مروری بر کاربرد ریزسیالات در آماده‌سازی گامت برای درمان ناباروری

احسان نباتی[۱‡]، یوسف محمدی[۲‡]، مریم سعادتمند[۳*]

۱و۲ - کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

۳- دانشیار دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف

‡ این نویسندگان به یک اندازه همکاری داشته‌اند.

پیام‌نگار[۱]: m.saadatmand@sharif.edu

چکیده:

ناباروری یکی از چالش‌های عمده سلامت جهانی است که علی رغم کارایی روش‌های رایج درمانی، محدودیت‌هایی نظیر استرس مکانیکی و عدم بهره‌گیری از فیلترهای طبیعی بدن را به همراه دارند. این مقاله کاربرد فناوری ریزسیالات در آماده‌سازی سلول‌های جنسی برای غلبه بر این محدودیت‌ها را مرور می نماید. سامانه‌های ریزسیالی با بهره‌گیری از مکانیزم‌های بیولوژیکی رئوتاکسی، تیگموتاکسی، کموتاکسی و ترموتاکسی، امکان جداسازی انتخابی و غیرتهاجمی اسپرم‌های با کیفیت و سالم را فراهم می‌کنند. همچنین این فناوری با شبیه‌سازی دقیق‌تر محیط فیزیولوژیک، فرآیندهای حساسی نظیر دینوداسیون بدون آنزیم و بلوغ آزمایشگاهی تخمک را با کاهش آسیب‌های سیتوپلاسمی و حفظ یکپارچگی ژنتیکی بهینه‌سازی می‌کند. در نهایت، کشت پویا جنین در سامانه‌های ریزسیالی، با تأمین پیوسته مواد مغذی و حذف ضایعات متابولیک، نرخ موفقیت لقاح و تشکیل بلاستوسیست را نسبت به روش‌های استاتیکی افزایش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: ریزسیالات، ناباروری، اسپرم، تخمک، مکانیزم‌های شبه درون‌تنی

[۱] * تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

Microfluidic Techniques for Gamete Preparation in Infertility Treatment: A Review

E. Nabati[1‡], Y. Mohammadi[2‡], M. Saadatmand[3*]

1,2- M. Sc. of Chemical Engineering, Sharif University of Technology

3- Associate Professor of Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology

‡ These authors contributed equally to this work.

Email: m.saadatmand@sharif.edu

Abstract

Infertility remains a significant global health challenge, and while conventional assisted reproductive technologies (ARTs) are effective, they are often limited by mechanical stress and the bypassing of natural physiological selection barriers. This review examines the application of microfluidics to prepare gametes, offering a solution to these limitations. By leveraging biological mechanisms such as rheotaxis, thigmotaxis, chemotaxis, and thermotaxis, microfluidic systems enable the non-invasive, selective isolation of high-quality sperm. Furthermore, this technology mimics the *in vivo* environment more accurately, optimizing sensitive processes like enzyme-free oocyte denudation and in vitro maturation (IVM). This approach minimizes cytoplasmic damage and preserves genetic integrity. Finally, dynamic embryo culture on microfluidic platforms may provide a continuous supply of nutrients and efficient removal of metabolic waste, thereby enhancing fertilization rates and blastocyst formation compared to static methods.

Keywords: Microfluidics, Infertility, Sperm, Oocyte, in vivo-like mechanisms

۱- مقدمه

طبق تعریف سازمان جهانی بهداشت، ناباروری به عنوان ناتوانی در بارداری پس از حداقل یک سال رابطه جنسی محافظت نشده، تعریف شده است. بر اساس آخرین برآوردهای سازمان جهانی بهداشت، از هر شش نفر، یک نفر در طول زندگی خود ناباروری را تجربه می‌کند [۱]. به طور کلی، تقریباً ۵۰٪ موارد ناباروری به عوامل زنانه، ۳۰٪ به عوامل مردانه و ۲۰٪ به ترکیب عوامل زن و مرد مربوط است [۲, ۳]. بر اساس گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت، ناباروری مردان را می توان به برخی از ویژگی‌های منی، از جمله تعداد کم اسپرم، زنده‌مانی (زنده یا مرده بودن اسپرم)، تحرک (توانایی کلی اسپرم‌ها برای حرکت کردن)، مورفولوژی طبیعی (ساختار فیزیکی و شکل استاندارد سلول) و یکپارچگی DNA نسبت داد [۴]. اسپرم‌ها باید از قسمت‌های مختلف از جمله واژن، دهانه رحم، رحم، محل اتصال رحم به لوله و لوله فالوپ عبور کنند. در طول این مسیر، اسپرم با اپیتلیوم و مایع مجرا[۲] تعامل دارد که می‌تواند بر حرکت و عملکرد آنها تأثیر بگذارد [۵].

تخمک[۳] نیز به‌عنوان سلول جنسی ماده (گامت)، یکی از اساسی‌ترین اجزای فرآیند تولیدمثل انسان محسوب می‌شود و نقش تعیین‌کننده‌ای در موفقیت لقاح و تکوین اولیه جنین دارد. این سلول طی فرآیند پیچیده تخمک‌زایی در تخمدان‌ها شکل گرفته و تحت کنترل دقیق محور هورمونی هیپوتالاموس–هیپوفیز–تخمدان به بلوغ نهایی می‌رسد [۶]. تخمک بالغ حاوی مجموعه کاملی از مواد ژنتیکی و ذخایر سیتوپلاسمی است که برای تقسیمات اولیه جنینی ضروری هستند. کیفیت ساختاری و عملکردی تخمک تأثیر مستقیمی بر نرخ لقاح، رشد جنین و موفقیت روش‌های کمک‌باروری دارد [۷]. بنابراین، حفظ سلامت تخمک در مراحل پیش از لقاح از اهمیت بالایی برخوردار است.

در بسیاری از موارد ناباروری مردان، مشکلات مربوط به کیفیت یا کمیت مایع منی نقشی مهم دارند و اختلالات مختلفی می‌توانند سبب کاهش توان باروری شوند [۸]. از جمله این بیماری‌ها می‌توان به کم‌نطفگی یا الیگواسپرمی، آزواسپرمیا، هیپواسپرمیا، بی‌نطفگی یا آنوزواسپرمیا، استِنوزواسپرمیا و تِراتواسپرمیا اشاره کرد. همچنین برای استفاده از روش های کمک باروری، به انتخاب دقیق سلول اسپرم از نمونه خام اولیه و آماده‌سازی تخمک نیاز است که روش های مبتنی بر ریزسیالات نقش اساسی برای حل چنین چالش‌هایی ایفا می‌کنند [۹ و۱۰]. پژوهش‌های مروری اخیر در این حوزه نشان می‌دهند که روش جداسازی در ناحیه فشرده جریان به یکی از رویکردهای کلیدی در جداسازی ذرات و سلول‌ها در سامانه‌های ریزسیالی تبدیل شده است. این روش از حیث مبانی نظری، طراحی کانال و دامنه کاربرد، پیشرفت‌های چشمگیری به همراه داشته است [۱۱]. همچنین، نشان

---

[۲] Luminal Fluid

[۳] Oocyte

داده شده است که ترکیب این رویکرد با نیروهای دی‌الکتروفورزی[۴] و مگنتوفورزی[۵]، دقت جداسازی پیوسته سلول‌ها را به‌طور چشمگیری افزایش داده و کارایی سامانه را در کاربردهای زیست‌پزشکی و تشخیصی ارتقا می‌بخشد [۱۲]. از سوی دیگر، پژوهش‌های اخیر بر ریزکانال‌های مارپیچی[۶] در سامانه‌های دیسکی نشان می‌دهند که هم‌افزایی نیروهای اینرسی[۷]، اثرات دورانی[۸] و دی‌الکتروفورزی می‌تواند تمرکزدهی ذرات و سلول‌ها را با دقت بسیار بالا فراهم آورد [۱۳]. افزون بر این، نتایج مدل‌سازی‌های عددی اخیر نشان می‌دهد که هندسه ریزکانال نقشی تعیین‌کننده در بهبود تمرکز اینرسی و جداسازی انتخابی اجزای خونی دارد و بهینه‌سازی آرایش کانال می‌تواند عملکرد جداسازی را به‌شکل چشمگیری ارتقا بخشد [۱۴و ۱۵]. برخلاف مرورهای پیشین که عمدتاً بر کاربردهای منفرد فناوری ریزسیالات، به‌ویژه جداسازی اسپرم، تمرکز داشته‌اند، مقاله حاضر دیدگاهی جامع و یکپارچه از کاربرد فناوری‌های ریزسیالات در مراحل مختلف فناوری‌های کمک‌باروری ارائه می‌دهد که شامل آماده‌سازی و جداسازی اسپرم، دینوداسیون تخمک، بلوغ آزمایشگاهی تخمک[۹]، ارزیابی کیفیت تخمک و کشت جنین است. افزون بر مرور پیشرفت‌های اخیر، این مقاله مکانیسم‌های زیستی مورد استفاده در سامانه‌های ریزسیالی را تشریح کرده، طراحی‌ها و کاربردهای مختلف این سامانه‌ها را با یکدیگر مقایسه می‌کند و در نهایت، چالش‌های موجود و فرصت‌های آینده برای انتقال بالینی پلتفرم‌های ریزسیالی زیست‌تقلید در درمان‌های کمک‌باروری را مورد بحث قرار می‌دهد.

۲- فیزیولوژی سلول های جنسی

همانطور که در شکل ۱-a مشخص است اسپرم از سه قسمت اصلی تشکیل شده است: سر، قسمت میانی و دم. سر اسپرم بخش قدامی است و یک هسته متراکم را احاطه کرده است که ماده ژنتیکی را به شکل کروموزوم های محکم بسته بندی شده لازم برای لقاح در خود جای می‌دهد. آکروزوم حاوی آنزیم‌هایی است که به اسپرم کمک می کند تا در طول لقاح به تخمک نفوذ کند. قسمت میانی، ناحیه مرکزی اسپرم است که بین سر و دم قرار دارد که حاوی غلظت متراکمی از میتوکندری است. قطعه میانی مسئول تولید انرژی مورد نیاز برای شنا و تحرک اسپرم است. دم که به عنوان تاژک نیز شناخته می‌شود، ساختار بلندی است که از قسمت میانی امتداد می‌یابد. دم وظیفه دارد اسپرم را از طریق یک حرکت شلاق‌مانند به جلو هدایت کند [۱۶و ۱۷].

تخمک بزرگ‌ترین سلول بدن بوده و در مرحلسه متافاز دوم میوز[۱۰] متوقف می‌شود. این سلول توسط لایه‌های محافظ احاطه شده است: داخلی‌ترین لایه، زونا پلوسیدا (یک پوشش گلیکوپروتئینی) و خارجی‌ترین لایه،

---

[۴] Dielectrophoresis (DEP)

[۵] Magnetophoresis

[۶] Spiral Microchannel

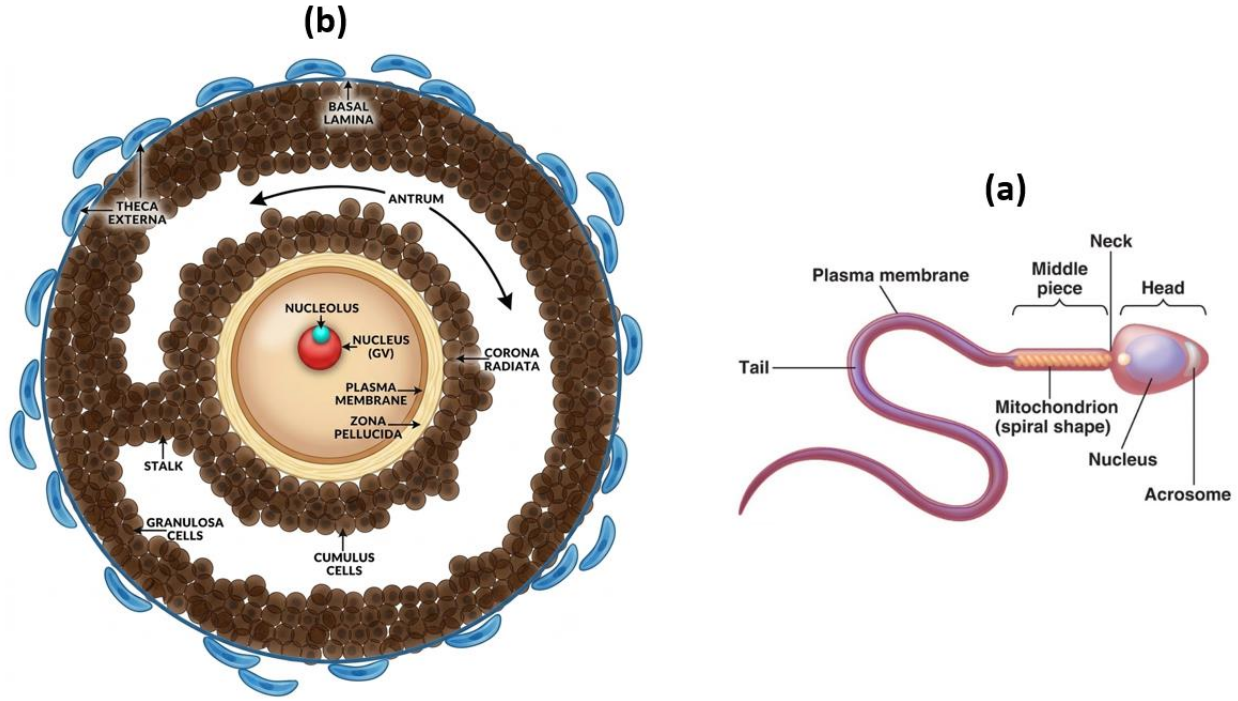
[۷] Inertial forces

[۸] Rotational effects

[۹] In vitro maturation (IVM)

[۱۰] Meiosis

سلول‌های کومولوس هستند (شکل ۱-b). سلول‌های کومولوس از طریق اتصالات شکاف‌دار، مواد مغذی و سیگنال‌های ضروری را به تخمک منتقل می‌کنند. فضای پری‌ویتلین بین تخمک و زونا پلوسیدا قرار داشته و جسم قطبی را در خود جای می‌دهد. وجود دوک میوزی[۱۱] سالم و جسم قطبی طبیعی، نشان‌دهنده بلوغ و کیفیت مطلوب تخمک است [۱۸–۲۱].



شکل ۱. بخش‌های مختلف سلول جنسی. (a) اسپرم [۲۲]. (b) تخمک [۲۱].

Figure 1. Different parts of the gamete cells. (a) Sperm cell [22]. (b) Oocyte [21].

۳- دستگاه تولید مثل زنانه

اسپرم‌های با قابلیت لقاح در طول انتقال اسپرم از طریق دستگاه تناسلی زن[۱۲] انتخاب می‌شوند. فرآیندهای انتخاب در سراسر دستگاه تناسلی زن، از جمله واژن، دهانه رحم، رحم، محل اتصال رحمی[۱۳]، لوله‌های فالوپ و توده کومولوس[۱۴] تکامل یافته است [۲۳]. لقاح مجموعه‌ای منظم از رویدادهای مولکولی و سلولی است که شامل نفوذ اسپرم به درون کومولوس، چسبندگی و اتصال اسپرم به زونا پلوسیدا، اگزوسیتوز آکروزوم و نفوذ اسپرم به زونا پلوسیدا می‌باشد. اسپرم با استفاده از آنزیم هیالورونیداز[۱۵]، سلول‌های کومولوس را رد کرده و به زونا پلوسیدا

[۱۱] Mitotic spindle

[۱۲] Female Reproductive Tract

[۱۳] Uterotubal Junction

[۱۴] Cumulus mass

[۱۵] Hyaluronidase

می‌رسد. در این مرحله، پروتئازهای سرین‌شبه تریپسین نظیر آکروزین، پروتئین‌های زونا پلوسیدا را تجزیه می‌کنند. در نهایت، اسپرم با غشای تخمک ادغام شده و محتوای ژنتیکی خود را وارد سیتوپلاسم می‌کند. ورود اسپرم باعث افزایش یون کلسیم و شکسته شدن توقف متافاز دو می‌گردد [۲۴و ۲۵].

۴- فناوری کمک باروری

لقاح آزمایشگاهی[۱۶] و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم[۱۷]، روش‌های درمان ناباروری هستند که در آن تخمک در خارج از بدن بارور می شود. در طی لقاح آزمایشگاهی، تخمک از تخمدان زن خارج می‌شود و در آزمایشگاه با اسپرم بارور می‌شود. تخم بارور شده که جنین نامیده می شود، برای رشد و نمو به رحم زن بازگردانده می‌شود تا لانه‌گزینی انجام شود. تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم یا میکرواینجکشن نیز مشابه روش لقاح آزمایشگاهی است با این تفاوت که اسپرم با کیفیت و قابل بارور توسط سوزن نازکی مستقیماً به داخل سیتوپلاسم تخمک تزریق می‌شود [۲۶].

۵- روش‌های جداسازی سلول اسپرم

۵-۱- روش‌های متداول جداسازی سلول اسپرم

انتخاب اسپرم به طور معمول به صورت روزانه در آزمایشگاه‌های فناوری کمک باروری در سراسر جهان انجام می‌شود. دو تکنیک مرسوم شناورسازی[۳] و سانتریفیوژ گرادیان چگالی[۴] به عنوان روش‌های کلینیکی شناخته می‌شوند [۲۷].

۵-۱-۱- روش شناورسازی

در این روش، نمونه منی ابتدا سانتریفیوژ می‌شود تا اسپرم‌ها از پلاسمای منی جدا شوند. سپس، لایه‌ای از محیط کشت غنی شده بر روی رسوب اسپرم اضافه می‌شود. اسپرم‌های با حرکت پیشرونده قادر خواهند بود از این لایه عبور کنند و به لایه بالایی شنا کنند [۲۸]. این اسپرم‌های فعال سپس جمع‌آوری شده و برای استفاده در فرآیندهای باروری آماده می‌شوند. این روش به دلیل سادگی و هزینه پایین محبوبیت دارد، اما ممکن است زمان‌بر باشد و درصد جداسازی متوسطی داشته باشد (شکل ۲-a).

---

[۱۶] In-Vitro Fertilization (IVF)

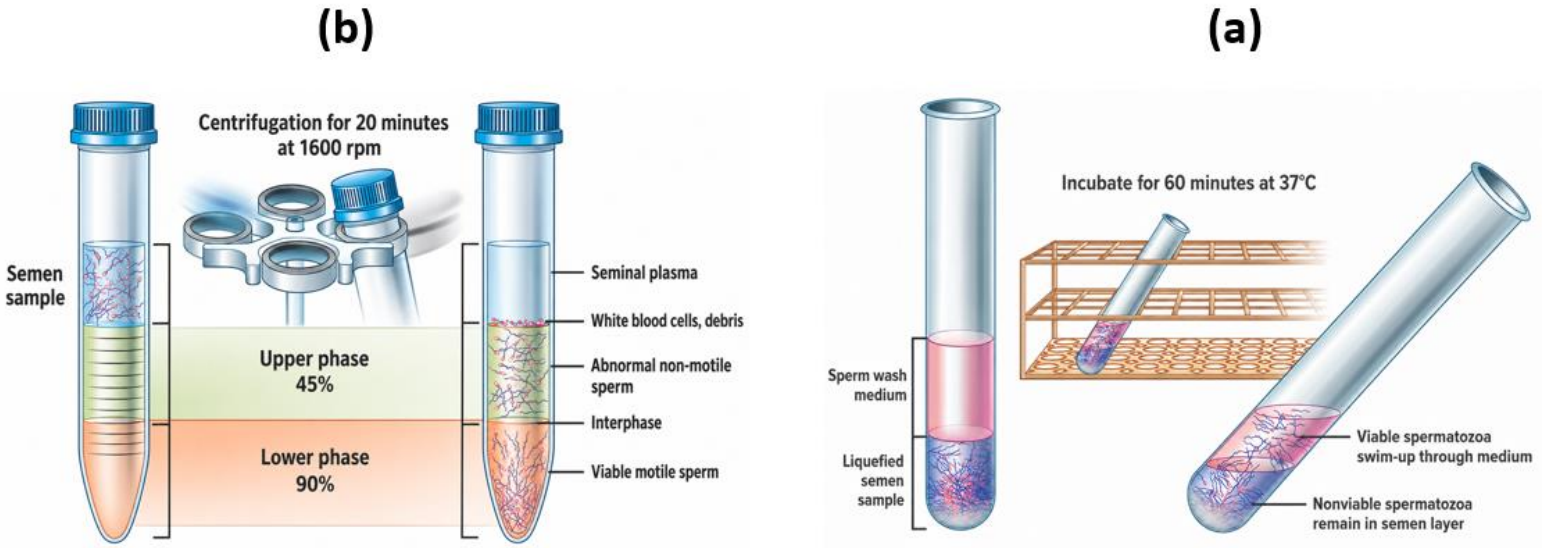
[۱۷] Intra-Cytoplasmic Sperm Injection **(**ICSI**)**

[۳] Swim-up

[٤] Density Gradient Centrifugation (DGC)

۵-۱-۲- روش سانتریفیوژ گرادیان چگالی

یکی دیگر از روش‌های کمک باروری، روش سانتریفیوژ گرادیان چگالی است که با استفاده از نیروی گریز از مرکز، سلول‌های اسپرم را بر اساس چگالی جدا می‌کند. همانطور که در شکل ۲-b نشان داده شده است، اسپرم‌ها در یک محیط با گرادیان چگالی قرار داده می‌شوند و سپس سانتریفیوژ می‌شوند. چگالی در بالای لوله کمتر و در پایین لوله بیشتر است. اسپرم‌های با تحرک بیشتر به پایین لوله مهاجرت می‌کنند [۲۹].



شکل ۲. شماتیک دو روش مرسوم کلینیکی جداسازی اسپرم [۳۰]. (a) شناورسازی ، (b) سانتریفیوژ گرادیان چگالی.

Figure 2. Schematic of the two conventional clinical sperm separation methods [30]. (a) Swim-up, (b) Density gradient centrifugation.

در حال حاضر، تکنیک‌های مورد استفاده برای انتخاب اسپرم برای فناوری کمک باروری نیاز به چندین مرحله شستشوی اسپرم برای جداسازی اسپرم زنده دارد. بیشتر پروتکل‌ها برای جداسازی اسپرم متحرک به دانسیته اسپرم (سانتریفیوژ گرادیان چگالی) و یا تحرک اسپرم (شناورسازی) تکیه دارند. با وجود کاربرد گسترده و اثربخشی نسبی این روش‌ها در افزایش غلظت اسپرم‌های متحرک، هر یک دارای محدودیت‌هایی هستند که می‌تواند بر کیفیت نهایی اسپرم‌های انتخاب‌شده تأثیر بگذارد. از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به افزایش احتمال آسیب به DNA اسپرم و بروز شکستگی‌های DNA (میزان آسیب در ماده ژنتیکی داخل سر اسپرم)، تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (تولید رادیکال‌های آزاد) در اثر مراحل سانتریفیوژ و آماده‌سازی نمونه، و در نتیجه کاهش کیفیت عملکردی اسپرم اشاره کرد. علاوه بر این، این روش‌ها قادر به شبیه‌سازی فرآیند انتخاب طبیعی اسپرم نیستند؛ فرآیندی که به طور طبیعی در دستگاه تولیدمثل زن رخ می‌دهد و طی آن تنها اسپرم‌هایی با تحرک،

سلامت ژنتیکی و توان بارورسازی بالاتر موفق به رسیدن به محل لقاح می‌شوند [۳۱]. در شرایط طبیعی، انتخاب اسپرم در دستگاه تولیدمثل زن یک فرآیند چند مرحله‌ای و بسیار اختصاصی است که تنها بر اساس تحرک اسپرم انجام نمی‌شود. پس از انزال، بخش عمده‌ای از اسپرم‌ها در محیط اسیدی واژن، مخاط دهانه رحم و پاسخ ایمنی دستگاه تناسلی حذف می‌شوند. سپس اسپرم‌های باقی‌مانده برای عبور از رحم و لوله فالوپ باید توانایی شنا در برابر جریان مایعات، عبور از کانال‌های باریک و پاسخ مناسب به سیگنال‌های شیمیایی و حرارتی را داشته باشند. علاوه بر این، برهم‌کنش اسپرم با اپیتلیوم لوله فالوپ، اتصال موقت به سلول‌های این ناحیه، وقوع ظرفیت‌یابی[۱]، افزایش تدریجی تحرک[۲] و پاسخ به عوامل شیمیایی ترشح‌شده از تخمک و سلول‌های کومولوس همگی در انتخاب اسپرم‌هایی با سلامت عملکردی و ژنتیکی بالاتر نقش دارند [۳۲]. در مقابل، روش‌های متداولی مانند شناورسازی و سانتریفیوژ گرادیان چگالی عمدتاً بر ویژگی‌هایی نظیر تحرک یا چگالی تکیه دارند و قادر به بازسازی این ریزمحیط پیچیده و مکانیسم‌های انتخاب طبیعی نیستند. ازاین‌رو، ممکن است اسپرم‌هایی انتخاب شوند که اگرچه از تحرک مناسبی برخوردارند، اما از نظر بلوغ عملکردی، سلامت DNA، وضعیت ظرفیت‌یابی یا توانایی پاسخ به سیگنال‌های فیزیولوژیک، کیفیت مطلوبی نداشته باشند. مهمترین نگرانی در مورد رویکردهای بالینی فعلی این است که آنها تقریباً تمام موانع طبیعی که اسپرم در داخل بدن با آن‌ها روبرو می‌شود را دور می‌زند [۳۳و ۳۴]. شواهد جدید حاکی از اهمیت فرایند انتخاب اسپرم در فناوری‌های کمک باروری بر سلامت فرزندان است [۳۵]. یافتن روشی که از طریق آن انتخاب و جداسازی اسپرم به سمت مکانیزم‌های طبیعی بدن نزدیک‌تر شود، موضوع مهمی است. ثابت شده است که اسپرم دارای رفتارهایی مانند رئوتاکسی[۳] (حرکت سلول در خلاف جهت جریان)، کموتاکسی[۴] (حرکت سلول در جهت گرادیان شیمیایی)، ترموتاکسی[۵] (حرکت سلول در جهت گرادیان دما) و دنبال کردن مرز[۶] است [۳۶]. با این حال، استفاده از این مکانیزم‌ها در روش‌های معمول امکان‌پذیر نیست و نیاز به روش‌های نوین جداسازی سلول اسپرم احساس می‌شود.

۵-۲- روش نوین ریزسیالات

ریزسیالات علمی است که با حجم کم مایعات در مقیاس میکرولیتر تا پیکولیتر سروکار دارد. ریزسیالات و آزمایشگاه روی تراشه[۷] به دلیل قابلیت حمل، حساسیت بالا و فرصت‌هایی برای پردازش نمونه با توان بالا و موازی، در طیف گسترده‌ای از کاربردهای زیست‌پزشکی استفاده می‌شوند [۳۷و ۳۸]. ریزسیالات به عنوان یک سامانه سریع و اتومات برای جداسازی سلول ها و مطالعه عملکرد گامت[۸]، قادر به ارائه ریزمحیط‌های هندسی محدود است که

---

۱ Capacitation

۲ Hyperactivation

۳ Rheotaxis

۴ Chemotaxis

۵ Thermotaxis

۶ Boundary Following

۷ Lab on a Chip

۸ Gamete

محیط طبیعی درون‌تنی را تقلید می‌کند. برای یافتن روش‌های جداسازی جدید، از این سامانه‌ها برای مطالعه حرکت اسپرم، برهم‌کنش‌های آن‌ها با هندسه‌های ریز دستگاه تناسلی زنان، و رفتار مهاجرت آن‌ها در پاسخ به محرک‌های خارجی مانند جریان مایع یا گرادیان‌های شیمیایی استفاده شده است. رفتار دنباله‌روی مرزی و تمایل اسپرم به عبور از خطوط جریانی آرام در ریزسیالات برای ایجاد استراتژی‌های انتخاب سریع و در عین حال ساده مورد توجه قرار گرفته است [۹]. مرتب‌سازی اسپرم مبتنی بر ریزسیالات یکی از روش‌های جداسازی سلولی است که به سرعت در حال رشد است. همانطور که پیش‌تر نیز در مطالعات مختلف نشان داده شده است، فناوری ریزسیالات به دلیل قابلیت کار با حجم کم نمونه و خودکارسازی فرآیندها، علاوه بر کاربرد در جداسازی سلول‌های زنده مانند اسپرم، ابزاری بسیار کارآمد برای تخلیص و مدیریت DNA با کیفیت بالا به شمار می‌رود [۳۹]. در مطالعات باروری و همچنین درمان‌های ناباروری، مرتب‌سازی اسپرم مرحله‌ای ضروری است که در آن سلول‌های اسپرم زنده، متحرک و از نظر مورفولوژی مناسب باید از مایع منی یا نمونه‌های اسپرم شسته شده جدا شوند [۲۶و ۴۰و ۴۱]. در جدول ۱ مقایسه‌ای بین روش‌های کلینیکی و ریزسیالات آورده شده است.

جدول ۱. مزایا و معایب روش‌های جداسازی سلول اسپرم شامل روش های کلینیکی و ریزسیالات [۳۰].

Table 1. Advantages and disadvantages of sperm cell separation methods, including clinical and microfluidic approaches [30].

Separation Technique	Advantages	Disadvantages
Swim-up	• Simple, fast, and economical • Isolation of motile sperm with normal morphology • Non-invasive, reduces reactive oxygen species (ROS) production, and yields healthy DNA • Reduces sperm with chromosomal abnormalities • Can be used simultaneously with density gradient centrifugation	• Decreased number of recovered sperm • Poor yield in high-volume samples
Density Gradient Centrifugation	• Easy • Isolation of motile sperm with normal morphology • Suitable for clinics and treatment centers • Can be used simultaneously with the swim-up technique	• Poor yield in high-viscosity semen samples • Increased production of reactive oxygen species (ROS) • Aggregation/sticking of sperm cells to each other

Microfluidics	• Selection based on morphology and motility • Eliminates damage caused by centrifugation • Reduced DNA fragmentation compared to clinical methods • Direct use of the sample	• Low yield • High cost • Lack of standardization

۵-۲-۱- مکانیزم تیگموتاکسی

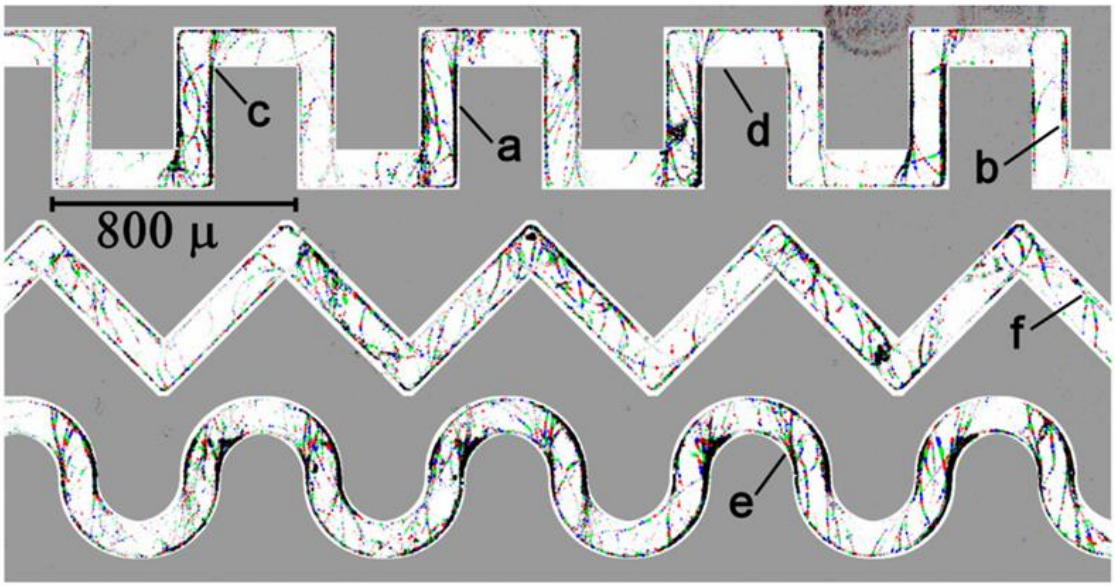
پاسخ اسپرم به محرک‌های مکانیکی از جمله تعامل اسپرم با سطح دیواره‌های مرزی از طریق دنبال کردن آنها و تغییر جهت‌های فضایی آن به عنوان تیگموتاکسی شناخته می‌شود. تیگموتاکسی برای یافتن جزئیات بیشتر در مورد مسیریابی اسپرم در طول باروری و بهبود طراحی دستگاه‌های جداکننده اسپرم مورد مطالعه قرار گرفته است. در محیط‌های زیستی، اسپرم‌ها اغلب در نزدیکی دیواره‌های کانال‌های رحمی و لوله‌های فالوپ مشاهده می‌شوند [۴۲].علی رغم تمایل اسپرم به دنبال کردن مرز، با افزایش ویسکوزیته بافر، اسپرم بیشتر در وسط کانال تجمع می‌یابد [۴۳]. یکی از نخستین مطالعات بنیادین که رفتار ذاتی اسپرم در ریزمحیط[۱]های محدود را به‌صورت سیستماتیک بررسی کرد، مطالعه‌ی دنیسنکو[۲] و همکاران بود. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است اسپرم‌های انسانی در ریزکانال‌ها تمایل شدیدی به حرکت در امتداد دیواره‌ها و گوشه‌ها دارند [۴۴]. پدیده‌ای که بعدها به‌عنوان تیگموتاکسی[۳] شناخته شد. مطالعات آزمایشگاهی بر روی هندسه میکروکانال‌های مختلف نشان دادند که اسپرم‌ها تمایل دارند در امتداد دیوار مرزی شنا کنند و زمانی که با شیب‌های تیز مواجه می‌شوند مسیر خود را تغییر می‌دهند. در این شرایط، اسپرم‌ها بدون احساس تغییر در شیب دیواره مرزی، حرکت خود را از سر می گیرند تا زمانی که به دیواره مرزی دیگر برسند [۴۵]. این مشاهدات تأثیر سطح داخلی لوله فالوپ را در هدایت اسپرم ثابت کرد و نشان داده که مهاجرت اسپرم به شدت وابسته به هندسه‌ی میکروکانال می‌باشد.

---

۱ Microenvironment

۲ Denissenko

۳ Boundary-Following



شکل ۳. جداسازی اسپرم بر اساس مکانیسم تیگموتاکسی. اثر هندسه‌های مختلف بر مهاجرت و مسیر حرکتی سلول اسپرم [٤٤].

Figure 3. Sperm separation based on the thigmotaxis mechanism. Effect of different geometries on sperm cell migration and trajectory [44].

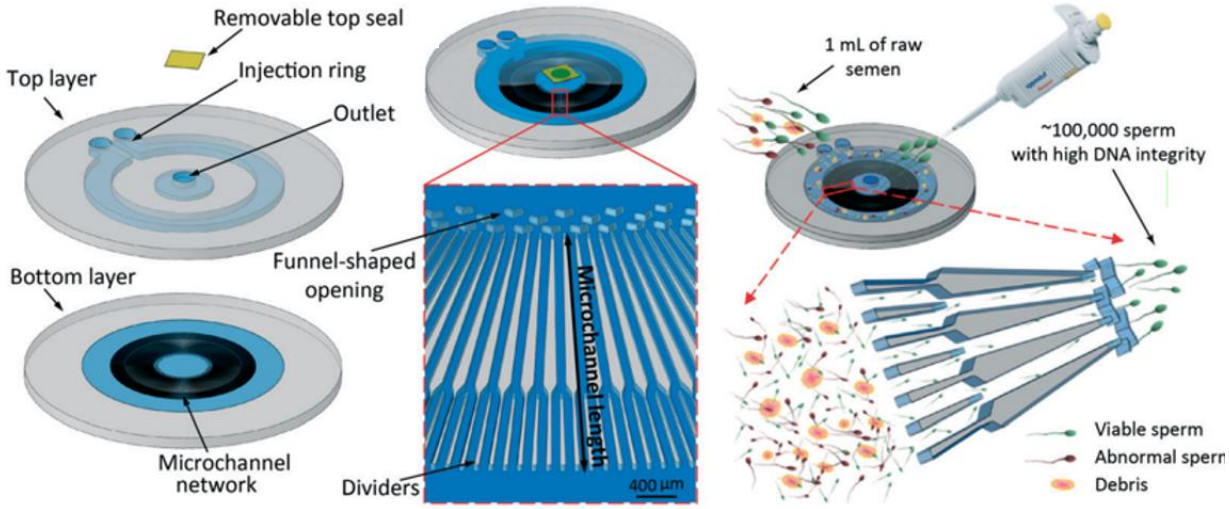
نصرتی[۱] و همکاران برای انتخاب اسپرم بر اساس دنبال کردن مرز، یک تراشه ریزسیالاتی با ۵۰۰ میکروکانال از جنس پلی دی متیل سیلوکسان[۲] ارائه کردند. همانطور که در شکل ۴-a نشان داده شده است، این آرایش از ریزمحیط لوله فالوپ تقلید می‌کند و فرصتی را برای انتخاب اسپرم با توان بالا در دوره‌های زمانی کوتاه‌تر فراهم می‌کند. علاوه بر این، نیازی به پیش‌فرآوری مایع منی نیست، که یک نیاز اصلی برای اکثر روش‌های جداسازی اسپرم با ریزسیالات است [۴۶]. در مطالعه دیگری یک روش نوین و غیرفعال مبتنی بر ریزسیالات برای انتخاب اسپرم معرفی شده است که بر اساس رفتار طبیعی اسپرم‌های متحرک در دنبال‌کردن دیواره‌ها و چرخش در گوشه‌ها عمل می‌کند (شکل ۴-b). در این سامانه، بدون اعمال جریان خارجی یا سانتریفیوژ، اسپرم‌ها صرفاً بر اساس توانایی حرکتی و ترجیح آن‌ها به دنبال کردن مرزهای میکروکانال‌ها جداسازی می‌شوند. نشان داده شد که اسپرم‌هایی که وارد کانال‌های راست یا چپ می‌شوند، یکپارچگی DNA بالاتری نسبت به آن‌هایی دارند که مستقیماً به جلو حرکت می‌کنند. به‌طوری‌که میزان سلامت DNA آن‌ها بیش از ۵۱% بالاتر از اسپرم‌های شناگر مستقیم و بیش از ۶۷% بالاتر از اسپرم موجود در مایع منی خام گزارش شد [۴۷].

---

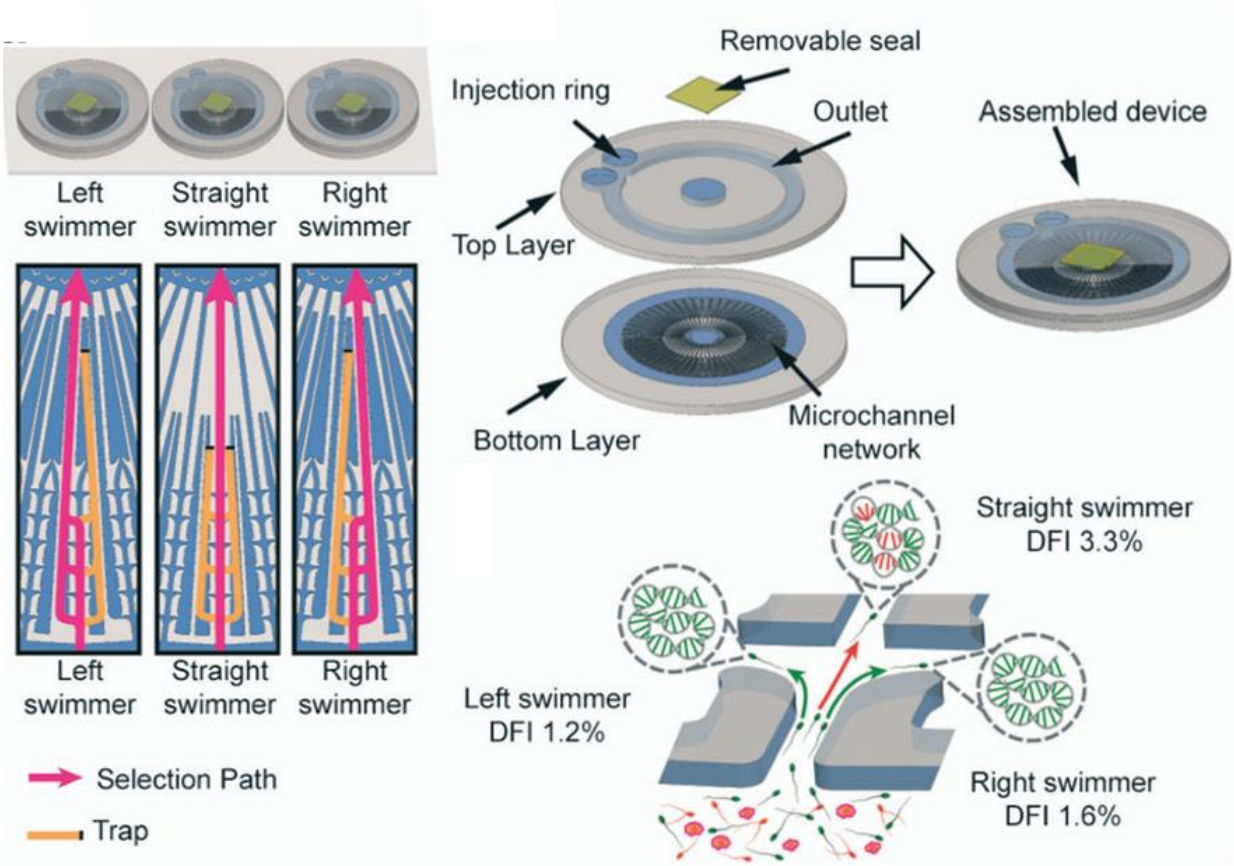
[۱] Nosrati

[۲] Polydimethylsiloxane (PDMS)

(a)


Removable top seal
Injection ring
Top layer
Outlet
Funnel-shaped opening
Bottom layer
Microchannel network
Dividers
Microchannel length
400 µm
1 mL of raw semen
~100,000 sperm with high DNA integrity
Viable sperm
Abnormal sperm
Debris

(b)


Left swimmer
Straight swimmer
Right swimmer
Left swimmer
Straight swimmer
Right swimmer
Selection Path
Trap
Removable seal
Injection ring
Outlet
Assembled device
Top Layer
Bottom Layer
Microchannel network
Straight swimmer DFI 3.3%
Left swimmer DFI 1.2%
Right swimmer DFI 1.6%

شکل ٤. فرآیند انتخاب اسپرم بر اساس دنبال کردن مرز. (a) دستگاه ریزسیالی متشکل از ۵۰۰ میکروکانال از جنس PDMS. در مطالعه نصرتی و همکاران، با ورود یک میلی‌لیتر مایع منی خام به بخش حلقوی، ۱۰۰,۰۰۰ اسپرم زنده و متحرک در قسمت خروجی جمع‌آوری شد [٤٨]. (b) سامانه ریزسیالات طراحی‌شده برای جداسازی اسپرم بر اساس رفتار دنبال‌کردن مرزها و پیچیدن در کانال‌ها [٤٧].

Figure 4. Sperm selection based on boundary-following migration. (a) A microfluidic device composed of 500 PDMS microchannels. According to the study by Nosrati et al. upon introduction of 1 mL of raw semen into the ring, 100,000 motile and viable sperm were collected at the outlet [48] (b) A microfluidic system designed for sperm separation based on boundary-following behavior and channel coiling [47].

در مجموع، مطالعات نشان می‌دهند که مکانیسم تیگموتاکسی می‌تواند با بهره‌گیری از رفتار طبیعی اسپرم در دنبال کردن دیواره‌ها، جداسازی اسپرم‌های با تحرک و کیفیت بالاتر را بدون اعمال نیروهای خارجی امکان‌پذیر سازد. با این حال، تفاوت در طراحی ریزکانال‌ها، شرایط آزمایش و شاخص‌های ارزیابی، مقایسه مستقیم نتایج را محدود می‌کند. همچنین، با وجود نتایج امیدوارکننده، بیشتر شواهد در مقیاس آزمایشگاهی به دست آمده‌اند و برای تأیید کارایی این روش در بهبود پیامدهای بالینی درمان‌های کمک‌باروری، انجام مطالعات بالینی گسترده‌تر ضروری است.

۵-۲-۲- مکانیزم رئوتاکسی

حرکت جهت‌دار اسپرم‌ها در دستگاه تولید مثل زن، فرآیندی تصادفی و بدون قاعده نیست، بلکه نتیجه برهم‌کنش‌های پیچیده میان ویژگی‌های ذاتی اسپرم و محرک‌های فیزیکی–شیمیایی محیط اطراف آن است. در این رابطه، رئوتاکسی به عنوان مکانیسم کلیدی مسئول هدایت اسپرم‌ها به سمت تخمک در برابر جریان مایع موجود در لوله رحمی عمل می‌کند. رئوتاکسی به توانایی اسپرم برای جهت‌گیری و شنا در خلاف جهت جریان سیال اطلاق می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که اسپرم‌های سالم و دارای تحرک پیش‌رونده (حرکت رو به جلو) قادرند در محدوده مشخصی از تنش برشی[۱] جهت حرکت خود را با جریان تنظیم کرده و به‌صورت فعال در خلاف جهت آن شنا کنند، در حالی که اسپرم‌های کم‌تحرک یا آسیب‌دیده به‌سادگی با جریان شسته می‌شوند [۴۹]. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اسپرم‌ها معمولاً در یک بازه محدود از سرعت جریان ۱۰۲-۲۲ میکرومتر بر ثانیه و نرخ برش s^{-1} ۵-۲ که به عنوان بازه مؤثر رئوتاکسی شناخته می‌شود، قادر به تشخیص جهت جریان و حرکت فعال در خلاف آن هستند [۵۰]. در این محدوده، برهم‌کنش بین ضربان تاژک اسپرم و تنش برشی سیال باعث ایجاد گشتاوری می‌شود که سر اسپرم را در خلاف جهت جریان هم راستا می‌کند. پاسخ اسپرم به بازه رئوتاکسی نه تنها به سرعت جریان بلکه به پایداری میدان جریان نیز وابسته است. میدان‌های سرعت یکنواخت و بدون نوسان شدید، امکان تنظیم پایدار جهت حرکت اسپرم را فراهم می‌کنند، در حالی که تغییرات ناگهانی در سرعت یا نرخ برش می‌تواند موجب اختلال در پاسخ رئوتاکتیک شود. در این راستا، طراحی هندسی میکروکانال نقش تعیین‌کننده‌ای در ایجاد و حفظ این بازه سرعت ایفا می‌کند. مکانیزم رئوتاکسی در مقایسه با دو مکانیزم کموتاکسی

[۱] Shear stress

و ترموتاکسی، در طول بیشتری از لوله فالوپ برقرار است و همین موضوع، اهمیت مکانیزم رئوتاکسی را چند برابر می‌کند [۵۱].

بر این اساس احمدخانی[۱] و همکاران یک سامانه ریزسیالات با تمرکز بر مکانیزم‌های رئوتاکسی و تیگموتاکسی توسعه دادند. در این راستا، چهار هندسه مختلف خطی، مربعی، زیگزاگی و سینوسی طراحی شد و اثر رئوتاکسی و تیگموتاکسی بررسی شد (شکل ۵-a). اگرچه اسپرم‌های جدا شده در همه میکروکانال‌ها ۱۰۰% متحرک بودند، هندسه‌های غیرخطی در مدت جداسازی اسپرم پیشرونده با کیفیت بالا مؤثرتر از هندسه خطی بودند [۵۲]. برای بهینه‌سازی میکروکانال سینوسی، دادخواه[۲] و همکاران هندسه‌ی مارپیچی با شعاع‌های چرخش ۶۰۰ و ۳۰۰ ، ۱۵۰ میکرون را طراحی کردند تا محیط دهانه رحم را شبیه سازی کند (شکل ۵-b). در حضور جریان برگشتی ملایم برای ایجاد مکانیسم رئوتاکسی نشان داده شد که میکروکانال با شعاع چرخش ۱۵۰ میکرون بهترین عملکرد را دارد. سپس برای افزایش تعداد اسپرم در خروجی، ۸۵ میکروکانال به صورت موازی در کنار یکدیگر قرار گرفتند و با وارد کردن ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه خام طی ۲۰ دقیقه عملیات جداسازی انجام شد و نتایج با روش‌های کلینیکی مانند سانتریفیوژ گرادیان چگالی و شناورسازی مقایسه شد و نشان داده شد که این سامانه ریزسیالاتی عملکرد بهتری نسبت به دو روش ذکر شده دارد [۵۳]. برقراری سرعت و دبی بهینه در میکروکانال‌ها از نکات حائز اهمیت است. پوری[۳] و همکاران یک دستگاه ریزسیالات دولایه مبتنی بر رئوتاکسی برای جداسازی اسپرم‌های متحرک با کیفیت بالا طراحی کردند که در آن میکروکانال‌های لایه بالا، جداسازی و لایه پایین نقش ذخیره اسپرم خام را بر عهده داشتند. در دبی $\mu L/min$ ۰/۲ بیشترین کیفیت حرکتی و تعداد اسپرم‌های متحرک مناسب برای فناوری های کمک باروری به دست آمد و در مقایسه با اسپرم خام و روش شناورسازی، این سامانه بالاترین زنده‌مانی و کمترین میزان شکست DNA را نشان داد [۳۱].

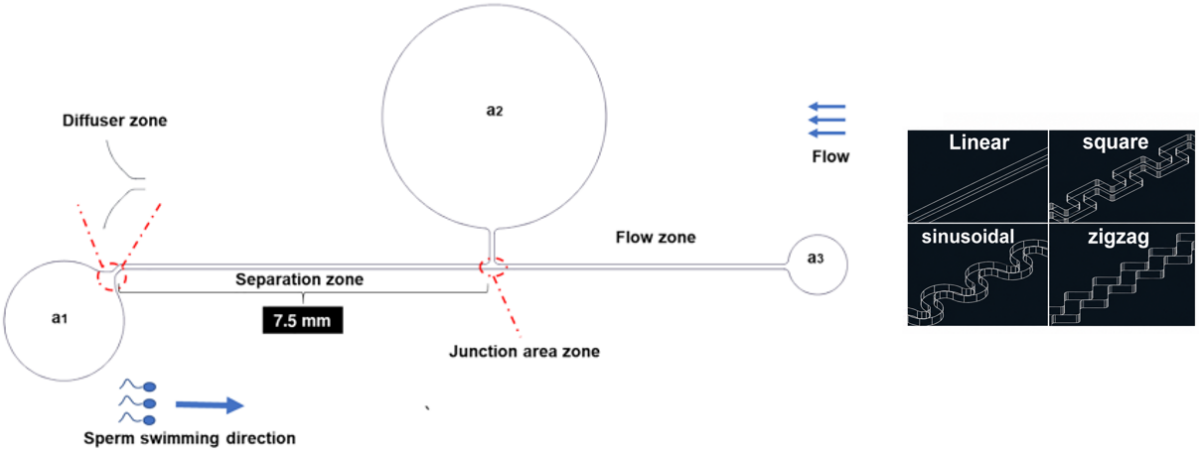
---

[۱] Ahmadkhani

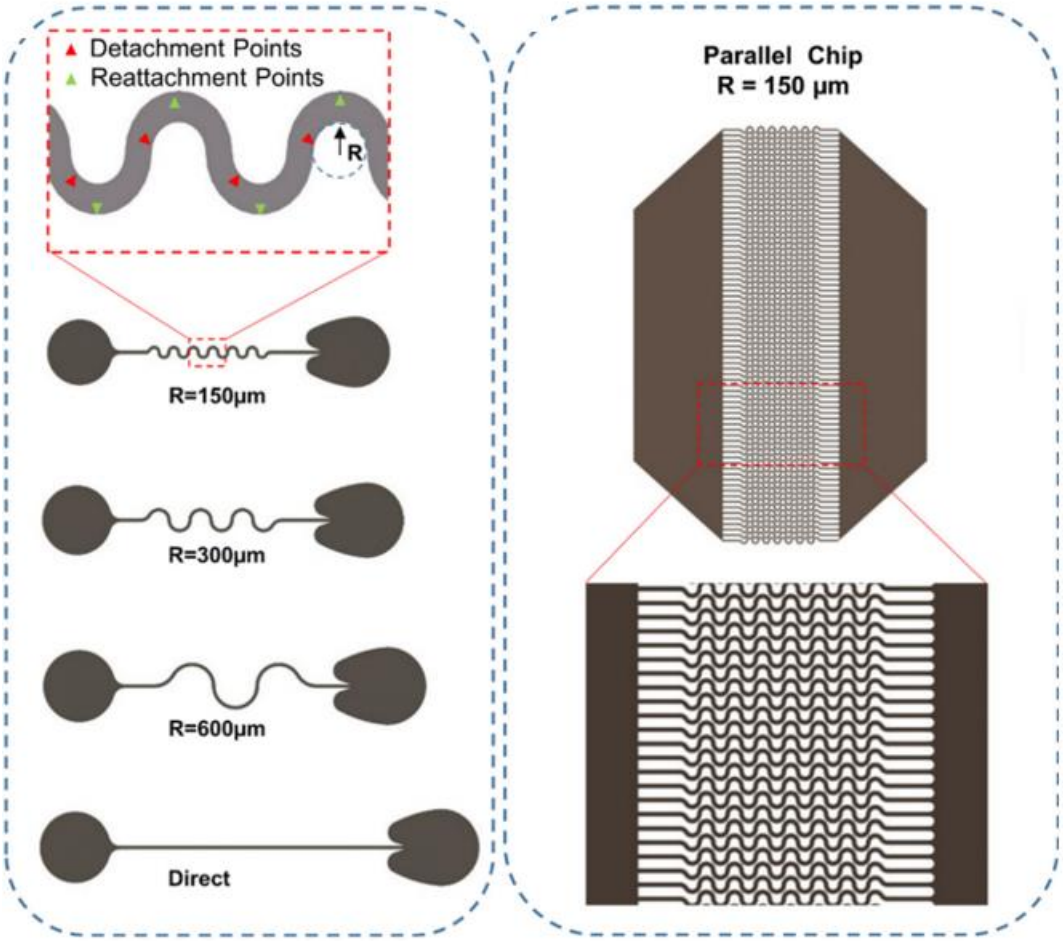
[۲] Dadkhah

[۳] Puri

(a)


Diffuser zone
a2
Flow
Flow zone
a3
Separation zone
7.5 mm
a1
Junction area zone
Sperm swimming direction
Linear
square
sinusoidal
zigzag

(b)


Detachment Points
Reattachment Points
R
R=150μm
R=300μm
R=600μm
Direct
Parallel Chip
R = 150 μm

شکل ۵. اثر هندسه‌های غیرخطی بر روی جداسازی اسپرم‌های با کیفیت بالا. (a) بررسی چهار هندسه‌ی خطی، مربعی، زیگزاگی و سینوسی در حضور مکانیزم رئوتاکسی به منظور جداسازی اسپرم‌های با کیفیت بالا [۵۲]. (b) شماتیک چهار کانال ریزسیالی با شعاع انحنای مختلف ۱۵۰ میکرومتر، ۳۰۰ میکرومتر، ۶۰۰ میکرومتر و بدون انحنا برای بررسی اثر انحنای کانال بر کیفیت اسپرم‌های انتخاب شده [۵۳].

Figure 5. Effect of non-linear geometries on the separation of high-quality sperm. (a) Investigation of four geometries—linear, square, zigzag, and sinusoidal—in the presence of a rheotaxis mechanism for the isolation of high-quality sperm [52] (b) Schematic of four microfluidic channels with different radii of curvature (150 µm, 300 µm, 600 µm) and a straight channel (no curvature) to evaluate the effect of channel curvature on the quality of selected sperm [53].

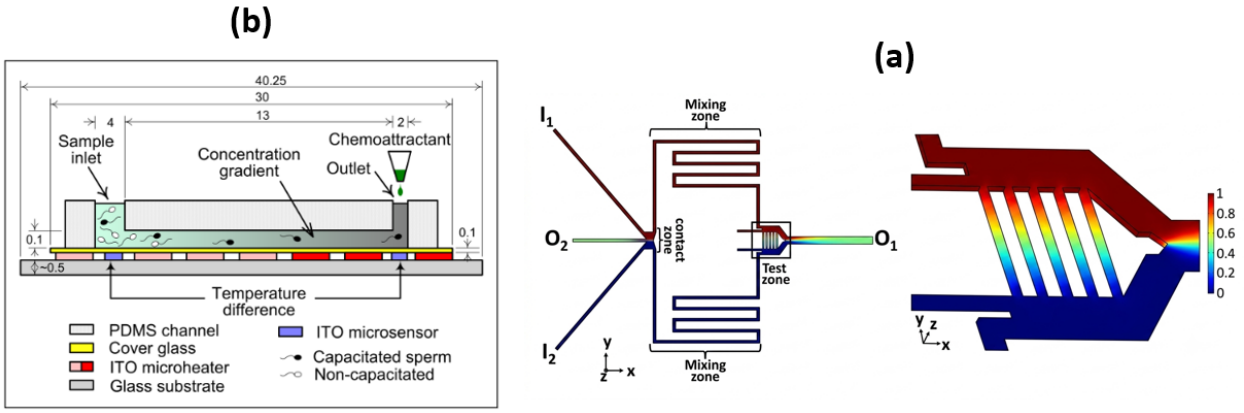
در مجموع، مطالعات نشان می‌دهند که رئوتاکسی یکی از مؤثرترین مکانیسم‌های طبیعی برای انتخاب اسپرم‌های با تحرک پیش‌رونده است و استفاده از آن در سامانه‌های ریزسیالاتی، امکان جداسازی اسپرم‌های با کیفیت بالا و آسیب DNA کمتر را فراهم می‌کند. با این حال، نتایج مطالعات بیانگر آن است که کارایی این روش به عواملی مانند هندسه میکروکانال، نرخ جریان و تنش برشی وابسته است و تغییر هر یک از این پارامترها می‌تواند بر عملکرد سامانه تأثیر بگذارد. همچنین، اگرچه برخی مطالعات برتری این روش را نسبت به روش‌های متداول مانند شناورسازی و گرادیان چگالی گزارش کرده‌اند، بیشتر این شواهد در شرایط آزمایشگاهی به دست آمده است؛ ازاین‌رو، ارزیابی بیشتر در مطالعات بالینی برای تعیین قابلیت انتقال این فناوری به کاربردهای روتین درمان ناباروری ضروری است.

۵-۲-۳- مکانیزم کموتاکسی و ترموتاکسی

کموتاکسی هدایت کننده اسپرم به سمت گرادیان غلظت یک جاذب شیمیایی است که توسط تخمک ترشح می‌شود. این حرکت جهت دار از طریق تغییر در الگوی ضربان دم اسپرم به دست می‌آید و به آن اجازه می‌دهد در مسیر مستقیم‌تری به سمت تخمک شنا کند [۵۴]. ترکیبات زیستی مانند هپارین، استیل کولین، آدرنالین، کلسی تونین، آنتی ترومبین III و پروژسترون به عنوان مواد شیمیایی جذب کننده اسپرم شناسایی شده‌اند [۵۵]. شکل ۶-a یک دستگاه ریزسیال مبتنی بر کموتاکسی را نشان می‌دهد که با استفاده از مخلوط استیل کولین به عنوان یک جذب‌کننده شیمیایی و مایع تخمدانی موش ساخته شد. این دستگاه توانست یک گرادیان غلظت یکنواخت از بسترهای شیمیایی را در یک محیط پایای سیال ایجاد کند [۵۶].

در میان مکانیسم‌های مختلف هدایت اسپرم در لوله فالوپ، ترموتاکسی را می‌توان به عنوان یک مکانیسم انتخاب طولانی‌مدت به‌ویژه در مقایسه با کموتاکسی در نظر گرفت. اختلاف دما کمتر از ۰,۰۱۴ درجه سانتیگراد در میلی‌متر در طول توده اسپرم انسان برای القای یک پاسخ ترموتاکتیک کافی است. در یکی از مطالعات، اثرات

غلظت استیل‌کولین و گرادیان دما بر مرتب‌سازی اسپرم موش با کیفیت بالا با استفاده از میکروهیتر اکسید قلع ایندیم در یک کانال میکروسیال منفرد مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبی از استراتژی‌های کموتاکسی و ترموتاکسی منجر به رفتار جداسازی بهتر و انتخاب دقیق‌تری از اسپرم‌های دارای ظرفیت می‌شود. شکل ٦-b نشان می‌دهد که افزودن محلول استیل‌کولین به خروجی منجر به یک گرادیان شیمیایی در طول کانال می شود. در این دستگاه، اسپرم‌های متحرک در ورودی با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در خروجی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد روبرو می‌شوند [۵۷].



شکل ٦. دستگاه ریزسیال مرتب‌سازی اسپرم. (a) مبتنی بر کموتاکسی [٥٦]. (b) مبتنی بر ترموتاکسی و کموتاکسی [٥٧].

Figure 6. Microfluidic device for sperm sorting. (a) Based on chemotaxis [56]. (b) Based on thermotaxis and chemotaxis [57].

در مجموع، مطالعات نشان می‌دهند که کموتاکسی و ترموتاکسی با تقلید از محرک‌های طبیعی موجود در لوله فالوپ، امکان انتخاب اختصاصی‌تر اسپرم‌های با ظرفیت باروری را فراهم می‌کنند. همچنین، ترکیب این دو مکانیسم نسبت به استفاده از هر یک به‌تنهایی، عملکرد بهتری در هدایت و انتخاب اسپرم‌های باکیفیت نشان داده است. با این حال، برخلاف روش‌های مبتنی بر رئوتاکسی و تیگموتاکسی، تعداد مطالعات و سامانه‌های ریزسیالاتی توسعه‌یافته بر پایه این مکانیسم‌ها محدود است و ارزیابی آن‌ها عمدتاً در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است؛ بنابراین، برای تعیین کارایی و قابلیت کاربرد بالینی این رویکردها، انجام مطالعات بیشتری بر روی نمونه‌های انسانی ضروری است.

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، مطالعات پیشین از نظر مکانیسم جداسازی، حجم نمونه، زمان جداسازی و تحرک‌پذیری اسپرم خروجی با یکدیگر مقایسه شده‌اند. این مقایسه نشان می‌دهد که هر یک از روش‌های مبتنی بر رئوتاکسی، تیگموتاکسی، کموتاکسی و ترموتاکسی دارای ویژگی‌ها و عملکرد متفاوتی هستند و انتخاب هر روش به هدف کاربرد، شرایط آزمایش و معیارهای مورد ارزیابی بستگی دارد.

جدول ۲. ارزیابی و مقایسه عملکرد مکانیزم‌های مختلف جداسازی اسپرم با استفاده از روش ریزسیالات در مطالعات گذشته.

Table 2. Evaluation and comparison of different sperm separation mechanisms utilized within microfluidic platforms in previous studies.

□□□□□□□□□□ □□□□□□□□□	□□□□□□□□□□ □□□□ (□□□)	□□□□□□□□ (٪ in □□□□□□)	□□□□□□ □□□□□□ (µ□)	□□□□□□□□□
R□□□□□□□□	30	>90	-	[9]
R□□□□□□□□ and Thigmotaxis	30	-	50	[58]
Thigmotaxis	20	>80	1000	[48]
R□□□□□□□□	15	93	-	[59]
R□□□□□□□□	40	99.46	-	[60]
R□□□□□□□□ and Thigmotaxis	60	99.47	30	[61]
Gradient R□□□□□□□□	15	>95	200	[62]
Chemotaxis	60	>70	80	[56]
Thermotaxis	15	85.25	-	[63]
Chemotaxis and Thermotaxis	60	95.97	۵۰	[64]

۵-۳- نمونه محصولات تجاری‌سازی شده برای جداسازی سلول اسپرم

۵-۳-۱- تراشه ZyMōt

ZyMōt Fertility Inc یکی از شرکت های پیشرو در تجاری سازی اولین دستگاه های ریزسیالی است که به طور خاص برای جداسازی اسپرم های متحرک و سالم از نمونه های منی طراحی شده است. شکل ۷-a نشان می‌دهد ZyMōt دو دستگاه مختلف به نام‌های ZyMōt multi و ZyMōt ICSI را ارائه داده که به ترتیب از میکروکانال‌ها و ریز منافذ غشاء برای جداسازی اسپرم بر اساس تحرکشان استفاده می‌کنند. دستگاه ZyMōt multi می‌تواند نمونه‌ها را تا ۳ میلی‌لیتر دریافت کند و ۱/۵-۱ میلی‌لیتر نمونه اسپرم غنی شده را در خروجی تولید کند که حتی برای روش IUI مناسب است. از سوی دیگر، دستگاه ZyMōt ICSI برای روش ICSI طراحی شده است که می‌تواند نمونه های کم‌حجم را پردازش کند و اسپرم های متحرک را جدا کند [65].

۵-۳-۲- تراشه FERTILE PLUS

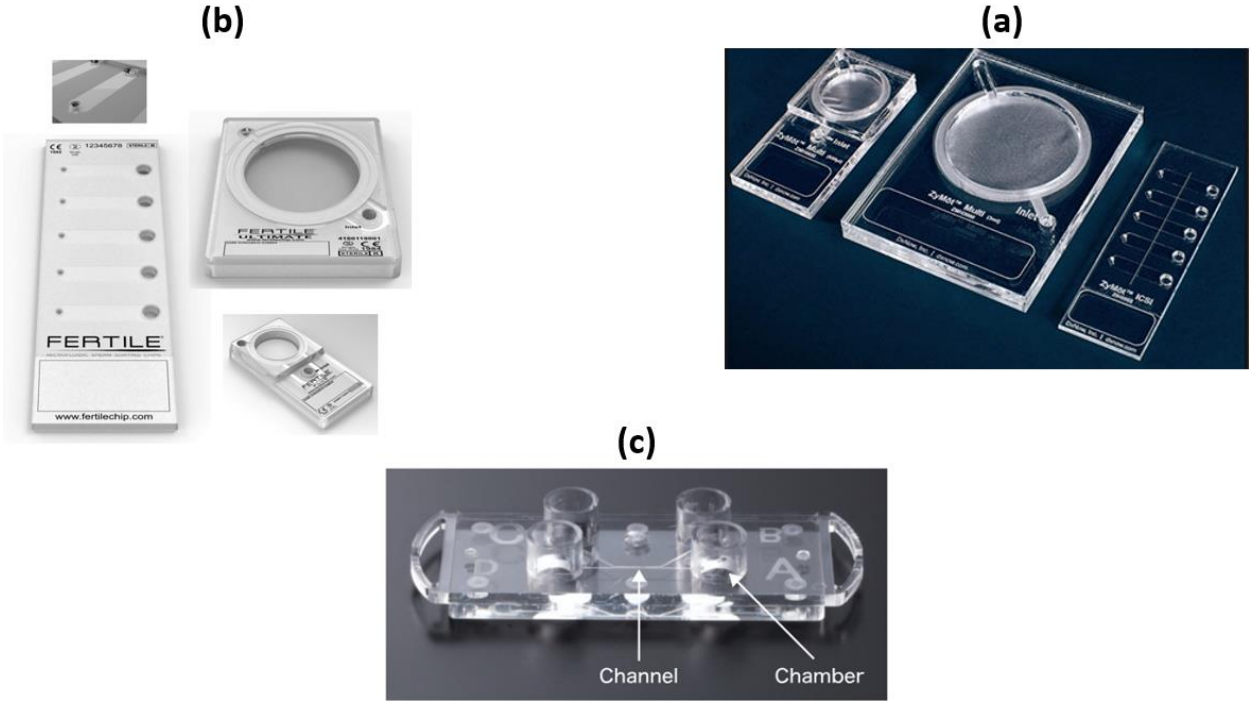
در یکی از مدل‌های دستگاه‌های ریزسیالی، جداسازی اسپرم بر پایه تحرک در ریزمحیط ایجادشده توسط میکروکانال‌ها انجام می‌شود. این روش امکان انتخاب اسپرم‌های سالم و متحرک را بدون سانتریفیوژ فراهم کرده و در IVF، IUI و ICSI کاربرد دارد. مدل‌های Fertile ساخت DxNow، عملکردی کاملاً مشابه دستگاه‌های ZyMōt داشته و تحت لیسانس شرکت اصلی تولید می‌شوند (شکل ۷-b). در مطالعه‌ای داده‌های ۵۳ زوجی که در یک

دوره ۱۲ ماهه تحت سیکل‌های ICSI قرار گرفتند بررسی شد. از هر زوج، دو نمونه یکسان دریافت شد که برای جداسازی سلول اسپرم یکی از این گروه‌ها از تکنیک سانتریفیوژ گرادیان چگالی و نمونه دیگر از FERTILE PLUS استفاده می‌کرد، بنابراین، زوج‌ها به‌عنوان کنترل‌کننده خودشان عمل می‌کردند. از آزمون t زوجی برای مقایسه میانگین نتایج لقاح ، تشکیل بلاستوسیست[1] و میزان اپلویدی استفاده شد. نرخ بلاستوسیست و اپلویدی برای FERTILE PLUS در مقایسه با سانتریفیوژ گرادیان چگالی به طور قابل توجهی بالاتر بود (۷۶٪ در مقابل ۵۶٪ و ۴۰٪ در مقابل ۲۰٪ به ترتیب). اگر چه افزایشی در نرخ لقاح برای چرخه های با استفاده از FERTILE PLUS وجود داشت، اما معنی دار نبود. شواهد آزمایشی برای انتخاب اسپرم نشان می‌دهد که دستگاه مرتب‌سازی ریزسیالی FERTILE PLUS در مقایسه با سانتریفیوژ گرادیان چگالی می‌تواند شکل‌گیری بلاستوسیست و نرخ اپلویدی را در روش ICSI بهبود بخشد [66].

۵-۳-۳- تراشه QUALIS

دستگاه کوآلیس (شکل ۷-C) یک تراشه جداسازی اسپرم مبتنی بر حرکت ذاتی سلول به منظور شکست خطوط جریان برای رسیدن به خروجی از جنس پلیمر سایکلو الفین است که توسط شرکت Menicon ساخته شده است و دارای تاییدیه سازمان غذا و داروی ایالات متحده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که اسپرم‌های متحرک جداشده توسط Sperm Sorter Qualis® در مقایسه با نمونه‌های جداشده توسط روش شناورسازی که یک روش رایج برای انتخاب اسپرم در کلینیک است، دارای شاخص شکست شدن DNA کمتری است [67].

[1] Blastocyst



شکل ۷. تراشه های ریزسیالاتی تجاری سازی شده. (a) تراشه ZyMōt [۶۵] (b) تراشه FERTILE PLUS [۶۶] (c) تراشه QUALIS [۶۷].

Figure 7. Commercially available microfluidic sperm selection chips. (a) ZyMōt chip [65] , (b) FERTILE PLUS chip [66] , and (c) QUALIS chip [67] .

۶- تخمک

در درمان‌های کمک‌باروری، تخمک یکی از عوامل کلیدی در موفقیت لقاح آزمایشگاهی و تکوین جنینی[۱] به‌شمار می‌رود. کیفیت تخمک انتخاب شده نه‌تنها بر موفقیت در لقاح، بلکه بر پایداری ژنتیکی جنین و در نهایت بر شانس تولد نوزاد سالم اثر مستقیم دارد [۷]. با این حال، آماده‌سازی تخمک در پروتکل‌های رایج آزمایشگاهی همچنان با چالش‌هایی همراه است که عمدتاً به ناسازگاری میان حساسیت بالای این سلول و مداخلات مکانیکی اعمال‌شده در شرایط آزمایشگاهی بازمی‌گردد [۶۸]. در پروتکل‌های رایج کمک‌باروری، تخمک در معرض دستکاری‌های متعددی قرار می‌گیرد؛ از پیپت‌کردن‌های مکرر تا اعمال نیرو برای جداسازی سلول‌های کومولوس. این مداخلات اگرچه برای پیشبرد فرآیندهای بالینی ضروری هستند، اما می‌توانند باعث آسیب به ساختار سلول شوند، به‌ویژه

[۱] Embryonic development

در شرایطی که بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی[1] به‌صورت ناهمزمان رخ می‌دهد. چنین ناهماهنگی‌هایی حتی در صورت لقاح موفق، قادر است کیفیت جنین تشکیل شده را کاهش دهد [۶۹–۷۱].

یکی از حساس‌ترین مراحل در این زنجیره، دینود کردن تخمک است که سلول های کومولوس از اطراف تخمک حذف می‌شوند. این اقدام فرآیندی ضروری برای انجام تزریق اسپرم داخل سیتوپلاسم می‌باشد [۶۸]. در روش‌های متداول، فرایند دینوداسیون معمولاً با استفاده از آنزیم هیالورونیداز یا اعمال تنش مکانیکی از طریق پیپت انجام می‌شود [۷۲]. هر دو روش، با وجود کارایی عملی، با محدودیت‌هایی همراه هستند. استفاده از آنزیم ممکن است بر ساختار تخمک اثر بگذارد، در حالی که مکش و رهایش مکرر می‌تواند خطر آسیب به غشای سلولی و به‌ویژه دوک میوزی را افزایش دهد. از آنجا که سلامت دوک میوزی با پایداری ژنتیکی این سلول ارتباط مستقیم دارد، هرگونه اختلال در این ساختار می‌تواند پیامدهای نامطلوبی در مراحل بعدی تکوین جنین ایجاد کند [۷۳و ۷۴].

این محدودیت‌ها ضرورت توسعه روش‌هایی را نشان می‌دهد که با ویژگی‌های فیزیکی و زیستی تخمک سازگارتر باشند. در این راستا، سامانه‌های ریزسیالی به‌عنوان ابزاری مناسب برای کنترل دقیق جریان، هندسه و تنش‌های مکانیکی مورد توجه قرار گرفته‌اند [۷۵]. برخلاف روش‌های دستی، این فناوری امکان اعمال نیروهای یکنواخت و قابل‌کنترل در مقیاس میکرونی را فراهم می‌کند؛ ویژگی‌هایی که آن را برای کار با سلول‌های بسیار حساس، از جمله تخمک، مناسب می‌سازد.

در این چارچوب، مراحل مختلف کار با تخمک—از حذف سلول های کومولوس تا بلوغ و ارزیابی کیفیت—نه به‌عنوان فرآیندهایی مستقل، بلکه به‌صورت اجزای یک زنجیرهٔ یکپارچه در نظر گرفته می‌شوند که هدف آن کاهش تنش‌های غیرضروری و حفظ پتانسیل لقاح می‌باشد.

۶-۱- دینود کردن تخمک

نخستین تلاش‌ها برای به‌کارگیری سامانه‌های ریزسیالی در دینود کردن تخمک بر این فرض استوار بود که محدودیت اصلی روش‌های سنتی نه در اصل جداسازی، بلکه در نحوهٔ اعمال نیرو نهفته است. در روش‌های دستی، تنش مکانیکی به‌صورت ناگهانی و وابسته به مهارت اپراتور اعمال می‌شود؛ در حالی که تخمک به تنش‌های تدریجی و یکنواخت، پاسخ ایمن‌تری نشان می‌دهد.

زرینگه[2] و همکاران نخستین شواهد عملی این رویکرد را ارائه کردند [۷۶]. آن‌ها با طراحی یک سامانه ریزسیالی ساده (مطابق شکل ۸-a) نشان دادند که می‌توان سلول‌های کومولوس را از تخمک‌های گاوی، بدون استفاده از آنزیم و صرفاً از طریق اعمال نیروی برشی سیالِ کنترل‌شده، جدا کرد. در این سامانه، کانال‌ها با قطری در حدود

[1] Cytoplasmic

[2] Zeringue

اندازه کمپلکس تخمک–کومولوس (حدود ۴۰۰ میکرومتر) طراحی شده بودند. این کمپلکس هنگام عبور از مسیرهایی با تنگ‌شدگی تدریجی—که عرض آن‌ها اندکی کمتر از قطر تخمک (حدود ۱۲۰ میکرومتر) بود—در معرض تنش برشی قرار می‌گرفت و فرایند جداسازی به‌صورت پیوسته از طریق درگاه‌های مکش بسیار باریک انجام می‌شد. در ادامه، همان گروه با معرفی سامانه دیگری نشان دادند که اعمال پالس‌های تنظیم‌شدهٔ جریان می‌تواند چرخش کنترل‌شدهٔ تخمک را تسهیل کرده و به حذف یکنواخت سلول‌های کومولوس از کل سطح آن منجر شود [۷۷]. این چرخش از تمرکز تنش در یک ناحیه خاص جلوگیری کرده و ایمنی فرآیند را افزایش می‌داد.

با تثبیت این مفهوم، نقش هندسه کانال و پارامترهای جریان سیال به خصوص تنش برشی به‌عنوان عوامل تعیین‌کننده در رفتار مکانیکی و حفظ یکپارچگی زیستی تخمک برجسته شد. ونگ[۱] و همکاران با طراحی یک سامانه ریزسیالی سه‌بخشی، جداسازی کنترل‌شده سلول‌های کومولوس را محقق کردند؛ به‌گونه‌ای که عرض کانال‌ها از ۵۰۰ میکرومتر در بخش‌های گشادشونده به‌صورت تدریجی به ۲۴۰، ۱۴۰ و در نهایت ۹۰ میکرومتر در بخش دندانه‌دار کاهش می‌یافت. در این ناحیه، زاویه ۱۴۱ درجه دندانه‌ها بیشترین کارایی لایه‌برداری را نشان داد. همچنین، تنظیم دبی در حدود ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، تنش برشی بهینه‌ای در حدود ۱۸۰ پاسکال ایجاد کرد که ضمن حفظ ساختار تخمک، به نرخ لقاح ۹۵/۹ درصد و تشکیل بلاستوسیست ۷۵/۵ درصد منجر شد [۷۸] (شکل ۸-b). در این معماری، هندسهٔ کانال به‌طور مستقیم الگوی توزیع تنش واردشده به تخمک را هدایت می‌کرد.

دسوکی[۲] و همکاران نشان دادند که افزودن واحدهای انبساطی[۳] با لبه‌های گرد برای ایجاد چرخش متقارن تخمک و جلوگیری از تمرکز تنش بهینه ۱۸۰ پاسکالی ضروری است [۷۹]. این یافته‌ها تأکید کردند که در مقیاس میکرونی، طراحی کانال از نظر عملکردی هم‌تراز با پارامترهای جریان است در نهایت، موتلو[۴] و همکاران یک تراشهٔ یک‌بارمصرف چندمرحله‌ای (شکل ۸-c) ساختند که می‌تواند کل فرآیند دینوداسیون، از فیلتراسیون مایع فولیکولی[۵] تا جمع‌آوری تخمکِ های دینود شده را به‌صورت یکپارچه و خودکار انجام دهد [۸۰]. در ادامه، فوک هوآنگ دین[۶] و همکاران، یک سامانه ریزسیالی برای دینود کردن تخمک معرفی کردند که شماتیک آن در شکل ۸-d آورده شده است. این سامانه از ساختار پله‌ای شکل بهره می‌برد و ارتفاع آن از ۳۰۰ به ۱۲۰ میکرومتر تغییر می‌کند تا با ایجاد تنش برشی تدریجی، دینود کردن تخمک را به‌صورت یکنواخت انجام دهد. دبی جریان ۰/۴۲ میکرولیتر بر ثانیه تنش برشی در حدود ۳۶ میلی‌پاسکال ایجاد کرد و راندمان دینوداسیون به حدود ۹۸ درصد رسید. در این پژوهش از هیالورونیداز نیز استفاده شده بود و برای شست‌وشوی کامل بقایای آنزیم و هدایت تخمک‌ها، سامانه‌ی خروجی شامل سه کانال و یک مکانیزم سوپاپ کشویی بود؛ به این صورت که با جابه‌جایی

---

۱ Weng

۲ Dessouki

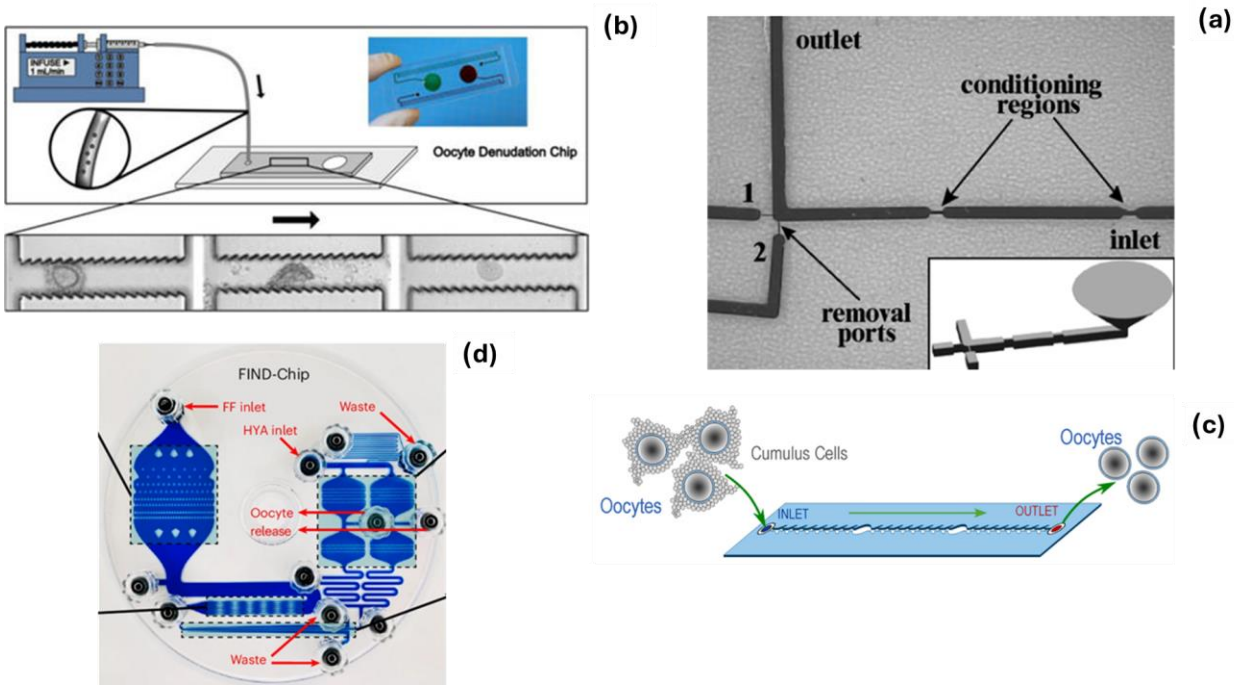
۳ Expansion units

۴ Mutlu

۵ Follicular fluid

۶ Phuc Hoang Dinh

سوپاپ، مسیر جریان میان خروجی‌ها تغییر می‌کرد تا ابتدا بقایای آنزیم و سلول‌ها تخلیه شوند و در مرحله‌ی نهایی، تخمک‌ها از مسیر دیگری جمع‌آوری شوند [۸۱].



شکل ۸. شماتیک کلی سامانه‌های ریزسیالی جهت دینود کردن تخمک. (a) نخستین سامانه ریز سیالی برای جداسازی سلول های کومولوس از تخمک گاوی [۷۶]. (b) سامانه با واحد های تکرار شونده انقباض و انبساطی [۷۸]. (c) سامانه با لبه های گرد برای ایجاد چرخش متقارن تخمک [۷۹]. (d) تراشه یک‌بار مصرف چند مرحله‌ای کل فرآیند دینود کردن تخمک [۸۱].

Figure 8. Overall schematic of microfluidic systems for denuding oocytes. (a) The first microfluidic system developed for separation of cumulus cells from bovine oocytes [76]. (b) A system with repetitive contraction–expansion units [78]. (c) A system with rounded edges to induce symmetric rotation of the oocyte [79]. (d) A disposable multi-stage chip for the complete oocyte denudation process [81].

۶-۲- بلوغ در شرایط آزمایشگاهی

در شرایط فیزیولوژیک، بلوغ نهایی تخمک درون یک فولیکول پویا و تحت تنظیم هماهنگ هورمونی رخ می‌دهد، در حالی که در بلوغ آزمایشگاهی متداول، کمپلکس کومولوس–تخمک به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در یک قطرهٔ ایستای محیط کشت نگه‌داری می‌شود [۱۰]. همان‌گونه که گزارش شده است، خروج ناگهانی تخمک از فولیکول و قطع ارتباط با سلول‌های کومولوس، منجر به آزاد شدن مهارکننده‌های مولکولی میوز نظیر cAMP و cGMP شده و آغاز زودرس بلوغ هسته‌ای را پیش از تکمیل بلوغ سیتوپلاسمی رقم می‌زند [۸۲]. نتیجهٔ این ناهماهنگی

آن است که توان تکوینی تخمک کاهش می‌یابد و در نتیجه، نرخ بارداری[۱] و تولد زنده نسبت به حالت بلوغ طبیعی در بدن کمتر می‌شود [۸۳].

در این زمینه، فناوری ریزسیالی به‌عنوان رویکردی نوین برای ایجاد یک محیط کشت پویا[۲] و نزدیک‌تر به شرایط فیزیولوژیک معرفی شده است. شواهد اولیه از مطالعات نشان می‌دهد که اعمال جریان‌های کنترل‌شده می‌تواند قابلیت های رشد و نمو جنین را بهبود بخشد. هیو[۳] و همکاران پیشنهاد دادند که کشت پویا جنین موش در یک سامانه ریزسیالی پالسی، نرخ لانه‌گزینی[۴] و بارداری مداوم را نسبت به کشت ایستا[۵] افزایش می‌دهد [۸۴]. به‌طور مشابه، استیوز[۶] و همکاران با استفاده از یک ریزتراشهٔ ساده، به نرخ بالای تشکیل بلاستوسیست و تولد نوزادان زنده دست یافتند [۸۵] و هوانگ[۷] و همکاران گزارش کردند که حرکت مداوم قطرات در پلتفرم الکترونشانی روی دی‌الکتریک[۸] ، تقسیم سلولی و خروج از پوسته جنین[۹] را بهبود می‌بخشد [۸۶].

گسترش این رویکرد به آماده‌سازی تخمک و بافت تخمدان نیز نتایج امیدوارکننده‌ای به همراه داشته است. لیبنترون[۱۰] و همکاران نشان دادند که کشت قطعات کورتکس تخمدان[۱۱] انسان در شرایط ریزسیالی، بقا و رشد فولیکول‌ها را در مقایسه با سامانه‌های ایستا افزایش می‌دهد [۸۷]. مزیت کلیدی این سامانه‌ها، همان‌گونه که اسمیت[۱۲] و همکاران تأکید کرده‌اند، ترکیب کنترل دقیق بیوشیمیایی و اعمال نیروهای مکانیکی ملایم است که می‌تواند استرس اکسیداتیو[۱۳] را کاهش داده و کیفیت تخمک را بهبود بخشد [۸۸و ۸۹] (شکل ۹-a). با این حال، تنظیم بهینهٔ نرخ جریان ضروری است، زیرا تنش برشی بیش از حد می‌تواند به ساختارهایی مانند دوک میوزی آسیب وارد کند [۶۸]. در همین راستا، مطالعات اخیر روی بافت قشری منجمد-ذوب‌شده تخمدان انسان نشان می‌دهد که کشت پویا در پلتفرم‌های ریزسیالی برخلاف انتظار، فولیکولوژنز اولیه را بهبود نمی‌بخشد. اعمال جریان بالای سیال، موجب افزایش مرگ‌ومیر و آپوپتوز[۱۴] در سلول‌های استرومایی می‌گردد. در واقع، کشت ایستا برای دستیابی به فولیکول‌های ثانویه، کارایی بهتری نسبت به شرایط پویا نشان داده است [۹۰].

---

۱ Pregnancy rate

۲ Dynamic culture

۳ Heo

۴ Implantation rate

۵ Static culture

۶ Esteves

۷ Huang

۸ Electrowetting-on-dielectric (EWOD)

۹ Embryo hatching

۱۰ Liebenthron

۱۱ Ovarian cortex

۱۲ Smith

۱۳ Oxidative stress

۱۴ Apoptosis

علاوه بر این، در سال‌های اخیر به‌منظور غلبه بر محدودیت‌های بلوغ تخمک در شرایط آزمایشگاهی، استفاده از سامانه‌های ریزسیالی با کنترل دقیق شرایط هیدرودینامیکی مورد توجه جدی قرار گرفته است. به‌عنوان نمونه، فرانکو[۱] و همکاران با طراحی یک بستر ریزسیالی برای تخمک‌های گاوی نشان دادند که اعمال پرفیوژن پیوسته و ملایم در بازه نرخ جریان ۰/۵ تا ۵ میکرولیتر بر دقیقه، همراه با زمان ماند ۱۰ تا ۳۰ دقیقه و استفاده از کانال‌هایی با عرض تقریبی ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکرومتر، شرایطی فراهم می‌کند که به حفظ یکپارچگی ساختاری تخمک و کاهش تنش‌های مکانیکی منجر می‌شود. این شرایط، با بهبود تبادل مواد و حذف متابولیت‌های نامطلوب، می‌تواند بلوغ سیتوپلاسمی و هسته‌ای را تقویت کرده و در نهایت نرخ بلوغ و پیامدهای تکوینی بعدی، از جمله لقاح و تشکیل بلاستوسیست، را بهبود بخشد [۹۱]. در همین راستا، ویت[۲] و همکاران گزارش کردند که سامانه‌های کشت پویا با ایجاد جریان و دیفیوژن[۳] مداوم، بیان ژن‌های سازنده اسیدهای چرب (مانند ژن SREBP1) را در محیط تخمک گاو کاهش داده و با مهار تجمع مضر چربی‌ها، تعداد سلول‌های بلاستوسیست جنین را افزایش می‌دهند. ساختار این سامانه ریزسیالی در شکل ۹-b آورده شده است [۹۲]. در مطالعه ماستروروکو[۴] و همکاران، استفاده از سامانه میلی‌سیالیِ[۵] شکل ۹-c نشان داد که محبوس‌سازی تخمک گوسفند در پایه‌های سه‌بعدی زیست‌سازگارِ حاوی آلژینات، از طریق ایجاد یک مانع فیزیکی در برابر جریان سیال، نقش مؤثری در کاهش مواجهه تخمک با تنش برشی در محدوده ۳/۱۴ تا ۶/۱۸ میکروپاسکال دارد. این راهبرد، هم‌زمان با شبیه‌سازی الگوی تغذیه مویرگی، به حفظ پایداری دوک میوزی، حمایت از بلوغ سیتوپلاسمی و حفاظت از زونا پلوسیدا منجر شد. افزون بر این، در شرایط دبی ۵۰ میکرولیتر بر دقیقه و زمان ماند ۲۴ ساعته، بلوغ هسته‌ای و کیفیت میتوکندریایی[۶] تخمک به مقادیر نزدیک به کنترل رسید و بهبود شایستگی لقاح و رشد بلاستوسیست را به همراه داشت [۹۳].

در نهایت، ترکیب فناوری ریزسیالی با یک روش دومرحله‌ای برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک، موسوم به CAPA□IVM، این امکان را فراهم می‌کند که تغییرات شیمیایی و زیستی به‌تدریج در محیط کشت اعمال شوند و شاخص‌های بلوغ تخمک نیز بدون نیاز به مداخلات تهاجمی، پایش شوند [۸۲و ۹۴]. مجموع این شواهد نشان می‌دهد که ریزسیالی، کاربردی نویدبخش برای آماده‌سازی سلول‌های تخمک در درمان ناباروری است، هرچند چالش‌های فنی و استانداردسازی همچنان پابرجا هستند.

---

۱ Franko

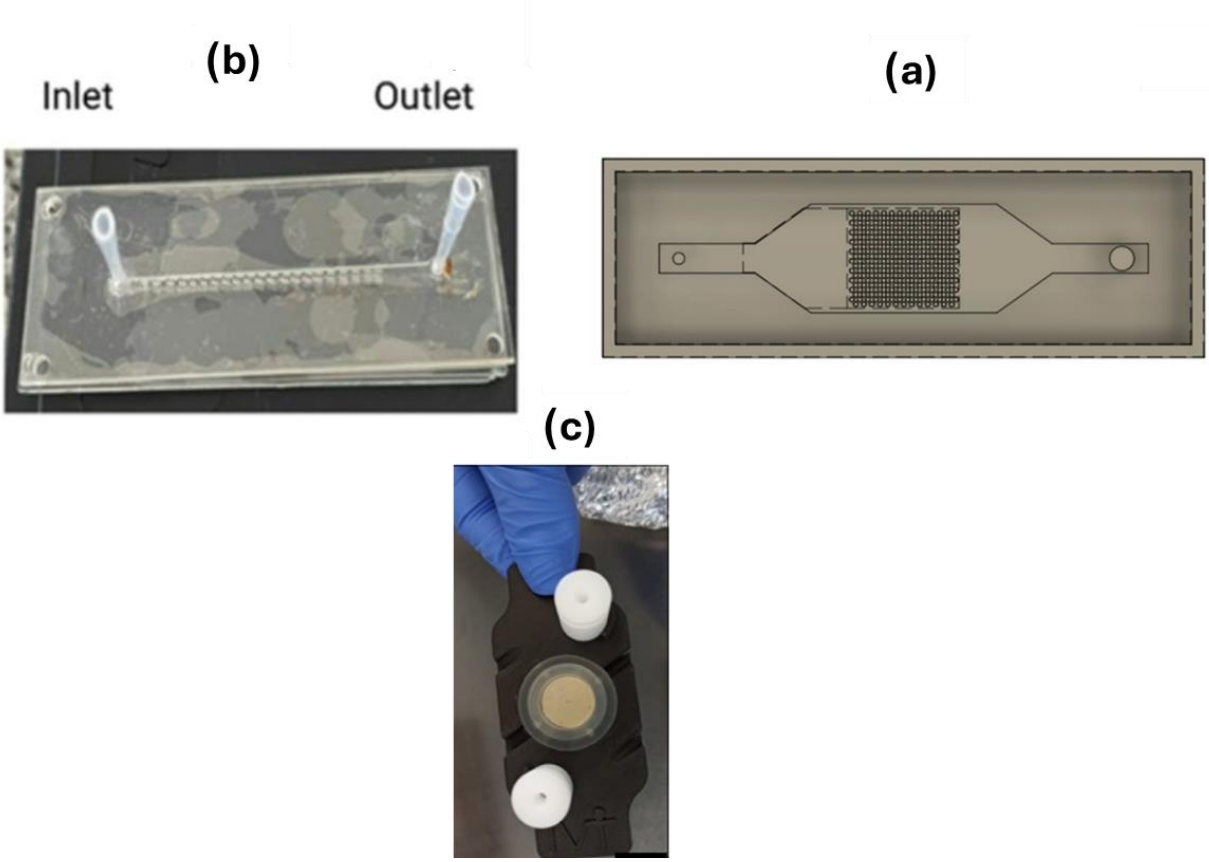
۲ Vit

۳ Diffusion

۴ Mastrorocco

۵ Millifluidic

۶ Mitochondrion



شکل ۹ . شماتیک سامانه‌های ریزسیال جهت بلوغ در شرایط آزمایشگاهی تخمک. (a) سامانه OoTrap **: بهبود جمع‌آوری و بلوغ تخمک با پرفیوژن قابل حمل [۷۲]. (b) بلوغ تخمک در ریزتراشه، چربی تخمک را کاهش و کیفیت بلاستوسیست را افزایش می‌دهد [۹۲]. (c) دستگاه میلی‌سیالی با پشتیبانی سه‌بعدی، جریان پویا و شرایط فیزیولوژیک تخمک را شبیه‌سازی می‌کند [۹۳].**

Figure 9 – Schematic of microfluidic systems for in vitro oocyte maturation. (a) The OoTrap system, which improves oocyte collection and maturation through portable perfusion [72]. (b) Oocyte maturation on a microchip, where the presence of fat is reduced in oocytes and blastocyst quality is improved [92]. (c) A milli-fluidic device with three-dimensional support and dynamic flow that mimics the physiological conditions of the oocyte [93].

۶-۳- بررسی کیفیت تخمک و جنین

انتخاب تخمک و جنین با پتانسیل موفقیت در لقاح همچنان یکی از چالش‌های اصلی کمک‌باروری است. این انتخاب به‌طور سنتی بر اساس معیارهای مورفولوژیک و زیر میکروسکوپ به صورت چشمی انجام می‌شود [۹۵]؛ معیارهایی که شامل ویژگی‌های کمپلکس کومولوس–تخمک، جسم قطبی و وضعیت زونا پلوسیدا هستند [۹۶–۹۸]. در حالی که سلامت دوک میوزی، به‌عنوان یکی از شاخص‌های کلیدی کیفیت تخمک، تنها با ابزارهای تخصصی قابل ارزیابی است [۹۵و ۹۹].

در این زمینه، طراحی سامانه‌های ریزسیالی با پیوند دادن ویژگی‌های فیزیکی به پیامدهای زیستی، راهکاری هدفمند برای سنجش کیفی تخمک‌ها پدید آورده است. ایواساکی[۱] و همکاران نشان دادند که هندسه کانال (پهنا ۷۰۰ میکرومتر و درازا ۱۰ میلی‌متر) و تنظیم دقیق دبی جریان هیدرودینامیکی (۱۲۰ میکرولیتر بر دقیقه)، تخمک‌ها را بر پایه سرعت رسوب‌گذاری به شکلی کارآمد دسته‌بندی می‌کند. این مهار فیزیکی مستقیماً با بلوغ سیتوپلاسمی پیوند داشت؛ به گونه‌ای که تخمک‌های برگزیده، نرخ تشکیل بلاستوسیست ۳۶ درصدی (در برابر ۱۴/۱ درصد) و نگهداشت ساختار طبیعی سیتوپلاسم ۹۵/۵ درصدی (در برابر ۲۴/۵ درصد) را ثبت نمودند که نحوه‌ی عملکرد این سامانه در شکل ۱۰-a نمایش داده شده است [۱۰۰]. در رویکردی دیگر، چوی[۲] و همکاران از نیروی دی‌الکتروفورز (اعمال ولتاژ ۳ ولت و بسامد ۱ مگاهرتز به مدت ۱۵ ثانیه) برای سنجش پیوند میان پاسخ الکتریکی و یکپارچگی زیستی بهره گرفتند. تخمک‌های فعال در این میدان، با کاهش نرخ پلی‌اسپرمی به ۳۱/۱ درصد (در برابر ۴۲/۹ درصد) و ارتقای نرخ رشد جنین به ۲۳/۸ درصد (در برابر ۱۰/۷ درصد در گروه غیرفعال)، شایستگی زیستی بالاتری از خود بروز دادند (شکل ۱۰-b) [۱۰۱]. با این همه، امکان استفاده از میدان‌های الکتریکی نیازمند سنجش‌های زیستی دقیق‌تری است. هوانگ[۳] و همکاران گزارش دادند که میدان‌های متناوب فراتر از یک نیروی محرک فیزیکی، کارکرد درون‌سلولی را نیز دگرگون می‌سازند. اعمال میدان‌های شدید ۱۳۳/۶ و ۲۶۶/۸ کیلوولت بر متر در فاصله ۱۰۰ میکرومتری الکترودها، با وجود حفظ زنده‌مانی بیش از ۸۰ درصدی، نرخ بکرزایی[۴] را به شکلی ناخواسته به ترتیب تا ۵۱/۶۵ و ۷۹/۹ درصد (نسبت به ۱۰/۱۷ درصد گروه شاهد) افزایش داد (شکل ۱۰-c) [۱۰۲].

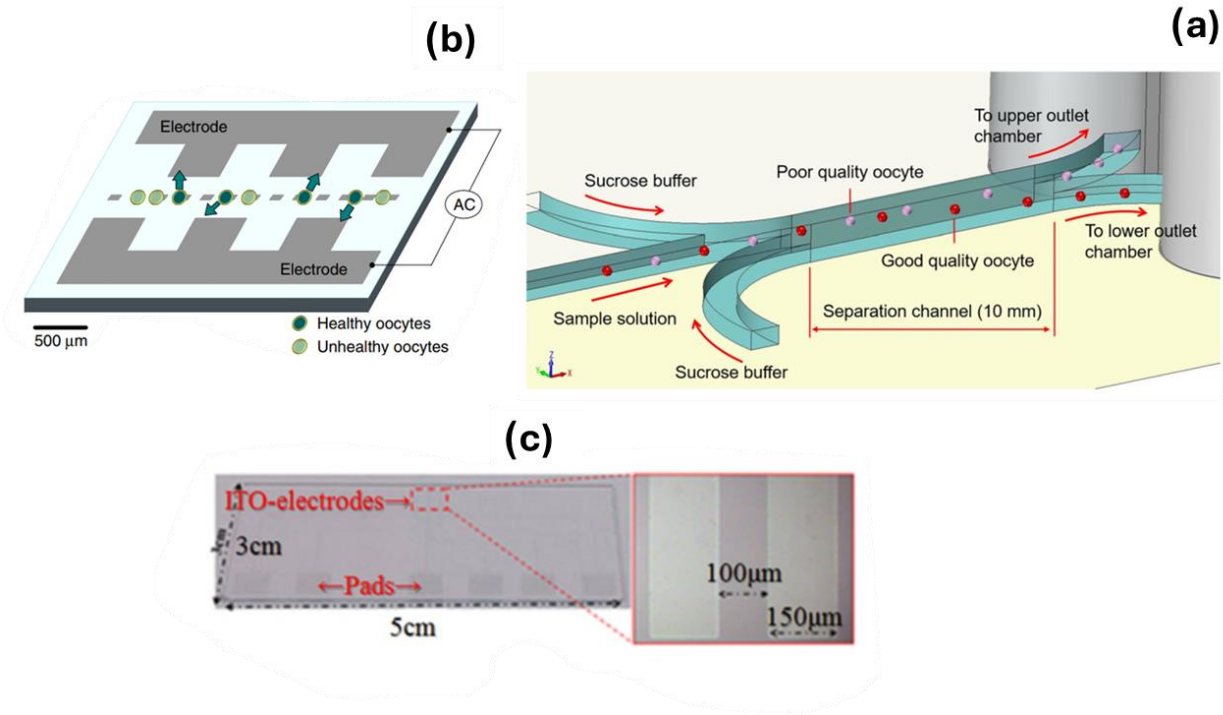
---

۱ Iwasaki

۲ Choi

۳ Huang

۴ Parthenogenesis rate



شکل ۱۰. شماتیک سامانه‌های ریزسیالی تشخیص کیفیت تخمک. (a) جداسازی تخمک ها با کیفیت خوب با استفاده از ساکارز [۱۰۰]. (b) بررسی کیفیت و زنده‌مانی تخمک‌های موش (بدون نیاز به اسپرم) پس از فعال‌سازی با میدان الکتریکی متناوب و نیروی دی‌الکتروفورز مثبت [۱۰۱]. (c) جداسازی تخمک‌های خوک بر اساس سرعت حرکت دی‌الکتروفورزی، به طوری که تخمک‌های با کیفیت‌تر (سالم‌تر) در میدان الکتریکی متناوب سریع‌تر حرکت می‌کنند [۱۰۲].

Figure 10 – Schematic of microfluidic systems for oocyte quality assessment. (a) Separation of high-quality oocytes using sucrose [100]. (b) Evaluation of mouse oocyte quality and viability (without the sperm) after activation using an alternating electric field and positive dielectrophoretic force [101]. (c) Separation of porcine oocytes based on dielectrophoretic migration velocity, where higher-quality (healthier) oocytes move faster in the alternating electric field [102] .

۶-۴- کشت جنین

در روش‌های مرسوم کمک‌باروری، کشت جنین عمدتاً به‌صورت ایستا در قطره‌های محیط کشت یا چاهک‌های ریز انجام می‌شود. با وجود کاربرد گستردهٔ این رویکردها، نرخ موفقیت لقاح آزمایشگاهی همچنان در حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد باقی مانده است [۱۰۳]. یکی از عوامل اصلی این محدودیت، ناتوانی سامانه‌های ایستا در بازآفرینی شرایط پویا لولهٔ رحم است؛ محیطی که در آن انقباضات عضلانی، جریان مایع و تنش‌های برشی ملایم، به‌طور هم‌زمان در تغذیه، جابجایی و حذف فرآورده‌های زاید جنین نقش دارند [۱۰۴]. افزون بر این، کشت ایستا فاقد تغییرات تدریجی در غلظت مواد مغذی و فاکتورهای رشد است؛ تغییراتی که در شرایط درون‌تنی، سیگنال‌های حیاتی برای پیشرفت تکوینی جنین را فراهم می‌کنند [۱۰۵].

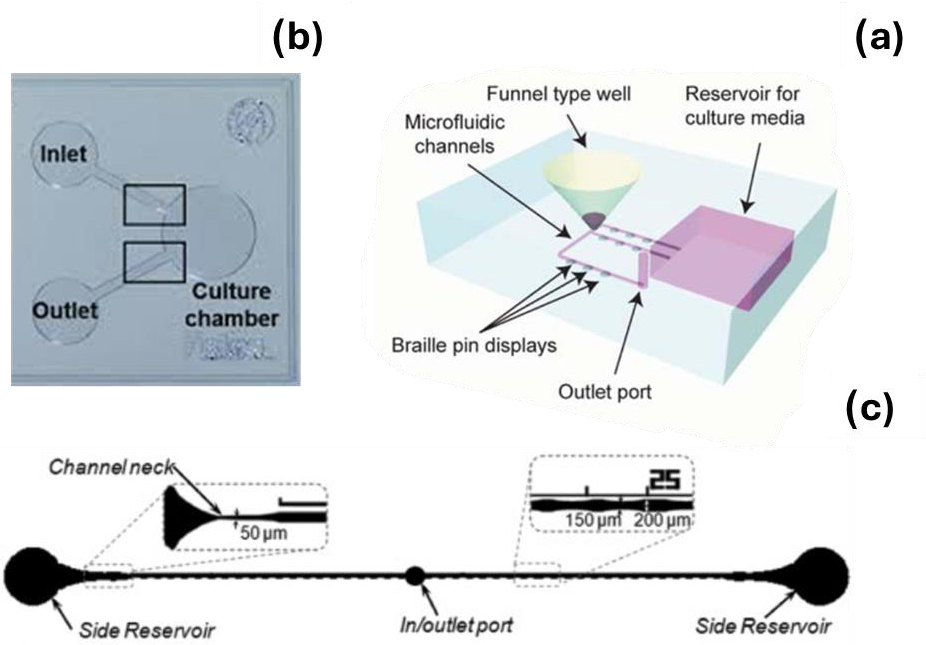
در این راستا، سامانه‌های ریزسیالی به‌عنوان رویکردی جایگزین برای مطالعه‌ی محیط‌های کشت پویا معرفی شده‌اند. این سامانه‌ها با ایجاد جریان در محیط کشت، به ارائه‌ی مدلی نزدیک‌تر به شرایط فیزیولوژیک کمک می‌کنند و دستکاری‌های مکرر را به حداقل می‌رسانند [۱۰۶و ۱۰۷]. تأمین پیوستهٔ مواد مغذی و حذف مداوم فرآورده‌های متابولیکی، از دیگر مزایای کلیدی این سامانه‌ها است. افزون بر این، سامانه‌ی ریزسیالی امکان کشت و ارزیابی جنین‌ها به‌صورت گروهی یا انفرادی را فراهم می‌سازد؛ به‌گونه‌ای که در کشت گروهی، نقش تعاملات پاراکراین[۱] و اتوکراین[۲] و در کشت انفرادی، پایش تک‌تک جنین‌ها قابل بررسی است [۱۰۸]. برخی یافته‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهند که کشت پویا در مقایسه با شرایط ایستا، می‌تواند بر نرخ تشکیل بلاستوسیست و زمان رسیدن به این مرحله تأثیر بگذارد [۸۵و ۱۰۹].

ارزیابی این سامانه‌ها در مدل‌های حیوانی و آزمایشگاهی گزارش‌های متنوعی را به دنبال داشته است. هیو و همکاران گزارش کردند که کشت پویا در چاهک قیفی‌شکل (شکل ۱۱-a)، تعداد سلول‌های بلاستوسیست و نرخ لانه‌گزینی را به مقادیر درون‌تنی نزدیک‌تر می‌سازد [۸۴]. استیوز و همکاران نیز با به‌کارگیری یک سامانه‌ی ریزسیالی ساده، تشکیل بلاستوسیست و تولد نوزاد زنده از جنین‌های منفرد موش را گزارش کردند (شکل ۱۱-b) . در مدل گاوی، سامانه‌های مبتنی بر تنگ‌شدگی‌های هندسی (شکل ۱۱-c) برای شبیه‌سازی انقباضات پریستالتیک لوله‌ی رحم به کار رفته‌اند [۸۵]. در مطالعات انسانی نیز برخی گزارش‌های اولیه از تراشه‌های موسوم به «IVF Chip» حاکی از رسیدن نرخ تشکیل بلاستوسیست به ۷/۷۳ درصد است و فناوری‌های الکترونشانی روی دی‌الکتریک برای کنترل حرکت قطرات و ارزیابی شکافت سلولی معرفی شده‌اند [۸۶و۱۱۰]. در مجموع، سامانه‌های ریزسیالی با ایجاد شرایط پویا و کاهش استرس اکسیداتیو، چشم‌اندازی امیدوارکننده برای ارتقای پیامدهای درمان ناباروری ارائه می‌دهند. با این وجود، باید تأکید کرد که برتری بالینی این سامانه‌ها بر روش‌های مرسوم هنوز به اثبات نرسیده است. علی‌رغم پتانسیل‌های نظری، در حال حاضر شواهد بالینی قوی برای برتر دانستن این فناوری در درمان ناباروری انسانی وجود ندارد و هرگونه نتیجه‌گیری قطعی در خصوص کارایی برتر آن‌ها، نیازمند انجام کارآزمایی‌های بالینی جامع‌تر در آینده است.

---

[۱] Paracrine

[۲] Autocrine



شکل ۱۱. شمای کلی سامانه های ریزسیالی جهت کشت پویا جنین. (a) **استفاده از چاهک های قیفی شکل جهت برای حفظ همزمان فاکتورهای اتوکرین و اعمال تحریک مکانیکی** [۸٤]. (b) **کشت تکی جنین های موش** [۸۵]. (c) **سامانه با تنگی های متعدد جهت تقلید از انقباضات پریستالتیک لولۀ رحم** [۱۰۹].

Figure 11. Schematic overview of microfluidic systems for dynamic embryo culture. (a) Use of funnel-shaped microwells to simultaneously retain autocrine factors and apply mechanical stimulation [84]. (b) Single culture of mouse embryos [85]. (c) A system with multiple constrictions designed to mimic peristaltic contractions of the uterine tube [109].

۷- نتیجه‌گیری

ناباروری به عنوان یک چالش سلامتی جهانی، نیازمند روش‌های درمانی دقیق و کم‌خطر است. روش‌های متداول آماده‌سازی سلول‌های جنسی، اگرچه استاندارد بالینی هستند، اما اغلب با محدودیت‌هایی نظیر آسیب مکانیکی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و دور زدن فرآیندهای طبیعی انتخاب سلول‌ها همراه هستند. فناوری ریزسیالات با ارائه محیطی کنترل‌شده و شبیه‌ساز شرایط فیزیولوژیک بدن، راهکاری نوین و کارآمد برای غلبه بر این چالش‌ها ارائه می‌دهد. در زمینه آماده‌سازی اسپرم، گذر از روش‌های تهاجمی مانند سانتریفیوژ گرادیان چگالی به سامانه‌های مبتنی بر ریزسیالات، امکان بهره‌گیری از مکانیزم‌های هوشمند بیولوژیکی را فراهم کرده است. مکانیزم‌های رئوتاکسی، تیگموتاکسی، کموتاکسی و ترموتاکسی به دستگاه‌های ریزسیالی اجازه می‌دهند تا اسپرم‌های با تحرک بالا، مورفولوژی طبیعی و یکپارچگی DNA سالم را با دقت و سرعتی بالاتر از روش‌های سنتی جدا کنند. در بخش تخمک، چالش اصلی حفظ سلامت ساختاری و ژنتیکی سلول حساس تخمک است. فناوری ریزسیالات با جایگزینی دستکاری‌های دستی و آنزیمی پرتنش، فرآیندهایی نظیر دینوداسیون و بلوغ آزمایشگاهی را بهینه‌سازی کرده است. اعمال نیروهای برشی یکنواخت و قابل تنظیم در مقیاس میکرونی، از آسیب به دوک میوزی و غشای سلولی جلوگیری کرده و ناهماهنگی بین بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی را کاهش می‌دهد. همچنین، کشت پویا جنین در

سامانه‌های ریزسیالی با شبیه‌سازی جریان‌های لوله رحم و تأمین پیوسته مواد مغذی، محیطی غنی‌تر و کم‌استرس‌تر برای رشد جنین فراهم می‌کند که منجر به افزایش نرخ تشکیل بلاستوسیست و بارداری‌های موفق‌تر می‌شود. ادغام فناوری ریزسیالات در پروتکل‌های کمک‌باروری، پلی میان مهندسی و زیست‌شناسی است که پتانسیل بالایی برای ارتقای کیفیت گامت‌ها، کاهش عوارض جانبی و افزایش شانس موفقیت درمان ناباروری دارد. با وجود پیشرفت‌های چشمگیر فناوری ریزسیالات، انتقال این سامانه‌ها از مرحله پژوهش به کاربرد گسترده بالینی همچنان با چالش‌هایی همراه است. از جمله مهم‌ترین این چالش‌ها می‌توان به نیاز به استانداردسازی طراحی و شرایط عملکرد دستگاه‌ها، افزایش قابلیت تکرارپذیری نتایج، تولید انبوه با هزینه مناسب، سازگاری با جریان کاری آزمایشگاه‌های کمک‌باروری و انجام مطالعات بالینی در مقیاس بزرگ برای ارزیابی ایمنی، اثربخشی و مزایای بلندمدت این فناوری اشاره کرد. با این حال، پیشرفت‌های اخیر در طراحی پلتفرم‌های ریزسیالی زیست‌تقلید، مواد زیست‌سازگار و فناوری‌های ساخت، فرصت‌های ارزشمندی را برای توسعه سامانه‌های یکپارچه، خودکار و کاربرپسند فراهم کرده است. انتظار می‌رود ادغام این فناوری‌ها با روش‌های نوین ارزیابی کیفیت گامت، تصویربرداری پیشرفته و ابزارهای مبتنی بر هوش مصنوعی، امکان انتخاب دقیق‌تر سلول‌های جنسی و جنین را فراهم کرده و در نهایت به بهبود پیامدهای بالینی، افزایش نرخ موفقیت درمان‌های کمک‌باروری و گسترش کاربرد ریزسیالات در مراکز درمان ناباروری منجر شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های مالی بنیاد ملی علم ایران در اجرای این پژوهش، ذیل شماره طرح ۴۰۲۳۴۶۷، مراتب سپاسگزاری خود را ابراز نمایند.

منابع

[1] Mburu, G., Kiarie, J., & Allotey, P. (2026). WHO guideline on infertility: an opportunity to reduce global health inequalities. *The Lancet Global Health*, *14*(1), e12–e13.

[2] Nosrati, R., Graham, P. J., Zhang, B., Riordon, J., Lagunov, A., Hannam, T. G., Escobedo, C., Jarvi, K., & Sinton, D. (2017). Microfluidics for sperm analysis and selection. *Nature reviews. Urology*, *14*(12), 707–730.

[3] Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *13*(1), 1–9.

[4] Organization, W. H. (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. *Geneva: World Health Organization*, 6, 1–276.

[5] Bertolla, R. P. (2020). Sperm biology and male reproductive health. *Scientific Reports 2020 10:1*, *10*(1), 1–3.

[6] Schuetz, A. W. (1974). Role of hormones in oocyte maturation. *Biology of reproduction*, *10*(2), 150–178.

[7] Babayev, E., & Seli, E. (2015). Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, *27*(3), 175–181.

[8] Milardi, D., Grande, G., Sacchini, D., Astorri, A. L., Pompa, G., Giampietro, A., De Marinis, L., Pontecorvi, A., Spagnolo, A. G., & Marana, R. (2012). Male Fertility and Reduction in Semen Parameters: A Single Tertiary-Care Center Experience. *International Journal of Endocrinology*, 2012.

[9] Sarbandi, I. R., Lesani, A., Moghimi Zand, M., & Nosrati, R. (2021). Rheotaxis-based sperm separation using a biomimicry microfluidic device. *Scientific Reports 2021 11:1*, *11*(1), 1–8.

[10] Das, M., & Son, W.-Y. (2023). In vitro maturation (IVM) of human immature oocytes: is it still relevant? *Reproductive Biology and Endocrinology*, *21*(1), 110.

[11] Ashrafizadeh, S. N., Zare, M., & Khatibi, M. (2025). A comprehensive review of pinch flow fractionation in microfluidics: From principles to practical applications. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, *208*, 110087.

[12] Zare, M., Khatibi, M., & Ashrafizadeh, S. N. (2025). Synergistic effects of dielectrophoretic and magnetophoretic forces on continuous cell separation via pinched flow fractionation. *Physics of Fluids*, *37*(2).

[13] Zare, M., Khatibi, M., Ashrafizadeh, S. N., & Duval, J. F. L. (2025). Enhanced microparticle focusing in a serpentine microchannel integrated on a lab-on-a-disk platform using combined inertial and dielectrophoretic forces. *Physics of Fluids*, *37*(7), 72035.

[14] Dalir, L., Omidi, S., Saadatmand, M., & Heidari, F. (2024). Simulation, Assessment, and Improvement of a MicrofluidicChip Used for Motile-Sperms Separation. *Iranian Chemical Engineering Journal*, *23*(134), 69–80, In Persian.

[15] Razmjoo, M., Khatibi, M., & Ashrafizadeh, S. N. (2026). Geometry-Driven Inertial Focusing and Dielectrophoretic Separation of Blood Microparticles in Serpentine Lab-on-a-Disc Microchannels: A Numerical Study. *Langmuir*, *42*(22), 15863–15880.

[16] Mortimer, D. (2018). The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Molecular Human Reproduction*, *24*(12), 567–592.

[17] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). Molecular Biology of the Cell. *Molecular Biology of the Cell*.

[18] Camaioni, A., Klinger, F. G., Campagnolo, L., & Salustri, A. (2018). The Influence of Pentraxin 3 on the Ovarian Function and Its Impact on Fertility. *Frontiers in immunology*, *9*, 2808.

[19] Keefe, D., Liu, L., Wang, W., & Silva, C. (2003). Imaging meiotic spindles by

polarization light microscopy: principles and applications to IVF. *Reproductive biomedicine online*, *7*(1), 24–29.

[20] Rienzi, L., Ubaldi, F., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., & Greco, E. (2005). Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reproductive biomedicine online*, *10*(2), 192–198.

[21] Wassarman, P. M., & Litscher, E. S. (2022). Female fertility and the zona pellucida. *eLife*, *11*.

[22] Kumar, N., & Singh, A. K. (2021). The anatomy, movement, and functions of human sperm tail: an evolving mystery. *Biology of reproduction*, *104*(3), 508–520.

[23] Young, R. E., & Huh, D. D. (2021). Organ-on-a-chip technology for the study of the female reproductive system. *Advanced drug delivery reviews*, *173*, 461.

[24] Honda, A., Siruntawineti, J., & Baba, T. (2002). Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Human reproduction update*, *8*(5), 405–412.

[25] Kim, E., Yamashita, M., Kimura, M., Honda, A., Kashiwabara, S. I., & Baba, T. (2008). Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *International Journal of Developmental Biology*, *52*(5–6), 677–682.

[26] Kashaninejad, N., Shiddiky, M. J. A., & Nguyen, N. T. (2018). Advances in Microfluidics-Based Assisted Reproductive Technology: From Sperm Sorter to Reproductive System-on-a-Chip. *Advanced Biosystems*, *2*(3), 1700197.

[27] Jayaraman, V., Upadhya, D., Narayan, P. K., & Adiga, S. K. (2012). Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *29*(6), 557.

[28] Magdanz, V., Boryshpolets, S., Ridzewski, C., Eckel, B., & Reinhardt, K. (2019). The motility-based swim-up technique separates bull sperm based on differences in metabolic rates and tail length. *PloS one*, *14*(10).

[29] Ali, A. H., Ajina, T., Ali, M. Ben, & Mehdi, M. (2022). Efficacy of density gradient centrifugation technique (DGC) in enhancing sperm cell DNA quality for assisted reproductive technique. *Middle East Fertility Society Journal*, *27*(1), 1–9.

[30] Baldini, D., Ferri, D., Baldini, G. M., Lot, D., Catino, A., Vizziello, D., & Vizziello, G. (2021). Sperm Selection for ICSI: Do We Have a Winner? *Cells*, *10*(12).

[31] Puri, D. B., Hemadri, V., Biswas, G., & Tripathi, S. (2025). Microfluidic-assisted sperm sorter: a high-throughput sperm selection device. *Lab on a Chip*.

[32] Leung, E. T. Y., Lee, C. L., Tian, X., Lam, K. K. W., Li, R. H. W., Ng, E. H. Y., Yeung, W. S. B., & Chiu, P. C. N. (2021). Simulating nature in sperm selection for assisted reproduction. *Nature Reviews Urology 2021 19:1*, *19*(1), 16–36.

[33] Jackson, R. E., Bormann, C. L., Hassun, P. A., Rocha, A. M., Motta, E. L. A., Serafini, P. C., & Smith, G. D. (2010). Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertility and sterility*, *94*(7), 2626–2630.

[34] Belva, F., Bonduelle, M., Roelants, M., Michielsen, D., Van Steirteghem, A., Verheyen, G., & Tournaye, H. (2016). Semen quality of young adult ICSI offspring: the first results. *Human reproduction (Oxford, England)*, *31*(12), 2811–2820.

[35] Zhu, L., Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, R., Wu, Y., Huang, Y., Liu, F., Li, M., Sun, S., Xing, L., Zhu, Y., Chen, Y., Xu, L., Zhou, L., Huang, H., & Zhang, D. (2016). Maternal and Live-birth Outcomes of Pregnancies following Assisted Reproductive Technology: A Retrospective Cohort Study. *Scientific reports*, *6*.

[36] Berendsen, J. T. W. (2019). Microfluidic spermatozoa selection for clinical applications.

[37] Xiang, N., & Ni, Z. (2023). Microfluidics for Biomedical Applications. *Biosensors*, *13*(2), 161.

[38] Khalighi, S., & Saadatmand, M. (2022). Review of Using Microfluidics Technology for Fabrication of Cardiovascular Engineered Bioscaffolds. *Iranian Chemical Engineering Journal*, *21*(121), 66–84, In Persian.

[39] Raji, F., & Rahbar Kelishami, R. (2020). A Review of DNA Purification Methods: Microfluidics Systems. *Iranian Chemical Engineering Journal*, *19*(111), 55–80, In Persian.

[40] Xiao, S., Riordon, J., Simchi, M., Lagunov, A., Hannam, T., Jarvi, K., Nosrati, R., & Sinton, D. (2021). FertDish: microfluidic sperm selection-in-a-dish for intracytoplasmic sperm injection. *Lab on a Chip*, *21*(4), 775–783.

[41] Sequeira, R. C., Criswell, T., Atala, A., & Yoo, J. J. (2020). Microfluidic Systems for Assisted Reproductive Technologies: Advantages and Potential Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *17*(6), 787–800.

[42] Zaferani, M., Palermo, G. D., & Abbaspourrad, A. (2019). Strictures of a microchannel impose fierce competition to select for highly motile sperm. *Science advances*, *5*(2).

[43] Ahmadkhani, N., Hosseini, M., Saadatmand, M., & Abbaspourrad, A. (2022). The influence of the female reproductive tract and sperm features on the design of microfluidic sperm-sorting devices. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *39*(1), 19–36.

[44] Denissenko, P., Kantsler, V., Smith, D. J., & Kirkman-Brown, J. (2012). Human spermatozoa migration in microchannels reveals boundary-following navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(21), 8007–8010.

[45] Mohammadi, Y., & Saadatmand, M. (2024). Exploring Thigmotaxis and Rheotaxis Mechanisms in Sperm Cell Migration Within Different Microchannels Using Finite Element Method. *2024 31st National and 9th International Iranian Conference on Biomedical Engineering, ICBME 2024*, 194–199.

[46] Nagata, M. P. B., Endo, K., Ogata, K., Yamanaka, K., Egashira, J., Katafuchi, N., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Goto, Y., Sakatani, M., Hojo, T., Nishizono, H., Yotsushima, K., Takenouchi, N., Hashiyada, Y., & Yamashita, K. (2018). Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(14), E3087–E3096.

[47] Eamer, L., Vollmer, M., Nosrati, R., San Gabriel, M. C., Zeidan, K., Zini, A., & Sinton, D. (2016). Turning the corner in fertility: high DNA integrity of boundary-following sperm. *Lab on a Chip*, *16*(13), 2418–2422.

[48] Nosrati, R., Vollmer, M., Eamer, L., San Gabriel, M. C., Zeidan, K., Zini, A., & Sinton, D. (2014). Rapid selection of sperm with high DNA integrity. *Lab on a Chip*, *14*(6), 1142–1150.

[49] Rappa, K., Samargia, J., Sher, M., Pino, J. S., Rodriguez, H. F., & Asghar, W. (2018). Quantitative analysis of sperm rheotaxis using a microfluidic device. *Microfluidics and Nanofluidics*, *22*(9), 100.

[50] Zaferani, M., Cheong, S. H., & Abbaspourrad, A. (2018). Rheotaxis-based separation of sperm with progressive motility using a microfluidic corral system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(33), 8272–8277.

[51] Khodamoradi, M., Tafti, S. R., Shaegh, S. A. M., Aflatoonian, B., Azimzadeh, M., & Khashayar, P. (2021). Recent Microfluidic Innovations for Sperm Sorting. *Chemosensors 2021, Vol. 9, Page 126*, 9(6), 126.

[52] Ahmadkhani, N., Saadatmand, M., Kazemnejad, S., & Abdekhodaie, M. J. (2023). Qualified sperm selection based on the rheotaxis and thigmotaxis in a microfluidic system. *Biomedical engineering letters*, *13*(4), 671–680.

[53] Dadkhah, E., Hajari, M. A., Abdorahimzadeh, S., Shahverdi, A., Esfandiari, F., Ziarati, N., Taghipoor, M., & Montazeri, L. (2023). Development of a novel cervix-inspired tortuous microfluidic system for efficient, high-quality sperm selection. *Lab on a Chip*, *23*(13), 3080–3091.

[54] Friedrich, B. M., & Jülicher, F. (2007). Chemotaxis of sperm cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(33), 13256–13261.

[55] Jahangiri, A. R., Ziarati, N., Dadkhah, E., Bucak, M. N., Rahimizadeh, P., Shahverdi, A., Sadighi Gilani, M. A., & Topraggaleh, T. R. (2023). Microfluidics: The future of sperm selection in assisted reproduction. *Andrology*.

[56] Bhagwat, S., Sontakke, S., Deekshith, K., Parte, P., & Jadhav, S. (2018). Chemotactic behavior of spermatozoa captured using a microfluidic chip. *Biomicrofluidics*, *12*(2).

[57] Ko, Y. J., Maeng, J. H., Hwang, S. Y., & Ahn, Y. (2018). Design, Fabrication, and Testing of a Microfluidic Device for Thermotaxis and Chemotaxis Assays of Sperm. *SLAS Technology*, *23*(6), 507–515.

[58] Bouloorchi Tabalvandani, M., Saeidpour, Z., Habibi, Z., Javadizadeh, S., & Badieirostami, M. (2024). Tunable motile sperm separation based on sperm persistence in migrating through shear barriers. *Biomicrofluidics*, *18*(6).

[59] Wu, J. K., Chen, P. C., Lin, Y. N., Wang, C. W., Pan, L. C., & Tseng, F. G. (2017). High-throughput flowing upstream sperm sorting in a retarding flow field for human semen analysis. *Analyst*, *142*(6), 938–944.

[60] Ataei, A., Lau, A. W. C., & Asghar, W. (2021). A microfluidic sperm-sorting device based on rheotaxis effect. *Microfluidics and Nanofluidics*, *25*(6), 52.

[61] Sharma, S., Kabir, M. A., & Asghar, W. (2022). Selection of healthy sperm based on positive rheotaxis using a microfluidic device. *Analyst*, *147*(8), 1589–1597.

[62] Huang, C. H., Chen, C. H., Huang, T. K., Lu, F., Jen Huang, J. Y., & Li, B. R. (2023). Design of a gradient-rheotaxis microfluidic chip for sorting of high-quality Sperm with progressive motility. *iScience*, *26*(8).

[63] Chen, S., Chen, J., Qin, Z., Wang, J., Wang, Y., Liu, R., Zhao, W., Zhang, M., Zhang, Y., & Luo, M. (2024). Microfluidic thermotaxic selection of highly motile sperm and in vitro fertilization. *Bio-Design and Manufacturing*, *7*(5), 687–700.

[64] Doostabadi, M. R., Mangoli, E., Marvast, L. D., Dehghanpour, F., Maleki, B., Torkashvand, H., & Talebi, A. R. (2022). Microfluidic devices employing chemo□and thermotaxis for sperm selection can improve sperm parameters and function in patients with high DNA fragmentation. *Andrologia*, *54*(11), e14623.

[65] ZyMōt Fertility – A better way to process sperm (n.d.)..

[66] Banti, M., Van Zyl, E., & Kafetzis, D. (2024). Sperm Preparation with Microfluidic Sperm Sorting Chip May Improve Intracytoplasmic Sperm Injection Outcomes Compared to Density Gradient Centrifugation. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*.

[67] Kishi, K., Ogata, H., Ogata, S., Mizusawa, Y., Okamoto, E., Matsumoto, Y., Kokeguchi, S., & Shiotani, M. (2015). Frequency of Sperm DNA Fragmentation According to Selection Method: Comparison and Relevance of a Microfluidic Device and a Swim-up Procedure. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, *9*(11), QC14–QC14.

[68] Ashibe, S., Irisawa, K., Yokawa, K., & Nagao, Y. (2021). Mechanism of the adverse effect of hyaluronidase used for oocyte denudation on early development of bovine embryos. *Zygote*, *29*(5), 337–341.

[69] Doshi, A., & Overton, C. (n.d.). Setting up an IVF unit. *Good Clinical Practice in Assisted Reproduction*, 289–309.

[70] Kim, I. H., Son, D. S., Lee, H. J., Yang, B. C., Lee, D. W., Suh, G. H., Lee, K. W., & Jung, S. C. (1998). Bacteria in semen used for IVF affect embryo viability but can be removed by stripping cumulus cells by vortexing. *Theriogenology*, *50*(2), 293–300.

[71] Lavy, G., Boyers, S. P., & DeCherney, A. H. (1988). Hyaluronidase removal of the cumulus oophorus increases in vitro fertilization. *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer*, *5*, 257–260.

[72] Beilby, K. H., Kneebone, E., Roseboom, T. J., van Marrewijk, I. M., Thompson, J. G., Norman, R. J., Robker, R. L., Mol, B. W. J., & Wang, R. (2023). Offspring physiology following the use of IVM, IVF and ICSI: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *Human reproduction update*, *29*(3), 272–290.

[73] Kastelic, D. (2002). ON THE OUTCOME OF INTRACYTO- EFFECT OF MULTIPLE PIPETTE USE PLASMATIC SPERM INJECTION (ICSI). *JOURNAL FÜR FERTILITÄT UND REPRODUKTION*, *12*(2), 20–33.

[74] Cho, J.-R., Yu, E.-H., Lee, H.-J., Kim, I.-H., Jeong, J.-H., Lee, D.-B., Cho, S.-K., & Joo,

J.-K. (2024). Ultra-fast vitrification: minimizing the toxicity of cryoprotective agents and osmotic stress in mouse oocyte cryopreservation. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(3), 1884.

[75] Fang, Y., Wu, R., Lee, J. M., Chan, L. H. M., & Chan, K. Y. J. (2023). Microfluidic in-vitro fertilization technologies: Transforming the future of human reproduction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *160*, 116959.

[76] Zeringue, H. C., & Beebe, D. J. (2004). Microfluidic removal of cumulus cells from mammalian zygotes. Humana Press, pp. 365–374.

[77] Zeringue, H. C., Rutledge, J. J., & Beebe, D. J. (2005). Early mammalian embryo development depends on cumulus removal technique. *Lab on a Chip*, *5*(1), 86–90.

[78] Weng, L., Lee, G. Y., Liu, J., Kapur, R., Toth, T. L., & Toner, M. (2018). On-chip oocyte denudation from cumulus-oocyte complexes for assisted reproductive therapy. *Lab on a chip*, *18*(24), 3892–3902.

[79] Dessouky, A. H., El-Hussieny, H., El-Sherry, T. M., Parque, V., & Fath El-Bab, A. M. R. (2025). Development of a low-cost microfluidic chip for hyaluronidase-free oocyte denudation in mammals. *Biotechnology Notes*, *6*, 133–142.

[80] Mutlu, B. R., Civale, S. C., Diettrich, J., Gupta, N., Barber, T., Sayare, M., Penzias, A. S., Alper, M. M., Toth, T. L., Kapur, R., Toner, M., Sakkas, D., & Ozkumur, E. (2026). Microfluidic automation improves oocyte recovery from follicular fluid of patients undergoing in vitro fertilization. *Nature Medicine*.

[81] Hoang, P., Lee, D., Lee, H., Kang, Y., & Seok, T. (2026). Development of a novel Automated Microfluidic Oocyte Denudation (AMOD) system for assisted reproductive technology, 533(February).

[82] Gilchrist, R. B., Ho, T. M., De Vos, M., Sanchez, F., Romero, S., Ledger, W. L., Anckaert, E., Vuong, L. N., & Smitz, J. (2024). A fresh start for IVM: Capacitating the oocyte for development using pre-IVM. *Human Reproduction Update*, *30*(1), 3–25.

[83] Lonergan, P., & Fair, T. (2016). Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, *4*, 255–268.

[84] Heo, Y. S., Cabrera, L. M., Bormann, C. L., Shah, C. T., Takayama, S., & Smith, G. D. (2010). Dynamic microfunnel culture enhances mouse embryo development and pregnancy rates. *Human Reproduction*, *25*(3), 613–622.

[85] Esteves, T. C., van Rossem, F., Nordhoff, V., Schlatt, S., Boiani, M., & Le Gac, S. (2013). A microfluidic system supports single mouse embryo culture leading to full-term development. *RSC Advances*, *3*(48), 26451.

[86] Huang, H.-Y., Shen, H.-H., Tien, C.-H., Li, C.-J., Fan, S.-K., Liu, C.-H., Hsu, W.-S., & Yao, D.-J. (2015). Digital microfluidic dynamic culture of mammalian embryos on an Electrowetting on Dielectric (EWOD) chip. *PLoS ONE*, *10*(5), e0124196.

[87] Liebenthron, J., Köster, M., Drengner, C., Reinsberg, J., van der Ven, H., & Montag, M. (2013). The impact of culture conditions on early follicle recruitment and growth from human

ovarian cortex biopsies in vitro. *Fertility and Sterility*, *100*(2), 483–491.

[88] Wang, M., Zhu, T., Liu, C., Jin, L., Fei, P., & Zhang, B. (2022). Oviduct-mimicking microfluidic chips decreased the ROS concentration in the in vitro fertilized embryos of CD-1 mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *154*, 113567.

[89] Smith, G. D., & Takayama, S. (2017). Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction. *Molecular Human Reproduction*, *23*(4), 257–268.

[90] Valle, J. S. Del, Mancini, V., Garay, M. L., Asseler, J. D., Fan, X., Metzemaekers, J., Louwe, L. A., Pilgram, G. S. K., & Westerlaken, L. A. J. Van Der (2022). Dynamic in vitro culture of ovarian cortical tissue using a micro fl uidics platform does not improve early folliculogenesis(July), 1–14.

[91] Franko, R., Almeida, M. De, & Melo, M. (2025). Lab on a Chip maturation with a field-deployable fluidic device †, 187–200.

[92] Vit, F. F., Sangalli, J. R., & Fiorenza, M. F. (2026). Dynamic microdevice culture during bovine oocyte maturation decreases lipid accumulation and improve blastocyst cell numbers, 1–13.

[93] Mastrorocco, A., Cacopardo, L., Temerario, L., Martino, N. A., Tridente, F., Rizzo, A., Lacalandra, G. M., Robbe, D., Carluccio, A., Elena, M., & Aquila, D. (2022). Investigating and Modelling an Engineered Millifluidic In Vitro Oocyte Maturation System Reproducing the Physiological Ovary Environment in the Sheep Model.

[94] Lee, M.-S., Hsu, W., Huang, H.-Y., Tseng, H.-Y., Lee, C.-T., Hsu, C.-Y., Shieh, Y.-C., Wang, S.-H., Yao, D.-J., & Liu, C.-H. (2020). Simultaneous detection of two growth factors from human single-embryo culture medium by a bead-based digital microfluidic chip. *Biosensors and Bioelectronics*, *150*, 111851.

[95] Rama Raju, G. A., Prakash, G. J., Krishna, K. M., & Madan, K. (2007). Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reproductive biomedicine online*, *14*(2), 166–174.

[96] Ubaldi, F., & Rienzi, L. (2008). Morphological selection of gametes. *Placenta*, *29*, 115–120.

[97] Lemseffer, Y., Terret, M.-E., Campillo, C., & Labrune, E. (2022). Methods for Assessing Oocyte Quality: A Review of Literature. *Biomedicines*, *10*(9).

[98] Bertrand, E., Van den Bergh, M., & Englert, Y. (1995). Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Human reproduction (Oxford, England)*, *10*(5), 1189–1193.

[99] Ozturk, S. (2020). Selection of competent oocytes by morphological criteria for assisted reproductive technologies. *Molecular reproduction and development*, *87*(10), 1021–1036.

[100] Iwasaki, W., Yamanaka, K., Sugiyama, D., Teshima, Y., Briones-Nagata, M. P., Maeki, M., Yamashita, K., Takahashi, M., & Miyazaki, M. (2018). Simple separation of good quality bovine oocytes using a microfluidic device. *Scientific Reports*, *8*(1), 14273.

[101] Choi, W., Kim, J.-S., Lee, D.-H., Lee, K.-K., Koo, D.-B., & Park, J.-K. (2008).

Dielectrophoretic oocyte selection chip for in vitro fertilization. *Biomedical Microdevices*, *10*, 337–345.

[102] Huang, H.-Y., Kao, W.-L., Wang, Y.-W., & Yao, D.-J. (2018). AC-electric-field-induced parthenogenesis of mouse oocyte. *Micro & Nano Letters*, *13*(6), 794–797.

[103] Polyzos, N. P., Drakopoulos, P., Parra, J., Pellicer, A., Santos-Ribeiro, S., & Tournaye, H. (2018). Cumulative live birth rates according to the number of oocytes retrieved after the first ovarian stimulation for in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a multicenter multinational analysis including~ 15,000 women. *Fertil Steril*, *110*(4), 661–670.

[104] Croxatto, H. B. (2002). Physiology of gamete and embryo transport through the Fallopian tube. *Reproductive BioMedicine Online*, *4*(2), 160–169.

[105] Menezo, Y., Dale, B., & Elder, K. (2018). Time to re-evaluate ART protocols in the light of advances in knowledge about methylation and epigenetics: an opinion paper. *Hum Fertil*, *21*(3), 156–162.

[106] Xie, Y., Wang, F., Puscheck, E. E., & Rappolee, D. A. (2007). Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress□activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, *74*(10), 1287–1294.

[107] Castiaux, A. D., Spence, D. M., & Martin, R. S. (2019). Review of 3D cell culture with analysis in microfluidic systems. *Anal Methods*, *11*(33), 4220–4232.

[108] Ebner, T., Shebl, O., Moser, M., Mayer, R. B., Arzt, W., & Tews, G. (2010). Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and live birth. *Reproductive BioMedicine Online*, *21*(6), 762–768.

[109] Kim, M. S., Bae, C. Y., Wee, G., Han, Y., & Park, J. (2009). A microfluidic *in vitro* cultivation system for mechanical stimulation of bovine embryos. *ELECTROPHORESIS*, *30*(18), 3276–3282.

[110] Mizuno, J., Ostrovidov, S., Sakai, Y., Fujii, T., Nakamura, H., & Inui, H. (2007). Human ART on chip: improved human blastocyst development and quality with IVF-chip. *Fertility and Sterility*, *88*(Suppl 1), S101.