به نام

خداوند

جان و خرد

دانشکده علوم کشاورزی
گروه علوم دامی
(گرایش فیزیولوژی دام)

عنوان:

اثر مقادیر مختلف سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک بر ذخیره سازی اسپرم قوچ در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد

از :
پروانه پریسوژ

استاد راهنما :
دکتر محمّد روستائی علی‌مهر

اسفند ۹۲

تقدیم به:

مادرم،

دریای عشق و ایثار....

و

پدرم،

دنیای محبّت و ایثار...

و

برادرم

همدل و همراهم...

سپاسگزاری

من به سرچشمه‌ی خورشید، نه خود بردم راه ذره‌ای بودم و مهر تو مرا بالا برد

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند.

سپاس از سه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم: پدرانمان، موهایشان سپید شد تا ما روسپید شویم: مادرانمان و عاشقانه سوختند تا کرمانخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند: استادانمان

واجب است از حمایت‌های بی‌دریغ همراهان همیشگی و پشتیبانان خستگی ناپذیرم **پدر و مادر عزیزم**، تشکر و قدردانی نمایم که همدلی‌هایشان توان مضاعفی به من بخشید و امیدوارم که با شکوهی ذره‌ای از محبت‌های بیدریغشان باشم.

از تلاش‌ها و رهنمودهای ارزنده و سازنده استاد راهنمای گرانقدرم **جناب آقای دکتر محمد روستائی علی مهر** که در طول انجام تحقیق پیشه یار و یاور بنده بوده و همواره با صبر و شکیبایی مرا از مساعدت‌های علمی‌شان برخوردار نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

همچنین از جناب آقایان **دکتر محمد علی شریفی** و **دکتر نوید قوی حسین زاده** به خاطر کمک‌ها و راهنمایی‌های ارزشمندشان در انجام این پژوهش سپاسگزارم. با امتنان از اساتید بزرگوار داوران محترم جناب آقایان **دکتر مهرداد محمدی** و **دکتر اردشیر محیط** که زحمت بازخوانی این پایان نامه را بر عهده داشتند از صمیم قلب تشکر می‌نمایم.

یاد و خاطره‌ی دوستی با خانم‌ها زهرا بشارتی و ماریا جلیلی و آقایان مونس جلالی، حسن ضیایی راد، یاسر شفیعی منش، ابوذر نجف زاده، علی رادمنش و مسعود موسوی و همچنین سایر دوستان دوران تحصیلم که ذکر نامشان در این نوشته‌ی کوتاه نمی‌گنجد، را همیشه در گنجینه خاطر خود حفظ خواهم کرد.

چکیده

اثر مقادیر مختلف سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک بر ذخیره‌سازی اسپرم قوچ در دمای ۵ درجه سانتی گراد

پروانه پریسوژ

دو آزمایش متوالی به منظور بررسی اثر سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک بر اسپرم قوچ با استفاده از ۴ قوچ انجام گرفت. در هر آزمایش ۲۰ انزال جمع آوری شد که شامل یک انزال به ازای هر قوچ در هر نوبت نمونه گیری بود. در آزمایش اول سیلی-مارین به عنوان افزودنی برای رقیق‌کننده تجاری (تریس-گلوکز- زرده تخم‌مرغ) مورد بررسی قرار گرفت. نمونه منی رقیق شد و به پنج قسمت تقسیم شد سپس مقدارصفر (S.)، ۵۰ ($S_{۵۰}$)، ۱۰۰ ($S_{۱۰۰}$)، ۱۵۰ ($S_{۱۵۰}$) و ۲۰۰ ($S_{۲۰۰}$) میکروگرم سیلی‌مارین در میلی‌لیتر اضافه شد. نمونه‌ها تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سرد شدند و به مدت ۷۲ ساعت ذخیره شدند. غلظت مالون‌دی‌آلدهید (MDA) پس از ۴۸ ساعت و سلامت غشا پلاسمایی، سلامت آکروزوم (Alexa flour 488)، تحرک (CASA) و زنده‌مانی (Hoechest bisbenzimide 33258) اسپرم در زمان صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. کمترین غلظت MDA (میلی‌مول / $۱۰^{۶} \times ۱۰$ اسپرم) در $S_{۱۵۰}$ (۱۷۳) و $S_{۲۰۰}$ (۱۵۸) مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). اثر مستقل سیلی‌مارین نشان داد که کمترین سلامت غشا پلاسمایی، بیشترین سلامت آکروزوم و بیشترین زنده مانی اسپرم به ترتیب در S. (۵۰/۱۵٪)، $S_{۱۰۰}$ (۷۷/۰۷٪) و $S_{۱۰۰}$ (۷۷/۹۲٪) یا $S_{۱۵۰}$ (۷۶/۸۵٪) وجود داشت ($P<۰/۰۵$). در زمان ۷۲، تحرک پیش‌رونده اسپرم در $S_{۱۰۰}$ (۶۸/۴۸٪) ، $S_{۱۵۰}$ (۷۱/۸۲٪) و $S_{۲۰۰}$ (۶۴/۰۹٪) بیشترین بود ($P<۰/۰۵$). هدف از آزمایش دوم، تعیین اثر متقابل بین سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک بر اسپرم قوچ ذخیره شده در ۵ درجه سانتی‌گراد بود. انزال‌ها با استفاده از تریس-گلوکز- زرده تخم‌مرغ (۱۵٪) رقیق شدند و صفر (S_-) یا ۱۰۰ (S_+) میکروگرم سیلی‌مارین و صفر (C_-) یا ۰/۰۳۱۲۵ (C_+) درصد اسیدکاپروئیک اضافه شد. نمونه‌ها تا دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سرد شد و به مدت ۷۲ ساعت ذخیره شدند. ارزیابی‌ها مانند آزمایش اول انجام شد. نتایج نشان داد که اثر متقابل سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک بر غلظت MDA، سلامت آکروزوم، سلامت غشا پلاسمایی، تحرک و زنده‌مانی اسپرم معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). بیشترین غلظت MDA (۴۱۲) در S_- C_- مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بیشترین و کمترین زنده‌مانی اسپرم (به ترتیب ۸۶/۲۸٪ و ۷۲/۴۸٪)، سلامت غشا پلاسمایی (به ترتیب ۸۴/۱۶٪ و ۷۰/۳۶٪) و سلامت آکروزوم (به ترتیب ۸۳/۵۳٪ و ۷۰/۶٪) به ترتیب در S_+ C_+ و S_- C_- مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). کمترین تحرک اسپرم در S_- C_- مشاهد شد (۶۴/۰۸٪، $P<۰/۰۵$). تحرک پیشرونده S_+ C_+ (۷۵/۷۸٪) بیشتر از S_+ C_+ (۷۱/۴۹٪) بود ($P<۰/۰۵$). بنابراین افزودن ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سیلی‌مارین یا ۰/۰۳۱۲۵ درصد اسیدکاپروئیک و همچنین مخلوط آن‌ها به منی قوچ سبب بهبود ماندگاری اسپرم در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد می‌شود.

کلمات کلیدی: اسپرم قوچ، سیلی‌مارین، آنتی‌اکسیدان، کاپروئیک‌اسید، مالون‌دی‌آلدهید

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی ..... چ
چکیده انگلیسی ..... ح
مقدمه ۲

فصل اوّل: مرور منابع

۱-۱- خصوصیات سلول اسپرماتوزوا ۵
۱-۱-۱- غشای پلاسمایی اسپرم ۵
۱-۱-۲- آکروزوم سلول اسپرم ۶
۱-۱-۳- میتوکندری سلول اسپرم ۶
۱-۲- ذخیره‌سازی در سرما ۷
۱-۳- سرد کردن اسپرم و استرس اکسیداتیو ۸
۱-۴- اثرات پاتولوژیک ROS ۸
۱-۴-۱- پراکسیداسیون لیپیدها ۹
۱-۴-۲- آسیب‌های DNA ۹
۱-۴-۳- مرگ برنامه‌ریزی شده سلول ۱۰
۱-۴-۴- کاهش تحرک اسپرم ۱۱
۱-۵- آنتی اکسیدان‌ها و عملکرد آن‌ها ۱۱
۱-۶- آشنایی با گیاه خار مریم ۱۲
۱-۶-۱- پیشینه‌ی استفاده از گیاه دارویی خارمریم ۱۳
۱-۶-۲- ترکیبات موجود در گیاه ماریتیغال ۱۴
۱-۶-۳- خواص آنتی‌اکسیدانی سیلی‌مارین ۱۷
۱-۷- افزودنی مناسب برای رقیق‌کننده ۱۸
۱-۸- آشنایی اختصاری با سیستم آنالیز رایانه‌ای (CASA) ۲۰

فصل دوم: مواد وروش‌ها

۲-۱- محل و زمان آزمایش ۲۳
۲-۲- حیوانات مورد استفاده و تغذیه‌ی آن‌ها ۲۳
۲-۳- مواد مورد استفاده ۲۴
۲-۴- وسایل مورد استفاده ۲۵
۲-۵- محلول‌ها و رقیق‌کننده‌های مورد استفاده در انجام این تحقیق ۲۵
۲-۵-۱- رقیق‌کننده تریس-گلوکز حاوی ۱۵ درصد زرده تخم مرغ ۲۵
۲-۵-۲- روش آماده سازی رنگ هوخست بیس بنزآمید ۲۵
۲-۵-۳- روش آماده سازی محلول هایپواسموتیک ۲۵
۲-۵-۴- روش آماده سازی بافر فسفات (PBS) ۲۶
۲-۶- جمع‌آوری منی ۲۶
۲-۶-۱- آماده‌سازی مهبل مصنوعی ۲۶
۲-۶-۲- نمونه‌گیری ۲۶
۲-۷- آماده‌سازی نمونه‌های منی قبل از ذخیره‌سازی ۲۷

۲-۷-۱- آماده‌سازی تیمارهای آزمایش اول ۲۷
۲-۷-۲- آماده‌سازی تیمارهای آزمایش دوم ۲۷
۲-۸- ارزیابی نمونه‌ها ۲۸
۲-۸-۱- تحرک ۲۸
۲-۸-۱-۱- تنظیم نرم‌افزار HFT- CASA ۲۸
۲-۸-۲- سلامت غشا پلاسمایی ۲۹
۲-۸-۳- زنده‌مانی اسپرم ۲۹
۲-۸-۴- سلامتی غشا آکروزوم ۳۰
۲-۸-۵- غلظت مالون دی‌آلدهید ۳۰
۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری ۳۲
۲-۹-۱- آزمایش اول ۳۲
۲-۹-۲- آزمایش دوم ۳۲
فصل سوم: نتایج و بحث
۳-۱- نتایج و بحث آزمایش اول ۳۴
۳-۱-۱- نتایج آزمایش اول ۳۴
۳-۱-۱-۱- اثر مستقل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیشرونده و ویژگی‌های حرکتی اسپرم ۳۴
۳-۱-۱-۲- اثر مستقل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم و زنده‌مانی اسپرم ۳۶
۳-۱-۱-۳- اثر متقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک و ویژگی‌های حرکتی اسپرم ۳۸
۳-۱-۱-۴- غلظت مالون‌دی‌آلدهید ۴۲
۳-۱-۲- بحث آزمایش اول ۴۳
۳-۲- نتایج و بحث آزمایش دوم ۴۷
۳-۲-۱- نتایج آزمایش دوم ۴۷
۳-۲-۱-۱- اثر مستقل سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیشرونده و ویژگی‌های حرکتی اسپرم ۴۷
۳-۲-۱-۲- اثر مستقل سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک در زمان ذخیره‌سازی بر سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم و زنده‌مانی اسپرم ۴۹
۳-۲-۱-۳- اثر متقابل سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک بر تحرک پیشرونده و ویژگی‌های حرکتی اسپرم ۵۱
۳-۲-۱-۴- اثر متقابل سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک بر سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم و زنده‌مانی اسپرم ۵۴
۳-۲-۱-۵- اثر متقابل سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک در زمان ذخیره‌سازی بر سلامت غشا پلاسمایی اسپرم ۵۵
۳-۲-۱-۶- اثر متقابل اسیدکاپروئیک در زمان بر سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم و زنده‌مانی اسپرم ۵۷
۳-۲-۱-۷- اثر مستقل سیلی‌مارین و اسید کاپروئیک بر غلظت مالون‌دی‌آلدهید ۵۹
۳-۲-۱- ۸- اثر متقابل سیلی‌مارین و اسید کاپروئیک بر غلظت مالون‌دی‌آلدهید ۶۰
۳-۲-۲- بحث آزمایش دوم ۶۰
۳-۳- نتیجه گیری کلی ۶۲
۳-۴- پیشنهادات ۶۳
منابع ۶۴
پیوست‌ها ۷۲

فهرست جداول

۲-۱- ترکیبات شیمیایی خوراک استفاده شده برای تغذیه قوچها ۲۴
۳-۱- اثر مستقل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک و ویژگی‌های حرکتی اسپرم ۳۵
۳-۲- اثر مستقل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم و زنده‌مانی اسپرم ۳۷
۳-۳- اثر متقابل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی اسپرم بر تحرک و ویژگی‌های حرکتی اسپرم ۴۰
۳-۴- اثر سیلی‌مارین بر میزان تولید مالون‌دی‌آلدهید پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی ۴۲
۳-۵- اثر مستقل سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک و ویژگی‌های حرکتی اسپرم ۴۸
۳-۶- اثر مستقل سیلی‌مارین و زمان ذخیره‌سازی بر سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم و زنده‌مانی اسپرم ۵۰
۳-۷- اثر مستقل سیلی‌مارین و اسید کاپروئیک بر میزان تولید مالون دی‌آلدهید پس از ۴۸ ساعت ذخیره‌سازی ۵۹

فهرست شکل‌ها

۱-۱-اسپرماتوزوآ ۵
۱-۲- گیاه خار مریم ۱۳
۲-۳- ساختار شیمیایی مهمترین ترکیبات سیلی‌مارین ۱۵
۲-۱- حیوانات مورد استفاده در پژوهش ۲۴
۲-۲- مهبل مصنوعی ۲۶
۲-۳- چگونگی محاسبه ویژگی‌های حرکتی اسپرم توسط CASA ۲۹
۳-۱- اثر متقابل سیلی‌مارین و اسید کاپروئیک بر تحرک و ویژگی‌های حرکت ۵۲
۳-۲- اثر متقابل سیلی‌مارین و اسید کاپروئیک بر زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی و سلامت آکروزوم اسپرم ۵۵
۳-۳- اثر متقابل سیلی‌مارین و اسید کاپروئیک در زمان صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ۵۶
۳-۴- اثر متقابل اسید کاپروئیک و زمان ذخیره‌سازی بر سلامت غشا پلاسمایی، سلامت آکروزوم و زنده‌مانی اسپرم ۵۸
۳-۵- اثر متقابل سیلی‌مارین و اسید کاپروئیک بر غلظت مالون‌دی‌آلدهید ۶۰

مقدمه

اسپرم قوچ نسبت به گونه‌های دیگر در برابر استرس شوک سرمایی، حساس‌تر است [Muino-Blanco, 2008] از این رو، تلقیح در سرویکس به وسیله منی منجمد و یخ گشایی شده، با نتایج قابل قبولی همراه نیست. امروزه تلقیح داخل رحمی در میش به کمک روش لاپاراسکوپی، باروری اسپرم‌های منجمد و یخ گشایی شده را بهبود بخشیده است. در ایران به دلیل محدودیت‌های تکنیکی و فقدان تسهیلات مناسب، لاپاراسکوپی انجام نمی‌شود؛ در نتیجه استفاده از منی تازه و رقیق شده تنها رویکرد برای انجام تلقیح مصنوعی در گله‌های گوسفند است.

ذخیره‌سازی در سرما تغییراتی را در یکپارچگی آکروزوم اسپرم ها [Hollinshead et al., 2004] ، حالت‌های ظرفیت-پذیری [Paulenz et al., 2004] و تحرک آن‌ها [Gundogan, 2003] ایجاد می‌کند. بعلاوه در زمان ذخیره‌سازی اسپرم در سرما، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)[1] در نتیجه متابولیسم اسپرم، سبب آثار مخربی بر ساختار و عمل اسپرم می‌شود[Meyers, 2005]. درحقیقت ROS نقش دوگانه‌ای در فعالیت‌های اسپرم دارد، از یک طرف برای انجام واکنش-های فیزیولوژی اسپرم از جمله ایجاد ظرفیت‌پذیری در دستگاه تولید مثلی ماده، لازم است، از طرف دیگر تولید زیاد آن منجر به فعال‌شدن روند آپاپتوز و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. برای ذخیره‌سازی اسپرم در آزمایشگاه باید ROS به حداقل برسد [De Lamirande et al., 1997].

طی پراکسیداسیون لیپیدها، اسیدهای چرب غیراشباع کاهش می‌یابند. ازآنجا که رادیکال‌های آزاد باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند و به دلیل اینکه غلظت‌های بالای اسیدهای چرب غیراشباع برای حفظ سیالیت غشا و تحرک اسپرم ضروری است، کاهش تحرک اسپرم را می توان در چنین شرایطی توجیه کرد [Baumber et al., 2000]. همچنین استحکام طبیعی غشا نه تنها برای متابولیسم طبیعی اسپرم‌ها بلکه جهت اتصال موفق اسپرم به تخمک، واکنش آکروزومی طبیعی و کامل و نیز فرآیند ظرفیت‌یابی سلول‌های اسپرم، لازم است [Verma et al., 1998]. مشخص شده که مواد آنتی‌اکسیدان از پراکسیداسیون چربی‌های غشا سلول جلوگیری می‌کنند [bendich, 1993]. یکی از راه‌کارهای کاهش آثار ROS در زمان ذخیره‌سازی اسپرم استفاده از مواد آنتی‌اکسیدان است [Soares, 2002]. در این بین استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی بر اسپرم و سلول‌های مختلف نتایج مثبتی را بیان کرده است.

ماریتیغال یا خار مریم با نام علمی Silybum marianum L. Gaertn و نام انگلیسی Milk thistle متعلق به خانواده‌ی Asteraceae (گل‌ستاره‌ای) است [زرگری، ۱۳۷۶]. سیلی‌مارین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی است که حتی تا چند برابر خواص آنتی‌اکسیدانی ویتامین E گزارش شده است [Vogle, 1979]. ثابت شده است که سیلی‌مارین یک پالایش کننده‌ی موثر برای رادیکال‌های آزاد مختلف مانند رادیکال‌های پراکسیل و هیدروکسیل و یون هیپوکلریت

[1] .Reactive oxygen species

است که در نوتروفیل‌ها و سلول‌های کبدی به وجود می‌آیند و از اختلالات متابولیسمی این سلول‌ها پیشگیری می‌کند. سیلی‌مارین از طریق تثبیت غشای گلبول‌های قرمز و افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداسیون و سوپراکسیددیسموتاز (SOD) شرایط حفاظتی برای گلبول‌های قرمز را فراهم می‌کند. اثرات تثبیتی روی غشای گلبول قرمز خون بوسیله افزایش در زمان همولیز کامل آن نشان داده شده است [Muzes et al., 1991; Lang et al., 1993]. در مورد تاثیر سیلی‌مارین بر سلول اسپرم قوچ تاکنون گزارشی نشده‌است.

همچنین اثر حفاظتی اسیدکاپروئیک به عنوان افزودنی به رقیق کننده منی حیوانات مختلف سال‌هاست که تایید شده است. اسیدهای چرب همانند اسید کاپروئیک فعالیت تنفسی اسپرم را برای مدت زمان طولانی، افزایش می‌دهند [Mann and Lutwak-Mann, 1981]. تحقیقات نشان داد که با اسید کاپروئیک می‌توان اسپرم گاو را به مدت ۶ روز به‌صورت مایع در دمای ۵ درجه سلسیوس ذخیره کرد [Shannon and Curson, 1984]. اخیرا گزارش شده است که افزودن اسیدکاپروئیک به منی قوچ، سبب بهبود باروری اسپرم قوچ تا پس از ۵۲ ساعت ذخیره‌سازی در ۵ درجه سانتی‌گراد می‌شود [Roostaei et al, 2013] این‌طور به نظر می‌رسد که استفاده از افزودنی‌های مناسب می‌تواند به ماندگاری طولانی مدت اسپرم کمک کند.

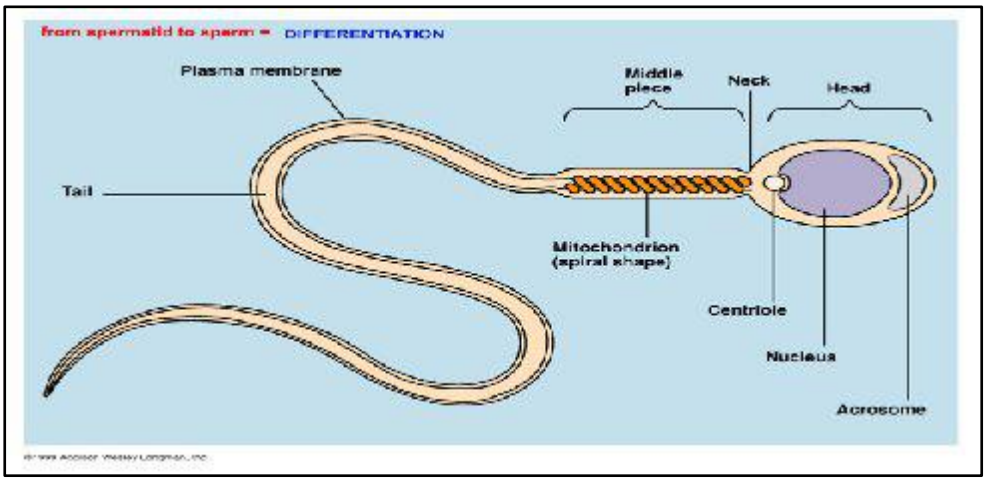
با توجه به تاثیرات سیلی‌مارین و اسیدکاپروئیک، در این پژوهش بر آن شدیم که اثر سیلی‌مارین را در یک آزمایش و اثر سیلی‌مارین را همراه با اسیدکاپروئیک در آزمایش دیگر مورد بررسی قرار دهیم.

فصل اوّل

کلیات و مرور منابع

۱-۱- خصوصیات سلول اسپرماتوزوا

سلول اسپرماتوزوآ، سلولی هاپلوئید با هسته‌ای بزرگ، تقریبا فاقد سیتوپلاسم و با خصوصیات آناتومیک و متابولیک ویژه خود بوده، که نقطه پایانی اسپرماتوژنزیز درحیوانات نر محسوب می‌شود (شکل ۲-۱). در قسمت پیشین سر دارای آکروزوم (که هنگام باروری آن را قادر به نفوذ به اووسیت کرده) و در ناحیه پیشین تاژک،دارای یکسری میتوکندری است که با تولید ATP مقدار زیادی از آن را، صرف تحرک سلول کرده و بطور کلی سلولی با فعالیت سنتزی کم بوده وجهت حفظ حیات خود به عملکردهای کاتابولیکی وابسته است [Barbas and Mascarenhas., 2009].



شکل ۱-۱- اسپرماتوزوآ

سلول اسپرم پس از تشکیل در بیضه، بلوغ در اپیدیدم، انزال و تلقیح به دستگاه تولید مثل ماده، در مسیر حرکت به سوی اووسیت، با رسیدن به بخش ایستموس اویداکت و ظرفیت پذیرشدن، فعال شده سپس با اتصال به پوشش خارجی سلول اووسیت (زونا پلوسیدا) و القای واکنش آکروزومی از سوی زوناپلوسیدا به آن، اسپرم متحرک هایپراکتیو شده، زونا پلوسیدا را شکافته، سرانجام اسپرم با اوولما[1] ادغام، سپس هسته نر با هسته ماده ترکیب و یک ژنوم دیپلوئید با خصوصیات فردی جدید تشکیل میگردد . بنابراین برای لقاح موفقیت‌آمیز یک سلول اسپرم، بایستی غشاها، ارگانل‌ها و ژنوم آن سالم و عملکرد شایسته‌ای داشته باشد [Silva and Gadella., 2006]

۱-۱-۱- غشای پلاسمایی سلول اسپرم

1. Oolemma

غشای پلاسمایی اسپرم در تنظیم عملکرد سلول در تمام مراحل چرخه زندگی آن مانند بلوغ، ظرفیت‌پذیری، واکنش آکروزومی و باروری نقش حیاتی بر عهده داشته، لیکن در طی روش‌های حفاظت انجمادی، به دلیل تخریب غشایی، توانایی تعداد زیادی از سلول‌های اسپرم کاهش می‌یابد .غشای پلاسمایی اسپرم، تمام سلول را احاطه، ارگانل‌ها و ترکیبات درون سلولی را حفظ و با قابلیت نفوذ پذیری انتخابی خود، غلظت یون‌ها و دیگر ترکیبات محلول را در درون و بیرون سلول متعادل و پروتئین‌های مخصوص غشای پلاسمایی، انتقال گلوکز و فروکتوز از محیط خارج سلول به درون اسپرم را آسان می‌کنند .بنابراین اگر غشای پلاسمایی اسپرم سالم نبوده و درست عمل نکند، سلول رو به زوال رفته و با مرگ خود، قادر به باروری نخواهد بود [Silva and Gadella., 2006]. از طرفی بعضی از عملکردهای سلول اسپرم مانند تحرک و ظرفیت-پذیری در رابطه با تغییرات غشای پلاسمایی اسپرم بوده [Iqbal and Hunter., 1995] و ترکیب غشای پلاسمایی اسپرم،روی روند ادغام غشاها، هنگام باروری و تغییرات فیزیکی درحین سردسازی وانجماد اثردارد لذا لازم است که جهت پیشبرد روش‌های کمک کننده به تولید مثل مانند تلقیح مصنوعی و بارورسازی در آزمایشگاه، سلامت غشای پلاسمایی اسپرم ارزیابی گردد [Silva and Gadella., 2006].

۱-۱-۲- آکروزوم سلول اسپرم

آکروزوم، وزیکولی بزرگ در بخش پیشین سر اسپرم، با منشا گلژی و انباشته از آنزیم‌های هیدرولیتیک، با ترشحات اسیدی،جهت هضم لایه‌های پوششی اووسیت، به منظور نفوذ اسپرم به تخمک و بروز باروری می‌باشد. اتصال اسپرم به زوناپلوسیدا و بروز واکنش آکروزومی، منجر به فعال و آزاد شدن آنزیم‌های آکروزومی گشته، که این پدیده همراه با تحرک هایپراکتیو اسپرم، در نفوذ اسپرم به زوناپلوسیدا کمک خواهد کرد. شکل آکروزوم در اسپرم پستانداران، تفاوت گونه‌ای داشته ولی محتوی آنزیم‌هایی مانند هیالورونیداز، آکروزین و اسیدفسفاتاز در همه‌ی گونه‌ها یکسان است [Aguas and Pinto da Silva., 1985]

۱-۱-۳- میتوکندری سلول اسپرم

میتوکندری‌های اسپرم در قسمت قطعه میانی بالای بخش تاژک قرارگرفته و توسط واکنش‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو، ATP تولید می‌کنند. اهمیت میتوکندری برای تحرک اسپرم (تحرک یک فرایند توام با مصرف ATP)، اخیرا مورد مطالعه قرار گرفته است . اگر چه میکروتوبول‌های وابسته به ATP، که مسئول تحرک اسپرم است در دم اسپرم، در انتهای تاژک قرار می‌گیرند، لذا ناحیه مصرفATP، از ناحیه تولید آن دور بوده و یکی دیگر از اهمیت‌های مهم میتوکندری و ATP ، مصرف ATP جهت فعالسازی کانال سدیم /پتاسیم در غشای پلاسمایی سر اسپرم است .بنابراین عملکرد صحیح

میتوکندری در سلول اسپرم جهت حفظ تحرک و بقای آن در دستگاه تولیدمثل ماده و در روش‌های کمک کننده به تولید مثل مهم است [Silva and Gadella., 2006].

۱-۲-ذخیره‌سازی در سرما

نیاز به انتقال منی از محل جمع‌آوری به نقاط دیگر همچنین ضرورت استفاده طولانی مدت از قوچ‌های با ارزش ارثی مناسب باعث انجام مطالعاتی در زمینه ذخیره‌سازی اسپرم در شرایط مصنوعی شد. روشی که متابولیسم اسپرم را کاهش و بدین‌ترتیب زمان زنده‌مانی اسپرم را افزایش دهد. بنابراین محققین بررسی‌هایی را در زمینه ذخیره‌سازی اسپرم در شرایط مایع با کاهش دما جهت کاهش فعالیت‌های متابولیکی و انجماد اسپرم با کاهش دما به زیر صفر جهت متوقف کردن فعالیت‌های متابولیکی انجام دادند [Salamon and Maxwell, 2000].

تلقیح مصنوعی با استفاده از منی ذخیره شده در مقایسه با جفتگیری طبیعی، باعث افزایش تعداد نتاج هر دام نر و نیز امکان تفکیک فاصله زمانی بین اسپرم جمع‌آوری شده و زمان باروری می‌شود، لذا استفاده گسترده از سلول‌های زاینده برتر، حتی پس از مرگ نرهای اصیل و ممتاز، ممکن [Bailey et al., 2000] و معاوضه و نقل و انتقال آنها در سطح بین‌المللی مقدور است [Barbas and Mascarenhas., 2009].

اخیرا نیز بانک‌های منی، برای نژادهای اهلی مثل گاو، گوسفندو بز نسبت به گونه‌های غیراهلی بیشتر توسعه یافته اند [Barbas and Mascarenhas., 2009].

بهبود ژنتیکی و کنترل بیماری گونه‌های مزرعه‌ای، اهمیت اساسی در موفقیت صنعت دامپروری و غذایی داشته، از این رو تلقیح مصنوعی با استفاده از منی ذخیره‌شده در کنار برنامه‌های اصلاح نژادی به عنوان ابزار کمک کننده در افزایش تولیدات حیوانی و گونه‌های دامی قابل بحث بوده [Bailey et al., 2000] که میتواند منجر به تغییرات مهم در فراورده‌های حیوانی شده، همچنین یکی از پیشرفت‌های مهم بیوتکنولوژی در صنعت تولیدمثل، به ویژه در سیستم‌های نگهداری متمرکز آن محسوب شده و از دیگر مزیت‌های تلقیح مصنوعی، کارآیی بیشتر آن در برنامه‌های انتخاب ژنتیکی، دستکاری و نگهداری مواد ژنتیکی است [Matsuoka et al., 2006].

مطالعات گسترده حاکی از آن بود که ذخیره‌سازی اسپرم قوچ به صورت منجمد منجر به کاهش تحرک و زنده‌مانی در نتیجه کاهش نرخ باروری می‌شود [Matsuoka et al.,2006]. خسارت‌های ناشی از انجماد به سه دسته ساختاری (فیزیکی)، بیوشیمیایی و عملکردی تقسیم می‌شوند. خسارت‌های ساختاری غشای پلاسمایی، کلاهکی، صفحات میتوکندری و آکسونم را تحت تاثیر قرار می‌دهد. آسیب‌های فوق ساختاری با تغییرات بیوشیمیایی همراه است. این تغییرات عبارتند از آزادسازی گلوتامیک اگزالواستیک ترانس آمیناز، از دست رفتن لیپوپروتئین و آمینواسیدها، کاهش

فعالیت فسفاتاز، کاهش پروتئین‌های دارای اتصال ضعیف به کلسترول، افزایش سدیم و کاهش پتاسیم، غیر فعال شدن آنزیم‌های هیالورونیداز و آکروزین موجود درکلاهک، اتلاف پروستاگلاندین، کاهش سنتز ATP و ADP و در نهایت کاهش فعالیت پروتئولیتیک کلاهک [Salamon and Maxwell., 1995]. تغییرات برودتی شیمیایی و فیزیکی اسپرم منجر به کاهش هماهنگی در اعمال، بقا در دستگاه تناسلی ماده و توانایی باروری اسپرم خواهندشد [Evenson and Jost, 2000].

با توجه به اطلاعات موجود استفاده از منی سردشده قوچ می‌تواند جایگزین مناسبی برای منی منجمد باشد. اگرچه سردکردن منجر به کاهش تحرک، توان بقا در دستگاه تناسلی ماده، باروری و افزایش سقط جنین می‌شود خسارت‌های ناشی از ذخیره‌سازی در سرما کمتر از حفاظت یخزدگی است [Maxwell and Salamon, 1993]. بسیاری از محققین ۱۵-۱۰^{o}C را بهترین دما برای ذخیره‌سازی اسپرم در حالت مایع می‌دانستند. در مقابل تعدادی از محققین گزارش کردند که اسپرم قوچ و گاو پس از ذخیره‌سازی در دمای ۵^{o}C از شرایط بهتری برخوردار است. کاهش دمای اسپرم از دمای محیط به حدود ۵^{o}C فعالیت متابولیکی سلول را کاهش و دوره حیات اسپرم را افزایش می‌دهد. کاهش سریع دما و شوک سرما باعث بروز تغییرات غیرقابل برگشت در سلول اسپرم خواهد شد [Salamon and Maxwell, 2000].

۱-۳- سرد کردن اسپرم و استرس اکسیداتیو

اسپرمی که به لحاظ عملکردی طبیعی است، سطوح پایینی از ROS[1] را تولید می‌کند. اما در اثر فرایندهای سرد کردن و انجماد، کانال‌های یونی کلسیم تحریک شده و یک شیوع وابسته به کلسیمی از ROS را نشان داده که در نهایت منجر به استرس اکسیداتیو می شود .تولید مقدار متوسط از ROS ممکن است با فرایندهای طبیعی بلوغ درگیر شده با ظرفیت-پذیری[2] و واکنش آکروزمی، همراه شود، ولی ROS اضافی و استرس اکسیداتیو باعث کاهش فعالیت آنزیم هایی که در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی نقش دارند شده و موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید، کاهش یکپارچگی غشا، افزایش نفوذپذیری سلول، غیرفعال شدن آنزیم های موجود در غشا، آسیب بهDNA ، کاهش در تحرک و ظرفیت باروری اسپرم ذخیره شده می‌شود [Bucak and Yuce., 2007].

۱-۴- اثرات پاتولوژیک ROS

در شرایط پاتولوژی افزایش ROS استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند. به دلیل حساسیت بالای اسپرماتوزوا به شرایط استرس اکسیداتیو، صدمات زیادی متوجه آن خواهد شد، که از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد.

---

1. Reactive oxygen species
2. Capacitation

۱-۴-۱- پراکسیداسیون لیپیدها

اسپرماتوزوآ به دلیل داشتن اسید چرب غیراشباع در غشا مورد حمله پرکسیدازها قرار گرفته و این واکنش پرکسیدازی منجر به شکست اسیدهای چرب غیراشباع و تولید محصولات تغییر یافته اکسیداتیوی می‌شود که برای سلول کشنده است . حضور اسیدهای چرب غیراشباع منجر به حفظ سیالیت غشای اسپرماتوزوآ می‌شود [Jones et al., 1979] به طوری که واکنش پراکسیدازی این اسیدهای چرب سیالیت غشا، فعالیت آنزیم‌های غشایی و کانال‌های یونی را کاهش می دهد، در نتیجه مکانیسم‌های سلولی طبیعی که برای لقاح لازم اند، تحت تاثیر قرار میگیرند .یکی از روش‌های برآورد محصولات پایدار ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها، بررسی میزان مالون‌دی‌الدهاید [1](MDA) است [Sharma and Agarwal., 1996]

۱-۴-۲- آسیب‌های DNA

اگرچه آسیب‌های حاصل از DNA روی رادیکال‌های ROS به عنوان عامل سببی بسیاری ازروندهای پاتولوژی پیشنهاد شده است ولی آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم افراد نابارور کمتر مورد توجه محققین بوده است .بنابراین، مطالعات اخیر نشان داده است که تعدادی از بازهای پورین اکسیده شده بوسیله روش‌های حساس قابل شناسائی هستند و ردیابی ۸-هیدروکسی گوانین به عنوان یکی از ۲۰ نوع تولیدات حاصل از آسیب‌های اکسیداتیو DNA است که در پی هیدرولیز آنزیمی DNA و جداسازی به روش‌های کروماتوگرافی نظیر HPLC با موفقیت جهت شناسایی و تعیین میزان آسیب‌های DNA در بافت‌های مختلف و خون و ادرار مورد استفاده قرار گرفته است .اخیراً این روش‌ها برای ارزیابی افراد در معرض خطر اکسیداتیو مرتبط با روش زندگی، زمینه ژنتیک،بیماری های تحلیل برنده و سموم محیطی مورد استفاده قرار می-گیرد[Fraga et al., 1990]

فراگا و همکاران (۱۹۹۱) نقش کاهش ویتامین C رژیم غذایی را روی آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم با استفاده از اندازه گیری ۸- هیدروکسی، ۲- داکسی گوانوزین موردارزیابی قرار دادند و همچنین در سال 1997 کودامو همکاران با اندازه‌گیری آسیب‌های اکسیداتیو در اسپرم مردان نابارور دریافتند که میزان شاخص اکسیداتیو DNA [2] برابر با۱/۲ ± ۰/۱ با محدوده ۱/۳- ۰/۲ بود که با گزارشات قبلی تقریبا همخوانی داشت .همچنین میزان ۸- هیدروکسی، ۲- داکسیگوانوزین در سایر سلول‌ها یا بافت‌ها با روشHPLC توسط کودامو همکاران اندازه‌گیری گردید و میزان آسیب اکسیداتیو DNA در گلبول‌های سفید خون از ۰/۶ تا ۰/۳ در بافت ریه ۰/۷ – ۰/۵ و در مخاط کلون ۰/۵- ۰/۳ در هر ۱۰۵ داکسی گوانوزین در

1. Malondialdehyde
2. Deoxyguanosin

مقایسه با این سلول‌ها و سایر بافت‌های بدن، آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم انسان بسیار شدیدتر بود .میزان متوسط سطح ۸- هیدروکسی و ۲- داکسی گوانوزین در اسپرم مردان نابارور نسبت به گروه شاهد بالاتر بود [Kodama et al., 1997].

کودام و همکاران (۱۹۹۷) در پژوهشی که بوسیله HPLC-EC به انجام رساندند به نتایجی در خصوص نقش اکسیداسیون DNA اسپرم در باروری مردان دست یافتند .پژوهش آنان نشان داد که ارتباطی بین میزان ۸- هیدروکسی، ۲- داکسی گوانوزین و غلظت اسپرم یاتعداد اسپرم در واحد حجم مایع سمینال وجود دارد. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که آسیب اکسیداتیو شدید DNA اسپرم با شرایط الیگوآزواسپرمی همراه است. یکی از راه‌های بیان ارتباط این است که اسپرم بیماران با آسیب اکسیداتیو شدید DNA ، دژنره شده و در طول روند اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم در اپیدیدیم توسط سلول‌های پوششی جذب می‌شوند که منجر به کاهش تعداد اسپرم در این بیماران می‌شود[Kodama et al., 1997]

متابولیت‌های اکسیداتیو در اسپرم فعالیت ویژه‌ای دارند ولی با این وجود هیچ مکانیسم ترمیمیDNA در کروماتین متراکم اسپرم وجود ندارد [Pogani et al., 1981] ، به همین دلیل بازهایDNA ی اسپرم و پیوند های فسفودی استری ساختار آن به آسیب‌های پرکسیداتیوی حساساند، سطح بالای ROS منجر به تخریب بازها، پیوستگی عرضی پروتئین‌ها و تجزیه شدن DNA میشود .البته آسیب DNA اسپرم در حد کم توسط تخمک، پس از لقاح ترمیم می‌شود ولی آسیب بیش از حد آن قابل ترمیم نیست .لازم به ذکر است که میزان ترمیم به کیفیت تخمک بستگی دارد . مارکر زیستی که می‌تواند میزان آسیب DNA را تعیین کند، ۸- هیدروکسی، ۲- داکسی گوانوزین است [Aitken et al., 2003].

۱-۴-۳-مرگ برنامه ریزی شده سلول

آپاپتوز در لغت به معنای افتادن برگ است ولی در بیولوژی سلولی به معنای مرگ برنامه ریزی شده سلول ها است که یک فرایند فیزیولوژی حیاتی برای نمو فعال وطبیعی وهمچنین حفظ تعادل می‌باشد. آپاپتوز نوعی از مرگ سلولی است که در آن سلول‌های میزبان، به دنبال فعالیت برنامه‌ریزی شده آبشاری از وقایع، که توسط مجموعه دقیقی از ژن‌ها کنترل می‌شود از بین می‌روند .بر خلاف نکروز در آپاپتوز خود سلول‌ها نیز نقش فعالی در مرگ خود ایفا می‌کنند که از این رو به آپوپتوز، خودکشی سلول نیز گفته می‌شود .این فرایند طی مراحل تکوین موجودات زنده و نیز به عنوان یک مکانیسم هومئوستاتیک برای حفظ جمعیت سلولی در بافت رخ می‌دهد، همچنین در مواردی از بیماری‌ها و حتی در جریان مراحل پیری موثر است [Nagata., 1997].

تولید فراوان ROS واکنش‌های زنجیره‌ای آپوپتوز را فعال می‌کند [Agarwal et al., 2003]. میزان ROS با سطح کاسپازها به عنوان یک پروتئاز آپوپتوزی رابطه مثبت دارد [Sikka., 2004]. میتوکندری‌ها نیز در روند آپوپتوز نقش کلیدی ایفا می‌کنند، با توجه اینکه، غشای داخلی میتوکندری حاوی سیتوکروم C است، در صورت تخریب غشای

میتوکندری توسط ROS، این سیتوکروم از میتوکندری رها شده و باعث فعالسازی کاسپازها و القای پدیده آپوپتوز می‌شود. همچنین آپوپتوز می‌تواند آسیب‌های DNA ی ایجاد شده توسط ROS را تشدید کند [Sikka., 2004]

۱-۴-۴- کاهش تحرک اسپرم

تحرک یک امر ضروری برای اسپرماتوزوآ است، تا بتواند مسیر تولید مثلی را طی کرده و خود را به محل لقاح برساند و سپس به داخل تخمک نفوذ کند. مطالعات نشان داده است که سطح ROS با تحرک اسپرماتوزوا رابطه مستقیم دارد. اثرات ROS بر تحرک ممکن است موقت یا دائمی باشد. اگر افزایش ROS باعث تخلیه سریع ATP و کاهش فسفوریلاسیون پروتئین آکسونمال شود، تحرک اسپرم به صورت موقت دچار اختلال خواهد شد. اما در صورتی که پراکسیداسیون حاصل از افزایش ROS به غشای اسپرم و پروتئین آکسونمال صدمه بزند، تحرک اسپرم به صورت دائمی از بین می‌رود [Armstrong et al., 1999; Iwasaki and Gagnon., 1992]

۱-۵- آنتی اکسیدان ها و عملکرد آنها

مکانیسم‌های متفاوتی برای مهار استرس اکسیداتیو و کاهش آسیب‌های ناشی از ROS وجود دارد، که یکی از آن‌ها سیستم آنتی‌اکسیدانی است .وجود آنتی‌اکسیدان‌ها وضعیت ثابتی از سطح ROS را در پلاسمای سمینال ایجاد می کند . آن‌ها به عنوان پاکسازی‌کننده رادیکال‌های آزاد، اسپرم را در برابر ROS حفاظت می‌کنند.

میزان اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در یک نسبت خاص حفظ می شوند و هر گونه تغییر در جهت افزایش این نسبت به سمت اکسیدان‌ها، شرایط استرس اکسیداتیو ایجاد می کند. همچنین آنتی‌اکسیدان‌ها، کاهش آنزیم های سیتوپلاسمی ناشی از فرایند اسپرمیوژنز را جبران می کنند [Aitken et al., 1989].

ROS ها برای عملکرد فیزیولوژی اسپرماتوزوآ ضروری است ولی باید کنترل‌هایی صورت گیرد که غلظت آن در یک سطحی نگهداری شود تا به سلول آسیب نرساند. این وظیفه توسط آنتی‌اکسیدان‌های موجود در پلاسمای منی صورت میگیرد. مهمترین آنتی‌اکسیدان‌هایی که اسپرماتوزوآ را در برابر تجمع ROS ها و آسیب‌های استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند عبارتند از سوپراکساید دیسموتاز SOD [Alvarez and Storey., 1983]، کاتالاز (CAT) [Jeulin et al., 1989]، گلوتاتیون (GSH)، سیستم پراکسیداز، سلنیم و سلنوپروتئین‌ها مانندهیدروپراکسید گلوتاتیون پراکسیداز فسفولیپیدها (PHGPx) و سیستم گلوتاتیون ردوکتاز [Li., 1975]، ویتامین هایE ، C وA [chow., 1991]، گلوتاتیون اسپرمین، تیول‌ها،اوره [Ronquist and Niklasson., 1984]، آلبومین، تائورین و هیپوتائورین [Alvarez., 1983]، کارنیتین و روی. علاوه بر این موارد نقش مثبت آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌های D و K در مقالات گزارش شده است [Kodentsova., 1994]. این آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان یک شبکه محافظتی وسیع با یکدیگر کار کرده و بسیاری از آن‌ها