





دانشگاه کردستان

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

عنوان:

اثر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی با و بدون زرده تخم مرغ بر انجماد اسپرم بز مرخز

پژوهشگر:

کبری سید عقیلی

استاد راهنما:

دکتر عباس فرشاد

اساتید مشاور:

دکتر آرمین توحیدی

دکتر فردین عمیدی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی علوم دامی گرایش
فیزیولوژی دام

مهرماه ۱۳۸۸



دانشگاه کردستان
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی علوم دامی گرایش فیزیولوژی دام

عنوان:

اثر سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی با و بدون زرده تخم مرغ بر انجماد اسپرم بز مرخز

پژوهنگر:

کبری سید عقیلی

۱۹۲۸

در تاریخ ۲۸ / ۷ / ۱۳۸۸ توسط کمیته تخصصی و هیات داوران زیر مورد بررسی قرار گرفت و با نمره ۱۰ درجه عالی به تصویب رسید.

امضاء	موضوع علمی	نام و نام خانوادگی	هیات داوران
	استادیار	دکتر عباس فرشاد	۱- استاد راهنما
	استادیار	دکتر آرمین نوحیدی	۲- استاد مشاور
	استادیار	دکتر فردین عمیدی	۳- استاد مشاور
	استادیار	دکتر موجیب سوری	۴- استاد داور خارجی
	استادیار	دکتر شمس الدین احمدی	۵- استاد داور داخلی

مهر و امضاء گروه دانشکده کشاورزی و تحصیلات تکمیلی - دکتر سیمان کبری

مهر و امضاء گروه دانشکده کشاورزی و تحصیلات تکمیلی - دکتر سیمان کبری



تعهد نامه

اینجانب کبری سید عقیلی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی دام دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی گروه علوم دامی تعهد می‌نمایم که محتوای این پایان‌نامه نتیجه تلاش و تحقیقات خود بوده و از جایی کپی‌برداری نشده و به پایان رسانیدن آن نتیجه تلاش و مطالعات مستمر اینجانب و راهنمایی و مشاوره اساتید بوده است.

با تقدیم احترام

کبری سید عقیلی

۱۳۸۸ / ۷ / ۲۹

تقدیم بہ

خانوادہ عزیزم

کہ بافداکاریا و محبت بی کرانشان گذران دوران تحصیل را بر من آسان نمودند:
بہ تک تک سخطات سبز بہ یادگار مانده از پدرم کہ بہ من درس زندگی آموخت،
بہ تک تک ثانیہ ہای صبر و عطفوت مادرم کہ اگر دعائیش نبود.....

و بہ برادران و خواهران مہربانم

مشکر و قدردانی

حدوشنای بیکران، آفریننده را که تپش تنها سزاوار جلال اوست. خداوند رحمانی که در سایه رحمت بی پایانش، توانی دوباره یافتم تا در مسیر شناخت و معرفت قدمی هر چند قاصر بردارم.

بر خود لازم می دانم از زحمات خانواده عزیزم که در طول مدت تحصیل، حامی و مشوق من بودند، مشکر و قدردانی نمایم. از زحمات آقایان دکتر عباس فرشاد، دکتر آرمین توحیدی و دکتر فردین عمیدی که در طی این پایان نامه مرا راهنمایی و مشاوره فرمودند، کمال تشکر را دارم. از آقایان دکتر منوچهر سوری و دکتر شمس الدین احمدی که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند، تشکر نموده و از اساتید گروه علوم دامی که در امر پیشرفت و تحصیل اینجانب زحماتی را متحمل شده اند، سپاسگذارم. همچنین بر خود فرض می دانم که از دانشجویان و کارشناسان گروه علوم دامی و تمام کسانی که به نحوی در انجام پایان نامه، با اینجانب همکاری داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی نموده و از خداوند متعال، توفیقات روز افزون برایشان، مسئلت نمایم.

کبری سید عقیلی

۱۳۸۸/۷/۲۸

چکیده

هدف از این پژوهش ارزیابی اثر غلظت های مختلف آلومین سرم گاوی (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) با و بدون حضور غلظت های مختلف زرده تخم مرغ (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) و اثر جایگزینی آنها با یکدیگر بر قابلیت انجماد پذیری اسپرم بز مرخز، در رقیق کننده پایه تریس- اسیدسیتریک - گلوکز (همراه با ۵ درصد گلیسرول) پس از فرآیند انجماد و یخ گشایی می باشد. جنبایی، جنبایی پیش رونده و ویژگی های حرکتی اسپرم با کمک سیستم آنالیز رایانه ای اسپرم اندازه گیری شد. همچنین نرخ بازایی جنبایی اسپرم با فرمول $[100 \times (\text{جنبایی پیش از انجماد} / \text{جنبایی پس از انجماد})]$ محاسبه شد. ویژگی های زنده مانی و واکنش آکروزومی و ویژگی های توام (اسپرم زنده/بدون آکروزوم، زنده/آکروزوم سالم، مرده/بدون آکروزوم و مرده/آکروزوم سالم) نیز به روش رنگ آمیزی سه مرحله ای اندازه گیری شد. بخشی از نمونه هر تیمار، پس از سرد شدن تا دمای ۵ درجه سانتیگراد (پیش از انجماد در بخار نیتروژن) و بخشی دیگر پس از انجماد، در حمام آب گرم با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه بازایی شده، سپس برای متغیرهای مورد نظر ارزیابی شدند. اثر سطوح مختلف آلومین سرم گاوی بر متغیرهای جنبایی، جنبایی پیش رونده، نرخ بازایی جنبایی، زنده مانی اسپرم و از نظر ویژگی های توأم زنده مانی و وضعیت آکروزومی بر درصد اسپرم های زنده/آکروزوم سالم و اسپرم مرده/بدون آکروزوم معنی دار بوده ($p < 0.05$)، در حالیکه بر واکنش آکروزومی، ویژگی های حرکتی اسپرم و از نظر ویژگی های توأم زنده مانی و وضعیت آکروزومی بر درصد های اسپرم زنده/بدون آکروزوم و مرده/آکروزوم سالم معنی دار نبود ($p > 0.05$). سطوح مختلف زرده تخم مرغ بر تمام ویژگی های فوق الذکر به جز فاکتور اسپرم زنده/آکروزوم سالم تفاوت معنی دار نداشت ($p > 0.05$). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، در عدم حضور زرده تخم مرغ و حضور سطوح آلومین سرم گاوی، کمترین سطح آلومین (۵ درصد) و بطور عکس و مشابه، در عدم حضور آلومین سرم گاوی و حضور زرده تخم مرغ، کمترین سطح زرده (۵ درصد) نسبت به سطوح دیگر، اثرات مطلوب و رقیق کننده های حاوی بیش از ۵ درصد زرده تخم مرغ و آلومین سرم گاوی اثر نامطلوب روی ویژگی های زنده مانی، جنبایی و مقاومت انجمادی اسپرم بز داشته و در ترکیب توام آن دو با یکدیگر، سطح ۵ درصد آلومین سرم گاوی همراه با سطح ۱۰ درصد زرده تخم مرغ نسبت به سطوح دیگر، ویژگی های جنبایی و زنده مانی اسپرم منجمد و یخ گشایی شده بز را بیشتر حفظ کردند. در ارزیابی اثرات اصلی و ترکیبی هر دو ماده آزمایشی روی واکنش آکروزومی اسپرم، بالاترین سطوح هر دو (۱۵ درصد)، منجر به بروز بیشترین واکنش آکروزومی اسپرم بز شدند. همچنین در حضور آلومین سرم گاوی و عدم حضور زرده تخم مرغ، ویژگی های عملکردی اسپرم کاهش و بالعکس، در حضور زرده تخم مرغ و عدم حضور آلومین سرم گاوی ویژگی های عملکردی اسپرم افزایش داشته و در ترکیب آلومین سرم گاوی با زرده تخم مرغ در حین مشاهده اثر کاهشی روی ویژگی های جنبایی و زنده مانی، اثر افزایشی در بروز واکنش آکروزومی اسپرم بز مرخز مشاهده شد. پس می توان بیان نمود که آلومین سرم گاوی نمی تواند جایگزین مناسبی برای زرده تخم مرغ در رقیق کننده های انجمادی اسپرم بز مرخز باشد.

کلمات کلیدی: آلومین سرم گاوی، اسپرماتوزوا، انجماد، زرده تخم مرغ، بز مرخز

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

مقدمه و اهداف پژوهش

۱ مقدمه
۶ اهداف پژوهش

فصل اول (مروری بر پژوهش های پیشین)

۸ ۱-۱- بز و جایگاه آن در تحقیقات فیزیولوژی تولید مثل
۹ ۱-۲- خصوصیات سلول اسپرما توزا
۱۱ ۱-۲-۱- غشای پلاسمایی سلول اسپرم
۱۱ ۱-۲-۲- آکروزوم سلول اسپرم
۱۲ ۱-۲-۳- میتوکندری سلول اسپرم
۱۲ ۱-۳- اهمیت حفاظت از انجماد سلول اسپرم
۱۷ ۱-۴- اثر تخریب انجمادی روی سلول اسپرم
۱۹ ۱-۴-۱- اثر تخریب انجمادی روی توان باروری اسپرم
۲۰ ۱-۵- نقش رقیق کننده ها بر حفاظت از انجماد سلول اسپرم
۲۳ ۱-۶- آشنایی با آلبومین ها و آلبومین سرم گاوی
۲۸ ۱-۶-۱- روش های جداسازی آلبومین سرم گاوی از خون
۲۸ ۱-۶-۲- اثر آلبومین سرم گاوی بر غشای پلاسمایی اسپرم
۲۹ ۱-۶-۳- اثر آلبومین سرم گاوی روی اکسیداسیون سلول اسپرم در طول حفاظت انجمادی
۳۱ ۱-۶-۴- اثر آنتی اکسیدانتی آلبومین سرم گاوی
۳۲ ۱-۶-۵- اثر آلبومین سرم گاوی روی جنبایی سلول اسپرم
۳۸ ۱-۶-۶- اثر آلبومین سرم گاوی روی زنده مانی و باروری سلول اسپرم
۴۰ ۱-۷- ظرفیت پذیری و تغییرات شبه ظرفیت پذیری ناشی از حفاظت انجمادی در سلول اسپرم
۴۲ ۱-۷-۱- اثر آلبومین سرم گاوی روی ظرفیت پذیری سلول اسپرم
۴۷ ۱-۷-۲- اثر آلبومین سرم گاوی روی نسبت کلسترول به فسفولیپید سلول اسپرم
۴۹ ۱-۷-۳- آلبومین سرم گاوی به عنوان پذیرنده استرول ها (کلسترول)
۵۳ ۱-۸- مراحل بروز واکنش آکروزومی در سلول اسپرم
۵۴ ۱-۸-۱- اثر آلبومین سرم گاوی روی واکنش آکروزومی سلول اسپرم
۵۸ ۱-۹- مزایای حضور زرده تخم مرغ در رقیق کننده های حفاظتی سلول اسپرم
۶۰ ۱-۱۰- معایب حضور زرده تخم مرغ در رقیق کننده های حفاظتی سلول اسپرم

۶۲۱۱-۱- اثر توام زرده تخم مرغ و آلومین سرم گاوی روی سلول اسپرم.....
۶۵۱۲-۱- مضرات پلاسما منی بز و اثر آلومین سرم گاوی روی آن.....
۶۸۱۳-۱- شستن یا نشستن پلاسما منی بز.....
۷۰۱۴-۱- تکنیک گرادنت منقطع آلومین سرم گاوی
۷۲۱۵-۱- آشنایی اختصاری با سیستم آنالیز رایانه ای (CASA).....

فصل دوم: (مواد و روش ها)

۷۵۲-۱- مکان، زمان و دام مورد استفاده در آزمایش
۷۵۲-۲- تغذیه و مدیریت دام مورد آزمایش.....
۷۷۲-۳- جمع آوری و ارزیابی منی پیش از انجماد.....
۷۸۲-۴- مواد و روش تهیه رقیق کننده ها و رنگ های مورد استفاده در آزمایش.....
۷۹۲-۴-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده در رقیق کننده ها و رنگ های مورد آزمایش.....
۷۹۲-۴-۲- روش تهیه رقیق کننده ها و رنگ های مورد استفاده در آزمایش.....
۷۹۲-۴-۲-۱- روش تهیه رقیق کننده پایه.....
۸۰۲-۴-۲-۲- روش تهیه رقیق کننده های حاوی آلومین سرم گاوی.....
۸۱۲-۴-۲-۳- روش تهیه رقیق کننده های حاوی زرده تخم مرغ.....
۸۱۲-۴-۲-۴- روش آماده سازی رنگ تریپان بلو.....
۸۲۲-۴-۲-۵- روش آماده سازی رنگ بیسمارک برون.....
۸۲۲-۴-۲-۶- روش آماده سازی رنگ روزبنگال.....
۸۲۲-۴-۲-۷- روش آماده سازی تثبیت کننده گلو تر آلدئید.....
۸۲۲-۴-۳- ترکیب و آماده سازی رقیق کننده های مورد آزمایش
۸۴۲-۴-۴- روش رقیق سازی نمونه های منی.....
۸۴۲-۵- روش انجماد
۸۵۲-۶- روش یخ گشایی.....
۸۸۲-۷- ارزیابی نمونه ها توسط سیستم آنالیز رایانه ای.....
۹۰۲-۷-۱- تعیین نرخ بازیابی جنبایی از طریق ارزیابی تیمارها در ساعت صفر (۵ درجه سانتیگراد).....
۹۰۲-۷-۲- ارزیابی تیمارها پس از یخ گشایی
۹۲۲-۸- رنگ آمیزی تیمارها جهت برآورد زنده مانی و وضعیت آکروزومی.....
۹۳۲-۹- روش آماری مورد استفاده در تجزیه و تحلیل داده ها.....
۹۴۲-۹-۱- مدل آماری.....

فصل سوم: (نتایج و بحث)

۹۵۱-۳-نتایج
۹۵۱-۱-۳-ارزیابی اولیه نمونه‌ها
۹۶۲-۱-۳-اثر عوامل آزمایشی بر ویژگی های جنبایی اسپرم
۹۶۱-۲-۱-۳-اثر اصلی آلبومین سرم گاوی بر ویژگی های جنبایی اسپرم
۹۷۲-۲-۱-۳-اثر اصلی زرده تخم مرغ بر ویژگی های جنبایی اسپرم
۹۷۳-۲-۱-۳-اثر متقابل آلبومین سرم گاوی و زرده تخم مرغ بر ویژگی های جنبایی اسپرم
۹۸۳-۱-۳-اثر عوامل آزمایشی بر ویژگی های حرکتی اسپرم
۹۸۱-۳-۱-۳-اثر اصلی آلبومین سرم گاوی بر ویژگی های حرکتی اسپرم
۹۸۲-۳-۱-۳-اثر اصلی زرده تخم مرغ بر ویژگی های حرکتی اسپرم
۹۸۳-۳-۱-۳-اثر متقابل آلبومین سرم گاوی و زرده تخم مرغ بر ویژگی های حرکتی اسپرم
۱۰۲۴-۱-۳-اثر عوامل آزمایشی بر زنده مانی و واکنش آکروزومی اسپرم
۱۰۲۱-۴-۱-۳-اثر اصلی آلبومین سرم گاوی بر زنده مانی و واکنش آکروزومی اسپرم
۱۰۳۲-۴-۱-۳-اثر اصلی زرده تخم مرغ بر زنده مانی و واکنش آکروزومی اسپرم
۱۰۴۳-۴-۱-۳-اثر متقابل آلبومین سرم گاوی و زرده تخم مرغ بر زنده مانی و واکنش آکروزومی اسپرم
۱۰۵۵-۱-۳-اثر عوامل آزمایشی بر ویژگی های توام زنده مانی و وضعیت آکروزومی اسپرم بز مرکز
۱۰۵۱-۵-۱-۳-اثر اصلی آلبومین سرم گاوی بر ویژگی های توام زنده مانی و وضعیت آکروزومی اسپرم
۱۰۶۲-۵-۱-۳-اثر اصلی زرده تخم مرغ بر ویژگی های توام زنده مانی و وضعیت آکروزومی اسپرم
۱۰۷۳-۵-۱-۳-اثر متقابل آلبومین و زرده تخم مرغ بر ویژگی های توام زنده مانی و واکنش آکروزومی اسپرم
۱۱۰۲-۳-بحث
۱۲۰نتیجه گیری
۱۲۱پیشنهادات
۱۲۲فهرست منابع و مآخذ
۱۳۱چکیده انگلیسی

فهرست جداول

صفحه

عنوان

۲۵	جدول ۱-۱- ترکیب اسید آمینه های آلبومین سرم گاوی.....
۷۶	جدول ۱-۲- ترکیبات شیمیایی جیره غذایی مورد استفاده در پژوهش.....
۷۶	جدول ۲-۲- ترکیب شیمیایی کنسانتره مورد استفاده در پژوهش.....
۷۸	جدول ۲-۳- درجه بندی اسپرم ها بر مبنای شدت حرکت موجی آنها.....
۷۹	جدول ۲-۴- ترکیبات رقیق کننده پایه براساس مقدار ۱۰۰ میلی لیتر.....
۸۳	جدول ۲-۵- سطوح آلبومین سرم گاوی و زرده تخم مرغ بر حسب درصد در تیمارهای آزمایشی.....
۸۳	جدول ۲-۶- ترکیب رقیق کننده های مورد آزمایش براساس مقدار ۱۰۰ میلی لیتر.....
۸۳	جدول ۲-۷- چگونگی تخصیص رقیق کننده ها به تیمارها.....
۸۷	جدول ۲-۸- جدول از پیش تهیه شده جهت ثبت نتایج آنالیز رایانه ای.....
۹۳	جدول ۲-۹- نحوه طبقه بندی نمونه های رنگ شده اسپرم براساس مشاهده در زیر میکروسکوپ.....
۹۵	جدول ۳-۱- میانگین ویژگی های ارزیابی شده اولیه نمونه های منی پیش از مخلوط کردن.....
۹۵	جدول ۳-۲- میانگین ویژگی های ارزیابی شده اولیه نمونه های منی پس از مخلوط کردن.....
۹۶	جدول ۳-۳- درصد ویژگی های جنبایی اسپرم در بین سطوح آزمایشی آلبومین سرم گاوی.....
۹۷	جدول ۳-۴- درصد ویژگی های جنبایی اسپرم در بین سطوح آزمایشی زرده تخم مرغ.....
۹۹	جدول ۳-۵- درصد ویژگی های جنبایی اسپرم در بین تیمارهای اختصاص یافته.....
۹۹	جدول ۳-۶- درصد ویژگی های حرکتی اسپرم در بین سطوح آزمایشی آلبومین سرم گاوی.....
۱۰۰	جدول ۳-۷- درصد ویژگی های حرکتی اسپرم در بین سطوح آزمایشی زرده تخم مرغ.....
۱۰۱	جدول ۳-۸- درصد ویژگی های حرکتی اسپرم در بین تیمارهای اختصاص یافته.....
۱۰۳	جدول ۳-۹- درصد زنده مانی و واکنش آکروزومی اسپرم در بین سطوح آزمایشی آلبومین سرم گاوی.....
۱۰۴	جدول ۳-۱۰- درصد زنده مانی و واکنش آکروزومی اسپرم در بین سطوح آزمایشی زرده تخم مرغ.....
۱۰۸	جدول ۳-۱۱- درصد زنده مانی و واکنش آکروزومی اسپرم در بین تیمارهای اختصاص یافته.....
۱۰۸	جدول ۳-۱۲- درصد ویژگی های توام زنده مانی و وضعیت آکروزومی در بین سطوح آزمایشی آلبومین.....
۱۰۹	جدول ۳-۱۳- درصد ویژگی های توام زنده مانی و وضعیت آکروزومی در بین سطوح آزمایشی زرده تخم مرغ.....
۱۰۹	جدول ۳-۱۴- درصد ویژگی های توام زنده مانی و وضعیت آکروزومی در بین تیمارهای اختصاص یافته.....

فهرست شکل ها

صفحه	عنوان
۱۰	شکل ۱-۱- قسمت های مختلف سلول اسپرمتوزوا.....
۲۳	شکل ۱-۲- مدل جایگزینی Zn روی پروتئین آلبومین.....
۲۷	شکل ۱-۳- فرم معمولی (متراکم) و فرم باز شده پروتئین آلبومین سرم گاوی.....
۲۷	شکل ۱-۴- دومین های مولکول آلبومین سرم گاوی.....
۳۷	شکل ۱-۵- نحوه جنبایی اسپرم موش کشت شده در سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی.....
۴۵	شکل ۱-۶- مسیر سیگنالینگ ظرفیت پذیری توسط آلبومین سرم گاوی
۵۲	شکل ۱-۷- روند خروج کلاسترول از غشای اسپرم توسط آلبومین.....
۷۲	شکل ۱-۸- مشخصات گرادنت منقطع آلبومین سرم گاوی.....
۷۶	شکل ۲-۱- بزهای نر مرخز مورد استفاده در پژوهش
۷۷	شکل ۲-۲- اجزای مهبل مصنوعی و مهبل مصنوعی وصل شده.....
۸۵	شکل ۲-۳- نمونه ای از پایت های مورد استفاده در پژوهش.....
۸۸	شکل ۲-۴- سیستم آنالیز رایانه ای ویژگی های جنبایی و حرکتی نمونه های اسپرم
۸۹	شکل ۲-۵- چگونگی محاسبه ویژگی های حرکتی اسپرم توسط سیستم رایانه ای
۸۹	شکل ۲-۶- کلاس بندی جنبایی اسپرم با خطوط رنگی توسط سیستم آنالیز رایانه ای.....
۹۱	شکل ۲-۷- لام مکلر چمبر مورد استفاده در پژوهش
۹۱	شکل ۲-۸- مراحل گذاشتن نمونه های منی روی لام مکلر و مشاهده آن زیر میکروسکوپ.....
۹۳	شکل ۲-۹- چگونگی رنگ پذیری نمونه های اسپرم توسط رنگ سه گانه.....
۱۰۲	شکل ۳-۱- چهار حالت زنده مانی و وضعیت آکروزومی اسپرم های رنگ آمیزی شده با رنگ سه گانه

فهرست نمودارها

صفحه	عنوان
۹۶	نمودار ۳-۱- اثر اصلی سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی بر ویژگی‌های جنبایی اسپرم.....
۹۷	نمودار ۳-۲- اثر اصلی سطوح مختلف زرده تخم مرغ بر ویژگی‌های جنبایی اسپرم.....
۱۰۳	نمودار ۳-۳- اثر اصلی سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی بر زنده ماننی و واکنش آکروزومی اسپرم.....
۱۰۴	نمودار ۳-۴- اثر اصلی سطوح مختلف زرده تخم مرغ بر زنده ماننی و واکنش آکروزومی اسپرم.....
۱۰۵	نمودار ۳-۵- اثر اصلی سطوح مختلف آلبومین بر ویژگی‌های توام زنده ماننی و وضعیت آکروزومی اسپرم.....
۱۰۶	نمودار ۳-۶- اثر اصلی سطوح مختلف زرده بر ویژگی‌های توام زنده ماننی و وضعیت آکروزومی اسپرم.....

مقدمه و اهداف پژوهش

مقدمه

بلوغ کامل سلول اسپرم در دستگاه تولید مثل دام نر، شامل وقایع مولکولی پیچیده و دقیقی است که در نهایت اسپرم را قادر به عبور از دستگاه تولید مثل ماده، جهت رسیدن به جایگاه تخمک، ظرفیت پذیری، اتصال به زونا پلوسیدا، انجام واکنش اکروزمی، عبور از زونا پلوسیدا، اتصال به غشای پلاسمایی تخمک، ادغام دو گامت و در نهایت ایجاد جنین می‌سازد. بلوغ اسپرم از محل تولید آن در بیضه (اپیدیدیم) شروع و حتی پس از تخلیه در دستگاه تولید مثل ماده تا رسیدن به تخمک ادامه دارد (۱).

هدف از انجماد اسپرم به کاربردن آنها در تکنیک‌های کمک کننده به تولیدمثل^۱ بوده که در این تکنیک‌ها، منی پس از انزال، بطور مستقیم وارد دستگاه تولید مثل ماده نشده بلکه پس از تحریک دام نر و جمع آوری منی توسط مهبل مصنوعی^۲، اسپرم رقیق شده و به منظور نگهداری طولانی مدت به صورت سردسازی یا انجماد (۱۳۱)، با روش‌هایی مانند قرار دادن در دستگاه تولیدمثل ماده (AI)^۳ و در آزمایشگاه با اضافه نمودن به محیط کشت جهت باروری اووسیت بالغ (IVF)^۴ و یا انتخاب یک اسپرم جنبا و سالم از نظر مورفولوژی، جهت تزریق درون سیتوپلاسمی اووسیت (ICSI)^۵ مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳۱ و ۶۲). لذا استفاده از اسپرم

1- ART (Assisted Reproduction Technique)

2- artificial vagina

3- AI (Artificial Insemination)

4- IVF (InVitro Fertilization)

5- ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

نرمال و کارآمد در این تکنیک‌ها ضروری و روش‌های به کار برده شده جهت غنی سازی سلول اسپرم، نقش مهمی را در پیشرفت این تکنیک‌ها برعهده خواهد داشت (۶۲).

انجماد منی پستانداران، تحولی اساسی در نگهداری منی (۸۳) و حفاظت از انجماد سلول اسپرم، راهی برای حفظ ژرم پلاسم^۱ (پروتوپلاسم سلول جنسی) بوده که می‌تواند با حفظ DNA گونه‌ها، در دامپروری، آبی‌پروری و حفظ تنوع زیستی کاربرد داشته (۱۵) و بانک‌های ذخیره اسپرم، می‌توانند همراه با دیگر تکنولوژی‌های تولید مثلی، در بهبود نژادها (۱۲۶) و حفاظت گونه‌های وحشی و بومی در حال انقراض، نقش داشته باشند (۱۲۶ و ۱۵). همچنین با انجماد اسپرم، امکان قرنطینه کردن آن (۱۱)، انتقال آن به فاصله‌های خیلی دور (۱۱ و ۱۲۶)، کنترل بیماری‌ها و حفظ بانک‌های ژنتیکی ممکن بوده (۶۵) و به طور کلی حفاظت از انجماد اسپرم همراه با تکنیک‌های کمک کننده به تولید مثل، جهت حل مشکلات باروری حیوانات آزمایشگاهی، دامی و انسان کاربرد فراوانی داشته و خواهد داشت (۸۱ و ۱۵).

جهت پیشرفت در روش‌های حفاظت از انجماد اسپرم (۱۱۰) و رسیدن به بیشترین نرخ بازیابی و باروری اسپرم یخ‌گشایی شده (۱۱۵)، آگاهی از پیچیدگی غشای پلاسمایی اسپرم گونه‌های مختلف (۱۱۰ و ۱۱۵)، برهم کنش بین ترکیبات غشا، و تاثیر سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی روی غشای اسپرم ضروری می‌باشد (۱۱۰). غشای پلاسمایی اسپرم، مدل کامل و عالی جهت بررسی اثر فاکتورهای اگزوزنوس مختلف روی غشاها بوده و نقش بیولوژیکی منحصر به فردی را در فرآیند باروری بازی می‌کند (۷۰). انجماد و یخ‌گشایی، تکامل غشای اسپرم را افزایش و منجر به واکنش آکروزومی سلول اسپرم شده، همچنین فرآیندهای ظرفیت پذیری و

1- germplasm

واکنش آکروزمی، جنبایی^۱ اسپرم را تحت تاثیر قرار داده، از طرفی عمر و توانایی آن را در واکنش با دستگاه تولید مثل ماده و باروری کاهش می‌دهند (۱۵).

بطور کلی، کیفیت اسپرم یخ‌گشایی شده از روی فاکتورهای مهم جنبایی (۵۰، ۱۰۶ و ۱۳۷)، زنده مانی^۲ (۶۱، ۱۰۶ و ۱۳۷)، و حالت‌های آکروزوم آن ارزیابی شده (۱۰۶ و ۶۱) و جنبایی و مورفولوژی سلول اسپرم، پارامترهای ضروری در آزمایش‌های تحقیقاتی اسپرم و اساس رابطه بین کیفیت و باوری اسپرم بوده (۵۰)، بطوریکه ممکن است یک سلول اسپرم در عین زنده و جنبا بودن، آسیب دیده و توانایی بارورسازی یک تخمک را نداشته باشد (۱۵).

در مراحل حفاظت از انجماد سلول اسپرم، فاکتورهای کلیدی زیادی مثل ترکیب پلاسما منی (۱۵)، ترکیب شیمیایی رقیق‌کننده‌ها، نوع و غلظت حفاظت‌کننده‌های انجمادی، دمای نگهداری (۲ و ۱۵)، میزان سردسازی (۲، ۱۵ و ۵۰)، دوره تعادل دهی (۵۰)، روش انجماد و یخ‌گشایی (۲ و ۵۰) و کنترل بهداشت روی عمر سلول اسپرم اثر گذاشته (۱۵)، و تعادل بین این فاکتورها جهت کسب نتایج رضایت بخش، مهم می‌باشد (۱۱۵ و ۱۰۳).

کاهش در بازده حفاظت انجماد سلول اسپرم، ممکن است ناشی از فقدان اطلاعاتی در مورد مکانیسم عملکرد حفاظتی ترکیب شیمیایی رقیق‌کننده‌ها و یا مکانیسم تخریب سلولی در طول مراحل حفاظت انجمادی بوده و با وجود اینکه استرس‌های بیوشیمیایی (۱۵ و ۱۱۰) مانند تخریب اکسیداتیوی (۹۵)، کاهش لیپوپروتئین‌ها و اسیدهای آمینه و استرس‌های میکانیکی (۱۱، ۱۵ و ۱۱۰) مانند تغییرات ناگهانی دما (۱۱، ۷۰ و ۱۱۰)، شوک سرمایی (۹۵) فشارهای اسمزی (۱۱، ۱۵، ۷۰ و ۱۱۰)، دهیدراسیون القا شده از انجماد، تشکیل کریستال‌های یخ درون سلولی (۱۱، ۱۵ و ۱۱۰) و خارج سلولی (۱۵)، و استرس‌های سمی حاصل از مواجه شدن با محافظت-

1- motility
2- viability

کننده‌ها (۱۵ و ۱۱۰)، توجیهی از موارد تخریب انجمادی روی سلول اسپرم می‌باشد، هنوز علل اصلی تخریب انجمادی، نامشخص و به این دلیل اکثر تئوری‌های مکانیسم‌های حفاظت از انجماد اسپرم، در حد آزمایش و تجربه بوده و در حال حاضر حتی با پیشرفته‌ترین و مطلوب‌ترین تجهیزات و روش‌های حفاظت انجمادی، فقط حدود ۵۰ درصد اسپرم‌ها، می‌توانند پس از مراحل انجماد و یخ‌گشایی، زنده بمانند (۹۵)، بطوریکه بارباس و همکاران (۲۰۰۶) نیز میزان جنبایی اسپرم تازه و منجمد- یخ‌گشایی شده را در بز نژاد سرانا^۱ به ترتیب ۶۵/۱ و ۳۸/۴ درصد گزارش کرده‌اند.

استفاده از روش‌هایی که حداقل فرآوری پلاسمای منی بز را به همراه داشته و یا نیاز به سانتریفیوژ کردن پلاسمای منی (که همراه با تخریب‌های فیزیکی و صرف زمان می‌باشد) را نداشته باشد، ضروری بوده، و تحقیقات ثابت کرده که روش‌های نسبتاً قابل قبولی برای حفاظت از انجماد منی بز وجود داشته، لذا بایستی در حال حاضر تمرکز تحقیقات روی به حداکثر رساندن نرخ باروری با حداقل تعداد اسپرم منجمد شده بز باشد (۱۱۵). از طرفی بقای اسپرم در پلاسمای منی انزال شده، محدود به ساعت کمی بوده، و جهت نگهداری اسپرم برای دوره طولانی به صورت سردسازی شده (۸۵) یا منجمد، رقیق‌سازی آن با محافظت‌کننده‌های انجمادی ضروری بوده (۲، ۸۵ و ۱۱۰)، لذا هدف از استفاده رقیق‌کننده‌های انجمادی برای سلول‌های اسپرم، تامین یک منبع انرژی و محیط مناسب جهت زنده ماندن و حفظ آنها از شوک سرمایی در زمان جمع‌آوری، فرآوری و انجماد و یخ‌گشایی می‌باشد (۱۱۵ و ۵۰).

اگرچه زرده تخم مرغ جهت حفاظت از انجماد اسپرم، در برابر شوک سرمایی (۲، ۱۵، ۶۴، ۱۰۱ و ۱۱۰) استفاده شده، لیکن با اضافه شدن زرده تخم مرغ به رقیق‌کننده منی، مشکلاتی مشاهده شده و تهیه رقیق‌کننده منی مطلوب و یکنواخت با حضور زرده تخم مرغ به دلیل تغییر ویژگی‌های کیفی آن براساس تعداد روزهای

1- serrana

پس از تخم گذاری و طول دوره انبار مشکل بوده (۱۰۱ و ۶۴) و نیز به دلیل واکنش مضر بین زرده تخم مرغ موجود در رقیق کننده‌ها، با آنزیم فسفولیپاز A₂ موجود در پلاسما می‌نی بز و هیدرولیز لیسیستین زرده به اسید های چرب و لیزولیسیستین توسط آنزیم مذکور و سمی بودن فراورده های حاصل به اسپرم بز (۶، ۱۵، ۳۷، ۹۱، ۱۱۵، ۱۲۴ و ۱۲۰)، لذا برداشتن زرده تخم مرغ از رقیق کننده های می‌نی، مزیت‌های حذف فساد ناشی از پاتوژن های مختلف زرده تخم مرغ و سازگاری بهتر بین ترکیبات رقیق کننده‌های می‌نی را به دنبال داشته، به همین دلیل استفاده از رقیق کننده می‌نی سنتتیک فاقد زرده تخم مرغ، لازم به نظر رسیده و اکثر تحقیقات روی محافظت کننده‌های انجمادی می‌نی، در جهت توسعه رقیق کننده بدون تخم مرغ پیش رفته، بطوریکه از آلبومین سرم گاوی به عنوان جایگزینی برای زرده تخم مرغ در رقیق کردن اسپرم قوچ، بوقلمون و ماهی قزل آلائی رنگین کمانی استفاده شده است (۱۰۱ و ۶۴).

آلبومین سرم گاوی به عنوان یک پروتئین حیوانی، جهت حفاظت اسپرم انسانی از صدمات ناشی از فرآیندهای انجمادی استفاده شده (۱۹)، همچنین در اکثر محلول‌های کشت سلول اسپرم، به عنوان بافری در برابر شوک اسمزی (۱۱۱) و حفظ اسمولالیتیه محلول و جنبایی و زنده مانی اسپرم، استفاده شده است (۱۳۰). در پروتکل‌های پیشرفته ظرفیت پذیری درون آزمایشگاهی اسپرم، نیاز حیاتی به یون کلسیم، بی کربنات و یک پروتئین به عنوان پذیرنده کلسترول (۲۰، ۱۰۸ و ۱۴۳) مثل آلبومین سرم گاوی جهت خروج کلسترول از غشای پلاسمایی اسپرم گزارش شده (۱۰۸ و ۱۴۳)، بطوریکه در اسپرم پستانداران، با خروج و مبادله لیپیدی بین غشاهای پلاسمایی و آلبومین سرم، ظرفیت پذیری اسپرم آسان شده (۲۷)، لذا حضور آن جهت ظرفیت پذیری و القای واکنش آکروزومی در سلول اسپرم ضروری و به طور گسترده در محیط‌های کشت ظرفیت پذیری و واکنش آکروزومی اسپرم استفاده شده است (۸۴). همچنین آلبومین سرم گاوی به عنوان یک

محصول فرعی صنعت گاو گوشتی، از خون گاو خالص سازی شده، لذا هزینه تهیه و فرآوری آن پائین و بطور فراوان و آماده در دسترس می باشد.

رقیق سازی اسپرم انزال شده بز، با حجم زیادی از رقیق کننده حاوی آلبومین سرم گاوی، تماس بین ترکیبات مضر سمینال پلاسما و اسپرم را کاهش و خطرات متفاوت ناشی از سمینال پلاسما را به حداقل رسانده و بقای انجمادی اسپرم انزال شده را بهبود می بخشد. بطوریکه گزارش شده است با افزایش غلظت آلبومین سرم گاوی از ۰/۱ به ۵ درصد جنبایی، جنبایی پیشرونده و سلامت آکروزوم اسپرم منجمد و یخ گشایی شده افزایش یافته است (۱۴۸). بنابراین بایستی توجه نمود که جمع آوری منی بز در رقیق کننده های مکمل شده با آلبومین سرم گاوی، می تواند روش موثری جهت بکارگیری آن در دیگر حیوانات اهلی باشد (۱۴۷ و ۱۴۸). همچنین گزارش شده که آلبومین سرم گاوی می تواند جایگزینی مناسب برای زرده تخم مرغ در رقیق کننده منی قوچ باشد و میزان جنبایی و زنده مانی سلول های اسپرم منجمد و یخ گشایی شده آن را افزایش دهد (۱۰۱ و ۱۳۷). از طرفی در مقایسه آلبومین سرم گاوی و زرده تخم مرغ در رقیق کننده بر پایه تریس، روی منی منجمد و یخ گشایی شده سگ، گزارش شده که در حضور آلبومین سرم گاوی، سلامت آکروزوم اسپرم حفظ نشده و نرخ آبستنی در مقایسه آن با از زرده تخم مرغ پائین بوده، و آلبومین سرم گاوی به عنوان یک منبع پروتئینی نمی تواند جایگزین زرده تخم مرغ برای حفاظت انجماد منی سگ باشد (۱۲۶).

اهداف پژوهش

با توجه به واکنش مضر بین زرده تخم مرغ و آنزیم فسفولیپاز A موجود در پلاسما منی بز و اثرات زیان بار فرآورده های حاصل از این واکنش، روی سلول های اسپرم بز، پیشرفت های چشمگیری با استفاده زرده تخم مرغ در انجماد اسپرم بز، در مقایسه با گاو مشاهده نشده است. همچنین با توجه به وجود چندین ویژگی

مشترک بین آلبومین سرم گاوی و زرده تخم مرغ، مانند مکانیسم عملکرد حفاظتی آنها از طریق خاصیت پوشش دهی به لیپیدهای غشای اسپرم و حفظ سلامت و عملکرد سلول در برابر تغییرات دمایی طی مراحل سردسازی و انجماد (۱۳ و ۲۵)، خروج کلسترول از غشای پلاسمایی و متعاقبا کاهش نسبت کلسترول به فسفولیپید و تغییر در سیالیت غشای سلول اسپرم (۲۱) و القای واکنش آکروزومی به سلول اسپرم از سوی هر دو، اثر جایگزینی آن با زرده تخم مرغ روی منی بز، بررسی نشده و نیز اطلاعات کمی در مورد اثرات پروتئین آلبومین سرم گاوی روی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی منی بز وجود دارد. لذا هدف از این پژوهش ارزیابی اثرات اصلی، ترکیبی و جایگزینی سطوح مختلف آلبومین سرم گاوی و زرده تخم مرغ (۰، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد) و تعیین بهترین سطوح آنها روی جنبایی، جنبایی پیشرونده^۱، زنده‌مانی، ویژگی‌های حرکتی و وضعیت واکنش آکروزومی اسپرم منجمد و یخ‌گشایی شده بز مرخز، با استفاده از سیستم آنالیز رایانه ای اسپرم (CASA)^۲ می‌باشد.

1- progressive motility

2- Computer Assisted Sperm Analysis