دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در گرایش فیزیولوژی دام

موضوع:

تاثیر انجماد دو مرحله‌ای، زمان اضافه کردن گلیسرول و ارتفاع پایوت ها از سطح ازت مایع بر کیفیت اسپرم قوچ پس از روند انجماد– ذوب

استاد راهنما

دکتر فرهاد فرخی اردبیلی

استاد مشاور

دکتر ایرج برنوسی

اساتید داور

دکتر محسن دانشیار **دکتر اسماعیل آین**

پژوش و نگارش

بهنام ریحانی

مهر ماه ۱۳۹۳

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است

چکیده فارسی

این تحقیق به منظور بررسی تاثیر زمان اضافه کردن گلیسرول، سرد سازی اولیه(انجماد دو مرحله ای) و ارتفاع پایوت ها از سطح ازت مایع بر کیفیت اسپرم قوچ پس از روند انجماد- ذوب انجام گرفت. برای این منظور نمونه منی از ۴ راس قوچ قزل (سن ۶ سال) جمع‌آوری و پس از ارزیابی اولیه از لحاظ حجم، غلظت، رنگ و حرکت توده ای مناسب با هم مخلوط شدند. نمونه مخلوط منی به دو قسمت مساوی تقسیم گردیدند. قسمت اول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با رقیق کننده حاوی ۵ درصد گلیسرول رقیق شدند (روش یک مرحله ای). قسمت دوم ابتدا با رقیق کننده بدون گلیسرول رقیق شده و پس از کاهش دما به ۴ درجه سانتی گراد و قبل از طی زمان تعادل، گلیسرول به میزان ۵٪ به آن اضافه گردید (روش دومرحله ای). پس از طی زمان تعادل نمونه های رقیق شده در پایوت های ۰/۵cc پر شدند. برای ارزیابی تاثیر انجماد (یا سردسازی) اولیه، پایوت ها به سه قسمت تقسیم شد. برای سرد سازی اولیه پایوت‌ها ابتدا در محفظه بالایی ظرف انجماد (دمای ۲۵ -تا ۳۵- درجه سانتی گراد) برای سه بازه‌ی زمانی مختلف صفر، ۵ و۱۰ دقیقه قرار داده شدند. در مرحله نهایی انجماد هر گروه از پایوت‌ها به دو قسمت تقسیم شده و نیمی از آنها در ارتفاع ۲/۵ و نیمی دیگر در ۳/۵ سانتی متری ازت مایع به مدت ۱۰ دقیقه برروی راک انجماد قرار گرفته و سپس در ازت مایع غوطه ور گردیدند. در نهایت از هر تیمار دو پایوت را ذوب و در داخل یک میکروتیوب با هم مخلوط نموده و برای مدت زمانی که آزمایش به طول می انجامید در داخل بن ماری ۳۷ درجه قرار داده شد. برای ارزیابی تحرک از سیستم CASA، درصد اسپرم ها زنده از رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین و برای سلامت غشای پلاسمایی اسپرم از HOST استفاده گردید. در صورت نیاز برای کاهش غلظت اسپرم ها و افزایش دقت CASA، برای رقیق سازی بیشتر نمونه ها از همان رقیق کننده مربوطه استفاده می شد. اضافه کردن گلیسرول در دمای ۳۷ و یا ۵ درجه سانتی گراد تاثیر معنی داری برروی هیچکدام از پارامترهای اسپرم نداشت ($P\geq0.05$). در اسپرم های منجمد شده در ارتفاع ۲/۵cc از ازت مایع درصد اسپرم های دارای حرکت پیشرونده، درصد اسپرم های زنده و درصد اسپرم های دارای غشای پلاسمایی سالم بیشتر از اسپرم هایی بود که در ارتفاع ۳/۵cm منجمد شده بودند ($P<0.05$). در نمونه‌هایی که به روش یک مرحله‌ای رقیق شده بودند درصد کل تحرک، درصد اسپرم های دارای حرکت پیشرونده، درصد اسپرم هایی زنده و درصد اسپرم های با غشای پلاسمایی سالم بیشتر از نمونه های بود که بدون سردسازی اولیه منجمد شده بودند در صورتیکه در روش دو مرحله ای اثر معنی داری مشاهده نگردید. به طور کلی بر اساس نتایج به دست امده از این تحقیق، انجماد منی قوچ در ارتفاع ۲/۵cm سانتی متر از ازت مایع باعث حفظ بیشتر کیفیت اسپرم ها شده و سردسازی اولیه در دمای ۲۰- تا -۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در نمونه هایی که به روش یک مرحله ای رقیق شده بودند باعث

بهبود کیفیت اسپرم ها می گردد. همچنین اضافه گردن گلیسرول در دمای ۳۷ یا ۵ درجه سانتی گراد تاثیری برروری کیفیت اسپرم ها پس اتز انجماد ندارد.

کلمات کلیدی:CASA،اسپرم،قوچ قزل،انجماد،گلیسرول، سرد سازی

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه ۱

۱-۱اهمیت پرورش دام..... ۲

۱-۲اهمیت تولید مثل در پرورش دام ۳

۱-۳تکنیک های تولید مثلی در برنامه اصلاح نژادی دام ٤

۱-۴تلقیح مصنوعی و اهمیت آن..... ٤

۱-۵تاثیر بهبود روش‌های انجماد بر تکنیک تلقیح مصنوعی:..... ٥

۱- ۶اهداف: ٥

فصل دوم مروری بر منابع ۷

۲-۱ دستگاه تولید مثل نر..... ۸

۲-۲ منی: ۸

۲-۳ سلولهای اسپرم: ۸

۲-۴ اسپرماتوژنزیس: ۹

۲-۴- ۱اسپرماتوسیتوژنز:..... ۹

۲-۴-۲اسپرمیوژنز: ۹

۲-٤-۲-۱ مرحله گلژی..... ۱۰

۲-٤-۲-۲ مرحله کلاهک..... ۱۰

۲-٤-۲-۳ مرحله آکروزومی..... ۱۰

۲-٤-۲-٤مرحله تکاملی..... ۱۰

۲-٤-۳ اسپرم ریزی..... ۱۲

۲-۵ مورفولوژی اسپرم..... ۱۳

۲-۵-۱سر اسپرم ۱۳

۲-۵-۱-۱ هسته..... ۱۳

۲-۵-۱-۲ لایه های اطراف هسته..... ۱۳

۲-۵-۱-۳ آکروزوم ۱۳

۲-۵-۲ دم..... ۱٤

۲-۶ مکانیسم تحرک اسپرم: ۱۵

۲-۷ عوامل موثر بر تحرک اسپرم..... ۱٦

۲-۷-۱-۱PH..... ۱٦

۲-۷-۱-۳ رقیق کردن ۱۷
۲-۷-۱-٤نور ۱۷
۲-۷-۱-٥ یون ها ۱۷
۲-۷-۱-٦ دما ۱۸
۲-۷-۲عوامل داخلی ۱۸
۲-۷-۲-۱ سن ۱۸
۲-۷-۲-۲ ناهنجاری های ساختمانی ۱۸
۲-۷-۲-۳ منابع انرژی ۱۹

۲-۸ روش های ذخیره اسپرم: ۱۹
۲-۸-۱ ذخیره از چند طریق انجام می گیرد: ۱۹

۲- ۹ رقیق کننده: ۲۰
۲-۹-۱ دلایل استفاده از رقیق کننده: ۲۱
۲-۹-۲ انواع رقیق کننده های مورد استفاده برای نگداری اسپرم: ۲۱
۲-۹-۳ رقیق کنندها به طور کلی به دو دسته تقسیم می شوند: ۲۱
۲-۹-۳-۱ رقیق کنندهای حیوانی(شیر و زرده تخم مرغ): ۲۱
۲-۹-۳-۲ رقیق کنندهای با منشا غیر حیوانی ۲۱

۲-۱۰ انجماد و ذوب کردن منی ۲۳
۲-۱۰-۱ انجماد سلولهای زنده: ۲۳
۲-۱۰-۲انجماد اسپرم قوچ: ۲٤

۲-۱۱ محلولهای رقیق کننده برای انجماد: ۲٤

۲-۱۳ روش ها ی مختلف انجماد: ۲٥

۲-۱٤عوامل موثر در انجماد اسپرم: ۲٦
۲- ۱٤-۱ سرما محافظها: ۲٦
۲-۱٤-۲ مرحله اضافه کردن گلیسرول: ۲٦
۲-۱٤-۳سرد سازی قبل از انجماد ۲۷
۲-۱٤-٤ نقش زمان تعادل در انجماد اسپرم : ۲۸

۲-۱٥ ارزیابی منی منجمد ۲۸

فصل سوم مواد و روش کار ۳۰

۳-۱ زمان و مکان انجام آزمایش ۳۱

۳-۲حیوانات مورد آزمایش ۳۱

۳-۳مواد مصرفی: ۳۱

۳-٤تجهیزات آزمایشگاهی ۳۲

۳-۵ جمع آوری منی..... ۳٤

۳-۶ ارزیابی کمی وکیفی نمونه منی گرفته شده: ۳٤
۳-٦-۱ حجم منی..... ۳٥
۳-٦-۲ ارزیابی حرکت توده ای یا حرکت اولیه اسپرم..... ۳٥
۳-٦-۳ ارزیابی غلظت اسپرم ۳٥
۳- ۷ مخلوط کردن نمونه های منی ۳٦

۳-۸ رقیق کننده مورد استفاده: ۳۷

۳-۹ رقیق کردن نمونه منی و سپری شدن زمان تعادل ۳۷

۳- ۱۰ انجماد منی..... ۳۷

۳-۱۱ ارزیابی نمونه ها..... ۳۸
۳- ۱۱-۱ ارزیابی تحرک اسپرم با استفاده از سیستمCASA:..... ۳۸
۳-۱۱-۲ محاسبه اسپرم های متحرک و داری حرکت پیشرونده:..... ۳۹
۳-۱۱-۳ تعیین درصد اسپرم مرده و زنده ۳۹
۳-۱۱-٤ تست سلامت غشای پلاسمایی(HOST): ٤۰

۳-۱۲ روش تحقیق :..... ٤۰

۳-۱۲طرح آزمایشات و آنالیز آماری: ٤۱
۳-۱٤-۱مدل آماری..... ٤۱

فصل چهارم نتایج ٤۲

۴-۱ نتایج تجزیه واریانس دادها:..... ٤۳

۴-۲ ارتفاع از سطح ازت مایع:..... ٤٤

۴-۳ سردسازی یا انجماد اولیه و زمان اضافه کردن گلیسرول: ٤٥

فصل پنجم بحث ٤۸

بحث..... ٤۹

پیشنهادات ٥۳

فصل ششم منابع..... ٥٤

فهرست اشکال و جداول

شکل ۱-۱گوسفند **نژاد قزل**..... ۳

شکل ۲-۱گامه های مختلف مرحله اسپرمیوژنزیس(ضمیری، ۱۳۸۵) ۱۱
شکل ۲-۲مراحل مختلف اسپرم ریزی(ضمیری،۱۳۸۵) ۱۲
شکل ۲- ۳ برش عرضی اسپرم ۱٤
شکل ۲-۴ساختمان کلی اسپرم ۱٥
شکل ۲- ٥ نحوه قرار گرفتن میکروتوبول ها در فلاژلوم اسپرم(کرمی،۱۳۹۲)..... ۱٦
شکل ۲-۶ محلول بایوکسل ۲۲
شکل ۳-۱سیدر گوسفندی، اسپری تتراسیکلین و ژل..... ۳۳
شکل ۳-۲واژن مصنوعی ۳٤
شکل ۳- ۳ منطقه‌ای از لام هموسایتومر که شمارش اسپرم در آن صورت می گیرد ۳٦
شکل۳-۴ : شکل مربوط به شمارش خطوط بالایی و چپ مربعات در لام هموسایتومتر ۳٦
شکل ۳- ٥روش های شمارش اسپرم با استفاده از لام هموسایتومتر ۳٦
جدول ۴-۱: نتایج تجزیه واریانس پارامترهای مختلف محاسبه شده توسط سیستم CASA در منی مجمد شده قوچ..... ٤۳
جدول ۴-۲: نتایج تجزیه واریانس پارامترهای مختلف اسپرم در منی منجمد و ذوب شده قوچ. ٤٤
جدول ۴-۳ میانگین (±SEM) پارامترهای محاسبه شده برای اسپرم های منجمد شده در ارتفاع ۲/٥و ۳/٥توسطCASA..... ٤٥
جدول ۴-۴ میانگین (±SEM) پارامترهای محاسبه شده در اسپرم های منجمد شده در ارتفاع ۲/٥و ۳/٥سانتی متری..... ٤٥
جدول ۴-٥: میانگین (±SEM) پارامترهای مختلف CASA برای اسپرم منجمد شده قوچ به روش یک مرحله ای اضافه کردن گلیسرول در زمان های مختلف سردسازی یا انجماد اولیه. ٤٦
جدول ۴-۶: میانگین (±SEM) پارامترهای مختلف CASA برای اسپرم منجمد شده قوچ به روش دو مرحله ای اضافه کردن گلیسرول در زمان های مختلف سردسازی یا انجماد اولیه. ٤٦
جدول ۴-۷: میانگین (±SEM) پارامترهای مختلف اسپرم در منی منجمد شده قوچ به روش یک مرحله ای اضافه کردن گلیسرول در زمان های مختلف سردسازی یا انجماد اولیه. ٤۷
جدول ۴-۸: میانگین (±SEM) پارامترهای مختلف اسپرم در منی منجمد شده قوچ به روش دو مرحله ای اضافه کردن گلیسرول در زمان های مختلف سردسازی یا انجماد اولیه. ٤۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱اهمیت پرورش دام

گوسفند اولین حیوانی است که حدود ۸ تا۱۰هزار سال پیش به دست انسان اهلی شده است. بدون شک کوچکی جثه، قابلیت رام شدن، بهره دهی زیاد از نقطه نظر تولید گوشت، پشم، شیروسایر فراوردهای آن باعث شده است که نظرانسان به این حیوان جلب گردد.(خالداری ۱۳۸۷).). گوشت گوسفند در ایران به عنوان یک منبع پروتئین رایج ودر مقایسه باگوشت گاو و بز مصرف آن بالا می باشد.درحال حاضر در هر سال حدود۴۳۵/۹ هزار تن(۵۲/۶درصد) از کل گوشت تولیدی در کشور توسط بیش از ۵۰ میلیون راس گوسفند تولید می شود.این مقدار پاسخگوی نیاز جمعیت کشور نبوده و افزایش بازده تولیدگوشت از اهمیت زیادی بر خوردار است.(2009، . ..(Talebi.

دام ودامپروری در تامین احتیاجات غذایی انسان نقش مهمی دارد. از زمانی که حیوانات در جوامع مختلف در جهت رفع احتیاجات غذایی انسان به کار گرفته شده اند در امور زندگی افراد آن جوامع تحول شگرفی به وقوع پیوسته است.(فرهومند، ۱۳۸۰).

افزایش جمعیت انسانی یکی از عواملی است که می تواند تاثیر مهمی بر روی تولید دامها بگذارد، این افزایش جمعیت و توزیع ناعادلانه غذا یکی از بزرگترین مشکلات دنیای امروز به شمار می رود. اصلاح نژاد دامها یعنی تولید گوشت و شیر بیشتر ودر نتیجه تغذیه و سلامت بهتر مردم(امانلو،۱۳۷۴).

ایران یکی از غنی ترین کشورهای دنیا به لحاظ تنوع نژاد در گوسفند و بز است به طوری که ۲۷ نژاد گوسفند و بیش از ۷ نژاد بز درایران پرورش می یابند. گوسفند و بز نقش بسیار مهمی را در تولید مواد غذایی و سهم قابل توجهی رادر درآمد ناخالص ملی کشور دارد. با افزایش روز افزون جمعیت و همچنین افزایش نیاز مردم ، بهبود و اصلاح نژاد این دامهای بومی می تواند بخش عظیمی از احتیاجات غذایی انسان را تامین کند(کریم زاده، ۱۳۹۰).یکی از نژادهای بومی گوسفند که در شمالغرب ایران پرورش می یابد نژاد قزل است . این نژاد یک نژاد چند منظوره گوشتی ،شیری است. لذا توجه به اصول پرورش و نگهداری این نژاد از لحاظ حداکثر تولید پروتئین حیوانی حائز اهمیت است.

شکل ۱-۱گوسفند **نژاد قزل**

۱-۲اهمیت تولید مثل در پرورش دام

تولید مثل، توالی رخدادهایی است که با رشد ونمو دستگاه تولید مثل در رویان آغاز می شود. سلولهای جنسی بارور ، از نیازهای اساسی برای ماندگاری گونه هاست. این توانایی باید با رفتارهای تولید مثلی و توان جفت گیری

همراه باشـد(ضـمیری،۱۳۸۵).اسـاس دامپروری های صنعتی (به خصوص آنهایی که در زمینه گاو شیری کار می کنند) بر دو پایه تولید مثل و شـیر اسـتوار است ودر خصوص دامپروری های که دام گوشتی نگهداری می کنند نیز تولید مثل یکی از ارکان اصلی است ، لذا جهت پیشبرد مسائل اقتصادی و تولیدی دا.مپروری توجه به مسائل تولید مثل اهمیت بسـیار زیادی دارد. نرخ پایین تولید مثلی در دامها،سـبب کاهش باز دهی تولید فراورده های دامی می شـود ونرخ بالای تولید مثل در انسـان افزایش جمعیت و دشـواری هایی را در پی خواهد داشت . بنابر این، اهمیت آگاهی از فرایند های تولید مثلی، به شکل فزاینده ای روز به روز بیشتر می شود؛ زیرا انفجار جمعیت و محـدویـت های منابع غذایی دامی نیازمند کنترل فرایندهای تولید مثلی(مهار تولید مثل در انسـان ، افزایش تولید مثل در دام ها) می باشد(ضمیری،۱۳۸۵).

۱-۳تکنیک های تولید مثلی در برنامه اصلاح نژادی دام

در طی سالهای اخیرتکنیک های تولید مثلی متعددی ابداع شده‌اند این تکنیکها در انسان با هدف درمان ناباروری انجام می گیرد ولی در علوم دامی غالبا در کنار برنامه های اصـلاح نژادی و به منظور تسـریع دراین برنامه ها به کار می روند .تکنیک های تولید مثلی از جمله:تلقیح مصنوعی، همزمان کردن فحلی و اولاسیون، سوپر اولاسیون، انتقال جنین، تقسـیم رویان، انتقال هسته و....باعث افزایش کارایی تولید مثلی دام شده و از طریق افزایش تعداد نتاج دام نر در سـال می تواند تسریع در برنامه های اصلاح نژادی بشود ، بدیهی است رکن اصلی و اساسی اصلاح نژاد، عمل تلقیح مصـنوعی، فراوری و انجماد منی تهیه شـده از دام نر برتر است(Evans and Maxwell,1987 وضمیری،۱۳۸۵).

۱-۴تلقیح مصنوعی و اهمیت آن

تلقیح مصـنوعی به عنوان یکی از قدیمی ترین تکنیک های تولید مثلی شـناخته می شـود که در این تکنیک اسـپرم از حیوان نر گرفته می شـود و پس از ارزیابی اولیه و رقیق سازی به وسیله ی ابزار خاصی به حیوان ماده فحل تزریق می شود(صفدریان،۱۳۸۶). بهبود روش های تلقیح مصنوعی نقش مهمی در برنامه های اصلاح نژاد و حفظ نژادهای بومی دام ها بعهده (Maxwell and Salamon, 1993). تکنیک تلقیح مصنوعی برای اولین بار در سـال ۱۷۸۰ میلادی توسط فیزیولوژیست ایتالیایی بنام اسپالانزایی صورت گرفت. او توانست با استفاده از این روش توله سگهایی را به وجود آورد. ایوانف روسی ، امکان انجام تلقیح مصنوعی مادیان را در سال ۱۹۹۰میلادی آغاز کرد اما نخستین کسی بود که گاو وگوسفند را با موفقیت تلقیح مصنوعی کرد.(ضمیری، ۱۳۸۵). با این وجود

تکنیک تلقیح مصنوعی در گوسفند با استقبال کمتری مواجه بوده است که مهمترین دلیل آن پایین بودن میزان آبستنی در صورت تلقیح اسپرم های منجمد از طریق روش های معمول و کم هزینه و نیاز به استفاده از لاپاروسکوپی برای افزایش باروری این گونه اسپرم ها می باشد. فرآیند انجماد و ذوب کردن اسپرم در قوچ با کاهش تحرک، زنده مانی و قابلیت باروری همراه می‌باشد (Evans and Maxvell, 1987; Holt, 1997).

۱–۵تاثیر بهبود روش‌های انجماد بر تکنیک تلقیح مصنوعی:

با توجه به اینکه انجماد اسپرم امکان نگهداری نامحدود آنها را فراهم می سازد، استفاده از این روش می تواند باعث افزایش قابل توجه کارایی تکنیک تلقیح مصنوعی گردد. با در نظر گرفتن اینکه از یک قوچ برتر می توان طی اکثر طول سال نمونه منی جمع آوری کرده و منجمد و ذخیره نمود (در طی حداقل ۸ ماه هر هفته نه بار نمونه گیری) که می تواند منجر به تولید حدود ۱۲۰۰۰ بره در طی هر سال گردد .(Gordon, 1997)برنامه انجماد اسپرم در حقیقت یک فرآیند بیوفیزیکی و بیوشیمایی است.اساس آن جلوگیری از شوک ناشی از تغییرات دما هنگام انجماد و یخ گشایی و شوک اسمزی حاصل از خروج آب سیتوپلاسمی اسپرم است. منی معمولا در دمای ۳۰ تا۳۷درجه‌ی سانتی گراد با اجزای پایه رقیق کننده(بدون سرم محافظ) متعادل می شود(محمدی-براتی۱۳۸۸). منی منجمد شده و نگه داری شده در دمای بسیار پاین یعنی در ازت مایع۱۹۶-درجه سانتیگراد، واکنش‌های متابولیکی اسپرماتوزوییدها را کاملا متوقف می کند این کار امکان نگهداری منی برای مدت طولانی را مهیا می کند. قدرت انتخاب متقاضیان منی افزایش یافته و نیز امکان تهیه منی در زمان و مکان واحدی و عرضه آن در مکانهای مختلف و حتی پس از ذخیره درازمدت به وجود می اورد. همچنین حمل و نقل داخلی و بین المللی منی آسان شده و می توان آنرا خارج از دوره تولیدمثل جمع اوری وذخیره نمود.(Hafez, 1982). فاکتورهای متعددی بر روی میزان مرگ و میر اسپرماتوزویید طی مراحل انجماد و ذوب اثر می گذارند که بعضی عبارتنداز: نحوه مراقبت هنگام رقیق سازی اولیه منی ، روش اضافه کردن گلیسرول، تعادل با گلیسرول، میزان سرد کردن و میزان انجماد و ذوب کردن می باشد .(Andarabi, 2009).

۱– ۶اهداف:

تحقیق حاضر با توجه به اهداف زیر انجام گرفت:

۱- ارزیابی تاثیر سردسازی اولیه (انجماد دو مرحله ای) برروی کیفیت انجماد اسپرم قوچ

۲- ارزیابی تاثیر اضافه کردن گلیسرول بصورت یک مرحله ای یا دو مرحله ای برروی کیفیت انجماد منی قوچ.

۳-ارزیابی تاثیر سرعت انجماد (از طریق فاصله پایوت ها از سطح ازت مایع) در مرحله نهایی انجماد برروی پارامتر های مختلف اسپرم قوچ.

۴-ارزیابی اثر متقابل روش رقیق سازی، روش انجماد و سرعت انجماد نهایی برروی کیفیت اسپرم های منجمد شده قوچ.

فصل دوم

مروری بر منابع

۲–۱ دستگاه تولید مثل نر

بخش های اساسی دستگاه تولید مثل نر در بر گیرنده بندیضه،بیضه ، ا سکروتوم، سیستم لوله‌ای برون بیضه‌ای، غده‌های تناسلی پیوست و آلت تناسلی هستند. بیضه‌ها جایگاه اصلی تولید اسپرم هستند و توان بالایی برای اسپرم سازی دارند، تولید روزانه اسپرم در هر دو بیضه دام ها بین یک تا ۲۵ بیلیون است که نشان دهنده تولید ۳۵ تا ۲۹۰ هزار اسپرم در هر ثانیه است.اسپرم ها در لوله های ظریفی به نام لوله های اسپرم ساز ساخته می شوند و پس از خروج از این لوله ها از راه لوله های ریته،(که در برخی گونه ها در مرکز بیضه هستند)، به لوله های برون بیضه ای (لوله های افرنت) منتقل می شوند. سپس اسپرم به اپیدیمیس رسیده و درآنجا تا زمان انزال انباشته می شود.(ضمیری،۱۳۸۵)

۲–۲ منی:

منی سوسپانسیون سلولی مایع می باشد که در بر گیرنده اسپرماتوزوییدها(گامت‌های نر) و ترشحات اندام‌های ضمیمه دستگاه تولید مثل نر می باشد. بخش مایع این سوسپانسیون که در زمان انزال بوجود می آید به پلاسمای منی موسوم است(حافظ،۱۳۸۵).

۲–۳ سلولهای اسپرم:

اسپرماتوزوییدها در لوله های اسپرم ساز بوجود می آیند. این لوله ها مجموعه کاملی از سلولهای زاینده‌ی در حال رشد را در بر دارند که نهایتا گامتهای نر را به وجود می آورند. اسپرماتوزوییدهای کامل سلولهای درازی هستند که از سر و دم تشکیل شده اند. سر مسطح حاوی هسته بوده و دم ساختاری دارد که توانایی به حرکت دراوردن اسپرم را دارد. تمامی اسپرماتوزوییدها توسط پلاسما یا غشا پلاسمایی در بر گرفته شده است. آکروزوم یا کلاهک آکروزومی، ساختمان دو جداره ای دارد که در حدفاصل غشا پلاسمایی و قسمت قدامی سر اسپرم واقع شده است . سر اسپرم توسط گردن به دم آن (تاژک) متصل می شود خود دم نیز به قسمت های میانی، اصلی و قطعه انتهایی تقسیم می شود .(حافظ،۱۳۸۵).

۲-۴ اسپرماتوژنزیس[1]:

یک فرایند پیچیده بیولوژیک تغییر شکل سلولی است که سلولهای زایای هاپلوییید جنس نر را از سلولهای پایه اسپرماتوگونی دیپلوئید تولید می کند این فرایند طی مراحل و چرخه های مختلفی انجام می پذیرد که این چرخه ها برای تولید متوالی و مکرراسپرم، ضروری است(Rex A.Hess and Luiz Renato de France,2008). در این فرایند سلولهای اسپرماتوگونیایی در یک بازه ی زمانی وسیع به سلولهای اسپرماتوزآ تبدیل می شوند که این فعل انفعال در لوله های زاینده به نام سمینیفروس انجام میپذیرد. بافت این لوله‌ها شامل سلولهای زایا و سلولهای سرتولی است که این سلولها در سال ۱۸۶۵توسط Enrico Sertoli کشف شد(Hess R,2005).

۲-۴- ۱اسپرماتوسیتوژنز[2]:

در رشد رویانی، سلولهای زاینده ابتدایی از کیسه زرده رویان به داخل غددجنسی تمایز نیافته مهاجرت می کنند. پس از رسیدن به غددجنسی جنینی، این سلولهای ابتدایی چندین بار تقسیم می شوند تا سلول های گونوسیت را به وجود آورند. به نظر می رسد این گونوسیت ها قبل ازبلوغ حیوان نر متمایز شده اسپرماتوگونیوم نوع A_0 را بوجود می اورند که خود این اسپرماتوگونیم ها سایر سلولهای زاینده را بوجود می آورند. اسپرماتوگونیم های نوع A_1 بتدریج تقسیم شده و اسپرماتوگونیوم های نوعA_2،A_3 و A_4 را بوجود می آورند.. نوعA_4 دوباره تقسیم می شود و اسپرماتوگونیم های حد واسط(In)را به بوجورد می آورد. این سلولها هم در تقسیم بعدی به اسپرماتوگونیم های نوعBتبدیل می شوند. این انواع مختلف اسپرماتوگونیم ها که در برش های بافت شناسی اپیتلیوم لوله های سمینی فر قابل تشخیص اند، اساس تکثیر سلولهای زاینده را تشکیل می دهند.($Russell\ L, 1990; Hess\ R, 2005$).

۲-۴-۲اسپرمیوژنز[3]:

اسپرماتیدهای گرد به کمک پاره‌ای تغییرات سریع ظاهری به اسپرماتوزوییدها تبدیل می شوند که این فرآیند در مجموع به اسپرمیوژنز معروف است. در این تغییرات، متراکم شدن کروماتین هسته‌ای، شکل گیری دم ا سپرم یا اجسام تاژکدار و رشد و تکامل کلاهک آکروزومی به چشم می خورد.(ضمیری،۱۳۸۵) . در زیر به شرح مراحل مختلف اسپرمیوژنی می پردازیم:

[1] Spermatogenesis
[2] Sermatocytogenesis
[3] Spermiogenesis

۲-۴-۲-۱ مرحله گلژی[۴]: دستگاه گلژزی در طول مراحل اولیه اسپرمیوزنز بسیار اهمیت دارد به گونه ای که تشکیل آکروزوم وابسته به توانای این اندامک جهت تولید وزیکول ها و گرانول های حاوی ترکیبات آنزیمی می باشد($Leblond\ CP, 1952$) . اسپرماتیدهای تازه تشکیل شده، یک دستگاه گلژی توسعه یافته دارد که بالای هسته قرار دارد وبه شمار فراوانی اندامک کیسه مانند تبدیل می شود . در آغاز، وزیکول‌های پیش آکروزومی ایجاد می شوند که با پیوستن و چسبیدن به یکدیگر، وزیکول بزرگتری را به نام وزیکول آکروزومی به وجود می اورند که در یک طرف هسته قرارمی گیرد. در این وزیکول ، ریز دانه های متراکمی قرار می گیرد که آن را گرانول اکروزومی می نامند. هنگام تشکیل شدن وزیکول اکروزومی، سانتریول ها به سوی پایه هسته به حرکت در می آیند. سانتریول های پیشین، نقطه چسبیدن دم به هسته را می سازد و سانتریول های پسین، آکسونیم را به وجود می اورند که بخش مرکزی دم است.(ضمیری،۱۳۸۵).

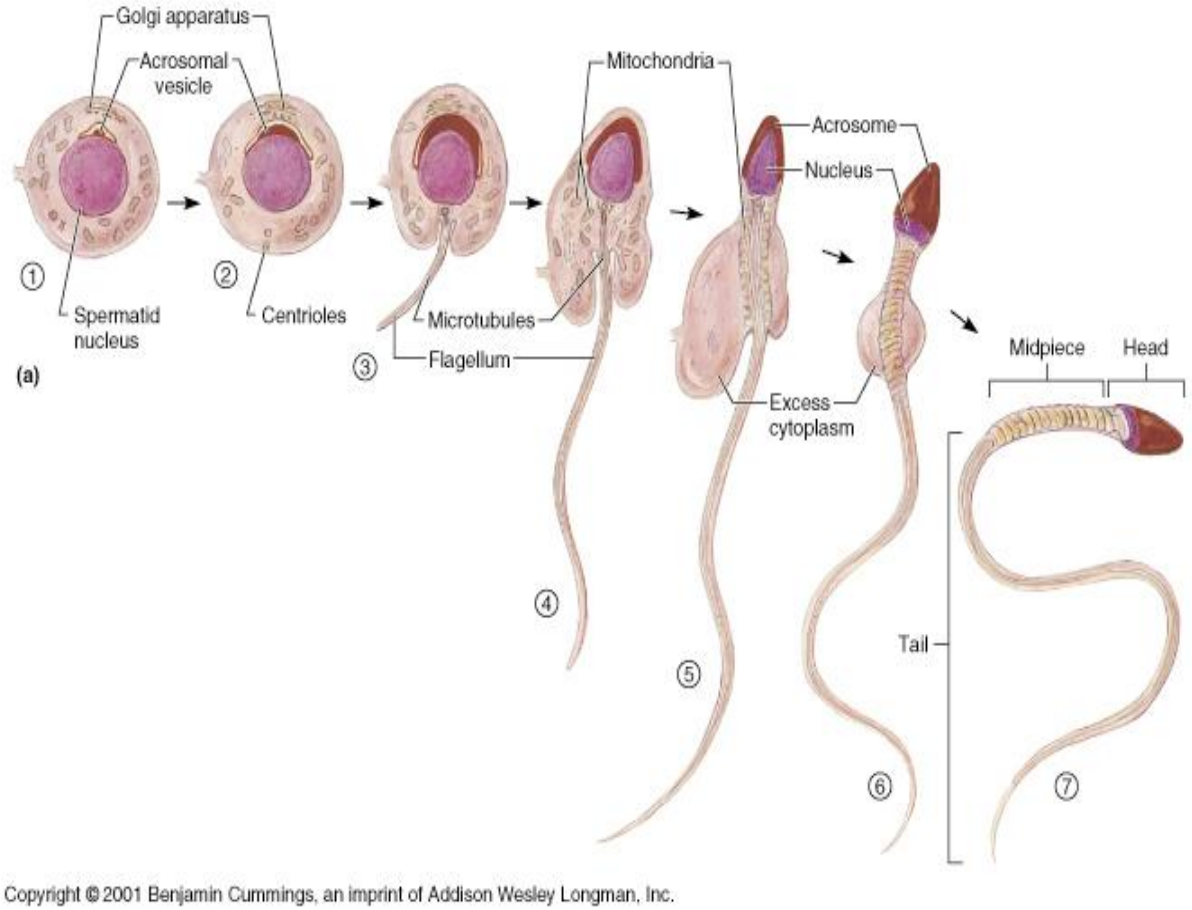
۲-۴-۲-۲ مرحله کلاهک[۵]: این مرحله شامل چندین گامه است(.($Rex\ A.\ Hess, Luiz\ Renato$ (2008) .در این مرحله اکروزوم کلاهک مشخصی را روی بخش پیشین هسته به وجود می آورد و دستگاه گلزی کار بسته بندی محتویات اکروزوم را انجام می دهد. از نزدیکی هسته به بخش پسین اسپرماتید می رود . فلاژوم اولیه که از سانتریول پسین ساخته شده است به سوی حفره لوله های اسپرم ساز امتداد می یابد. اکسونیوم ساختمانی تازک مانند دارد که دو لوله مرکزی دارد که پیرامون انرا ۹ جفت لوله در بر می گیرد(ضمیری،۱۳۸۵).

۲-۴-۲-۳ مرحله آکروزومی[۶]: این مرحله شامل تغییر مکان سیستم آکروزومی به سمت سطح بالایی هسته طویل شده اسپرماتید می باشد($Rex\ A.\ Hess\ and\ Luiz\ Renato\ de\ Frace, 2008$)در این مرحله تغییر شکل در آکروزوم و هسته، تحت تاثیر سلولهای سرتولی است. ساختار ویژه‌ای به نام جسم کروماتیدی متراکم می شود و ساختار حلقه‌ای شکلی را پیرامون آکسونیم بوجود می آورد که آن را آنولوس می نامند. میتوکندری های سیتوپلاسم در بخش جلویی آکسونیوم متراکم می شوند و غلافی را به وجود می آورند، به این بخش دم قطعه میانی می گویند(ضمیری،۱۳۸۵).

۲-۴-۲-۴مرحله تکاملی[۷]: در این مرحله بخش های از مانشت به سوی دم حرکت می کنند و ناپدید می شوند و بخش های از آن کلاهک پس هسته ای را می سازند. میتوکندری ها به طور کامل پیرامون یک سوم

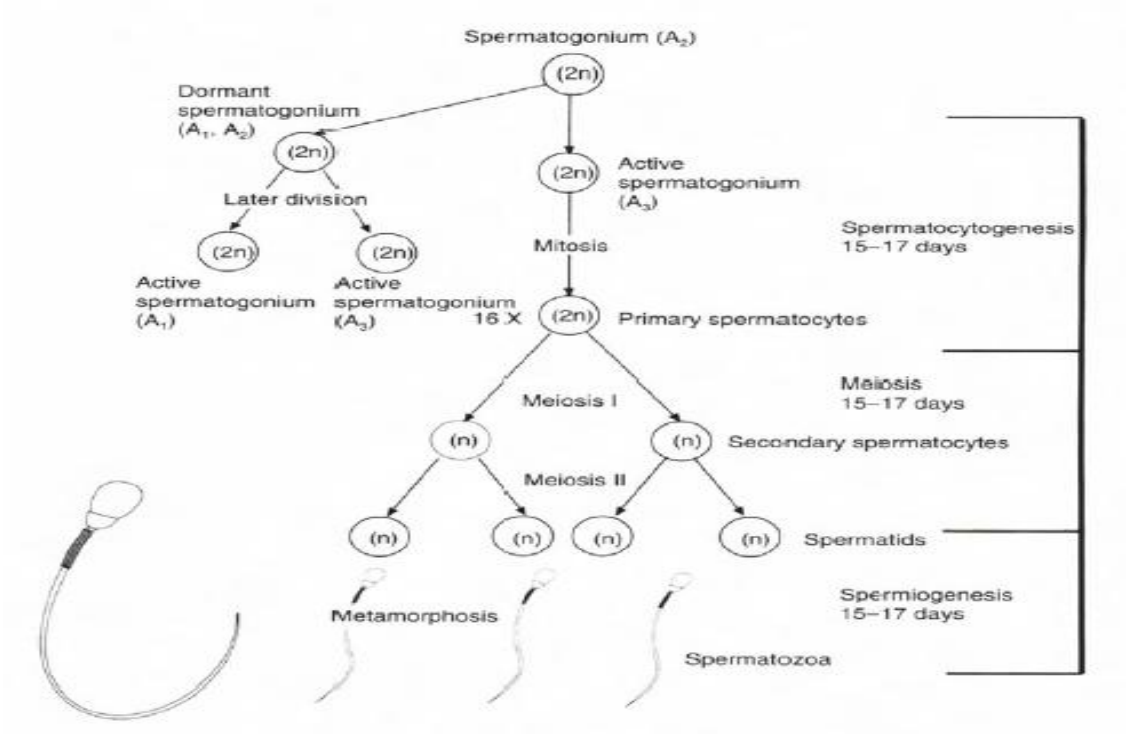
[4] *Golgi phase*
[5] *Cap phase*
[6] *acrosomic phase*
[7] *Maturation phase*

بخش پیشـین دم را می پوشانند و حالتی مارپیچی به خود می گیرند. تارهای کلفت دم (۹عدد) و غشای فیبری پیرامون آکسـونیم تشـکیل می شـوند. باید توجه کرد که سراسر اسپرم را غشای پلاسمایی اسپرم می پوشاند که یکپارچگی و سلامت آن برای زنده مانی و باروری اهمیت دارد.پس از دراز شدن اسپرماتید، باقی مانده سیتوپلاسم تحت تاثیر سلولهای سرتولی، به شکل ساختاری کروی به نام اجسام باقی مانده در می ایند که پایان گامه تکاملی اسپرمیوزنسیز است. (ضمیری،۱۳۸۵؛ $Frana\ LR, 1995$).



شکل ۲-۱گامه های مختلف مرحله اسپرمیوژنزیس(ضمیری، ۱۳۸۵)

۲-۴-۳ اسپرم ریزی[8]:جدا شدن اسپرم ها از یکدیگر و سلول های سرتولی و رها شدن به درون حفره لوله های اسپرم ساز را اسپرم ریزی می گویند که فرایندی مشابه تخمک ریزی است.در این فرایند پل های بین سلولی شکسته می شوند و اجسام باقی مانده از فرایند اسپرم سازی (که داری سیتوپلاسم جدا شده از اسپرم ها هستند) ، به وسیله ی سلول های سرتولی فاگوسیتوز می شوند.با جدا شدن این کیسه های سیتوپلاسمی هنوز اندکی سیتوپلاسمی در گردن اسپرم باقی می ماند که به آن قطره پروتوپلاسمی پیشین می گویند(ضمیری،۱۳۸۵). اسپرم سازی فرایندی است به نسبت کم بازده و در آن، شمار زیادی سلولهای جنسی پیش از آنکه به اسپرم تبدیل شوند از بین می روند..



شکل ۲-۲مراحل مختلف اسپرم ریزی(ضمیری،۱۳۸۵)

[8] *Spermmiation*

۲–۵ مورفولوژی اسپرم

در پستانداران به سلول متحرک و دارازی که برای انتقال هسته های هاپلوییدی نر به داخل تخمک ویژگی پیدا کرده اسپرم می گویند. سر اسپرم در بیشتر گونه ها از جمله پستانداران عمدتا به شکل پهن و بیضی شکل است و در جوندگان به شکل داسی شکل می باشد.($Jimmy\ D.\ Neill, 2000$). روشهای متعددی برای بررسی و ارزیابی مورفولوژی اسپرم پیشنهاد شده است(OMBLETET, 1995) . ناهنجاری های مورفولوژیکی اسپرم می تواند اثر منفی بر باروری و عمر رویان داشته باشد(WALTERS ET AL. 2005A, SAACKE. 2008).

۲–۵–۱سر اسپرم: شامل سه قسمت هسته، لایه اطراف هسته و آکروزوم می باشد.

۲–۵–۱–۱ هسته: شامل کروموزوم های هاپلوییدی است که این کروموزوم ها باید در هنگام باروری وارد تخمک شوند تا با ادغام با هسته تخمک تشکیل مجدد حیاط $2n$ کروموزومی را دهند. از ویژگی های هسته ی اسپرم نسبت به هسته سایر سلولهای سوماتیک این است که علاوه بر اینکه n کروموزومی است، کروماتین در هسته بسیار متراکم و یکنواخت می باشد($Eddy, 2006$).

۲–۵–۱–۲ لایه های اطراف هسته: در واقع یک ساختار سیتوپلاسم اسکلتی است و با توجه به وضعیتی که از لحاظ توپولوزیکی قرار گرفته اند، به سه قسمت زیرآکروزوم، میانی اکروزوم و خلفی آکروزوم طبقه بندی می شوند($Olson\ and\ Winfery, 1985$)

.

۲–۵–۱–۳ آکروزوم:یک وزیکول دو جداره است مانند یک کلاه قسمت اعظم هسته اسپرم را احاطه می کند و حاوی آنزیم های مورد نیاز برای نفوذ به تخمک می باشد . این آنزیم ها غالبا آنزیم های هیدرولیتیک هستند، مانند آنزیم هیالورنیداز که با استفاده از آن اسپرم ، اتصالاتی را که بین سلولهای کومولوس است از بین می برد و خود را به تخمک می رساند(ضمیری،۱۳۸۵).