

## The Effect of Freezing and Thawing on the Viability and Motility of Human Sperm: A Review Study

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Review

#### Authors

Narges Talebian <sup>1,2\*</sup>

1- Sarem Gynecology, Obstetrics and Infertility Research Center, Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Science (IUMS), Tehran, Iran.

2- Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran.

#### \*Corresponding Authors:

Narges Talebian; Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran. Address: Sarem Women Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal code: 1396956111, Phone: +98 (21) 44670888, Fax: +98 (21) 44670432.

### ABSTRACT

The cryopreservation of human spermatozoa has been an option for patients undergoing chemo or radiotherapies since the late 1950s. Cryopreservation of spermatozoa is a widely used technique, sperm cryopreservation is increasingly effective even in cases of other disorders, such as autoimmune diseases, that affect reproductive function. Moreover, sperm cryopreservation is offered to patients with severe oligospermia or ejaculatory dysfunction for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Also, some non-malignant diseases, such as diabetes and autoimmune disorders, may lead to testicular damage, and cryopreservation is also advisable in these conditions. Presently, there are different techniques for the cryopreservation of spermatozoa. Although there have been many improvements, the ideal technique for achieving better post-thaw sperm quality remains a mystery. A major obstacle during cryopreservation is the formation of intracellular ice crystals. Cryodamage generated by cryopreservation causes structural and molecular alterations in spermatozoa. Injuries can happen because of oxidative stress, temperature stress, and osmotic stress, resulting in changes in the plasma membrane fluidity, motility, viability, and DNA integrity of the spermatozoa. There are several methods for freezing and thawing semen, which may cause damage to sperm function, viability, and finally, quality and fertility. In this article, the effects of freezing and thawing on the viability and motility of sperm are reviewed. The possibility of cryopreserving human spermatozoa has existed for over 80 years now, and empirical methods are still used today. A common goal of all techniques used is to achieve the highest post-thaw cell survival possible because the cells face many obstacles during freezing, and cryoinjuries can happen. In summary, sperm cryopreservation is an essential technique, it can be observed in different cellular functions and levels, but it has many negative effects on sperm parameters because it causes a major decline in DNA integrity, membrane viability, motility, viability, and increases in the production of reactive oxygen species (ROS). With all articles reviewed, there is no certain conclusion concerning prioritizing a specific method, but we can assume that there is a bright future ahead for optimizing cryopreservation methods to a point at which we can achieve better fertility outcomes and higher pregnancy rates. Researchers are discovering new means of improving post-thaw sperm parameters.

**Keywords:** cryopreservation; Semen Analysis; Semen Freezing; Semen Thawing; Sperm Motility.

Received: 02 November 2024  
Accepted: 19 December 2024  
e Published: 03 February 2025

#### Article History

Copyright© 2025, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License which permits Share (copy and distribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-Noncommercial terms.

دهد. یک مانع بزرگ، تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی است. می‌دانیم که آب مایع برای عملکرد سلول‌های زنده ضروری است، اما انجماد آن می‌تواند کشنده باشد. آسیب‌های شناخته شده، که می‌تواند هنگام انجماد اسپرم اتفاق بیفتد، به طور خلاصه، انجماد اسپرم یک تکنیک ضروری است، می‌تواند در عملکردها و سطوح مختلف سلولی مشاهده شود، اما اثرات منفی زیادی بر پارامترهای اسپرم دارد، مانند: کاهش تحرک و زنده ماندن اسپرم، کاهش نرخ فعالیت میتوکندری، کاهش در یکپارچگی DNA، و افزایش در تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS). با بررسی مقالات، هیچ نتیجه قطعی در رابطه با اولویت بندی یک روش خاص وجود ندارد، اما می‌توان فرض کرد که آینده روشنی برای بهینه سازی روش‌های انجماد وجود دارد که بتوانیم به نتایج باروری بهتر و نرخ بارداری بالاتر دست یابیم. محققان در حال کشف روش‌های جدیدی برای بهبود پارامترهای اسپرم پس از ذوب هستند.

**کلیدواژه‌ها:** انجماد، آنالیز مایع منی، فریز مایع منی، ذوب مایع منی، تحرک اسپرم

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۰

\***نویسنده مسئول:** نرگس طالبیان؛ مرکز تحقیقات زنان، زایمان و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. آدرس: تهران، شهرک اکباتان، فاز ۳، میدان بسیج، بیمارستان فوق تخصصی صارم. کد پستی: ۱۳۹۶۹۵۶۱۱۱. تلفن: ۰۲۱۴۴۶۷۰۸۸۸. فکس: ۰۲۱۴۴۶۷۰۴۳۲.

### مقدمه

حدود ده‌ها سال است که فرآیند انجماد به عنوان یک روش نگهدارنده از اسپرم برای طولانی مدت مطرح شده است. علیرغم تاریخچه طولانی انجماد اسپرم، میزان بقای اسپرم همچنان محدود است. مکانیسم انجماد یا انجماد اسپرم در دهه ۱۹۶۰ به عنوان حفاظت از باروری معرفی شد [۱]. انجماد مایع منی انسان یک روش ضروری برای حفظ باروری سرطان و بیماران تحت درمان ناباروری به عنوان یک هدف پشتیبان می‌باشد. انجماد یک روش است که در آن سلول‌ها و بافت‌ها آسیب‌پذیر هستند [۲] و نمی‌تواند انتظارات ایده‌آل را برآورده کند چرا که انجماد با ایجاد آسیب‌های شیمیایی و فیزیکی مانند تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در اسپرم سبب آسیب به غشای سلول، اختلال در تحرک اسپرم، ایجاد ناهنجاری‌های ریختی، آسیب به آکروزوم، قطعه قطعه شدن DNA و در نتیجه کاهش عملکرد اسپرم می‌شود [۱]. در انجماد ممکن است تغییرات مضر در ساختار و عملکرد اسپرم ایجاد گردد فرآیند مخرب در طول انجماد و ذوب اسپرم انسان به دلیل شوک حرارتی با تشکیل یخ داخل سلولی و کریستال‌های یخ خارج سلولی، کم‌آبی سلولی و شوک اسمزی رخ دهد. غشاهای و عملکرد اندامک‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این می‌تواند منجر به اختلال در بقای سلول شود [۲]. امروزه تلاش‌های بسیاری در جهت بهبود و بهینه‌سازی تکنیک انجماد صورت گرفته است. یکی از این روش‌ها

## تأثیر فریز و ذوب بر روی بقا و میزان تحرک در اسپرم انسان: یک مطالعه مروری

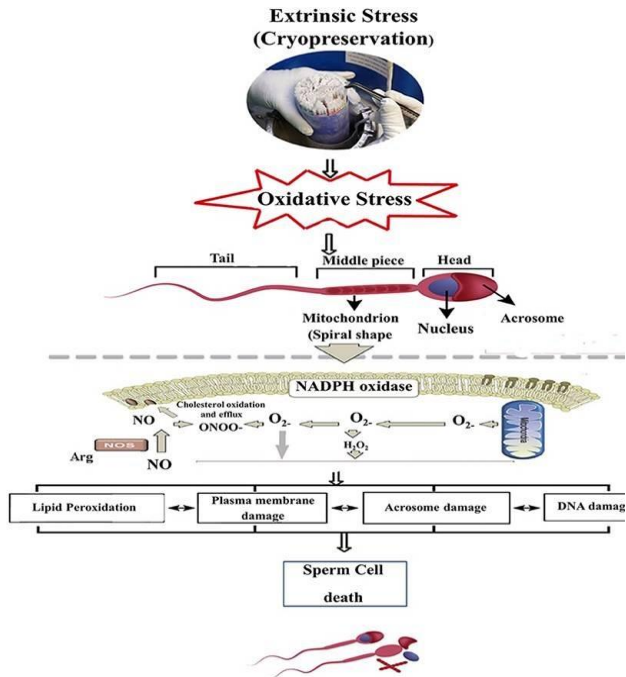
نرگس طالبیان<sup>۱،۲\*</sup>

<sup>۱</sup> مرکز تحقیقات زنان زایمان و ناباروری صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم تهران، ایران

### چکیده

انجماد اسپرم انسان از اواخر دهه ۱۹۵۰ برای بیماری‌هایی که تحت شیمی درمانی یا رادیوتراپی قرار می‌گیرند، مورد استفاده بوده است. انجماد اسپرم یک روش پرکاربرد برای حفظ اسپرم است، انجماد اسپرم به طور فزاینده‌ای حتی در موارد اختلالات دیگر، مانند بیماری‌های خودایمنی که بر عملکرد تولید مثل تأثیر می‌گذارد موثر است. علاوه بر این، انجماد اسپرم به بیماران مبتلا به اولیگواسپرمی شدید یا اختلال انزال برای تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) ارایه می‌شود. همچنین برخی بیماری‌های غیر بدخیم مانند دیابت و اختلالات خودایمنی ممکن است منجر به آسیب بیضه شود و انجماد در این شرایط نیز توصیه می‌شود. در حال حاضر تکنیک‌های مختلفی برای انجماد اسپرم وجود دارد تکنیک ایده‌آل برای دستیابی به کیفیت بهتر اسپرم پس از ذوب همچنان یک راز باقی مانده است. یک مانع اصلی در حین انجماد، تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی است. Cryodamage ایجاد شده توسط انجماد باعث تغییرات ساختاری و مولکولی در اسپرم می‌شود. صدمات ممکن است به دلیل استرس اکسیداتیو، استرس دمایی و استرس اسمزی اتفاق بیفتد، که سپس منجر به تغییر در سیالیت غشای پلاسمایی، تحرک، زنده بودن و یکپارچگی DNA اسپرم می‌شود. روش‌های متعددی برای فریز-ذوب مایع منی وجود دارد که ممکن است آسیب‌هایی بر عملکرد اسپرم، حیات اسپرم و در نهایت درصد کیفیت و باروری وارد کند. انجماد اسپرم انسان در حال حاضر بیش از ۸۰ سال است که وجود دارد و روش‌های تجربی هنوز هم امروزه استفاده می‌شود. هدف مشترک همه تکنیک‌های مورد استفاده دستیابی به بالاترین بقای سلولی پس از ذوب است، زیرا درصد حیات و تحرک اسپرم پس از فریز-ذوب کاهش می‌یابد. سلول‌ها در طول انجماد با موانع زیادی روبرو هستند و آسیب‌های سرمایی ممکن است رخ

رشد و نمو اولیه جنین، لانه‌گزینی و در نهایت کاهش میزان بارداری می‌باشد [۱۷]، [۱۸]. شکل (۱) نشان دهنده آسیب‌های انجماد در سلول اسپرم است [۱۶].



شکل ۱. القای بیش از حد استرس اکسیداتیو در نتیجه تولید ROS میتواند غشای پلاسمایی اسپرم و غشای آکروزومی را خراب کند و در نهایت ساختار مولکولی DNA را تغییر دهد.

تکنیک‌های انجماد، شامل انجماد آهسته و انجماد سریع می‌باشد [۱۸]. انجماد آهسته: شامل سرد کردن تدریجی اسپرم در طی یک دوره ۲ الی ۴ ساعته در دو یا سه مرحله با استفاده از دستگاه و یا از طریق بخار ازت مایع می‌باشد [۱۵]. در این روش یک محیط شیمیایی با وزن کم به مایع منی اضافه می‌شود تا از تشکیل یخ در سلول اسپرم طی فرایند فریز جلوگیری شود و فاز اسمزی و pH را بهینه سازی می‌کند و انرژی خارج سلولی اسپرم را تامین کند و این محیط شیمیایی به علت داشتن آنتی‌بیوتیک، آلودگی‌های باکتری را مهار می‌کند. از آنجایی که این روش یک روش معمول برای فریز اسپرم می‌باشد، یکی از ایرادات آن سرعت فریز می‌باشد [۱۹].

انجماد سریع: در پرتکل فریز سریع، بعد از اینکه محیط انجماد به نمونه اضافه شد نمونه‌ها داخل نی‌ها لود می‌شود و در فاصله ۱۵ الی ۲۰ سانتی‌متری از نیتروژن مایع (فاز بخار نیتروژن مایع با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه قرار می‌گیرد و سپس در نیتروژن مایع فرو برده می‌شود. فاز بخار نیتروژن مایع با توجه به فاصله و حجم نیتروژن در زیر آن یک شیب حرارتی ایجاد می‌کند. عدم مهارت در کنترل سرعت فریز ممکن است باعث تغییر در کیفیت اسپرم پس از ذوب

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است [۴]. اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌ها به محیط فریز اسپرم اثرات مثبتی می‌تواند داشته باشد. در انسان اضافه کردن آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین D و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی باعث بهبود حرکت اسپرم و کاهش قطعه قطعه شدن DNA اسپرم پس از فریز-ذوب می‌شود [۵]. لیستی از تعدادی از آنتی‌اکسیدان‌هایی که اثرات مثبت بر کیفیت اسپرم پس از فریز ذوب دارند در جدول (۱) آورده شده است [۹،۶،۷،۸].

جدول ۱. لیستی از آنتی‌اکسیدان‌ها پس از فریز-ذوب

اثرات	آنتی‌اکسیدان
باعث افزایش کیفیت اسپرم و تثبیت ساختار نوکلئوپروتئین	گلوتامین (GSH)
باعث حفظ بهتر سلامت آکروزوم	آلژینات
باعث افزایش تحرک اسپرم پس از ذوب، حفظ DNA اسپرم و منجر به افزایش حاملگی	ویتامین E
باعث حذف رادیکال‌های اکسیژن	ویتامین C
اثرات مفید در تحرک اسپرم، زنده ماندن اسپرم و سلامت DNA	ملاتونین
باعث بقا و باروری اسپرم	سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز
موجب بهبودی تحرک و حیات اسپرم پس از ذوب و همپنین آسیب DNA را کاهش می‌دهد.	تمپول

هدف مشترک تمام تکنیک‌های مورد استفاده دستیابی به بالاترین بقای سلولی پس از ذوب است زیرا سلول‌ها در طول این مدت با موانع زیادی روبرو هستند. یخ زدن، و آسیب‌های سرمایی ممکن است رخ دهد. یک مانع اصلی تشکیل یخ درون سلولی است می‌دانیم که آب مایع، برای عملکرد سلول‌های زنده ضروری است، اما جامد شدن آن می‌تواند کشنده باشد. برای دور زدن آن موانع، تا آنجا که ممکن است برای موفقیت در انجماد، برخی از مراحل کلیدی استاندارد باید دنبال شود. اولین مرحله، ذخیره‌سازی در نیتروژن مایع -۱۹۶ درجه سانتی‌گراد است [۱۰]. در فرایند فریز، دمای سلول‌ها یا کل بافت‌ها به طور معمول تا -۱۹۶ درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد [۱۱]، [۱۲]. ذخیره‌سازی طولانی مدت اسپرم از طریق مهار متابولیسم داخل سلولی انجام می‌شود، در واقع در دمای -۱۹۶ درجه سانتی‌گراد، به دلیل عدم انرژی حرارتی کافی جهت واکنش شیمیایی در این دما اساساً هیچ فعالیت بیوشیمیایی رخ نمی‌دهد، به علاوه محیط آبی که برای فعالیت‌های متابولیک سلول ضروری است، وجود ندارد [۱۳]. بنابراین به علت عدم انرژی حرارتی کافی برای واکنش‌های شیمیایی و فقدان آب کافی که برای فرآیندهای متابولیک ضروری است، فعالیت‌های متابولیکی سلول متوقف می‌شود [۱۰، ۱۱]. با این حال، ممکن است بافت یا سلول‌های زنده طی فرآیندهای فریز-ذوب دچار آسیب شوند [۱۴]. بنابراین قبل از انجماد، باید یک محافظ برودتی اضافه کرد، به عنوان عاملی که میزان آب داخل سلولی را کاهش می‌دهد و از بلورهای یخ داخل سلولی جلوگیری می‌کند [۱۵]. اثرات منفی فریز در عملکرد اسپرم شامل: اختلال در تحرک، حیات، ساختار کروماتین، غشای پلاسمایی اسپرم، توانایی لقاح،

### بحث و نتیجه‌گیری

امروزه انجماد در گامت‌ها، جنین‌ها و بافت‌ها (تخمندان و بیضه) را در زمینه‌های مختلف می‌توان یافت. انجماد نیز یک روال شناخته شده است. این تکنیک مورد استفاده برای چندین دهه در تولید مثل کمکی برای حفظ مواد ژنتیکی بوده است [۲۱، ۲۱]. در مورد منی انسان، این رویکرد بسیار ارزشمند است و در بیماران تحت شیمی‌درمانی یا رادیوتراپی و بیماران مبتلا به سایر بیماری‌های خود ایمنی می‌توان از آن استفاده کرد، حتی در بیماران مبتلا به الیگواسپرمی شدید و اختلال انزالی. انجماد مایع منی انسان در سال ۱۷۷۶ توسط Spallanzani، کشیش ایتالیایی که که با مشاهده تأثیر برف بر روی اسپرم انسان، تأثیر دمای پایین را بر تحرک اسپرم‌ها توصیف کرد، مورد توجه قرار گرفت [۲۸، ۲۷]. در انجماد اسپرم، دو روش استاندارد که در اواسط قرن بیستم توسعه یافت، هنوز هم استفاده می‌شود: انجماد آهسته قابل برنامه‌ریزی و انجماد بر روی بخارات نیتروژن مایع. با وجود موفقیت‌های این روش‌های تجربی، روش‌های جدیدی که سریع‌تر، ارزان‌تر و ساده‌تر هستند، مورد تردید قرار گرفته است. یکی از این روش‌های امیدوار کننده، انجماد شیشه‌ای است که در حال حاضر فقط برای انجماد جنین و تخمک استفاده می‌شود. مطالعات بر روی انجماد اسپرم انسان نتایج بسیار متناقضی ارائه می‌دهد، احتمالاً به این دلیل که اسپرم‌های انسان نسبت به سایر بافت‌های تولیدمثلی، نسبت به تغییرات اسمزی حساس‌تر هستند. تکنیک ایده‌آل برای دستیابی به کیفیت بهتر اسپرم پس از ذوب همچنان یک راز باقی مانده است. انجماد روشی بسیار پیچیده است زیرا پروتکل‌های مختلف، حامل‌های انجماد و عوامل محافظ سرما را پوشش می‌دهد [۲۹]. یک مانع اصلی در حین انجماد، تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی است یک تجزیه و تحلیل اولیه اسپرم باید انجام شود تا مشخص شود که آیا اسپرم می‌تواند ابتدا به تخمک برسد و سپس بارور کند. در انزال باید به اندازه کافی اسپرم متحرک پیشرونده وجود داشته باشد تا حداقل یک اسپرم به تخمک برسد. تعیین تحرک اسپرم از نظر بیولوژیکی و بالینی مهم است زیرا وجود یا عدم وجود اسپرم‌های سریع و پیشرونده اطلاعات پیش‌آگهی بهتری را برای ART به ما می‌دهد [۳۱، ۳۰]. یکی از پارامترهای اسپرم تحرک می‌باشد که تحت تأثیر فریز قرار می‌گیرد. مکانیسم دقیق کاهش تحرک اسپرم هنوز مشخص نیست اما اثرات مخرب فریز بر میتوکندری و غشاء پلاسمایی اسپرم می‌تواند باعث کاهش تحرک اسپرم در طی فریز شود [۳۲]. سلول‌های اسپرم غنی از میتوکندری هستند، زیرا منبع انرژی ثابتی برای تحرک آنها مورد نیاز است و آسیب میتوکندری در طی فرآیندهای انجماد با از دست دادن نفوذپذیری غشاء مرتبط است. این واقعیت را تأیید می‌کند که انجماد به دلیل آسیب میتوکندری و همچنین به دلیل تغییرات فیزیکی در دم بر تحرک تأثیر می‌گذارد [۳۳]. غشاء پلاسمایی اسپرم به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای که دارد نسبت به فرایند فریز-ذوب بسیار حساس است. شوک سرمایی می‌تواند باعث اثرات سوء ناشی از بی‌ثباتی غشای پلاسمایی در دمای پایین تر از ۵ درجه سانتی‌گراد شود و این بی‌ثباتی بر روی سلامت آکروزوم تأثیر گذاشته و موجب اختلال در غشای لیپیدی می‌شود

شود [۱۹]. آسیب سرمایی شناخته شده، که می‌تواند هنگام انجماد اسپرم اتفاق بیفتد، می‌تواند در عملکردها و سطوح مختلف سلولی مشاهده شود، مانند کاهش تحرک و زنده ماندن اسپرم، کاهش نرخ فعالیت میتوکندری، کاهش در یکپارچگی DNA، و افزایش در تولید گونه‌های اکسیژن فعال [۲۰] (ROS) بیشتر آسیب‌های سرمایی ناشی از انجماد سلول‌ها با سرعت انجماد نادرست است، چه خیلی آهسته یا خیلی سریع. اگر سرعت خیلی زیاد باشد، آب به سرعت به اندازه کافی خارج نمی‌شود، و کریستال‌های یخ درون سلولی تولید می‌شوند که می‌توانند به اندامک‌های سلولی آسیب برسانند. اگر سرعت خیلی آهسته باشد، سلول‌ها آب را به سرعت از بین می‌برند [۱۰]. هیچ کدام از این گزینه‌ها برای بقای سلولی خوب نیست؛ هر دو خنک کننده خیلی کم یا خیلی زیاد می‌توانند سلول‌ها را از بین ببرند [۲۱]. مهم‌ترین تفاوت سرعت انجماد و ذوب و به دنبال آن استفاده از یک محافظ سرما و غلظت آن است [۲۲]. برای ثبت، افت دما در هنگام انجماد آهسته با سرعتی از ۰.۵ تا ۰ درجه سانتیگراد در دقیقه رخ می‌دهد، و در طول شیشه‌ای شدن، دما صدها درجه سانتیگراد در دقیقه کاهش می‌یابد [۲۱]. روش‌های مبتنی بر سرعت فریز آهسته تقریباً پروتکل‌های مشابهی دارند که شامل افزودن Cryoprotectant Agent (CPA) قبل از انجماد، انجماد سلول‌ها، ذوب سلول‌ها و حذف CPA پس از ذوب می‌شود برای حفظ نرخ انجماد تا حد امکان، لازم است قبل از انجماد، به اسپرم محافظت کننده‌های سرمایی اضافه شود. با این حال، افزودن CPA منجر به استرس اسمزی می‌شود که می‌تواند برای اسپرم بسیار سمی باشد. در طول فرایند انجماد، کریستال‌های یخ شروع به ظهور می‌کنند و آب کمتری باقی می‌ماند که املاح در آن حل می‌شوند، بنابراین غلظت املاح خارج سلولی و CPA افزایش می‌یابد و یک محیط هیپراسموتیک برای سلول‌ها ایجاد می‌کند که می‌تواند مکانیسم‌های سلولی مختلف مرتبط با زنده‌مانی سلول را تحت تأثیر قرار دهد. همه CPAها بسیار محلول در آب هستند و مستقیماً روی غشاء اثر می‌گذارند، با این حال ترکیبات شیمیایی متفاوتی دارند، و ما می‌توانیم آنها را به دو دسته تقسیم کنیم: CPAهای نفوذی و CPAهای غیر نفوذی [۲۳]. تفاوت بین این دو گروه در عبور آنها از غشاء است. CPAهای نفوذی از غشاء عبور می‌کنند. CPAهای غیرقابل نفوذ از غشای سلولی عبور نمی‌کنند، آنها غلظت خارج از سلول را افزایش می‌دهند و باعث می‌شوند آب از سلول خارج شود [21]. مناسب بودن CPAها برای حفاظت از فرایند فریز، بستگی به توانایی آن‌ها در نفوذ به سلول، نوع سلول و همچنین غلظت آن‌ها دارد بطور مثال گلیسرول که یک CPA نفوذ پذیر است در غلظت ۲ تا ۳ درصد اثرات بهینه دارد و در غلظت بالای ۴ درصد می‌تواند روی تکای دور هسته اسپرم اثر بگذارد [۲۴]. با این حال، محیط محافظ سرمایی [۲۵، ۲۳] فقط در غلظت‌های مناسب مفید هستند، اگر غلظت خیلی زیاد باشد، می‌توانند برای سلول‌ها سمی باشند، بنابراین ترکیب محیط انجماد در تمام تکنیک‌های انجماد بسیار مهم است. اسپرم‌ها از نظر اسمزی شکننده هستند و قادر به تحمل غلظت‌های بالای CPA در سرعت‌های بالا نیستند، بنابراین حجم زیادی از نمونه‌های اسپرم را نمی‌توان منجمد کرد [۲۶].

## جدول ۲. خلاصه و جزئیات چندین مقاله در اثرات فریز-ذوب بر روی اسپرم

عنوان	هدف	نتیجه گیری	نام نویسنده و سال
تأثیر انجماد و ذوب منی بر بقا و میزان تحرک اسپرم	مقایسه میزان بقا و تحرک اسپرم از طریق مایع منی در انجماد و ذوب در طول درمان ناباروری	انجماد اسپرم منجر به کاهش تحرک اسپرم می‌شود	RamDayal et al (۲۰۲۱)
مطالعه تحرک اسپرم انسان بعد از انجماد	بررسی اثرات انجماد و ذوب بر روی تحرک اسپرم	تحرک اسپرم‌ها پس از انجماد کاهش می‌یابد.	Surg Lt. et al (۲۰۱۴)
انجماد اسپرم: رویکردها، کارایی‌ها	بررسی تکنیک‌های انجماد، آسیب برودتی در سطوح مولکولی و ساختاری، و محافظ‌های سرما را مورد بحث قرار می‌دهد	انجماد اسپرم، اثرات منفی زیادی بر پارامترهای اسپرم دارد زیرا باعث کاهش عمده در یکپارچگی، زنده ماندن DNA، غشاهای تحرک و زنده ماندن اسپرم می‌شود.	Sanj a Ozi ni c, et al (۲۰۲۳)
پارامترهای اسپرم انسانی پس از فرآیند انجماد با تیمار آنتی اکسیدان میواینوزیتول در بیماران آستنواسپرمی	بررسی اثر میواینوزیتول بر روی مایع منی افراد مبتلا به آستنواسپرمی انجام گرفت	یافته‌های مطالعات نشان می‌دهد که در طول روند انجماد-ذوب، به دلیل بروز استرس اکسیداتیو که در نتیجه به هم خوردن تعادل بین میزان رادیکالهای آزاد اکسیژن و ظرفیت اکسیدانسی مایع آنتی منی ایجاد می‌شود، منجر به کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی مردان می‌شود.	راحیل جنتی فر و همکاران (۱۴۰۰)
اثرات آلزینات بر پارامترهای اسپرم انسان در طول انجماد و ذوب	بررسی اثرات آلزینات بر پارامترهای اسپرم انسان در طی انجماد بود	آلزینات باعث جلوگیری از واکنش زودرس آکروزوم اسپرم DNA و محافظت از اسپرم از دنا توره شدن در طول فرایند سریع انجماد می‌شود.	Somayeh Feyznaneh, et al (۲۰۲۱)
تأثیر تراکم کروماتین بر تمامیت DNA اسپرم فریز و ذوب شده در مردان نوزاد اسپرم	بررسی اثرات تنش گرمایی کیسه بیضه بر کیفیت نمونه منی	تنش گرمایی منجر به آسیب رساندن تراکم کروماتین اسپرم و DNA همچنین آسیب می‌شود.	Zhang MH et al (۲۰۱۵)

[۳۰،۳۴]. مورفولوژی اسپرم یکی دیگر از پارامترهایی است که تحت تاثیر فریز اسپرم قرار میگیرد و تعداد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی پس از فریز بطور قابل توجهی کاهش می‌یابد و اکثر ناهنجاری‌ها مربوط به سر و دم اسپرم می‌باشد [۳۴]. به طور خلاصه، انجماد اسپرم یک تکنیک ضروری است، اما اثرات منفی زیادی بر پارامترهای اسپرم دارد زیرا باعث کاهش عمده در یکپارچگی DNA، زنده ماندن غشاء، تحرک و زنده ماندن می‌شود. با این حال، آسیب‌های سرمایی که ممکن است در حین انجماد اتفاق بیفتند، اثرات منفی بر عملکرد سلول دارند، بنابراین درک تغییراتی که در طول فرآیند انجماد وجود دارد و سپس بهینه سازی تکنیک انجماد مهم است. همانطور که در بالا توضیح داده شد، تکنیک‌های زیادی وجود دارد که اکثر آنها روش‌های استاندارد هستند که برای مدتی طولانی مورد استفاده قرار می‌گیرند و هنوز هم بسیار مفید هستند، اما برای دستیابی به نتایج بهتر پس از ذوب، باید مقداری پیشرفت کرد. تعداد معینی از روش‌های جدید توسط محققان در سال‌های اخیر معرفی شده است، مطالعات نشان داده که آسیب DNA اسپرم در افراد نابارور به طور معنی‌داری بالاتر از افراد بارور بوده است و در صورتی که اسپرم این افراد فریز شود به مراتب آسیب DNA بیشتر خواهد بود [۲۵]. در سال ۲۰۱۴ مطالعاتی بر روی اثرات فریز روی تحرک اسپرم انجام شد و آمارها نشان داد که فرآیند انجماد-ذوب باعث کاهش ۶۶ درصدی اسپرم‌های متحرک سریع پیشرونده، کاهش ۴۵ درصدی در اسپرم‌های متحرک آهسته پیشرونده و کاهش ۲ درصدی در اسپرم‌های متحرک غیرپیشرونده شد. همچنین تاثیر محیط فریز بر روی بقا اسپرم بررسی شد و مطالعات کاهش قابل توجهی در میزان زنده ماندن اسپرم نشان داد [۲۹]. کاراکوس و همکاران [۳۶] ادعا کردند که انجماد به طور قابل توجهی کیفیت اسپرم (بیشتر تحرک و زنده ماندن) را کاهش می‌دهد، علاوه بر این، پس از انجماد، بین ۲۵ تا ۷۵ درصد از اسپرم‌ها ممکن است زنده‌مانی نداشته باشند یا حرکت خود را از دست بدهند [۱۰]. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که فرآیند فریز علیرغم مزایای فراوان بر پارامترهای اسپرمی نظیر حرکت، بقا و نیز ماده ژنتیکی آن اثرات مخربی دارد [۳۷،۳۸]. متداول‌ترین سوال در مطالعات این است که کدام روش انجماد اسپرم، نتایج بهتری را پس از ذوب ارائه می‌دهد. اما هنوز هیچ روش استاندارد وجود ندارد که بازیابی پارامترهای اسپرم تحت تاثیر انجماد و ذوب را در همه جنبه‌ها بهینه کند. با بررسی مقالات، هیچ نتیجه قطعی در رابطه با اولویت بندی یک روش خاص وجود ندارد، اما می‌توان فرض کرد که آینده روشنی برای بهینه‌سازی روش‌های انجماد تا نقطه‌ای وجود دارد که بتوانیم به نتایج باروری بهتر و نرخ بارداری بالاتر دست یابیم. محققان در حال کشف روش‌های جدیدی برای بهبود پارامترهای اسپرم پس از ذوب هستند. تمامی پارامترهای اسپرم در تحقیقات به عمل آمده پس از ذوب نسبت به قبل از انجماد، کاهش معنی‌داری داشتند. برخی از مطالعات مروری و تحقیقات در باره اثرات فریز-ذوب بر روی اسپرم در جدول (۲) نشان داده شده است.

## ملاحظات اخلاقی

هیچ مسئله اخلاقی در این بررسی وجود نداشت.

## تضاد منافع

در این مطالعه تضاد منافع وجود نداشت.

## منبع تامین مالی

هیچ بودجه‌ای در این گزارش مورد برنامه ریزی نشده است.

16. Ibrar Muhammad Khan, et al. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals.2021:volum8
17. Li,Y-x, et al. Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and metaanalysis. *Eur.J.Obstet.Gynecol*, 2019: 233;84-92
18. Li, Z, et al. Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa. *Asian J. Androl*. 2022: 24, 563
19. Sharma R, et al. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Syst Biol Reprod Med*. 2015: 61(1):1-1
20. Desrosiers P, et al. Membranous and structural damage that occur during cryopreservation of human sperm may be time-related events. *Fertil. Steril*. 2006;85, 1744–1752
21. Sanja Ozimic, et al. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. *Issues Mol. Biol*. 2023: 45, 4716–4734
22. Li, Z, et al. Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa. *Asian J. Androl*. 2022: 24, 563
23. Paoli, D, et al. Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure. *Genet. Damage Hum. Spermatozoa* 2014: 791, 137–150.
24. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 2016; 85(1): 47-64
25. Pegg DE. Principles of Cryopreservation. *Cryopreserv. Free. Dry. Protoc*. 2015, 1257, 3–19
26. Isachenko V, et al. Vitrification of Human ICSI/IVF Spermatozoa without Cryoprotectants: New Capillary Technology. *J. Androl*. 2012:33, 462–468,
27. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of Sperm: Indications, Methods and Results. *J. Urol*. 2003, 170, 1079–1084.
28. Kidd SA, et al. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertility and Sterility*2001; 75(2):237-48
29. Ozkavukcu S, et al. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2008; 25:403-11
30. Barratt CLR, et al. special interest group for andrology basic semen analysis course: A continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Hum. Reprod*. 2011, 26, 3207–3212.
1. Hezavehei, et.al. Sperm servation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed. Online*, 2018:37(3); 327-39
2. Ram Dayal, et al. Effect of Semen Freezing and Thawing on Sperm Survival and Motility Rate: A Comparative Analysis 2021:511-517
3. Surg Lt, et al. Study of human sperm motility post cryopreservation. *Medical Services, Armed Forces*.2014:349-353
4. Majzoub A, Agarwal A. Antioxidants in sperm cryopreservation. *Male Infertility*. 2020:671-8
5. Albrizio M, et al. Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. *Theriogenology*. 2015: 83(3): 421-9
6. Benson, J, et al. The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology* 2012: 78, 1682–1699.
7. Amidi F, Pazhohan A, et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*. 2016: 17(4): 745–756.
8. Bateni Z, Azadi L, et al. Addition of Tempol in semen cryopreservation medium improves the post-thaw sperm function. *Syst Biol Reprod Med*. 2014: 60 (4): 245-50.
9. Azadi L, Tavalae M, et al. Effects of Tempol and Quercetin on Human Sperm Function after Cryopreservation. *Cryo Letters*. 2017: 38(1):
10. Sanja Ozimic, et al. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls *Mol. Biol*. 2023:45, 4716–4734
11. Di Santo, et al. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol*, 2012: 854837.
12. Anger JT, et al. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. *J. urol*. 2003:.170(4); 1079-84
13. Justice T, Christensen G. Sperm cryopreservation methods. *Spermatogenesis*. 2013: 209-15.
14. Martins, et al. Sperm cryopreservation. *In vitro fertilization*: 2019: 625-42
15. Said TM, et al. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online*. 2010: 21(4): 456-62

31. Björndahl, L. The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J. Androl.* 2010, 12, 33–35.
32. O’Connell M, et al. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum. Reprod.* 2002, 17, 704–709.
33. Flores E, et al. Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. *theriogenology*.2010.;74(3):354-63
34. Agha-Rahimi A, et al. Cryoprotectant-free, vitrification of human spermatozoa in new artificial seminal fluid. *Andrology.* 2016; 4(6): 1037-1044
35. Tavalae M, et al. Effect of varicocele on sperm functional characteristics and DNA methylation. *Andrologia.* 2015; 47(8): 904-9
36. Karakus, FN, et al. Effect of curcumin on sperm parameters after the cryopreservation. *Eur. J. Obstet. Gynecol Reprod. Biol.* 2021, 267, 161–166.
37. Naeini ZK, et al. Evaluation of ebselen supplementation on cryopreservation medium in human semen. *Iran J Reprod Med* 2014; 12:249–56
38. Rarani FZ, et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin/DNA damage before and after cryopreservation and the effect of folic acid and nicotinic acid on post-thaw sperm quality in normozoospermic men. *Cell Tissue Bank* 2019; 28:1-12an abscess. *Arch Gynecol Obstet.* 1997;261(1):55-8.