دانشگاه کردستان

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

عنوان:

بررسی اثرات تائورین، هایپوتائورین، گلوتاتیون و لیکوپن بر روی انجمادپذیری اسپرم بز مرخز

پژوهشگر:

محمّد رضازاده

استاد راهنما:

دکترعباس فرشاد

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم دامی گرایش فیزیولوژی دام

اردیبهشت ماه 1391

دانشگاه کردستان
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم دامی گرایش فیزیولوژی دام

عنوان:

بررسی اثرات تائورین، هایپوتائورین، گلوتاتیون و لیکوپن بر روی انجمادپذیری اسپرم بز مرخز

پژوهشگر:
محمّد رضازاده

در تاریخ 1391/02/24 توسط کمیته تخصصی وهیات داوران زیر مورد بررسی قرار گرفت و با نمره 18/72 و درجه بسیار خوب به تصویب رسید.

هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
1ـ استاد راهنما	دکتر عباس فرشاد	دانشیار	
2ـ استاد داور خارجی	دکتر شمس‌الدین احمدی	استادیار	
4ـ استاد داور داخلی	دکتر امجد فرزین‌پور	استادیار	

مهر و امضاء گروه

مهر و امضاء معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده

تعهد نامه

اینجانب محمّد رضازاده دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم دامی گرایش فیزیولوژی دام دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی گروه علوم دامی تعهد می نمایم که محتوای این پایان نامه نتیجه تلاش و تحقیقات خود بوده و از جایی کپی برداری نشده و به پایان رسانیدن آن نتیجه تلاش و مطالعات مستمر اینجانب و راهنمایی و مشاوره اساتید بوده است.

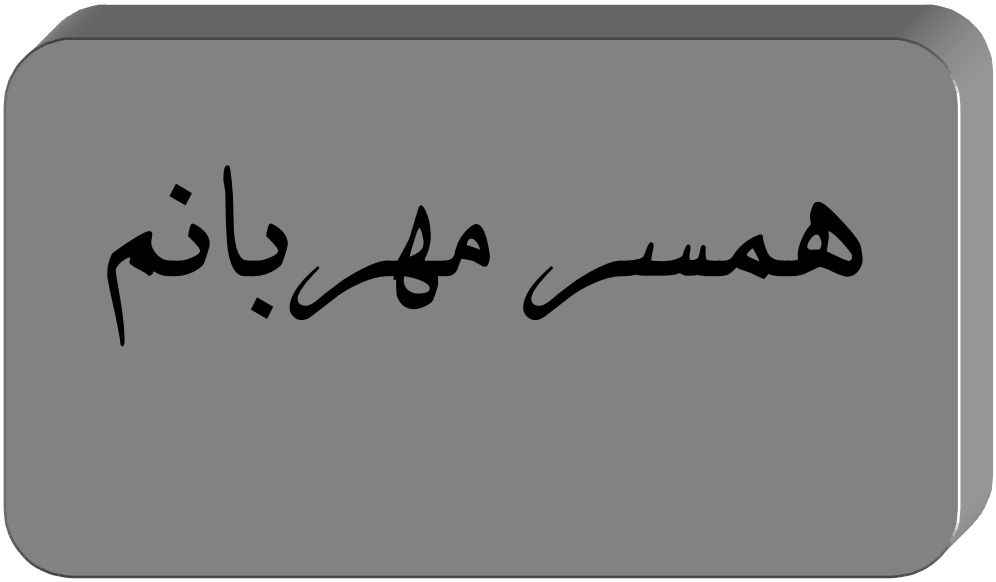
با تقدیم احترام

محمّد رضازاده

1391 / 02 / 24

تقدیم به

و



تقدیر و تشکر

غرض نقشی است کز ما باز ماند　　که هستی را نمی‌بینم بقایی

برای پایان‌نامه من عزیزان زیادی زحمت کشیدند که من فقط به بعضی از آنها اشاره خواهم کرد. در ابتدا از **پروردگارم** که مرا آفرید و به من نعمت حیات را ارزانی داشت. سپس تشکر می‌کنم از **مادرم** که مرا بدنیا آورد و زحمت بزرگ کردنم را در نبود پدرم، بجان خرید. بعد از مادر، از **همسر** مهربانم تشکر و سپاسگذاری می‌کنم که دور بودن از من را هر چند تلخش بود، با جان و دل پذیرفت تا من قطره‌ای بیشتر، از دریای علم نصیبم شود.

سپاس و قدردانی فراوان من نصیب استاد گرامی‌ام، آقای **دکتر فرشاد** باد که از علم اخلاقش، بیشتر نصیبم شد. همچنین جا دارد از تمام اساتیدی که طی این دو سال بر علم من افزودند از جمله آقایان دکتر صادقی، دکتر رستم‌زاده، دکتر فرزین‌پور، دکتر وزیری و دکتر رشیدی تشکر و قدردانی به عمل آورم. سپس تشکر می‌کنم از خانم دکتر بدخشان، که هر چند نه استاد مشاورم بود و نه استاد راهنما، اما برایم در امر آماری، کم نگذاشت. همچنین جا دارد از **مهندس رشیدی** (مسئول ایستگاه دامپروری سنندج)، **مهندس محمودی** (مسئول بخش امور دام جهاد کشاورزی سنندج) و خانم مهندس مروتی (مسئول آزمایشگاه بیولوژی تولید مثل دانشکده کشاورزی) تقدیر و تشکر کنم که همکاری لازم را با اینجانب داشتند. در پایان نیز از تمام دانشجویان عزیز از جمله یاسر حسینی، محمّد نعیمی، حسین سمنانی‌نژاد و همچنین از تمام همکلاسی‌هایم از جمله ناصر کارشی، محمّدحسن افشاری، رامین حبیبی، ابراهیم میرزامحمدی و صباح محمدی و ... تشکر می‌کنم.

از وصل نوشته بود و هجران‌نامه　　از خنده و گریه‌های پنهان‌نامه

تا خواست سخن به عشق آغاز کند　　ناچار رسید به خط پایان‌نامه

چکیده

هدف از انجام این تحقیق ارزیابی اثرات تائورین (10، 30 و 50 میلی‌مولار)، هایپوتائورین (10، 30 و 50 میلی‌مولار)، گلوتاتیون (1، 3 و 8 میلی مولار) و لیکوپن (200، 400 و 800 میکروگرم) بر روی انجماد پذیری اسپرم بز مرخز در صفاتی چون زنده‌مانی، جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، سلامت آکروزم و سلامت غشا می‌باشد. نمونه‌های منی از 4 بز مرخز از ایستگاه تحقیقاتی سنندج جمع‌آوری شد. کل 16 انزال با استفاده از واژن مصنوعی جمع‌آوری شدند و با رقیق‌کننده بر پایه تریس، رقیق شدند که شامل مواد افزودنی و بدون مواد افزودنی (شاهد) بودند. ارزیابی نمونه‌ها در 8 تکرار و داده‌های به دست آمده از 12 گروه آزمایشی و یک گروه شاهد در قالب طرح کامل تصادفی و با استفاده از نرم افزار SAS آنالیز شدند. میانگین تیمارها نیز بر اساس آزمون دانکن مقایسه شدند.

سطوح 10، 30 و 50 میلی‌مولار تائورین بطور معنی‌داری زنده‌مانی، جنبایی، جنبایی پیش‌رونده و سلامت غشا را کاهش دادند ($P<0.05$)، همچنین تائورین در سطح 50 میلی‌مولار بطور معتی‌داری سلامت آکروزم اسپرمهای بز را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد ($P<0.05$). هایپوتائورین نیز در سطوح 10، 30 و 50 میلی‌مولار باعث کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی، جنبایی، جنبایی پیش‌رونده و سلامت غشا اسپرم‌ها شدند($P<0.05$). همچنین در سطوح 10، 30 و 50 میلی‌مولار، هایپوتائورین باعث افزایش معتی‌داری در سلامت آکروزم شد ($P<0.05$). گلوتاتیون در سطح 1 میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌داری در زنده‌مانی، سلامت آکروزم و سلامت غشای اسپرم شد ($P<0.05$). گلوتاتیون در سطوح 10، 30 و 50 میلی‌مولار باعث افزایش معنی‌داری در سلامت آکروزم نسبت به تیمار شاهد شد ($P<0.05$). لیکوپن در سطوح 200، 400 و 800 میکروگرم باعث افزایش معنی‌داری در زنده‌مانی و جنبایی اسپرم‌ها شد. همچنین لیکوپن در سطح 200 و 400 میکروگرم باعث افزایش معنی-داری در جنبایی پیش‌رونده، سلامت آکروزم و سلامت غشا شد ($P<0.05$). در نتیجه اینکه تائورین و هایپوتائورین اثرات محافظتی خوبی بر روی سلامت آکروزم اسپرمها داشتند. گلوتاتیون اثر محافظتی خوبی بر روی زنده‌مانی، سلامت آکروزم و سلامت غشا داشت. لیکوپن نیز اثر محافظتی خوبی روی زنده‌مانی، جنبایی، جنبایی پیش‌رونده، سلامت آکروزم و سلامت غشا اسپرم‌های بز داشت.

کلمات کلیدی: انجمادپذیری، تائورین، هایپوتائورین، گلوتاتیون، لیکوپن، زنده‌مانی، جنبایی، اسپرم بز مرخز

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه 1

فصل اول (مرور منابع)..... 5

1-1 مایع منی..... 5

1-1-1 پلاسما 5

1-1-2 اسپرم..... 6

1-2 انجماد 7

1-3 استرس اکسیداتیو..... 9

1-4 پراکسیداسیون لیپیدی 10

1-5 اکسیداسیون DNA 11

1-6 رادیکال‌های آزاد..... 12

1-6-1 گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) 13

1-6-2 گونه‌های فعال نیتروژن (RNS) 16

1-7 آنتی‌اکسیدانها..... 17

1-8 تائورین..... 19

1-8-1 سنتز تائورین..... 19

1-8-2 محل تائورین..... 19

1-8-3 نقش تائورین..... 20

1-9 هایپوتائورین..... 22

1-9-1 سنتز هایپوتائورین..... 22

1-9-2 محل هایپوتائورین..... 23

1-9-3 نقش هایپوتائورین..... 23

1-10 گلوتاتیون (GSH) 24

1-10-1 سنتز گلوتاتیون 24

1-10-2 محل گلوتاتیون 25

1-10-3 نقش گلوتاتیون 25

1-11 لیکوپن..... 28

1-11-1 محل لیکوپن 28

1-11-2 نقش آنتی‌اکسیدانی لیکوپن 28

فصل دوم (مواد و روش) 30
2-1 مکان و حیوانات مورد آزمایش..... 30
2-2 تغذیه و مدیریت حیوانات مورد آزمایش..... 31
2-3 جمع‌آوری منی 32
2-4 ارزیابی اولیه 32
2-4-1 تعیین غلظت 33
2-4-2 تعیین درصد زنده‌مانی..... 34
2-4-3 تعیین درصد جنبایی و جنبایی پیش‌رونده..... 34
2-4-3 تعیین درصد سلامت آکروزوم 35
2-4-3 تعیین درصد سلامت غشا..... 35
2-5 آماده‌سازی رقیق‌کننده‌ها..... 36
2-5-1 روش تهیه رقیق‌کننده پایه..... 37
2-5-2 رقیق‌کننده‌های تیمارهای آزمایشی..... 38
2-5-3 روش رقیق‌کردن 38
2-6 روش انجماد..... 39
2-7 روش یخ‌گشایی 39
2-8 روش تجزیه و تحلیل داده‌ها..... 39
فصل سوم (نتایج و بحث) 41
3-1 نتایج ارزیابی اولیه..... 41
3-2 نتایج اثرات تائورین بر پارامترهای اسپرم در دمای 5 درجه سانتی‌گراد..... 42
3-3 نتایج اثرات تائورین بر پارامترهای اسپرم پس از یخ‌گشایی..... 43
3-4 نتایج اثرات هایپوتائورین بر پارامترهای اسپرم در دمای 5 درجه سانتی‌گراد..... 44
3-5 نتایج اثرات هایپوتائورین بر پارامترهای اسپرم پس از یخ‌گشایی..... 45
3-6 نتایج اثرات گلوتاتیون بر پارامترهای اسپرم در دمای 5 درجه سانتی‌گراد..... 46

3-7 نتایج اثرات گلوتاتیون بر پارامترهای اسپرم پس از یخ گشایی 46
3-8 نتایج اثرات لیکوپن بر پارامترهای اسپرم در دمای 5 درجه سانتی گراد 47
3-9 نتایج اثرات لیکوپن بر پارامترهای اسپرم پس از یخ گشایی 48
3-10 مقایسه تیمارها با یکدیگر در دمای 5 درجه سانتی گراد 49
3-11 مقایسه تیمارها با یکدیگر پس از یخ گشایی 52
3-12 بحث 54
3-12-1 تائورین 55
3-12-2 هایپوتائورین 57
3-12-3 گلوتاتیون 62
3-12-4 لیکوپن 61
نتیجه گیری و پیشنهادات 63
منابع 64

مقدمه

تلقیح‌مصنوعی[1] اولین تکنولوژی بزرگی است که برای بهبود تولیدمثل و ژنتیک حیوانات مزرعه استفاده می‌شود. پذیرش این تکنیک در سراسر دنیا باعث پذیرش دیگر تکنیک‌ها از جمله نگهداری اسپرم در دمای انجماد[2]، تعیین جنسیت اسپرم، تنظیم چرخه فحلی و کشت، انجماد و انتقال رویان می‌شود [46]. در گذشته، زیاد بودن مخارج تلقیح‌مصنوعی با توجه به پرورش گوسفند و بز در واحدهای کوچک، کم بودن مخارج نگهداری قوچ در گله و موفقیت‌آمیز نبودن استفاده از اسپرم منجمد گوسفند و بز از عواملی بودند که استفاده از تلقیح‌مصنوعی را در گوسفند و بز محدود می‌کردند. اما پیشرفت‌های اخیر در زمینه افزایش بازده تلقیح مصنوعی در گوسفند و بز، باعث بهبود وضعیت آن شد[1].

انجماد منی این امکان را مهیا می‌کند تا مواد ژنتیکی باارزش بتوانند به طور وسیعی گسترش یابند، حتی در گله‌های کوچک با استفاده از تلقیح‌مصنوعی می‌توان این رشد ژنتیکی را افزایش داد. با این وجود، تلقیح‌مصنوعی از راه سرویکس - زمانیکه از منی منجمد شده استفاده می‌شود ـ نرخ باروری را در بزها کاهش می‌دهد[17]. در بیشتر گونه‌ها، تکنیک انجماد منی منجر به انواع مختلفی از تغییرات سلولی می‌شود که در نهایت این تغییرات منجر به کاهش باروری اسپرم در مقایسه با اسپرم تازه می‌شود[25].

1. Artificial Insemination
2. Cryopreservation

عوامل محیطی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی از فاکتورهایی هستند که باعث ناباروری اسپرم می‌شوند[103]. لازمه بارور بودن اسپرم، داشتن جنبایی بالا و آکروزم سالم است. بالا بودن جنبایی اسپرم تحقق نمی‌شود مگر با وجود میتوکندری سالم و بالا بودن قابلیت انعطاف و سیالیت غشاء. برای حفظ این ویژگی لازم است که در غشای اسپرم سطوح بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع وجود داشته باشد[۷۸،۶۹]. این نوع اسیدهای چرب به علّت تشکیل رادیکال‌های آزاد، غشای اسپرم را برای پراکسیداسیون لیپیدی (LPO)[1] مستعد می‌کنند[۷۸،۵۴]. از طرف دیگر وقتی که اسپرم در تلقیح‌مصنوعی استفاده می‌شود، در طی فرآیندهای عملی در معرض اکسیژن قرار می‌گیرد که این عمل می‌تواند باعث تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[2] شود[21]. ROS الکترون‌ها را از سلول اسپرم به طرف خود می‌کشد و باعث متلاشی کردن DNA اسپرم می‌شود[87]. همچنین رادیکال‌های آزاد با ایجاد استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی باعث آسیب به DNA و غشای اسپرم می‌شوند[113].

در مقابل حمله ROS، سیتوپلاسم سلول‌های اسپرم به خوبی با یک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مجهز شده‌اند[103]. آنتی‌اکسیدانها با بافت چربی واکنش داده و با جمع‌آوری ROS از محیط، موجب خنثی-سازی و حذف آنان از درون و برون سلول شده و از گسترش پراکسیداسیون لیپیدی در غشاهای سلول جلوگیری می‌کنند[۱۰۳،۱۰۱،۶۷] از آنجائیکه سلول‌های اسپرم در طی اسپرماتوژنز حجم زیادی از سیتوپلاسم و آنتی‌اکسیدانهای خود را از دست می‌دهند[101]، بنابراین افزودن آنتی‌اکسیدان به مایع منی ضروری است.

چندین مطالعه در مورد مکمل کردن منی بز با آنتی‌اکسیدان‌ها انجام شده است[۴۳،۴۲،۳،۲]. آنتی-اکسیدانهای مختلفی برای محافظت اسپرم‌ها از اثرات زیان‌آور رادیکال‌های آزاد وجود دارد [۶۹،۴۲،۴۳]. آنتی‌اکسیدانهایی که قرار است در این پژوهش مورد ارزیابی قرار بگیرند، تائورین، هایپوتائورین،

1. Lipid Peroxidation
2. Reactive Oxygen Species

گلوتاتیون و لیکوپن می‌باشند. تائورین (2- آمینواتان‌سولفونیک‌اسید) یکی از بزرگترین آمینواسیدهای آزاد بین‌سلولی است که در بافت یا سلول (از جمله اسپرم، نوتروفیل، بافت شبکیه چشم، پلاسمای منی، مایع اپیدیدیمال، مایع رحم و لوله‌های فالوپ) بیشتر پستانداران یافت می‌شود[۶۱،۳۱] و نقش‌هایی مثل تنظیم اسمزی، تنظیم کلسیم، تکثیر سلول، قابلیت زنده‌مانی و جلوگیری از آسیب‌های وارد شده توسط اکسیداسیون بافتی را برعهده دارد[۸۶،۶۷]. از دیگر اثرات سودمند تائورین به عنوان یکی از آنتی-اکسیدانهای غیرآنزیمی[113] در سیستم‌های بیولوژیکی می‌توان به تثبیت غشای زیستی، حذف ROS و جنباکردن اسپرم اشاره کرد[۶۷،۲۱]. جانگ و همکاران (2006) اعلام داشتند که افزودن تائورین به رقیق‌کننده منی خوک می‌تواند جنبایی اسپرم را به طور معنی‌داری افزایش دهد. هایپوتائورین (2- آمینو-اتان‌سولفینیک‌اسید) هم که جزء آنتی‌اکسیدانهای غیرآنزیمی است[113] می‌تواند از پراکسیداسیون لیپیدی و پراکسی نیترات جلوگیری کرده و به عنوان یک عامل محافظتی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو در سیستم تولیدمثلی، از تشکیل LPO جلوگیری کند[۴۵،۴۴]. آلوارز و استوری (1983) طی تحقیقی بیان داشتند که هایپوتائورین می‌تواند تشکیل سوپراکسید را در منی خرگوش کاهش دهد.گلوتاتیون که یک آنتی‌اکسیدان سولفیدریلی، آنتی‌توکسین و کوفاکتور آنزیمی است می‌تواند از تشکیل رادیکال‌های آزاد جدید جلوگیری کرده و از میتوکندری در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت کند[86]. علاوه بر آن گلوتاتیون به رقیق شدن پرونوکلئوس اسپرم در طی باروری کمک می‌کند به این نحو که پروتامین‌ها را که موجب غلیظ شدن DNA می‌شوند، می‌شکند[116]. سینها و همکاران (1996) طی تحقیقی که بر روی بز انجام دادند مشخص کردند که افزودن گلوتاتیون به مایع رقیق‌کننده، تعداد اسپرم‌های غیرنرمال را کاهش می‌دهد. لیکوپن یک هیدروکربن آلیفاتیک است که بازده آنتی‌اکسیدانی دارد و قادر است رادیکالهای آزاد را از بین ببرد[112]. یوسال و بوکاک (2007) نشان دادند که افزودن لیکوپن می‌تواند پارامترهای اسپرم قوچ (از جمله جنبایی، زنده‌مانی، سلامت غشا و ...) را بعد از انجماد بهبود بخشد.

هدف از انجام این پژوهش ارزیابی اثرات تائورین (10، 30 و 50 میلی‌مولار)، هایپوتائورین (10، 30 و 50 میلی‌مولار)، گلوتاتیون (1، 3 و 8 میلی‌مولار) و لیکوپن (200، 400 و 800 میکروگرم) بر روی انجمادپذیری بز مرخز می‌باشد.

فصل اول- مرور منابع

1-1- مایع منی

منی[1]، مایع تولید شده در دستگاه تولید مثل حیوان نر و دربرگیرنده گامت‌های (سلول‌های جنسی) نر است. هنگام آمیزش، این مایع در واژن حیوان ماده می‌ریزد. اما به طریق مصنوعی هم آنرا از حیوان نر گرفته، منجمد و نگهداری یا برای تلقیح مصنوعی استفاده می‌کنند. منی شامل دو قسمت پلاسما و اسپرماتوزوآ می‌باشد[1].

1-1-1- پلاسما

پلاسمای منی بزهای نر ممکن است زرد رنگ باشد که این زردی ناشی از ریبوفلاوین ترشح شده از غدد وزیکولار است. قسمت اصلی پلاسمای منی قوچ و بز نر، آب است (75%) اما مواد آلی و غیرآلی نیز برای تغذیه و نگهداری اسپرم، در آن وجود دارد. پلاسمای منی معمولاً ایزوتونیک است. بر خلاف مایعات دیگر بدن، فشار اسمزی منی را بیشتر مواد آلی حفظ می‌کنند. مواد آلی اصلی در اسپرم قوچ و بز شامل فروکتوز، سوربیتول، اینوزیتول، اسیدسیتریک، گلیسریل‌فسفریل‌کولین، پروستاگلاندین‌ها و پروتئین‌ها همراه با مقدار زیادی یون سدیم، پتاسیم و کلرید است. pH پلاسمای منی با سیستم کمپلکس

1. Semen

بافری نزدیک 7 نگهداری می‌شود. خاصیت بافری پلاسمای منی از تغییر ناگهانی pH جلوگیری و از اسپرم محافظت می‌کند. خصوصیت ویژه پلاسمای منی بز نر، وجود آنزیم فسفولیپاز A است که از غدد کوپر ترشح می‌شود. زمانی که زرده تخم‌مرغ برای رقیق‌سازی اسپرم بکار می‌رود، این آنزیم باعث شکسته شدن لسیتین زرده تخم‌مرغ می‌شود و سمّی تولید می‌کند که بر اسپرم‌ها اثر می‌گذارد و باعث انعقاد مایع رقیق‌کننده می‌شود[1].

1-1-2- اسپرم

به منظور دستیابی به حداقل موفقیت، نه تنها رقیق‌کننده مناسب، میزان رقیق‌کردن، سرعت انجماد و یخ‌گشایی مورد نیاز است بلکه دانش در مورد فیزیولوژی اسپرم یک گونه برای حداکثر ریکاوری اسپرم بعد از یخ‌گشایی و به‌تبع آن باروری اسپرم، ضروری است. اسپرم بز یک مثال خوبی از این مورد است زیرا با وجود اینکه اسپرم بز از خیلی جهات شبیه اسپرم دیگر پستانداران است مثل شباهت در محیط انجماد، مواد منجمدکننده و سرعت انجماد و یخ‌گشایی که می‌تواند برای انجماد اسپرم بکار گرفته شود، اسپرم بز نیاز به توجه ویژه‌ای دارد تا بعد از یخ‌گشایی بیشترین زنده‌مانی را داشته باشند[95]. برای مثال اثر متقابل زیان‌آوری که بین زرده تخم‌مرغ و ترشحات غده بالبویوریترال[1] وجود دارد در گونه‌های دیگر مثل خوک، گاو یا قوچ وجود ندارد[97].

اسپرم‌ها گامت‌های نر هستند و در لوله‌های سمینیفر بیضه‌ها تولید می‌شوند. هر اسپرم از سه بخش سر، گردن و دم تشکیل شده است. سر اسپرم پهن و تخم‌مرغی شکل است و قسمت اعظم آنرا هسته در برمی-گیرد. هسته شامل کروموزم‌ها و مسئول انتقال اطلاعات ژنتیک پدری است. قسمت سر اسپرم با کلاهک مخصوصی بنام آکروزم پوشیده شده است که آنزیم‌های لازم برای مراحل لقاح را دارد. اندام حرکتی اسپرم، دم شلاق مانند طویلی است که حرکت آن باعث نفوذ سر اسپرم در مایعات می‌شود. گردن، پل

1. Bulbourethral Gland

ارتباطی بین سر و دم است. امکان دارد در هوای گرم یا دیگر وضعیت‌های تنش‌زا، گردن آسیب ببیند و باعث جدا شدن سر از دم شود[1].

1-2- انجماد

هنگامیکه حیوان نر در گله حضور دارد، منی تازه به منی منجمد شده ترجیح داده می‌شود، بویژه در طی فصل تولیدمثل که منی با کیفیتی تولید می‌شود. اما منی که برای یک مدت طولانی نگهداری می-شود، این شرایط را فراهم می‌کند تا در سطح وسیعی مورد استفاده قرار گرفته، در سراسر سال استفاده شود و مواد ژنتیکی حیوانات با ارزش که مرده‌اند، حفظ شود. همچنین استفاده از منی منجمد شده، مبادله بین‌المللی مواد ژنتیکی را تسهیل کرده و اجازه می‌دهد که منی در هر دو فصل تولیدمثل و غیرتولیدمثلی استفاده شود. تلقیح مصنوعی و همزمان کردن فحلی یکی از تکنولوژی‌های کلیدی برای اداره کردن سیستم تولیدمثلی، تعداد جفتگیری، زایمان و تولید گوشت و شیر در طی زمان مشخصی از سال برای بازاریابی و اهداف دیگر، است[19].

انجماد اسپرم پستانداران فرآیند پیچیده‌ای است که در آن چندین فاکتور باید در تعادل باشند تا نتایج مطلوب به دست آید[95]. به نظر می‌رسد انجماد منی به مدت طولانی یک وسیله خوبی برای تولیدمثل حیوانات باارزش مزرعه و همچنین برای حفظ گونه‌هایی که در حال انقراض هستند، می‌باشد[115]. یکی از بزرگترین تغییرات اسپرم در طی انجماد این است که حساسیت به ROS زیاد شده که در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد[13]. انجماد منی بز یک پدیده پیچیده‌ای است و این مسئله به خاطر وجود ترشحات غده بالبویوریترال است که با زرده تخم‌مرغ و شیر واکنش داده و مواد سمّی برای اسپرم تولید می‌کنند[74].

مشخص شده که نگهداری منی پستانداران در فاز انجماد در مقایسه با منی تازه، باروری را کاهش می‌دهد. تغییرات دما، استرس‌هایی را به غشا وارد می‌کند. این اتفاق احتمالاً با تغییراتی که در لیپید و

بنابراین در عملکرد غشا رخ می‌دهد، مرتبط است. از آنجائیکه اثرات استرس اکسیداتیو بر روی لیپیدهای غشا، محدود به دمای صفر درجه سانتیگراد نمی‌شود، این تغییرات در دمای زیر صفر درجه سانتیگراد نیز ادامه می‌یابد. با این وجود نباید این مطلب را از نظرها پنهان داشت که در نتیجه استرس‌های حرارتی، دیگر عناصر موجود در غشا (مثل پروتئین‌ها) نیز دستخوش تغییرات می‌شوند. پروتئین‌های یک غشای کامل که به صورت یک خوشه می‌باشند، توسط یک فاز لیپیدی جدا شده‌اند و می‌توان انتظار داشت که این مسئله می‌تواند عملکرد را تغییر دهد مخصوصا پروتئین‌هایی که بطور ویژه، حمل مواد را برعهده دارند مثل پروتئین‌های کانال یونی. تشابه زیادی بین آسیب وارده به غشا در طی فاز انجماد و واکنش آکروزم وجود دارد. افزایش کلسیم در طی سرما باعث کاپاسیته‌شدن و آمیزش بین غشای پلاسما و لایه بیرونی غشای آکروزم می‌شود[115].

کاهش دما در طی سردسازی منی و خود فرآیند انجماد منی می‌تواند بر جنبایی و ظرفیت تنفس اسپرم اثر بگذارد. از جمله پمپ‌های ATP که در انجماد منی نقش دارند، پمپ سدیم ـ پتاسیم (Na^+/K^+) است که در نتیجه دی‌پلاریزاسیون[1] جزئی غشا، تحت تاثیر قرار گرفته، نفوذپذیری به کلسیم زیاد می‌شود[25]. این فرآیند منجر می‌شود که کیسه‌های وزیکولی در غشای آکروزم به طور ناقص تشکیل شود که این خود باعث آسیب به غشای میتوکندری می‌شود[12]. صدمه وارد شده به ساختار لایه میتوکندری در طی فرآیند انجماد و یخ‌گشایی منجر به از دست رفتن این بخش از اسپرم شده که می‌تواند منجر به کاهش ظرفیت تنفسی[2]، کاهش دسترس بودن انرژی و کاهش جنبایی اسپرم شود[51].

طبق گفته اسپانجین وهمکاران (1995)، دپلیمریزاسیون فیلامنت آکتین اسکلت سلولی، یک گام مهمی برای واکنش آکروزم و کاپاسیتاسیون است که اجازه می‌دهد پلاسما و غشای آکروزم به یکدیگر نزدیک شوند، که به نوبه خود منجر به اگزوسیتوز آکروزمی می‌شود[106]. از آنجائیکه اسکلت سلولی به

1. Depolimerization
2. Respiratory Capacity

دما حساس است، انجماد و یخ‌گشایی سلول‌های اسپرم منجر به دپلیمریزاسیون فیلامنت‌های آکتین می‌شود که می‌تواند در تغییر غشا دخالت کرده و در نتیجه در کاپاسیتاسیون و واکنش آکروزم تغییر ایجاد می-شود[29،115].

1-3- استرس اکسیداتیو

استرس اکسیداتیو از طریق تعادل بین تولید و کاهش ROS در یک بافت مشخص می‌شود[23]. مراحلی که به تکنیک تولیدمثلی کمک می‌کند، مثل تلقیح مصنوعی، ممکن است باعث استرس اکسیداتیو بیشتری شود. در طی مراحل مختلف بلوغ اسپرم، سطوح متفاوتی از استعداد استرس اکسیداتیو وجود دارد. فرآیند اکسیداتیو وابسته به اسپرم بطور ویژه سودمند است چونکه ROS تولید شده در طی استرس اکسیداتیو و زمانیکه اسپرم در محیط آزمایشگاه ذخیره می‌شود، به کاپاسیته شدن اسپرم کمک می‌کند که ممکن است به اسپرم برای رسیدن به بلوغ کامل برای بارورکردن تخمک، کمک کند[37]. فرآیند انجماد شامل تعداد زیادی استرس زیان‌آور بالقوه است که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد- 1. تغییر در دما 2. اسموتیک و استرس‌های اکسیداتیوی که توسط غلظت مواد منجمد کننده، عرضه می‌شوند 3. تشکیل و ذوب شدن یخ در محیط خارج سلولی

1. تغییر در دما: تغییرات دمایی استرس‌هایی را بر غشا وارد می‌کند. این احتمال وجود دارد که این مسئله با تغییراتی در فاز لیپیدی غشا و همچنین تغییراتی در عملکرد غشا در ارتباط باشد. به نظر می‌رسد که شوک سرمایی، حالت نهایی سلسله‌ای از استرس‌هاست که تحت تاثیر سرعت شروع این پدیده، قرار می-گیرد. پتیت و بوهر (1998) نوسانات مهمی در محیط لیپیدی غشای پلاسما در طی انجماد نشان دادند که این نشان می‌دهد ترکیبات لیپیدی در این مکانیسم سهیم هستند[115].

2. استرس‌های انجماد: افزودن و برداشتن مواد محافظ انجماد در یک نسبت مولاری مشخصی انجام می‌شود اما استرس اسموتیک وارده بر غشای پلاسمایی اسپرم، بستگی بالایی به ضریب نفوذپذیری این

مواد دارد[49]. به طور کلی یکی از موادی که برای حفاظت از سلول در محیط انجماد استفاده می‌شود، گلیسرول[1] است که می‌تواند استرس اسموتیکی را القا کند. گائو و همکاران (1995) نشان دادند زمانیکه 1 مول گلیسرول به صورت یکدفعه‌ای به اسپرم انسان اضافه می‌شود، این حجم بیش از ظرفیت تحمل اسپرم است و ممکن است استرس را القا کند. آنها نشان دادند که اگر گلیسرول به طور تدریجی اضافه شود، استرس می‌تواند بطور قابل توجهی کاهش یابد که این مسئله می‌تواند زنده‌مانی اسپرم را افزایش دهد[115].

3. تشکیل کریستال یخ و انحلال آن: وقتی یک محلول به زیر نقطه انجماد می‌رسد آب خالص به شکل کریستال یخ و کریستال‌های یخ به صورت یک هسته در می‌آیند. مواد محلول در بخش آب مایع باقی مانده، حل می‌شوند و به این ترتیب فشار اسمزی محلول بیشتر می‌شود. ضمن اینکه درصدی از آب کریستالی شده به صورت یخ می‌باشد که این مسئله فشار اسمزی محلول را بیشتر می‌کند. در دماهای پایین، قسمتی از محلول که به صورت یخ در نیامده است، کوچکتر می‌شود و از اینرو فشار اسمزی محلول شدت می‌یابد.

به هر حال باید سرعت انجماد کردن، آهسته باشد تا اجازه بدهد آب سلول را ترک کند و از تشکیل یخ داخل سلولی که می‌تواند برای سلول کشنده باشد، جلوگیری کند. به طور کلی سلول‌های اسپرم در یک دامنه سرعت مناسبی بین 60-15 درجه سانتیگراد در دقیقه که به طور تجربی مشخص شده است بهترین نرخ زنده‌مانی باشد، منجمد می‌شوند[115].

1-4- پراکسیداسیون لیپیدی

توانایی انجماد اسپرم همه گونه‌های اهلی یک مسئله مشکل‌سازی است. با این وجود همه سلول‌ها به طور مشابه باید در شرایط انجماد، استرس‌های فیزیکی را تحمل کنند. اسپرم گونه‌های مختلف از لحاظ اندازه، شکل و ترکیب لیپیدی خیلی متفاوت هستند که همه اینها برای زنده‌مانی در شرایط انجماد اهمیّت

1. Glycerol