اگـر بـا دیامیـد (Diamide) درمـان شـوند نسبت به آن مقاوم می شوند. دیامید با اکسید گروه‌های SH آزاد و افزایش باند دی سـولفیدی، ایـن مقاومـت را سـبب مـی شـود. دی تیوتریتـول (Dithiothretol) بـر عکس دیامید با کاهش باندهای دی سـولفیدی موجـب ایجاد آسیب توسط خشکاندن انجمادی می شود (۱۰).

تمامیت کروموزومی و توانایی بـاروری اسـپرم بعـد از اضافه کردن مقداری EDTA به محیط کشـت در طـول خشکاندن انجمادی و سـپس نگهـداری آن، مـی توانـد حفظ شـود (۳۵). مطالعـه‌ای بـه منظـور کـاهش وقـوع آسیب کرومـوزومی و حفـظ تمامیـت کرومـوزومی روی اسپرم مـوش و اسـپرم انسـان انجـام پـذیرفت. در ایـن مطالعه اسپرم موش را درون محلول EGTA که حـاوی بافر تریس بود، قرار دادند کـه اکثـر اسـپرم‌هـا در ایـن محیط در مدت ۱۰ دقیقه بی حرکـت شـدند امـا زنـده بودند. ولی پس از اینکه به مدت ۶-۴ روز در دمای ۴°C در این محلول نگهـداری شـدند، زنـده مـانی خـود را از دست دادند. گروهی از این اسپرم‌ها که بلافاصله پس از قـرار گیـری در محلـول، خشـکانده شـدند، فقـط ٪۴۰ کروموزوم طبیعی داشتند و بنـابراین توانـایی کمـی در فعال کردن تخمک داشتند. در حالی که گروهی که بـه مدت ۶-۴ روز در بافر بودند، پـس از خشـکاندن ٪۹۵-۸۵ کرومـوزوم طبیعـی داشـتند چـون بـه خشـکاندن انجمادی مقاوم شدند و به همین دلیل به خوبی تخمک را فعال کردند و قادر به حمایت تکـاملی جنـین بودنـد (۱۲). یکی از عواملی کـه افـزودن آن منجـر بـه حفـظ یکپارچگی ژنوم می شود تری هالوز است. در مطالعه ای

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]



شکل ٤- رنگ آمیزی SCD جهت بررسی میزان قطعه قطعه شدن DNA اسپرم. در این آزمون بر اساس میزان هاله ای که اطراف اسپرم تشکیل می شود می توان اسپرم سالم را از اسپرم غیر طبیعی تشخیص داد. ۱. سلول طبیعی با هاله بزرگ، ۲. سلول طبیعی با هاله متوسط، ۳. سلول غیرطبیعی با هاله کوچک، ۴. سلول غیر طبیعی فاقد هاله (X۱۰۰۰).

روی اسپرم خرس نشان داده شد که افزودن تری هالوز به محیط، تمامیت DNA اسپرم را بعد از فرایند خشکاندن انجمادی بهبود می بخشد اما باروری و سپس تکامل به مرحله بلاستوسیست را ارتقاء نمی دهد (۳۶). تری هالوز در اسپرم سگ نیز نشان داد که می تواند منجر به کاهش قطعه قطعه شدن اسپرم شود گرچه این اختلاف معنی دار نبود (۲۱). اگر چه افزودن تری هالوز منجر به حفظ DNA اسپرم گراز به دنبال خشکاندن انجمادی شد اما نرخ باروری و تولید بلاستوسیست را نتوانست افزایش دهد (۳۶). به نظر می رسد تری هالوز با اتصال به DNA و همچنین با برقراری پیوند هیدروژنی بین ملکولهای خود منجر به تشکیل محیط ویسکوز شده و از DNA اسپرم به دنبال کاهش دما محافظت می کند (۳۷). همچنین تری هالوز با خروج آب از سلول و تشکیل باندهای هیدروژنی با DNA منجر به حفظ ساختار DNA می شود (۳۸). یکی دیگر از عواملی که در مطالعات برای کاهش اثرات مخرب بر DNA اسپرم توصیه شده است افزودن رزمارینیک اسید به اسپرم قبل از خشکاندن انجمادی است (۱۴، ۳۹). اخیرا Mercati و همکاران نشان دادند که افزودن ملاتونین منجر به حفظ مورفولوژی و وضعیت متیلاسیون DNA در اسپرم خرگوش به دنبال خشکاندن انجمادی شده است (۴۰). شکل ۴ رنگ آمیزی DNA با آزمون sperm chromatin dispersion test (SCD) را نشان می دهد که در آن اسپرم دارای DNA قطعه قطعه شده از اسپرم طبیعی تمیز داده می‌شود (شکل ۴).

سانتریول

اختلاف معنی داری بین عملکرد اسپرم در گونه‌های پستانداران جونده و غیر جونده در رابطه با وراثت سانتریول وجود دارد. جوندگان سانتریول خود را از تخمک و غیر جوندگان مانند انسان از اسپرم به ارث می‌برند. حفظ سانتریول پروگزیمال برای تشکیل دوک تقسیم در جنین ضروری است. استفاده از تری هالوز در خشکاندن انجمادی می تواند منجر به حفظ میکروتوبول شود. اهمیت تری هالوز در محیط کشت خشکاندن انجمادی برای جلوگیری از آسیب به سر اسپرم نشان داده شده است و بنابراین حفظ عملکرد سانتروزومی برای باروری و تکامل تخمک ضروری است و استفاده از مواد شیمیایی جهت فعال کردن تخمک برای نمونه‌های خشک شده در تری هالوز لازم نیست (۲۳).

نتیجه‌گیری

هدف از روش خشکاندن انجمادی، حفظ اسپرم گونه‌های مختلف به خصوص پستانداران و از جمله انسان در دمای محیط بدون استفاده از هرگونه یخچال و یا فریزر های معمولی بدون آسیب به منبع ژنتیکی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

است. بدین منظور مطالعات بیشتری باید در زمینه اصلاح روش خشکاندن انجمادی از قبیل دما، فشار و مدت زمان این فرایند برای حفظ دائمی و موفق اسپرم خشکانده شده صورت بگیرد. با انتخاب محیط کشت مناسب، تمامیت DNA می تواند در طول خشکاندن انجمادی حفظ شود. آسیب‌های ساختاری به سر اسپرم که موجب از دست دادن توانایی باروری می شود، ممکن است با بهبود محیط کشت کاهش یابند. همچنین موارد زیادی درمورد نحوه خشک کردن و بخش‌های دیگر وجود دارد که می تواند بهبود یابد که شامل رطوبت مناسب برای به حداقل رساندن مدت نگهداری و توسعه سیستم‌های نگهداری می‌باشد. بهینه سازی خشک کردن و آبدهی محیط کشت و شرایط رشد پس از ICSI هم می‌توانند باعث افزایش موفقیت گردند. این روش در آینده می‌تواند کمک شایانی به بیمارانی که نیاز به حفظ ماده ژنتیکی خود دارند نماید به خصوص برای نگهداری نمونه‌های مشکوک به آلودگی‌های ویروسی و یا در شرایط پاندمی.

References

1. Najafi L, Halvaei I, Movahedin M. Canthaxanthin protects human sperm parameters during cryopreservation. Andrologia. 2019;51(10):e13389.
2. Banihani SA, Alawneh RF. Human semen samples with high antioxidant reservoir may exhibit lower post-cryopreservation recovery of sperm motility. Biomolecules. 2019;9(3):111.
3. Pabón D, Meseguer M, Sevillano G, Cobo A, Romero J, Remohi J, et al. A new system of sperm cryopreservation: evaluation of survival, motility, DNA oxidation, and mitochondrial activity. Andrology. 2019;7(3):293-301.
4. Wierckx K, Stuyver I, Weyers S, Hamada A, Agarwal A, De Sutter P, et al. Sperm freezing in transsexual women. Arch Sex Behav. 2012;41(5):1069-71.
5. Bahmyari R, Zare M, Sharma R, Agarwal A, Halvaei I. The efficacy of antioxidants in sperm parameters and production of reactive oxygen species levels during the freeze-thaw process: A systematic review and meta-analysis. Andrologia. 2020;52(3):e13514.
6. Restrepo G, Varela E, Duque JE, Gómez JE, Rojas M. Freezing, Vitrification, and Freeze-Drying of Equine Spermatozoa: Impact on Mitochondrial Membrane Potential, Lipid Peroxidation, and DNA Integrity. J Equine Vet Sci. 2019;72:8-15.
7. Gil L, Olaciregui M, Luno V, Malo C, Gonzalez N, Martinez F. Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. Reprod Domes Anim. 2014;49:72-81.
8. Kamada Y, Wakayama S, Shibasaki I, Ito D, Kamimura S, Ooga M, et al. Assessing the tolerance to room temperature and viability of freeze-dried mice spermatozoa over long-term storage at room temperature under vacuum. Sci Rep. 2018;8(1):10602.
9. Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello AM, Pescatori ES, et al. DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. Fertil Steril. 2012;97(5):1067-73. e1.
10. Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R. Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. Biol Reprod. 2003;69(6):1859-62.
11. Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. Biol Reprod. 2003;68(1):136-9.
12. Kusakabe H, Yanagimachi R ,Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. Hum Reprod. 2007;23(2):233-9.
13. Hochi S, Watanabe K, Kato M, Hirabayashi M, Research DIG. Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. Mol Reprod Develop. 2008;75(5):890-4.
14. Olaciregui M, Luño V, González N, Domingo P, de Blas I, Gil L. Chelating agents in combination with rosmarinic acid for boar sperm freeze-drying. Reprod Biol. 2017;17(3):193-8.
15. Hochi S, Abdalla H, Hara H, Hirabayashi M. Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. J Reprod Develop. 2011;57(5):557-63.
16. Kaneko T, Ito H, Sakamoto H, Onuma M, Inoue-Murayama M. Sperm preservation by freeze-drying for the conservation of wild animals. PLoS One. 2014;9(11):e113381.
17. Jennings TA. Lyophilization: introduction and basic principles: CRC press; 1999.
18. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 1949;164(4172):666.
19. Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. Nature Biotechnol. 1998;16(7):639.
20. Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG, Yanagimachi R. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. Biol Reprod. 2003;69(6):2100-8.
21. Olaciregui M, Gil L. Freeze-dried spermatozoa: A future tool? Reproduction in Domestic Animals.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]

2017;52:248-54.
22. Martins CF, Báo SN, Dode M, Correa GA, Rumpf R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. Theriogenology. 2007;67(8):1307-15.
23. Patrick J, Comizzoli P, Elliott G. Dry preservation of spermatozoa: considerations for different species. Biopreserv Biobank. 2017;15(2):158-68.
24. Kaneko T, Serikawa T. Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. PLoS One. 201 7(4): e35043.
25. Kawase Y, Araya H, Kamada N, Jishage KI, Suzuki H. Possibility of long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. Biol Reprod. 2005;72(3):568-73.
26. Kwon IK, Park KE, Niwa K. Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. Biol Reprod. 2004;71(5):1430-6.
27. Shahba MI, El-Sheshtawy RI, El-Azab A-SI, Abdel-Ghaffar AE, Ziada MS, Zaky AA. The effect of freeze-drying media and storage temperature on ultrastructure and DNA of freeze-dried buffalo bull spermatozoa. Asian Pac J Reprod. 2016;5(6):524-35.
28. Czarny N, Harris M, De Iuliis G, Rodger J. Acrosomal integrity, viability, and DNA damage of sperm from dasyurid marsupials after freezing or freeze drying. Theriogenology. 2009;72(6):817-25.
29. Sánchez-Partida LG, Simerly CR, Ramalho-Santos J. Freeze-dried primate sperm retains early reproductive potential after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2008;89(3):742-5.
30. Wakayama S, Ito D, Kamada Y, Yonemura S, Ooga M, Kishigami S, et al. Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from− 196° C to 150° C. Sci Rep. 2019;9(1):1-9.
31. Palazzese L, Gosálvez J, Anzalone DA, Loi P, Saragusty J. DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development. J Reprod Develop. 2018;64(5) 393-400.
32. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. Biol Reprod. 2004;71(4):1167-73.
33. Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, et al. Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability in vitro and in vivo after intracytoplasmic sperm head injection. Zygote. 2007;15 (1):15-24.
34. Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. Proceed National Acad Sci. 2001;98(24):13501-6.
35. Kaneko T, Nakagata N. Improvement in the long-term stability of freeze-dried mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. Cryobiology. 2006;53(2):279-82.
36. Men NT, Kikuchi K, Nakai M, Fukuda A, Tanihara F, Noguchi J, et al. Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. Theriogenology. 2013;80(9):1033-44.
37. Loi P, Matsukawa K, Ptak G, Clinton M, Fulka Jr J, Nathan Y, et al. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. PloS One. 2008;3(8):e2978.
38. Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. Protein Sci. 2009;18(1):24-36.
39. Domingo P, Olaciregui M, González N, De Blas I, Gil L. Long-term preservation of freeze-dried rabbit sperm by adding rosmarinic acid and different chelating agents. Cryobiology. 2018;81:174-7.
40. Mercati F, Domingo P, Pasquariello R, Dall'Aglio C, Di Michele A, Forti K, et al. Effect of chelating and antioxidant agents on morphology and DNA methylation in freeze-drying rabbit (Oryctolagus cuniculus) spermatozoa. Reprod Domes Anim. 2020;55(1):29-37

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-14]