

کاربرد نانولیپوزوم‌ها در انجماد اسپرم

طوبی ندری^{۱*}، آرمین توحیدی^۲، سعید زین الدینی^۲، غلامحسین ریاضی^۴، مهدی ژندی^۲، محسن شرفی^۵
^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی دام پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
^۲ دانشیار گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،
^۳ استاد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران،
^۴ استاد گروه بیوشیمی دانشگاه تهران
^۵ استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.
 *نویسنده مسئول: T.nadri@ut.ac.ir

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی استفاده از لیپوزوم‌های لسیتین سویا در انجماد اسپرم حیوانات اهلی است. لیپوزوم‌ها، غشاهای فسفولیپیدی دولایه و مشابه غشای سلول هستند که می‌توانند به خوبی از اسپرم طی فرآیند انجماد و ذوب محافظت کنند. لیپوزوم‌ها طی فرایند انجماد و ذوب با پوشش اسپرم یا انتقال فسفولیپید به غشای سلول، از آن محافظت می‌کنند. محققین امکان استفاده از لیپوزوم‌ها را در زمینه‌های مختلفی از جمله، فن‌آوری تولیدمثل حیوانات، به‌عنوان الگوی غشای سلول اسپرم، حاملی برای ترکیبات ناپایدار و به‌عنوان یک محافظ انجمادی برای اسپرم نشان داده‌اند. از لیپوزوم‌ها برای درمان بیماری‌هایی مانند سرطان نیز استفاده می‌شود. همچنین، لیپوزوم‌ها به دلیل دارا بودن دو لایه لیپیدی، قادر به درون‌پوشانی آنتی‌اکسیدان‌های آب‌دوست و آب‌گریز هستند. فسفولیپیدهای دولایه لیپوزوم مکانی برای درون‌پوشانی داروهای آبیگریز است. انکپسولاسیون داروها در این بخش سبب کاهش حرکت و رهایش آهسته آن‌ها می‌شود. به‌طور کلی، لیپوزوم‌ها می‌توانند نقش محافظتی برای اسپرم طی انجماد و ذوب داشته باشند.

کلمات کلیدی: انجماد اسپرم، لیپوزوم، تلقیح مصنوعی، رقیق‌کننده

مقدمه

یک انجماد اسپرم موفق، بازدهی تلقیح مصنوعی را افزایش می‌دهد. همچنین، با ذخیره طولانی مدت اسپرم، امکان استفاده از اسپرم حیوانات نر با ارزش ژنتیکی بالا و انتقال آن به فواصل دور میسر می‌شود. امروزه، صنعت انجماد اسپرم برای دام‌های مهم مزرعه‌ای از جمله گاو، گسترش یافته است. اگرچه، از انجماد اسپرم می‌توان برای تهیه بانک ژنتیکی به منظور حفظ تنوع زیستی گونه‌های در معرض انقراض استفاده کرد (بیلی و همکاران، ۲۰۰۰). امروزه، برای بسیاری از حیوانات از جمله گوسفند و بز، انجماد اسپرم موثر و موفقی وجود ندارد؛ زیرا، تعداد زیادی از اسپرم‌ها به دنبال فرآیند انجماد و ذوب نابارور می‌شوند (توکر و همکاران، ۲۰۱۱؛

بهبود ژنتیکی گونه‌های مهم کشاورزی و کنترل بیماری‌ها، اهمیت اساسی در پایداری و پیشرفت صنعت غذا و کشاورزی دارند. در صنعت دامپروری، تلقیح مصنوعی مهمترین تکنیک کمک تولیدمثلی برای پیشرفت در تولید محصولات دامی است. به‌منظور به حداکثر رساندن توزیع زن‌های مطلوب با استفاده از تلقیح مصنوعی، یک انزال از یک حیوان نر با ارزش ژنتیکی بالا می‌تواند برای تلقیح چندین حیوان ماده استفاده شود (بیلی و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین، تلقیح مصنوعی با کاهش ارتباط بین حیوانات، گسترش بیماری‌های جنسی را نیز کاهش می‌دهد.



هزاوهی و همکاران، ۲۰۱۸؛ مدینالئون و همکاران، ۲۰۱۹). حفظ انجمادی اسپرم آسیب‌های غیر قابل برگشت و فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی را در غشای اسپرم و همچنین غشای میتوکندری و هسته به وجود می‌آورد (بوکاک و همکاران، ۲۰۱۰؛ سعید و همکاران، ۲۰۱۰؛ ساکاس و آلوارز، ۲۰۱۰) که در نتیجه آن زنده‌مانی اسپرم بعد از انجماد-ذوب تحت تاثیر قرار می‌گیرد. این آسیب‌ها اصولاً شامل آسیب به غشاهای اسپرم (غشای پلاسمایی، آکروزومی و غشای میتوکندری)، اسکلت سلولی و هسته، قطعه قطعه شدن و آسیب به DNA است. غشاهای پلاسمایی، آکروزومی و میتوکندریایی طی فرآیند انجماد-ذوب آسیب‌پذیری بیشتری را از خود نشان می‌دهند.

مطالعات نشان داده است که پس از فرآیند انجماد و ذوب تغییرات دینامیکی غیر قابل برگشتی در غشاء اتفاق می‌افتد و سیالیت غشای اسپرم دستخوش تغییر می‌گردد (بیلی و همکاران، ۲۰۰۰). طی انجماد اسپرم، کاهش جنبایی، تغییر در الگوی حرکت اسپرم، کاهش نرخ سوخت و ساز اسپرم، کاهش یا افزایش ترکیبات درون سلولی و کاهش سرعت انتقال اسپرم به جایگاه لقاح دیده می‌شود (تامسون و همکاران، ۲۰۱۰). بنابراین در چنین شرایطی، نرخ آبستنی کاهش می‌یابد (ساکاس و آلوارز، ۲۰۱۰). اسپرم‌ها طی فرآیند انجماد، در معرض تنش‌هایی در اثر برهم کنش آب و مواد محلول و تشکیل بلورهای یخ در داخل و خارج از غشای پلاسمایی اسپرم قرار می‌گیرند. زمانی که اسپرم‌ها پیش از انجماد در محیط‌های هایپراسموتیک قرار می‌گیرند، آب درون سلولی خود را از دست می‌دهند و در پی آن، چروکیده می‌شوند، ولی هنگام یخ‌گشایی، ورود آب به سلول موجب پاره شده غشای سلولی می‌شود (بوکاک و همکاران، ۲۰۱۰).

اثر انجماد بر سامانه آنتی‌اکسیدانی اسپرم

اسپرم در معرض تنش‌های اکسیداتیو زیادی از جمله شوک سرمایی قرار دارد. تنش‌های اکسیداتیو رادیکال‌های آزاد زیادی تولید می‌کنند که مسئول آسیب‌های سلول هستند (گالاردو، ۲۰۰۷؛ ساکاس و آلوارز، ۲۰۱۰).

همچنین، فرآیند انجماد منجر به کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم می‌شود و آن را برای آسیب‌های ناشی از ROS (Reactive Oxygen Species) مستعد می‌سازد (لاسو و همکاران، ۱۹۹۴). گلووتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید

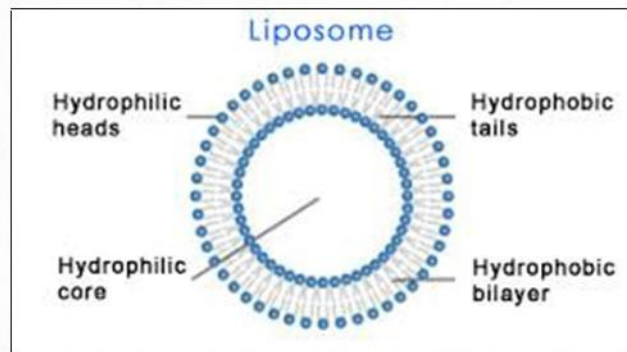
دیسموتاز سامانه دفاعی اسپرم هستند که آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداسیون را کم می‌کنند. دیده شده که در شرایط تنش سرمایی میزان سوپراکسید دیسموتاز (بوکاک و همکاران، ۲۰۱۰؛ لاسو و همکاران، ۱۹۹۴) و گلووتاتیون پراکسیداز منی کم می‌شود که این خود آسیب‌های ناشی از تنش سرمایی بر اسپرم را زیاد می‌کند (گادیا و همکاران، ۲۰۰۴). لذا جهت افزایش زنده‌مانی، سلامت غشای پلاسمایی و غشای میتوکندری، جلوگیری از خروج سیتوکروم C از میتوکندری، حفظ تراکم و سلامت DNA و مهار آپوپتوز بایسته است که از راهکارهای جدیدی جهت تحقق این امر استفاده شود، تا علاوه بر حفظ ریخت‌شناختی اسپرم، آسیبی به ژنوم اسپرم‌ها نیز وارد نشود.

بنابراین، احتمالاً با استفاده از انتقال آنتی‌اکسیدان به اسپرم می‌توان با مهار بیشتر رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اکسیداسیون فسفولیپیدهای غشاهای زیستی اسپرم، در نتیجه حفظ پتانسیل نفوذپذیری آن‌ها، از وارد آمدن آسیب به غشاهای میتوکندری و کروماتین جلوگیری کرده و سبب افزایش زنده‌مانی اسپرم و حفظ کیفیت ژنوم می‌شود و به دنبال آن، افزایش نرخ باروری و یک آبستنی موفق را به دنبال خواهد داشت.

معرفی لیپوزوم‌ها و ویژگی‌های آن‌ها

لیپوزوم‌ها ساختارهای وزیکولی دو لایه لیپیدی هستند که توانایی ادغام با غشای سلول را دارند و بعد از ادغام ساختار لیپیدی آن‌ها با غشاء سلول، تمام محتویات داخل این وزیکول‌ها به سلول منتقل می‌شوند. لیپوزوم‌ها به دلیل داشتن ساختاری ساده و خودسامانده و در ضمن کم‌هزینه بودن ساخت آن‌ها توجه اذهان را به خود متوجه ساخته‌اند. شباهت زیاد این ساختارها به غشای سلولی، محققین را بر آن داشت تا از لیپوزوم‌ها به عنوان مدلی برای مطالعه عملکرد غشاهای سلولی بهره گیرند.

اطلاعات گسترده‌ای از خصوصیات و ساخت این وزیکول‌های دو لایه در دسترس است، که می‌توان در طراحی سامانه‌های انتقال دارو به کار گرفت (رمضانی و همکاران، ۲۰۱۳). خصوصیات منحصر به فرد لیپوزوم‌ها مانند اندازه کوچک، زیست تخریب‌پذیر بودن، خصوصیات آبدوست و آبگریز و سمیت پایین آن‌ها سبب شده است تا در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرند (وان تران و همکاران، ۲۰۱۹). ساختار لیپوزوم‌ها مطابق شکل ۱ می‌باشد.



شکل ۱- ساختار لیپوزوم

کاربرد نانولیپوزوم در انجماد اسپرم

اثر حفاظتی لیپوزوم‌ها از سلول در طول انجماد-ذوب برای اولین بار در اسپرم کشف شد (روپکه و همکاران، ۲۰۱۱). تحقیقات اخیر روی لیپوزوم‌ها امکان استفاده از آن‌ها را در زمینه‌های مختلفی از جمله، فن‌آوری تولیدمثل حیوانات، بعنوان الگویی از غشای سلول اسپرم، حامی برای ترکیبات ناپایدار، محافظت کننده انجمادی گامت و جنین و نیز در حیوانات تراریخته نشان داده است (گرا، ۲۰۱۰). لیپوزوم‌ها از فسفولیپیدهای مختلفی تشکیل شده‌اند که می‌توانند از اسپرم در طول انجماد-ذوب محافظت کنند (پیل و همکاران، ۲۰۱۲). تعامل بین اسپرم و اجزای تشکیل دهنده رقیق کننده هنوز کاملاً روشن نشده است اگرچه، سازوکار پیشنهادی برای توضیح محافظت انجمادی لیپوزوم‌ها از اسپرم در طول انجماد-ذوب، اتصال قابل برگشت فسفولیپیدهای خارجی لیپوزوم به غشای پلاسمایی اسپرم و همچنین پوشش اسپرم حین فرآیند انجماد و ذوب بیان شده است (پیل و همکاران، ۲۰۱۲). این مشاهدات، منجر به فرضیه حفاظت نهایی اسپرم از طریق پوشش شد. بنابراین، لیپوزوم‌ها باید روی غشای پلاسمایی قرار گرفته و غشاء را محصور کنند (پیل و همکاران، ۲۰۱۲). از طرفی، تعامل بین لیپوزوم و سلول سبب تسهیل انتقال کلاسترول و لیپید و نیز بازآرایی اجزای غشای سلول و در نتیجه ثبات سلول‌ها در طی انجماد می‌شود (روپکه و همکاران، ۲۰۱۱).

در مطالعه‌ای، استفاده از لیپوزوم‌های تشکیل شده از فسفاتیدیل کولین زرده تخم‌مرغ، سبب تغییر فاز انتقال لیپیدهای غشای اسپرم شد و حساسیت اسپرم به سرما و انجماد را کاهش داد و شواهدی مبنی بر ارتباط خود به خودی لیپوزوم‌ها و اسپرم ارائه شده است (زیرئون و همکاران، ۲۰۰۲). در پژوهش‌های دیگر اثرات مفید مکمل کردن محیط‌های انجمادی اسپرم با لیپوزوم‌ها برای انجماد اسپرم اسب گزارش

شده است (پیل و همکاران، ۲۰۱۲؛ مدینالئون و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، اثر لیپوزوم‌های تک‌لایه مختلف بر انجماد اسپرم گاو مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان دادند که مکمل‌سازی لیپوزوم‌های فسفاتیدیل کولین غیراشباع تخم‌مرغ با فسفاتیدیل گلیسرول سبب افزایش حرکت پیش‌رونده اسپرم شد (روپکه و همکاران، ۲۰۱۱). اگرچه، گزارش‌هایی نیز وجود دارد که افزودن لیپوزوم به اسپرم ذوب شده گاو، سبب القا واکنش آکروزومی و افزایش ظرفیت لقاح می‌گردد (گرا، ۲۰۱۰).

نتیجه‌گیری

هدف این مطالعه، مروری بر استفاده از لیپوزوم‌ها در انجماد اسپرم حیوانات اهلی است. از لیپوزوم‌های حاوی آنتی‌اکسیدان می‌توان با هدف مهار و حذف رادیکال‌های آزاد داخل سلول، جلوگیری از آسیب به DNA، حفظ سلامت و نفوذپذیری غشای پلاسمایی و میتوکندریایی، مهار کاسپازها، مهار آپوپتوز در اسپرم و در نهایت کاهش مرگ سلول‌های اسپرم استفاده شود. استفاده از نانولیپوزوم‌ها، راهکاری نوین در انجماد اسپرم برای افزایش کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد و ذوب می‌باشد.

منابع:

- Bailey, J.L., Blodeau, J.F., Cormier, N., (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon minireview. *Journal of Andrology* 21, 1-7.
- Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sarıözkan, S., Başpınar, N., Taşpınar, M., Çoyan, K., Bilgili, A., Akalın, P.P., Büyükleblebici, S., Aydos, S., (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology* 61, 248-253.
- Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., Ruiz, S., (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62, 690-701.

Sakkas, D., Alvarez, J.G., (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and Sterility* 93, 1027-1036.

Toker, M.B., Alcay, S., Gokce, E. and Ustuner, B., (2016). Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology*, 72(3), pp.205-209.

Thomson, L.K., Fleming, S.D., Barone, K., Zieschang, J.-A., Clark, A.M., (2010). The effect of repeated freezing and thawing on human sperm DNA fragmentation. *Fertility and Sterility* 93, 1147-1156.

Van Tran, V., Moon, J.-Y., Lee, Y.-C., 2019. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. *Journal of Controlled Release*.

Zeron, Y., Tomczak, M., Crowe, J., Arav, A., (2002). The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* 45, 143-152.

Gallardo, J.M., (2007). Evaluation of antioxidant system in normal semen. *Revista de investigación clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion* 59, 42-47.

Grad, I., (2010). Liposomes in gamete and embryo biotechnology. *Annals of Animal Science* 10, 3-8.

Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H.M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmacili, V. and Shahverdi, A., (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive Biomedicine Online*.

Lasso, J.L., Noiles, E.E., Alvarez, J.G., Storey, B.T., (1994). Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology* 15, 255-265.

Medina-León, A.Z., Domínguez-Mancera, B., Cazalez-Penino, N., Cervantes-Acośla, P., Jácome-Sosa, E., Romero-Salas, D., Barrientos-Morales, M., (2019). Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. *Austral Journal of Veterinary Sciences* 51, 119-123.

Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magiśtrini, M., (2012). Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77, 268-279.

Ramezani, R., Sadeghizadeh, M., Behmanesh, M., Hosseinkhani, S., (2013). Characterization of Zwitterionic Phosphatidylcholine-Based Bilayer Vesicles as Efficient Self-Assembled Virus-Like Gene Carriers. *Molecular Biotechnology* 55, 120-130.

Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H., Wolkers, W., (2011). Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology* 76, 1465-1472.

Said, T.M., Gaglani, A., Agarwal, A., (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive Biomedicine Online* 21, 456-462.

Application of liposomes in the sperm cryopreservation

Touba Nadri^{1*}, Armin Towhidi², Saeed Zeinoaldini³, Gholam Hossein Riazi⁴, Mehdi zhandi², Mohsen Sharafi⁵

¹ Ph.D. Candidate of Animal physiology, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

² Associate Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

³ Professor, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

⁴ Professor, IBB Center, University of Tehran, Tehran, Iran

⁵ Assistant Professor of Animal Physiology, Tarbiat Modares University, Department of Animal science, Tehran, Iran

*Corresponding Author E-mail: T.nadri@ut.ac.ir

Abstract

The aim of this study was to evaluate the use of soybean lecithin liposomes in cryopreservation of animal sperm. Liposomes are bilayer phospholipid membranes and they are similar to cell membranes. Liposomes can protect the sperm membrane by sperm coating or phospholipid transferring during the freeze-thawing process. Researches have shown the possibility of using liposomes from different aspects, including animal reproduction technology, a model of sperm cell membrane, a carrier for unstable compounds and a sperm cryoprotectant. Liposomes are also used to treat diseases such as cancer. Also, liposomes can encapsulate hydrophilic and hydrophobic antioxidants because of their two lipid layers. The liposome bilayer phospholipids are a place for the encapsulation of hydrophobic drugs. Encapsulation of drugs in this part decreases their movement and lead to their slow releasing. Therefore, liposomes can have a protective role for sperm during the freezing and thawing process.

Keyword(s): Sperm freezing, Liposome, Artificial insemination, Extender