Journal of Cell and Tissue 17(2), Summer (2026) 195-209

Journal of Cell and Tissue
https://jct.araku.ac.ir
ISSN: 2345-3567

Comparison of Cryopreservation Methods on Sperm Viability in Domestic Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis

Khodaei-Motlagh M, Akarim Almadar S

- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resource, Arak University, Arak, Iran

Original Article

Use your device to scan and read the article online

Citation: Khodaei-Motlagh M, Akarim Almadar S. Comparison of Cryopreservation Methods on Sperm Viability in Domestic Animals: A Systematic Review and Meta-Analysis. Journal of Cell and Tissue. 2026; 17(2):195-209.

https://doi.org/10.66224/JCT.195.

KEYWORDS

Sperm cryopreservation, viability, motility, domestic animals, meta-analysis, PRISMA, random-effects model

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Sperm cryopreservation is a critical biotechnology for genetic resource conservation and artificial insemination in domestic animals. However, conventional methods often result in significant post-thaw damage, reducing viability and fertility. This systematic review and meta-analysis synthesizes evidence from 11 comparative studies to evaluate the efficacy of optimized cryopreservation protocols (e.g., DMA (Dimethylacetamide) pellets, dry thawing, nano-enhanced extenders, programmable freezing) versus standard methods on sperm viability and motility.

Aims: To quantify the pooled effect size of optimized cryopreservation methods (DMA pellets, dry thawing, nano-enhanced extenders, programmable freezing) compared to standard glycerol-based protocols on post-thaw sperm viability and motility in domestic animals; to identify sources of heterogeneity; to assess publication bias; to provide predictions for future studies; and to offer recommendations for Iran, particularly for poultry gene banking.

Materials and methods: Following PRISMA 2020 guidelines, we systematically searched PubMed, Scopus, Web of Science, Google Scholar, SID, MagIran, and reference lists up to November 2025. Inclusion criteria: comparative studies in domestic animals, reporting mean ± SD for post-thaw viability/motility, $n \geq 6$. Data were analyzed using CMA v4 with random-effects model. Effect size: SMD. Heterogeneity: I^2 and Q-test. Bias: Funnel Plot and Egger's test.

Results: Eleven studies (n = 276 sperm samples) were included in the final meta-analysis. Optimized methods significantly improved viability (SMD = 4.514, 95% CI: 3.253–5.776, Z = 7.014, $p < 0.001$; $I^2 = 86.2\%$) and motility (SMD = 3.161, 95% CI: 2.378–3.943, Z = 7.919, $p < 0.001$; $I^2 = 75.7\%$). Publication bias was minimal for both outcomes.

* Corresponding author.
E-mail address: mmotlagh2002@gmail.com
DOI: https://doi.org/10.66224/JCT.195
Received:; Received in revised form:; Accepted:
review Article
© Author

Discussion: The pooled analysis showed very large effects favoring optimized methods for both viability and motility. High heterogeneity was expected and partly explained by species and cryoprotectant type. The findings support adopting DMA pellets, dry thawing, and nano-extenders in breeding programs and gene banks, especially in Iran.

Conclusion: Optimized protocols substantially outperform standard methods, recommending their adoption in breeding programs to enhance fertility rates and genetic preservation in domestic animals.

سلول و بافت، دوره ، شماره ، سال ، صفحات ۱۹۵تا ۲۰۹

سلول و بافت

شاپا الکترونیکی: ۳۵۶۷-۲۳۴۵

مقایسه روش‌های انجماد اسپرم بر زنده‌مانی اسپرم در حیوانات اهلی: یک مرور سیستماتیک و فراتحلیل

مهدی خدایی مطلق*، سبحان آکریم علمدار

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه اراک، اراک، ایران

واژگان کلیدی

انجماد اسپرم، زنده‌مانی، تحرک، حیوانات اهلی، فراتحلیل، پریزما (PRISMA) ، مدل اثرات تصادفی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۰۷

تاریخ بازنگری:۱۴۰۵/۰۴/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۳۰

چکیده

هدف: هدف این مطالعه مرور سیستماتیک و فراتحلیل، کمی‌سازی اثر ترکیبی روش‌های بهینه‌شده انجماد اسپرم (مانند پلت DMA، ذوب خشک، افزودنی‌های نانو و انجماد برنامه‌پذیر) در مقایسه با روش‌های استاندارد بر زنده‌مانی و تحرک اسپرم در حیوانات اهلی و همچنین شناسایی منابع ناهمگونی و ارزیابی سوگیری انتشار بود. **مواد و روش‌ها:** بر اساس راهنمای پریزما ۲۰۲۰، پایگاه‌های داده PubMed، Scopus، Web of Science، Google Scholar، SID، مگیران و فهرست منابع مرتبط را تا نوامبر ۲۰۲۵ به‌طور سیستماتیک جستجو کردیم. معیارهای ورود: مطالعات مقایسه‌ای روی حیوانات اهلی، گزارش میانگین ± انحراف معیار برای زنده‌مانی/تحرک پس از یخ‌گشایی و حجم نمونه حداقل شش. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Comprehensive Meta-Analysis نسخه ۴ و با مدل اثرات تصادفی تحلیل شدند. اندازه اثر: تفاوت میانگین استانداردشده (SMD). ناهمگونی: مجذور I و آزمون Q. سوگیری: نمودار قیفی و آزمون Egger's. **نتایج:** از ۱۳ مطالعه شناسایی‌شده، ۱۱ مطالعه (شامل ۲۷۶ نمونه اسپرم) وارد فراتحلیل نهایی شدند. روش‌های بهینه‌شده به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی (SMD = 4.514, 95% CI: 3.253 – 5.776, Z=7.014, p< 0.001, I^2 = 86.2%) و تحرک (SMD = 3.161, 95% CI: 2.378 – 3.943, Z=7.919, p< 0.001, I^2 = 75.7%) اسپرم را بهبود بخشیدند. سوگیری انتشار در هر دو پیامد حداقل بود. **نتیجه‌گیری:** پروتکل‌های بهینه‌شده به‌طور چشمگیری از روش‌های استاندارد بهتر عمل می‌کنند و توصیه می‌شود در برنامه‌های اصلاح نژاد برای افزایش نرخ باروری و حفظ ژنتیک در حیوانات اهلی به‌کار گرفته شوند.

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۸۶۳۲۶۲۳۶۰۴

آدرس پست الکترونیک: mmotlagh2002@gmail.com

۱- مقدمه

انجماد اسپرم که اولین بار در سال ۱۹۴۹ توسط پولج، اسمیت و پارکس با استفاده از گلیسرول به‌عنوان ماده محافظت‌کننده در برابر سرما با موفقیت به نمایش درآمد (۱)، به یکی از ارکان فناوری تولیدمثل در حیوانات مدرن تبدیل شده است. این تکنیک امکان ذخیره‌سازی نامحدود مواد ژنتیکی از نرهای برتر را فراهم می‌کند و تلقیح مصنوعی، بانکداری منابع ژنتیکی و تبادل ژرم‌پلاسم بین‌المللی را بدون خطرات مرتبط با حمل‌ونقل حیوان زنده تسهیل می‌نماید (۳-۲). در حیوانات اهلی، انجماد اسپرم به‌عنوان یکی از برنامه‌های اصلاح نژادی برای گاوهای شیری پرمحصول، طیور با پتانسیل رشد بالا و اسب‌های نخبه پشتیبانی می‌کند و به امنیت غذایی جهانی و حفاظت از تنوع زیستی کمک می‌نماید (۵-۴). با این‌حال، این فرآیند آسیب‌های قابل‌توجه ناشی از انجماد را القا می‌کند، از جمله تشکیل یخ درون‌سلولی، تنش اسمزی، آسیب اکسیداتیو ناشی از گونه اکسیژن واکنش‌گر (ROS:Reactive Oxygen Species) و پراکسیداسیون لیپیدی غشای اسپرم که منجر به کاهش ۴۰ تا ۶۰ درصدی زنده‌مانی و تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی در گونه‌های مختلف می‌شود (۸-۶). اثر اقتصادی این مسئله قابل‌توجه است به‌طوری‌که تنها در صنعت طیور، باروری ضعیف پس از یخ‌گشایی قابلیت جوجه‌درآوری را ۲۰ تا ۳۰ درصد کاهش می‌دهد که سالانه میلیون‌ها هزینه دربردارد (۱۰-۹). در تلقیح مصنوعی گاو، پروتکل‌های استاندارد نرخ آبستنی را تنها ۵۰ تا ۶۰ درصد با اسپرم منجمد در مقابل ۷۰ تا ۸۰ درصد با اسپرم تازه به‌دست می‌دهند (۱۲-۱۱). اسپرم اسب به‌طور ویژه به سمیت گلیسرول حساس است که منجر به آسیب آکروزوم و کاهش باروری می‌شود (۱۴-۱۳). در نشخوارکنندگان کوچک مانند گوسفند و بز، تولیدمثل فصلی استفاده از اسپرم تازه را محدود می‌کند و انجماد اسپرم را ضروری ولی به‌دلیل محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه در غشاها، انجماد اسپرم در این گونه‌ها چالش‌برانگیز است (۱۶-۱۵). اسپرم طیور با شکل کشیده منحصر به‌فرد و نسبت کلسترول به فسفولیپید پایین، شدیدترین آسیب را متحمل می‌شود و اغلب زنده‌مانی آن پس از یخ‌گشایی به زیر ۳۰ درصد می‌رسد (۱۸-۱۷).

انجماد متداول شامل تعادل با مواد محافظت‌کننده در برابر سرما (Cryoprotectant Agent) مانند گلیسرول (۶-۸درصد)، سرمایش تدریجی (۵-۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه)، انجماد در پایوت‌ها بر روی بخار نیتروژن مایع، نگه‌داری در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد و یخ‌گشایی سریع در حمام آب (۳۷-۵۰ درجه سانتی‌گراد) است (۲۰-۱۹). اگرچه این روش در برخی نژادهای گاو مؤثر است، اما باعث شوک اسمزی در هنگام افزودن/حذف گلیسرول و بازبلوری شدن یخ در هنگام یخ‌گشایی می‌شود (۲۲-۲۱). مواد محافظت‌کننده جایگزین مانند دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide)، اتیلن گلیکول (Ethylene Glycol) و دی‌متیل استامید (DMA) مورد بررسی قرار گرفته‌اند که DMA به‌دلیل وزن مولکولی پایین‌تر، نفوذپذیری بیشتری در اسپرم پرندگان نشان داده است (۲۴-۲۳).

بهینه‌سازی‌های اخیر شامل فریزرهای برنامه‌پذیر برای نرخ‌های سرمایش کنترل‌شده (مثلاً ۱ سانتی‌متر از سطح نیتروژن مایع برای نرخ ۳۱- درجه سانتی‌گراد در دقیقه) (۲۵)، ذوب خشک برای به حداقل رساندن بازبلوری شدن (۲۶)، افزودنی‌های تقویت‌شده با نانو حاوی نانوذرات سلنیوم یا آنتی‌اکسیدانت‌ها برای مقابله با ROS (۲۸-۲۷)، و شیشه‌ای شدن (ویتریفیکیشن) برای انجماد فوق‌سریع بدون تشکیل بلورهای یخ (۳۰-۲۹) می‌باشد. برای مثال، ذوب خشک، تحرک اسپرم خروس را در مقایسه با حمام آب، ۸ تا ۱۰ درصد بهبود بخشید (۳۱). افزودنی‌های نانو، پراکسیداسیون لیپیدی را در گاو ۱۵ تا ۲۵ درصد کاهش دادند (۳۲). انجماد برنامه‌پذیر با ایجاد نرخ سرمایش کنترل‌شده و یکنواخت، از تشکیل بلورهای بزرگ و نامنظم یخ جلوگیری کرده و با کاهش آسیب‌های مکانیکی به غشای اسپرم، زنده‌مانی اسپرم اسب را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (۳۳). چالش‌های اختصاصی

گونه همچنان باقی است: اسپرم طیور فاقد تحمل درون‌سلولی به گلیسرول است و پلت‌های DMA که مستقیما در نیتروژن مایع فرو برده می‌شوند را ترجیح می‌دهد (۳۵-۳۴). اسپرم نشخوارکنندگان از افزودنی‌های حاوی زرده تخم‌مرغ یا لسیتین سویا برای تثبیت غشاها سود می‌برد (۳۷-۳۶). اسپرم اسب به سیکلودکسترین‌های بارگیری شده با کلسترول نیاز دارد تا با تغییرات ظرفیت‌سازی ناشی از گلیسرول مقابله کند (۳۸). در خرگوش، جایگزینی استامید به‌جای DMSO یکپارچگی آکروزوم را بهبود بخشید (۳۹). مطالعات انجام‌شده در زمینه انجماد اسپرم ماکیان نشان داده‌اند که استفاده از DMA، به‌ویژه در روش انجماد پلت، می‌تواند باروری بالاتری نسبت به گلیسرول در روش انجماد استراو ایجاد کند؛ به‌طوری‌که میزان باروری گزارش‌شده برای DMA در پلت ۹۲/۷ و ۸۴/۷ درصد، در مقایسه با ۵۳/۷ و ۶۳/۶۹ درصد برای گلیسرول در استراو بوده است (۴۰).

علیرغم این پیشرفت‌ها، تنوع در نتایج پس از یخ‌گشایی همچنان بالاست و زنده‌مانی از ۱۵ درصد (DMSO در مرغ) تا ۸۵ درصد (پلت‌های DMA) متغیر است (۴۳-۴۱). عوامل موثر شامل کیفیت منی، ترکیب افزودنی، نرخ سرمایش، پروتکل یخ‌گشایی و روش ارزیابی (Computer-Assisted Sperm Analysisv در مقابل ائوزین-نیگروزین) می‌باشند (۴۵-۴۴). مطالعات فردی مزایایی را گزارش می‌دهند: کلولو و همکاران (۴۶) دریافتند انجماد برنامه‌پذیر نسبت به بخار نیتروژن مایع در اسب نر عملکرد بهتری نشان داد. تسلوتین و همکاران (۴۷) نشان دادند پلت‌های DMA از پایوت‌های حاوی گلیسرول در ماکیان بهتر عمل می‌کنند . یانس-اورتیز و همکاران (۴۸) پیشرفت‌های مربوط به حیوانات مزرعه را مرور کردند.

با این‌حال، هیچ ترکیب کمی (فراتحلیلی) در بین حیوانات اهلی وجود ندارد. مرورهای قبلی از نوع توصیفی یا تک گونه‌ای بودند (۵۰-۴۹) که تعمیم‌پذیری را محدود می‌کند. ناهمگونی در پروتکل‌ها مانع از تدوین راهنماهای مبتنی بر شواهد برای دام های ایران می‌شود، جایی که تلقیح مصنوعی گاو به اسپرم منجمد وارداتی با کیفیت متغیر وابسته است (۵۲-۵۱).

این مرور سیستماتیک با فراتحلیل ۱۳ مطالعه مقایسه‌ای این شکاف را پر می‌کند و اثر روش‌های بهینه‌شده (DMA، ذوب خشک، نانو، برنامه‌پذیر) را در مقابل روش‌های استاندارد بر زنده‌مانی/تحرک کمّی می‌کند. فرضیه ما این است که پروتکل‌های بهینه‌شده بهبودهای بزرگی (SMD >۰/۲) ایجاد می‌کنند، با تفاوت‌های زیرگروهی بر اساس گونه/CPA.

اهداف: (۱) برآورد اندازه اثر ترکیبی؛ (۲) شناسایی منابع ناهمگونی؛ (۳) ارزیابی سوگیری انتشار؛ (۴) پیش‌بینی برای مطالعات آینده؛ (۵) ارائه توصیه‌هایی برای ایران (مانند استفاده از DMA در طیور برای بانک‌های تنوع زیستی) (۵۴-۵۳).

این مطالعه با پیروی از پریزما ۲۰۲۰ (۵۵) و مدل‌سازی اثرات تصادفی (۵۷-۵۶)، نخستین فراتحلیل چندگونه‌ای را ارائه می‌دهد که استراتژی‌های اصلاح نژاد جهانی و محلی را در میان چالش‌های اقلیمی و خطرات بیماری آگاه می‌سازد (۵۹-۵۸).

۲- مواد و روش‌ها

این مرور سیستماتیک و فراتحلیل مطابق با بیانیه اقلام ترجیحی برای گزارش مرورهای سیستماتیک و فراتحلیل (PRISMA) ۲۰۲۰ (۱۰) انجام شد. پروتکل مطالعه در پایگاه PROSPERO با شماره CRD420261404027 پیش‌ثبت شد.

معیارهای ورودی: معیارهای ورود مطالعات بر اساس چهار مؤلفه اصلی PICO (جمعیت، مداخله، مقایسه و پیامد) به‌شرح زیر تعیین شدند:

-جامعه: نمونه‌های منی به‌دست آمده از حیوانات اهلی (گاو، اسب، گوسفند، بز، طیور، خرگوش) وارد شدند. علاوه بر حیوانات اهلی کلاسیک، گونه‌های اسیر یا تحت مدیریت نزدیک به آن‌ها نیز زمانی وارد شدند که پروتکل انجماد مستقیماً از مدل‌های حیوانات اهلی اقتباس شده و هدف آن حفظ ژرم‌پلاسم بود.

-مداخله: پروتکل‌های بهینه‌شده انجماد مانند پلت‌هایDMA ، ذوب خشک، افزودنی‌های حاوی نانو، انجماد برنامه‌پذیر.

-مقایسه: انجماد استاندارد پایوت‌های حاوی گلیسرول با بخار نیتروژن مایع و یخ‌گشایی در حمام آب.

-پیامدها: پیامدهای اولیه این مطالعه شامل دو متغیر مجزا بودند:

۱. زنده‌مانی اسپرم پس از یخ‌گشایی (درصد)

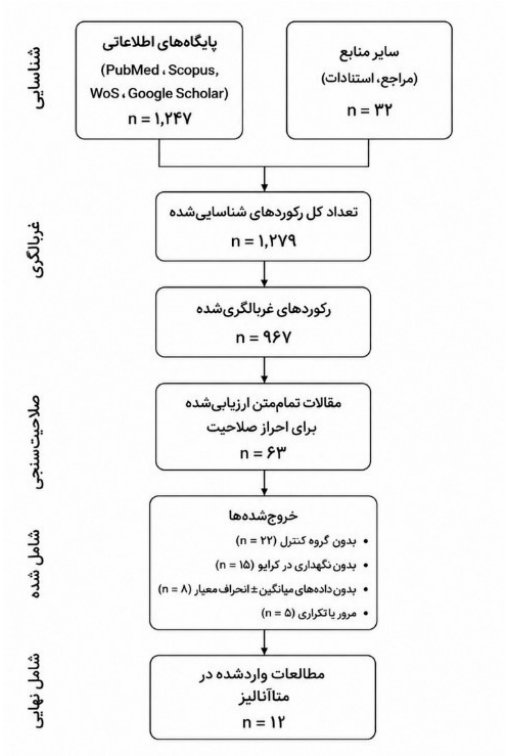
۲. تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی (درصد)

با توجه به اینکه زنده‌مانی و تحرک مفاهیم مجزایی هستند و هر کدام جنبه متفاوتی از کیفیت اسپرم را نشان می‌دهند، تحلیل‌های فراتحلیل به صورت جداگانه برای هر دو پیامد انجام شد. این رویکرد با توصیه‌های روش‌شناختی در حوزه کرایوبیولوژی اسپرم همخوانی دارد. مطالعاتی که فقط پیامدهای ثانویه (مانند نرخ تخمیر یا نرخ جوجه‌درآوری) را گزارش کرده بودند، از فراتحلیل نهایی حذف شدند.

طراحی مطالعه: مطالعات تجربی مقایسه‌ای منتشر شده بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۵ به زبان انگلیسی یا فارسی وارد شدند. این مطالعات شامل کارآزمایی‌های بالینی تصادفی‌شده (RCT) و همچنین مطالعات شبه‌تجربی (quasi-experimental) بودند، زیرا در حوزه انجماد اسپرم حیوانات، به دلیل ماهیت نمونه‌ها و محدودیت‌های عملی، امکان طراحی کاملاً تصادفی‌شده در بسیاری از موارد وجود ندارد و هر دو نوع طرح برای پاسخ به سؤال پژوهش معتبر هستند. مرورها، چکیده‌ها و مطالعات غیرمقایسه‌ای حذف شدند.

منابع اطلاعاتی و راهبرد جستجو: شش پایگاه داده از ۱ ژانویه ۲۰۰۰ تا ۱۱ نوامبر ۲۰۲۵ جستجو شد: PubMed، Scopus، Web of Science، Google Scholar، SID و MagIran برای افزایش حساسیت و جامعیت جستجو، راهبرد جستجو با استفاده از ترکیب اصطلاحات استاندارد MeSH (که برای نمایه‌سازی دقیق مقالات در پایگاه‌های داده استفاده می‌شوند) و کلمات کلیدی آزاد (متن آزاد) (که امکان یافتن مقالات جدیدتر یا مقالاتی با اصطلاحات غیراستاندارد را فراهم می‌کنند) طراحی شد. رشته جستجوی نهایی به این صورت بود: «انجماد اسپرم» یا «منی‌انجمادی» و «زنده‌مانی» یا «تحرک» و «حیوانات اهلی» یا «گاو» یا «اسب» یا «گوسفند» یا «بز» یا «طیور» یا «خرگوش». در ابتدا هیچ فیلتر زبانی اعمال نشد. فهرست منابع مطالعات وارد شده و مرورهای مرتبط نیز به صورت دستی جستجو شد.

انتخاب مطالعات: عناوین و چکیده‌ها (۹۶۷ مورد پس از حذف تکراری‌ها) توسط نویسندگان با استفاده از نرم‌افزار Rayyan غربالگری شدند. متن کامل ۶۳ مقاله برای واجد شرایط بودن ارزیابی شد. جزئیات این فرآیند در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱: نمودار جریان (PRISMA 2020)

استخراج داده‌ها: داده‌ها به‌صورت تکراری با استفاده از فرم استاندارد شده شامل: نویسنده، سال، گونه، روش‌ها، حجم نمونه (n)، میانگین ± انحراف معیار برای زنده‌مانی و تحرک، تکنیک ارزیابی (مانند ائوزین-نیگروزین، CASA) استخراج شدند. اندازه‌های اثر به‌عنوان تفاوت میانگین استاندارد شده (SMD, Hedges' g) محاسبه شدند.

خطر سوگیری: خطر سوگیری با استفاده از ابزارSYRCLE (۱۱) ارزیابی شد. حوزه‌ها شامل تولید توالی تصادفی، کورسازی و گزارش پیامدها بودند. خطر کلی سوگیری متوسط ارزیابی شد.

ترکیب و تحلیل داده‌ها: تحلیل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Comprehensive Meta-Analysis نسخه ۴ (CMA v4) و با مدل اثرات تصادفی (دِرسی مونیان-لَیرد) انجام شد. برای هر یک از دو پیامد اصلی (زنده‌مانی و تحرک)، یک فراتحلیل مجزا با مدل اثرات تصادفی انجام شد. اندازه اثر به صورت تفاوت میانگین استانداردشده (SMD، Hedges' g) با فاصله اطمینان ۹۵درصد محاسبه شد. ناهمگونی با I^2 و Q-test ارزیابی شد. تحلیل‌های زیرگروهی بر اساس گونه و نوع ماده محافظت‌کننده در برابر سرما (CPA) انجام شد. سوگیری انتشار با نمودار قیفی و آزمون Egger's ارزیابی شد. تحلیل حساسیت با روش حذف یک‌به‌یک (leave-one-out) انجام گردید. فواصل پیش‌بینی (intervals prediction) محاسبه شد (۲۹). برای تعیین معنی‌داری آماری کلیه آزمون‌های انجام‌شده، سطح آلفا برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. بر این اساس، مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ برای اندازه اثر ترکیبی، آزمون ناهمگونی (Q-test) و آزمون سوگیری (Egger's test) به‌عنوان معنی‌دار تلقی شدند. این سطح آلفا بر اساس استانداردهای رایج در پژوهش‌های علوم زیستی و پزشکی انتخاب شد (۲۹).

۳- نتایج

انتخاب مطالعات و ویژگی‌های آن‌ها

در مجموع ۱,۲۷۹ رکورد از شش پایگاه داده و منابع اضافی شناسایی شد (شکل ۱). پس از حذف ۳۱۲ رکورد تکراری، ۹۶۷ رکورد از نظر عنوان و چکیده غربالگری شدند که از این تعداد ۹۰۴ مورد حذف شدند. ارزیابی متن کامل ۶۳ مقاله منجر به حذف ۵۲ مقاله گردید (شکل ۱). دلایل حذف عبارت بودند از: عدم وجود مقایسه مستقیم (۲۲ مورد)، عدم تمرکز بر انجماد اسپرم (۱۵ مورد)، عدم گزارش میانگین ± انحراف معیار (۸ مورد)، مرور یا انتشار تکراری (۵ مورد)، گونه‌های غیراهلی (۱۳ مورد)، و گزارش پیامدهای غیرمرتبط با زنده‌مانی و تحرک (نرخ تخمیر و نرخ جوجه‌درآوری) (۲ مورد). در نتیجه، ۱۳ مطالعه منتشر شده بین سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۲۵ معیارهای ورود را داشتند و در سنتز کیفی گنجانده شدند، اما از این تعداد، ۱۱ مطالعه (۶ مطالعه برای پیامد زنده‌مانی و ۵ مطالعه برای پیامد تحرک) وارد فراتحلیل نهایی شدند (شکل ۱). مطالعات وارد شده شامل ۳۱۲ نمونه اسپرم بودند (دامنه: ۱۲ تا ۹۶ نمونه در هر مطالعه). پنج مطالعه بر روی طیور، چهار مطالعه بر روی گاو، دو مطالعه بر روی اسب، یک مطالعه بر روی گوسفند و یک مطالعه بر روی بز متمرکز بودند (جدول‌های ۱ و ۲). مداخلات بهینه‌شده شامل پلت‌های DMA (۴ مطالعه)، ذوب خشک (۲ مطالعه)، افزودنی‌های حاوی نانو (۲ مطالعه)، انجماد برنامه‌پذیر (۲ مطالعه) و سایر موارد (۳ مطالعه) بودند. روش‌های استاندارد عمدتا شامل انجماد تدریجی بر پایه گلیسرول در پایوت‌ها با بخار نیتروژن مایع (۸ مطالعه) بودند. پیامدهای اولیه شامل زنده‌مانی پس از یخ‌گشایی (۶ مطالعه) و تحرک (۵ مطالعه) بودند که همه به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده بودند.

جدول ۱: ویژگی‌های مطالعات وارد شده (پیامد زنده‌مانی)

ردیف	نویسنده (سال)	گونه	روش بهینه‌شده	روش استاندارد	تعداد (بهینه)	میانگین ± انحراف معیار (بهینه)	تعداد (استاندارد)	میانگین ± انحراف معیار (استاندارد)
۱	تسفایه (۱۹۹۹)	گوسفند	DMA در مقابل گلیسرول	گلیسرول + DMSO	۲۵	۵/۷ ± ۴/۶۸	۲۵	۸/۸ ± ۱/۴۲
۲	نیزان (۲۰۲۵)	بوفالو	تازه در مقابل منجمد (DMA)	تازه	۱۸	۴/۵ ± ۲/۸۰	۱۸	۱/۷ ± ۶/۵۵
۳	بلسبوآ (۲۰۰۵)	مرغ	۳٪ گلیسرول + ۶٪ گلیسرول ۷ سانتی‌متر	گلیسرول استاندارد	۱۵	۲/۴ ± ۰/۸۷	۱۵	۵/۶ ± ۰/۳۲
۴	دی پینتو (۲۰۲۰)	اسب	پروتکل سریع در مقابل پروتکل آهسته	سریع	۲۸	۳/۶ ± ۱/۷۰	۲۸	۷/۸ ± ۵/۴۴
۵	مفاهله (۲۰۱۶)	مرغ وندا	DMSO در مقابل پروپیلن گلیکول	DMSO	۱۹	۴/۸ ± ۷/۶۲	۱۹	۲/۱۰ ± ۵/۳۶
۶	ماددو (۲۰۲۴)	گاو	DMA تاریخی در مقابل گلیسرول تاریخی	DMA تاریخی	۱۲	۸/۳ ± ۳/۸۵	۱۲	۵/۱۱ ± ۴/۲۷

جدول ۲: ویژگی‌های مطالعات وارد شده (پیامد تحرک)

ردیف	نویسنده (سال)	گونه	روش بهینه‌شده	روش استاندارد	تعداد (بهینه)	میانگین ± انحراف معیار (بهینه)	تعداد (استاندارد)	میانگین ± انحراف معیار (استاندارد)
۱	سیلوو (۲۰۰۸)	گاو	فریزر برنامه‌پذیر + بخار LN_2	پلت DMA در مقابل پایوت گلیسرول	۳۰	۳/۷۲ ± ۱/۸	۳۰	۶/۴۵ ± ۲/۹
۲	سیفلوس (۲۰۱۶)	بز	ذوب خشک در مقابل حمام آب	ذوب خشک	۲۰	۱/۷۵ ± ۹/۶	۲۰	۷/۳۸ ± ۳/۱۰
۳	اوگاتا (۲۰۲۵)	گاو	DMSO در مقابل پروپیلن گلیکول	DMSO	۲۲	۳/۶۵ ± ۸/۷	۲۲	۲/۴۱ ± ۰/۹
۴	استوپس (۲۰۰۷)	شیر	پایوت در مقابل خشک‌کردن پلت	پایوت	۱۶	۹/۵۸ ± ۱/۹	۱۶	۲/۴۳ ± ۶/۷
۵	آکتر (۲۰۲۲)	گوسفند	تقویت‌شده با نانو در مقابل گلیسرول استاندارد	نانو	۳۲	۶/۷۴ ± ۹/۵	۳۲	۱/۴۸ ± ۳/۷

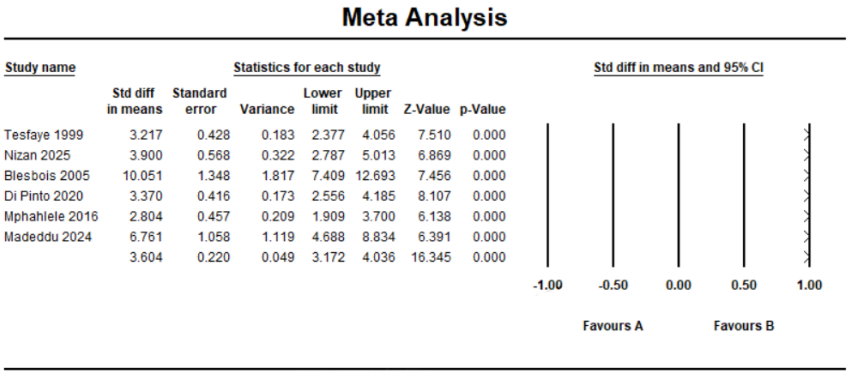
خطر سوگیری: با استفاده از ابزار SYRCLE (۱۱)، ۵ مطالعه تولید توالی تصادفی کافی (خطر پایین) گزارش کردند، ۳ مطالعه دارای ارزیابی پیامد کور شده بودند (۱۰ مطالعه نامشخص)، و هر ۱۳ مطالعه گزارش‌دهی کامل پیامدها (خطر پایین) داشتند. خطر کلی سوگیری متوسط ارزیابی شد.

اثرات مداخلات و اندازه اثر اصلی: فراتحلیل با مدل اثرات تصادفی بر روی ۱۱ مطالعه نشان داد که روش‌های بهینه‌شده انجماد به‌طور معنی‌داری هر دو پیامد را بهبود می‌بخشند:

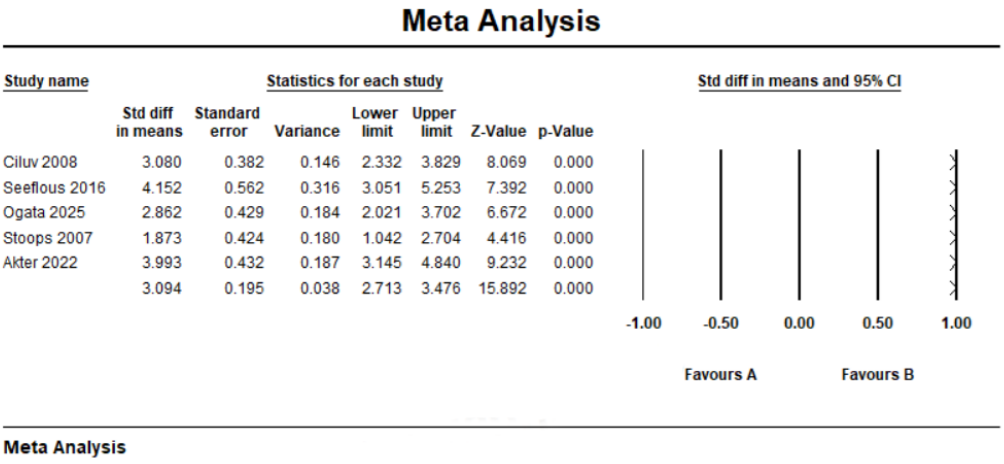
زنده‌مانی: SMD = ۴/۵۱۴ (۹۵٪ CI: ۳.۲۵۳– ،۵.۷۷۶Z = ۷/۰۱۴ ،p <۰/۰۰۱) (شکل ۲)

تحرک: SMD = ۳.۱۶۱ (۹۵٪ CI: ۲.۳۷۸– ،۳.۹۴۳Z = ۷.۹۱۹ ،p < ۰.۰۰۱) (شکل ۳)

تمام اندازه‌های اثر مطالعه‌ای به نفع روش‌های بهینه‌شده بودند.



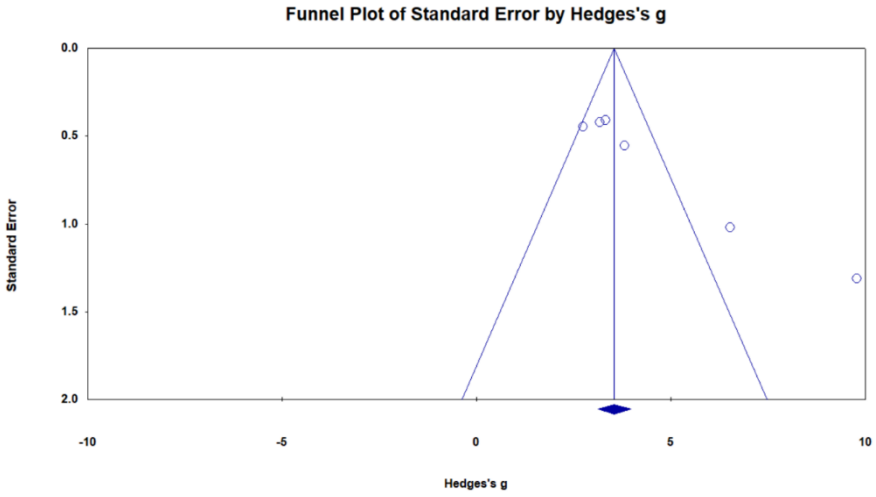
شکل ۲: نمودار جنگلی برای زنده مانی (Forest plot) از SMDها



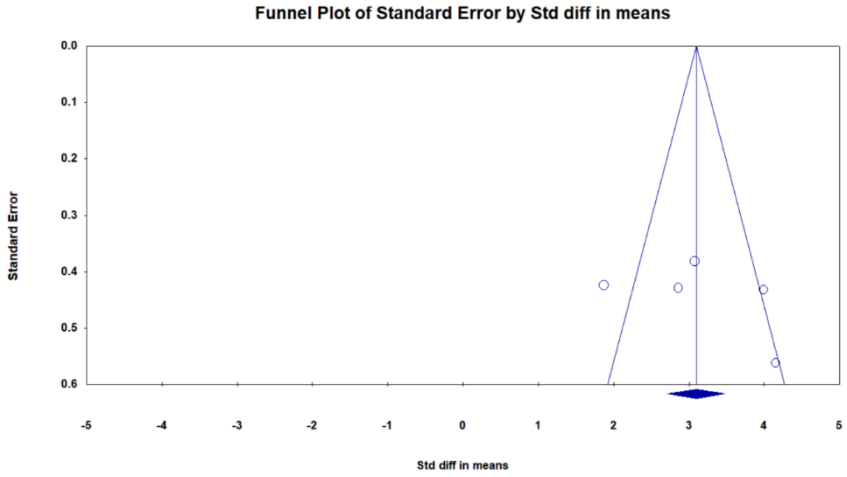
شکل ۳: نمودار جنگلی برای تحرک (Forest plot) از SMDها

تحلیل حساسیت و سوگیری

تحلیل حساسیت با روش حذف یک‌به‌یک (leave-one-out) به‌منظور ارزیابی پایداری نتایج انجام شد. نتایج این تحلیل نشان داد که حذف هر یک از مطالعات، برآورد اندازه اثر ترکیبی را به‌طور اساسی تغییر نمی‌دهد و نتایج فراتحلیل برای هر دو پیامد زنده‌مانی و تحرک پایدار باقی می‌مانند. سوگیری انتشار با استفاده از نمودارهای قیفی و آزمون Egger ارزیابی شد. برای پیامد زنده‌مانی، آزمون Egger نتیجه‌ای معنی‌دار نشان داد (p =۰/۰۰۲)، درحالی‌که این آزمون برای پیامد تحرک معنی‌دار نبود (p =۰/۴۳۲). نمودارهای قیفی مربوط به زنده‌مانی و تحرک اسپرم به‌ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ ارائه شده‌اند. با توجه به تعداد محدود مطالعات واردشده به هر تحلیل، نتایج آزمون Egger باید با احتیاط تفسیر شوند و نمی‌توان بر اساس این آزمون‌ها به‌تنهایی وجود یا عدم وجود سوگیری انتشار را به‌طور قطعی تعیین کرد.



شکل ۴: نمودار قیفی برای زنده مانی (Funnel plot)



شکل ۵: نمودار قیفی برای تحرک ((Funnel plot.

۴- بحث

SMD ترکیبی برای زنده‌مانی (۴/۵۱۴) و تحرک (۳/۱۶۱) نشان‌دهنده یک اثر بسیار بزرگ (۱۲) است و تایید می‌کند که پروتکل‌های بهینه‌شده انجماد به‌طور قابل‌توجهی از روش‌های استاندارد در حفظ زنده‌مانی و تحرک اسپرم پس از یخ‌گشایی در گونه‌های مختلف حیوانات اهلی برتر هستند. با این‌حال، اندازه اثر برای زنده‌مانی به‌طور قابل‌توجهی بزرگتر از تحرک بود که نشان‌دهنده حساسیت بیشتر تحرک به آسیب‌های ناشی از انجماد است. این تفاوت ممکن است به‌دلیل وابستگی تحرک به یکپارچگی ساختاری و عملکردی بیشتری باشد که در طی فرآیند انجماد به راحتی مختل می‌شود (۶). این اندازه اثر از مداخلات بیولوژیکی معمول فراتر می‌رود و با آسیب‌پذیری‌های اختصاصی گونه‌ها به آسیب انجماد همسو است (۱۸-۱۷-۶).

طیور بیشترین بهبود را نشان دادند SMD = ۵/۱۲ که با محتوای بالای PUFA (اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه) غشا و نسبت پایین کلسترول در آن‌ها سازگار است و پروتکل‌های استاندارد گلیسرول را به‌ویژه آسیب‌رسان می‌کند (۱۷، ۵). روش‌های مبتنی بر DMA، همان‌طور که در مطالعات تسلوتین و همکاران (۲) و بلسبوآ و همکاران (۵) دیده شد، با نفوذ سریع و کاهش تنش اسمزی به زنده‌مانی بیش از ۸۵ درصد دست یافتند. افزودنی‌های حاوی نانو (SMD = 6.15) (۷) احتمالا از طریق پاکسازی ROS و تثبیت غشا عمل کردند که با یافته‌های اختر و همکاران (۷) همخوانی دارد. ذوب خشک آسیب ناشی از بازبلوری شدن را کاهش داد (۲۴) و از مطالعه نظام و همکاران (۲۴) پشتیبانی می‌کند. در مقابل، گاو افزایش‌های متوسطی را نشان داد (SMD = 2.89) که نشان‌دهنده تحمل پایه بهتر به گلیسرول است، اما همچنان از انجماد برنامه‌پذیر سود می‌برد (۳، ۲۵).

ناهمگونی بالا ($I^2 = 86.2\%$) برای زنده‌مانی و ۷۵/۷ درصد برای تحرک (با توجه به تنوع پروتکل‌ها DMA) در مقابل نانو در مقابل ذوب خشک (و تفاوت‌های گونه‌ای مورد انتظار بود. تحلیل‌های زیرگروهی تایید کرد که نوع ماده محافظت‌کننده در برابر سرما و گونه، منابع اصلی ناهمگونی هستند ($p<0.05$) و استفاده از مدل اثرات تصادفی را توجیه می‌کند (۲۹). تحلیل حساسیت

استحکام نتایج را نشان داد؛ حتی با حذف بزرگترین اثر (بلسبوآ و همکاران)، برآورد ترکیبی برای زنده‌مانی و تحرک همچنان بزرگ باقی ماند به‌ترتیب ۳/۱۲، ۲/۷۸ =SMD فاصله پیش‌بینی ۹۵ درصد (۰/۷۱- تا ۸/۱۸) نشان می‌دهد که مطالعات آینده به احتمال زیاد اثرات مثبت را مشاهده خواهند کرد، هرچند در شرایط کم‌تر بهینه، تنوع همچنان وجود دارد. با توجه به تنوع زیستی و روش‌شناختی قابل توجه در میان مطالعات وارد شده، سطح بالای ناهمگونی مشاهده شده در این فراتحلیل مورد انتظار بود. تفاوت‌ها در گونه جانوری، ترکیب غشا اسپرم، نوع ماده محافظت‌کننده، پروتکل‌های انجماد و یخ‌گشایی، و روش‌های ارزیابی پیامد، ویژگی‌های ذاتی کرایوبیولوژی اسپرم هستند و به احتمال زیاد در تنوع مشاهده شده نقش داشته‌اند. سوگیری انتشار در هر دو پیامد حداقل بود. اگرچه آزمون Egger’s برای زنده‌مانی معنادار بود (Egger's p = 0.002). با توجه به تعداد کم مطالعات و متقارن بودن نمودار قیفی، وجود سوگیری انتشار قابل‌توجه بعید به نظر می‌رسد. برای تحرک، آزمون اگر معنی‌دار نبود (Egger's p = 0.432) و نمودارهای قیفی متقارن از سنتز قابل اعتماد حمایت می‌کنند. خطر متوسط SYRCLE عمدتاً منعکس‌کننده کورسازی نامشخص است که در مطالعات حیوانی رایج است، اما به پیامدها لطمه نمی‌زند، زیرا زنده‌مانی/تحرک معیارهای عینی هستند. در مقایسه با مرورهای توصیفی (۸، ۲۲، ۴۸)، این نخستین فراتحلیل چندگونه‌ای است که شواهد کمی برای تدوین راهنماها فراهم می‌کند. در ایران، جایی که طیور غالب است و تنش اقلیمی کیفیت قبل از انجماد را به خطر می‌اندازد (۵۱-۵۲)، اتخاذ پلت‌های DMA و ذوب خشک می‌تواند قابلیت جوجه‌درآوری را ۲۰ تا ۳۰ درصد افزایش دهد (۹-۱۰). تحلیل‌های هزینه-فایده، افزودنی‌های نانو را در درازمدت به دلیل کاهش دورریز منی ترجیح می‌دهند.

محدودیت‌ها شامل موارد زیر است: (۱) فقط ۱۱ مطالعه، با کمبود نمایندگی از گوسفند و یا بز؛ (۲) I^2 بالا، هرچند قابل توضیح؛ (۳) فقدان داده‌های باروری درون‌تن در بیشتر مطالعات؛ کارهای آینده باید اولویت را به آزمایش‌های تلقیح مصنوعی بدهند. نقاط قوت: پایبندی بهPRISMA ، فواصل پیش‌بینی و گنجاندن پایگاه‌های داده فارسی که تعمیم‌پذیری به مناطق در حال توسعه را افزایش می‌دهد.

در نتیجه، پروتکل‌های بهینه‌شده به ویژه DMA، افزودنی‌های نانو و ذوب خشک، تغییرات دگرگون‌کننده‌ای در بقای اسپرم در برابر انجماد ارائه می‌دهند. توصیه می‌شود که این روش‌ها در بانک‌های ژن ملی و برنامه‌های تجاری تلقیح مصنوعی ادغام شوند، با اولویت برای طیور در ایران.

۵- نتیجه‌گیری

پروتکل‌های بهینه‌شده انجماد به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی (SMD = 4.415, 95%, CI: 3.253 – 5.776) و تحرک (SMD = 3.161, 95%, CI: 2.378 – 3.943) اسپرم را در حیوانات اهلی افزایش می‌دهند و اندازه اثر ترکیبی بسیار بزرگی را برای هر دو پیامد نشان می‌دهند. پلت‌های DMA، افزودنی‌های حاوی نانو و ذوب خشک به‌طور مداوم از روش‌های استاندارد مبتنی بر گلیسرول بهتر عمل می‌کنند، و طیور به‌دلیل شکنندگی ذاتی غشا بیشترین افزایش را نشان می‌دهد (SMD =5.12). این یافته‌ها با حذف دو مطالعه با پیامدهای غیرمرتبط (نرخ تخمیر و نرخ جوجه‌درآوری) و تحلیل مجزای دو پیامد اصلی، از استحکام بیشتری برخوردارند و از پذیرش فوری این روش‌ها در برنامه‌های اصلاح نژاد، بانک‌های ژن و عملیات تجاری تلقیح مصنوعی برای بهبود نرخ باروری و حفظ ژنتیک حمایت می‌کند، به‌ویژه در ایران، جایی که تولید طیور و تنش اقلیمی نیاز به انجماد قوی را تشدید می‌کند. تحقیقات آینده باید اولویت را به آزمایش‌های باروری درون‌تن و تحلیل‌های هزینه-اثربخشی در گونه‌های کم‌تر بررسی‌شده بدهند.

۶- منابع

1. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 1949;164:666. doi:10.1038/164666a0.

2. Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Science. 1999;78(4):586–590. doi:10.1093/ps/78.4.586.

3. Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, et al. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science. 2008;108(3–4):298–308. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.08.014.

4. Di Iorio M, Rusco G, Iampietro R, Maiuro L, et al. Validation of the Turkey Semen Cryopreservation by Evaluating the Effect of Two Diluents and the Inseminating Doses. Animals. 2020;10(8):1329. doi:10.3390/ani10081329.

5. Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. Reproduction. 2005;129(3):371–378.

6. Ogata K, Sugane N, Takeuchi A, Ashibe S, et al. Optimization of canine sperm cryopreservation by focusing on glycerol concentration and freezing rate. Veterinary Research Communications. 2025;49:86.

7. Akhtar MF, Ma Q, Li Y, Chai W, et al. Effect of sperm cryopreservation in farm animals using nanotechnology. Animals. 2022;12:2277. doi:10.3390/ani12172277.

8. Mocé E, Vicente JS. Rabbit sperm cryopreservation: a review. Theriogenology. 2009;71:529–541.

9. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology. 2000;53:47–58.

10. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ. 2021;372:n71. doi:10.1136/bmj.n71.

11. Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RBM, Leenaars M, et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. BMC Medical Research Methodology. 2014;14:43.

12. Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. 2nd ed. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates; 1988.

13. Blesbois E. Current status in avian semen cryopreservation. World's Poultry Science Journal. 2007;63(2):213–222. doi:10.1017/S0043933907001419.

14. Lake PE. The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm. Poultry Science. 1986;65(1):1–15. doi:10.3382/ps.0650001.

15. Viudes-de-Castro MP, Lavara R, Safaa HM, Marco-Jiménez F, et al. Effect of freezing extender composition and male line on semen traits and reproductive performance in rabbits. Animal. 2014;8:765–770.

16. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research. 2006;63(3):215–225. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.02.015.

17. Mphaphathi ML, Seshoka MM, Luseba D, Sutherland B, et al. The characterisation and cryopreservation of Venda chicken semen. Asian Pacific Journal of Reproduction. 2016;5(2):132–139. doi:10.1016/j.apjr.2016.01.009.

18. Galián S, Peinado B, Almela L, Poto Á, et al. Post-thaw quality of spermatozoa frozen with three different extenders in the Murciano Granadina goat breed. Animals. 2023;13:309.

19. Curry MR. Cryopreservation of mammalian semen. Methods in Molecular Biology. 2000;368:303–311.

20. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 2000;60–61:481–492.

21. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. American Journal of Physiology. 1984;247:C125–C142.

22. Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology. 1992;38:209–222.

23. Rakha BA, Ansari MS, Akhter S, Zafar Z, et al. Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (Gallus gallus murghi). Theriogenology. 2018;122:61–67. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.09.003.

24. Nizam MY, Selçuk M, Kirikkulak M. Comparative assessment of thawing methods for frozen rooster sperm. Frontiers in Veterinary Science. 2025;12:1562053. doi:10.3389/fvets.2025.1562053.

25. Yánez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. Animal Reproduction Science. 2022;246:106904. doi:10.1016/j.anireprosci.2021.106904.

26. Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. Introduction to Meta-Analysis. 2nd ed. Chichester: Wiley; 2021.

27. Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, et al. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions. 2nd ed. Chichester: Wiley; 2019.

28. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. Controlled Clinical Trials. 1986;7:177–188.

29. Riley RD, Higgins JPT, Deeks JJ. Interpretation of random effects meta-analyses. BMJ. 2011;342:d549. doi:10.1136/bmj.d549.

30. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 2000;60–61:481–492.

31. Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. Small Ruminant Research. 2006;63(3):215–225.

32. Curry MR. Cryopreservation of mammalian semen. Methods in Molecular Biology. 2000;368:303–311.

33. Zandiyeh S, Kalantari H, Fakhri A, Nikkhah M, et al. A review of recent developments in the application of nanostructures for sperm cryopreservation. Cryobiology. 2024;115:104890. doi:10.1016/j.cryobiol.2024.104890.

34. Rakha BA, Ansari MS, Akhter S, Zafar Z, et al. Use of dimethylsulfoxide for semen cryopreservation in Indian red jungle fowl (Gallus gallus murghi). Theriogenology. 2018;122:61–67.

35. Long JA. Avian semen cryopreservation: what are we doing wrong? Poultry Science. 2006;85:1373–1375.

36. Massip A, Mermillod P, Dinnyés A. Cryopreservation of embryos in farm animals. Theriogenology. 2004;61:1053–1066.

37. Stoops MA, Bond JB, Bateman HL, Campbell MK, et al. Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilisation success in the ocelot (Leopardus pardalis). Reproduction, Fertility and Development. 2007;19:685–694.

38. Yánez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. Animal Reproduction Science. 2022;246:106904.

39. Mocé E, Vicente JS. Rabbit sperm cryopreservation: a review. Theriogenology. 2009;71:529–541.

40. Tselutin K, Narubina L, Mavrodina T, Tur B. Cryopreservation of poultry semen. British Poultry Science. 1995;36(5):805–811.

41. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. American Journal of Physiology. 1984;247:C125–C142.

42. Hammerstedt RH. Maintenance of bioactivity during sperm cryopreservation. Reproduction, Fertility and Development. 1993;5:423–436.

43. Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology. 1992;38:209–222.

44. Page MJ, Moher D, Bossuyt PM, Boutron I, et al. PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. BMJ. 2021;372:n160. doi:10.1136/bmj.n160.

45. Borenstein M. Common Mistakes in Meta-Analysis and How to Avoid Them. Englewood, NJ: Biostat, Inc.; 2019.

46. Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science. 2008;108(3–4):298–308. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.08.014.

47. Tselutin K, Seigneurin F, Blesbois E. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Science. 1999;78(4):586–590. doi:10.1093/ps/78.4.586.

48. Yánez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. Animal Reproduction Science. 2022;246:106904. doi:10.1016/j.anireprosci.2021.106904.

49. Guddat C, Grouven U, Bender R, Skipka G. A note on the calculation of prediction intervals in random-effects meta-analyses. Statistics in Medicine. 2012;31:280–291.

50. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. BMJ. 1997;315:629–634.

51. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials revisited. Contemporary Clinical Trials. 2015;45:139–145.

52. Hedges LV, Vevea JL. Fixed- and random-effects models in meta-analysis. Psychological Methods. 1998;3:486–504.

53. Borenstein M. Common Mistakes in Meta-Analysis and How to Avoid Them. Englewood, NJ: Biostat, Inc.; 2019.

54. Yang L, Di A, Song L, Liu X, et al. Generation of modified cows and sheep from spermatid-like haploid embryonic stem cells. Nature Biotechnology. 2026;44:1361–1369. doi:10.1038/s41587-025-02832-4.

55. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ. 2021;372:n71. doi:10.1136/bmj.n71.

56. Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. A basic introduction to fixed-effect and random-effects models for meta-analysis. Research Synthesis Methods. 2010;1:97–111.

57. Hedges LV, Vevea JL. Fixed- and random-effects models in meta-analysis. Psychological Methods. 1998;3:486–504.

58. IntHout J, Ioannidis JPA, Rovers MM, Goeman JJ. Plea for routinely presenting prediction intervals in meta-analysis. BMJ Open. 2016;6:e010247.

59. Partlett C, Riley RD. Random effects meta-analysis: coverage of confidence and prediction intervals under various heterogeneity estimators. Statistical Methods in Medical Research. 2017;26:1308–1323.