

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

دانشکده علوم کشاورزی  
گروه علوم دامی  
گرایش فیزیولوژی دام

## بررسی اثر سطوح مختلف مایع منی در شوک سرما بر اسپرم پوشش‌دار شده با زرده تخم مرغ در قوچ تالشی

از:

رضا رجبی توستانی

استاد راهنما:

دکتر محمد روستائی علی مهر

استاد مشاور:

مهندس مختار مهدی‌زاده اسطلخ کوهی

اسفند ۱۳۸۹

تقدیم بہ

استادانہ شمنند

دکتر علی رضا محمودزادہ

روح شاد، یادش کرامی

## تقدیر و تشکر

ای هستی، بخش، وجود مبرکات بی کرات تو ان شکر نیست ذره ذره وجودم برای تو نزدیک شدن به تویی تند. الهی مراد دکن تادانش اندکم نه زوبانی باشد برای فزونی تکبر و غرور، نه حلقه ای برای اسارت و نه دست مایه ای برای تجارت بلکه گامی باشد برای تجلیل از تو و متعالی ساختن زندگی خود و دیگران.

محبت های مادر، حمایت های پدرم و دلگرمی های برادرانم را ارج نهاده و خود را همواره مریهون به برای بی دریغ شان می دانم.

از استاد راهنمای فریخته و عزیزم آقای دکتر محمد روستانی علی مهر که با سه صدر و صبوری مرار اینجانبی نموده و با ارائه نظرات سازنده و راهنمایی بی دریغ شان در پیشبرد این پایان نامه سعی نمودم، کمال تشکر را دارم.

از استاد مشاور ارجمندم، آقای مهندس مختار مهدی زاده ا سطلج کوهی که در مسیر ساختن زمینه انجام این پژوهش تلاش بسیار نمودم تشکر می کنم.

از آقای دکتر محسن زواره که تجزیه و تحلیل آماری داده های این پژوهش را بر عهده گرفتند بسیار سپاسگزارم.

از آقای دکتر محمود حقیقیان رودسری و آقای دکتر مراد محمدی که زحمات بازخوانی و داوری پایان نامه را بر عهده داشتند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم.

از آقای دکتر جلیل حاجی زاده، نماینده محترم تحصیلات تکلیفی که مدیریت جلسه دفاع را بر عهده داشتند بسیار تشکر می کنم.

از دوست و همکار گرانقدرم آقای مهندس رسول معتمدی مرادبی که در لحظه لحظه انجام این پایان نامه با من همراه و به کام بودند و مراد انجام این پایان نامه یاری کردند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از دوست عزیزم آقای مهندس میثم شیخ پور برای کمک های فراوان شان بسیار سپاسگزارم.

از خانم مهندس قیامی و خانم مهندس شرفی که مراد انجام این پایان نامه یاری کردند سپاسگزارم.

در پایان از کلیه عزیزانی که مراد طول دوران تحصیل کمک کردند تشکر می نمایم و برایشان آرزوی سلامتی و پیروزی دارم.

رضارجبی توستانی

۸۹/۱۲/۹

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی .....	خ
چکیده انگلیسی .....	د
مقدمه .....	ا
<b>فصل اول: مروری بر منابع</b>	۳
۱-۱- خصوصیات و فواید مایع منی .....	۴
۱-۱-۱- نقش مایع منی در ظرفیت پذیری اسپرم .....	۵
۱-۱-۲- نقش مایع منی در تحرک اسپرم .....	۶
۱-۱-۳- نقش مایع منی در محافظت اسپرم .....	۷
۱-۱-۴- نقش مایع منی در ذخیره‌سازی اسپرم .....	۸
۱-۱-۵- واکنش آکروزومی .....	۹
۲-۱- اثرات نامطلوب مایع منی .....	۹
۳-۱- ظرفیت‌پذیری و واکنش آکروزومی اسپرم .....	۱۰
۴-۱- محافظت اسپرم به وسیله زرده تخم مرغ .....	۱۴
۵-۱- فاکتورهای مضر مایع منی برای ذخیره‌سازی اسپرم .....	۱۷
۱-۵-۱- پروتئین‌های مضر مایع منی برای ذخیره‌سازی اسپرم .....	۱۷
۲-۵-۱- واکنش پروتئین‌های مایع منی با لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین زرده تخم مرغ .....	۱۸
۳-۵-۱- مکانیسم محافظت اسپرم به وسیله لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین زرده تخم مرغ .....	۱۹
<b>فصل دوم: مواد و روش‌ها</b>	۲۲
۱-۲- مکان آزمایش و حیوانات مورد استفاده .....	۲۳
۲-۲- تغذیه و مدیریت حیوانات مورد آزمایش .....	۲۳
۳-۲- آماده‌سازی محلول‌ها و رقیق‌کننده‌ها .....	۲۳
۱-۳-۲- مواد شیمیایی مورد استفاده .....	۲۳
۲-۳-۲- وسایل مورد استفاده .....	۲۴
۳-۳-۲- محلول‌ها .....	۲۴
۱-۳-۳-۲- روش تهیه رنگ ائوزین-نیگروزین .....	۲۴
۲-۳-۳-۲- روش تهیه محلول هایپواسمتیک .....	۲۴
۴-۳-۲- آماده‌سازی رقیق‌کننده‌ها .....	۲۴
۱-۴-۳-۲- رقیق‌کننده تریس-زرده تخم مرغ برای پوشش‌دار کردن اسپرم .....	۲۴
۲-۴-۳-۲- رقیق‌کننده تریس-زرده تخم مرغ برای رقیق‌سازی تیمارها .....	۲۵
۴-۲- جمع‌آوری منی .....	۲۵
۱-۴-۲- جمع‌آوری نمونه‌های انزالی .....	۲۵
۲-۴-۲- جمع‌آوری اسپرم پوشش‌دار شده با رقیق‌کننده تریس-زرده تخم مرغ .....	۲۶
۳-۴-۲- استخراج اسپرم از اپیدیدیم .....	۲۶

## فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۵-۲- جمع آوری مایع منی .....	۲۶
۶-۲- ارزیابی های انجام شده .....	۲۷
۱-۶-۲- تعیین غلظت نمونه های منی .....	۲۷
۲-۶-۲- تحرک پیش رونده .....	۲۷
۳-۶-۲- زنده ماننی .....	۲۷
۴-۶-۲- سلامت غشای پلاسمایی .....	۲۸
۷-۲- آماده سازی تیمارها .....	۲۸
۱-۷-۲- روش رقیق کردن تیمارهای انزالی .....	۲۸
۲-۷-۲- روش رقیق کردن تیمارهای پوشش دار شده .....	۲۸
۳-۷-۲- روش رقیق کردن تیمارهای اپیدیمی .....	۲۹
۸-۲- طرح آماری و تجزیه و تحلیل داده ها .....	۳۰
<b>فصل سوم: نتایج</b>	
۱-۳- اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم .....	۳۲
۲-۳- اثر شوک سرمایی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم .....	۳۲
۳-۳- اثر متقابل سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم .....	۳۳
۴-۳- اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم طی زمان .....	۳۴
۵-۳- اثر شوک سرمایی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم طی زمان .....	۳۵
۶-۳- اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم طی زمان .....	۳۶
۷-۳- اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی .....	۳۸
۸-۳- اثر شوک سرمایی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی .....	۳۸
۹-۳- اثر متقابل سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم .....	۳۹
اپیدیمی .....	۳۹
۱۰-۳- اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی طی زمان .....	۳۹
۱۱-۳- اثر شوک سرمایی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی طی زمان .....	۴۰
۱۲-۳- اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر تحرک پیش رونده، زنده ماننی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم .....	۴۱
اپیدیمی طی زمان .....	۴۱
<b>فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری</b>	
۱-۴- بحث .....	۴۵
۲-۴- نتیجه گیری .....	۵۰
۳-۴- پیشنهادات .....	۵۱
<b>منابع</b>	
.....	۵۲
<b>پیوست ها</b>	
.....	۶۲

## فهرست جدول‌ها

صفحه	عنوان
۱۷	جدول ۱-۱. پروتئین‌های مشابه با پروتئین‌های مایع منی گاو در سایر گونه‌ها.....
۲۱	جدول ۱-۲. میانگین مقدار پروتئین‌های مایع منی در پستانداران.....
۲۳	جدول ۱-۲. ترکیب شیمیایی جیره غذایی استفاده شده در این پژوهش.....
۲۹	جدول ۲-۲. تیمارهای آزمایشی نمونه‌های انزالی.....
۲۹	جدول ۲-۳. تیمارهای آزمایشی نمونه‌های اپیدیمی.....
۳۲	جدول ۱-۳. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ.....
۳۲	جدول ۲-۳. اثر شوک سرمایی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ.....
۳۴	جدول ۳-۳. اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ.....
۳۵	جدول ۳-۴. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ در طی زمان.....
۳۵	جدول ۳-۵. اثر شوک سرمایی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم طی زمان.....
۳۷	جدول ۳-۶. اثر سطوح مختلف مایع منی، شوک سرمایی و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ.....
۳۸	جدول ۳-۷. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ.....
۳۸	جدول ۳-۸. اثر شوک سرمایی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ.....
۳۹	جدول ۳-۹. اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ.....
۴۰	جدول ۳-۱۰. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ در طی زمان.....
۴۱	جدول ۳-۱۱. اثر شوک سرمایی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی طی زمان.....
۴۳	جدول ۳-۱۲. اثر سطوح مختلف مایع منی، شوک سرمایی و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ.....

## فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۱۱	شکل ۱-۱. روند تغییرات در غشای لیپیدی اسپرم در طی ظرفیت‌پذیری
۱۲	شکل ۲-۱. چگونگی انتقال سیگنال در طی فرآیند واکنش آکروزومی
۲۰	شکل ۳-۱. مکانیسم محافظت اسپرم به وسیله زرده تخم مرغ
۲۶	شکل ۱-۲. مهبل مصنوعی

## فهرست پیوست‌ها

عنوان	صفحه
شکل ۱. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ.....	۶۳
شکل ۲. اثر شوک سرمایی منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ.....	۶۳
شکل ۳. مقایسه اثر سطوح مختلف مایع منی در شرایط نگهداری ۵ درجه سانتی‌گراد بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ.....	۶۴
شکل ۴. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم قوچ در طی زمان ذخیره‌سازی.....	۶۴
شکل ۵. اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر تحرک پیش‌رونده اسپرم طی زمان.....	۶۵
شکل ۶. اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر زنده‌مانی اسپرم طی زمان.....	۶۵
شکل ۷. اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر سلامت غشای پلاسمایی اسپرم طی زمان.....	۶۶
شکل ۸. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ.....	۶۶
شکل ۹. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ.....	۶۷
شکل ۱۰. مقایسه اثر سطوح مختلف مایع منی در شرایط نگهداری ۵ درجه سانتی‌گراد بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ.....	۶۷
شکل ۱۱. اثر سطوح مختلف مایع منی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی قوچ در طی زمان ذخیره‌سازی.....	۶۸
شکل ۱۲. اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر تحرک پیش‌رونده اسپرم اپیدیمی طی زمان.....	۶۸
شکل ۱۳. اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر زنده‌مانی اسپرم اپیدیمی طی زمان.....	۶۹
شکل ۱۴. اثر سطوح مختلف مایع منی و شوک سرمایی بر سلامت غشای پلاسمایی اسپرم اپیدیمی طی زمان.....	۶۹

بررسی اثر سطوح مختلف مایع منی در شوک سرما بر اسپرم پوشش دار شده با زرده تخم مرغ در قوچ تالشی  
رضارجبی توستانی

هدف از این پژوهش بررسی اثر سطوح مختلف مایع منی بر اسپرم پوشش دار شده با زرده تخم مرغ و اسپرم اپیدیدیمی در شرایط بدون شوک سرمایی و شوک سرمایی بود. نمونه‌های انزالی به وسیله مهبل مصنوعی از ۴ راس قوچ تالشی با میانگین وزن  $50 \pm 2/3$  کیلوگرم و سن ۳ تا ۵ سال جمع‌آوری شد. بعد از جمع‌آوری نمونه‌های انزالی، نمونه‌های پوشش دار شده جمع‌آوری شد. جهت تهیه نمونه‌های اپیدیدیمی بیضه‌های ۳ راس قوچ توسط عمل جراحی و بی‌حسی موضعی جدا و جهت استخراج اسپرم به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های پوشش دار شده و اپیدیدیمی پس از انتقال به آزمایشگاه و ارزیابی اولیه به صورت جداگانه تجمع و به ۳ بخش تقسیم شدند. سپس به هر بخش صفر، ۵۰ و ۱۰۰ درصد مایع منی افزوده شد. نمونه‌ها با رقیق کننده تریس-زرده تخم مرغ به گونه‌ای رقیق شدند که غلظت نهایی آنها  $600 \times 10^6$  اسپرم در هر میلی‌لیتر شود. درصد تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی (آزمایش تورم هایپواسموتیک) صفر، ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت پس از ذخیره‌سازی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ارزیابی شد. تیمار صفر درصد مایع منی در نمونه‌های انزالی و اپیدیدیمی نسبت به سایر تیمارها درصد تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی بالاتری داشت ( $P < 0/05$ ). در نمونه‌های انزالی درصد تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی و سلامت غشای پلاسمایی در تیمارهای با سطوح مشابه مایع منی تفاوت معنی‌داری را در شرایط شوک سرما و بدون شوک سرما نشان ندادند ( $P > 0/05$ ). همچنین در نمونه‌های اپیدیدیمی درصد تحرک پیش‌رونده و سلامت غشای پلاسمایی در تیمارهای با سطوح مشابه مایع منی تفاوت معنی‌داری را در شرایط شوک سرما و بدون شوک سرما نشان ندادند ( $P > 0/05$ ). بنابراین کاهش مجاورت مایع منی با اسپرم سبب بهبود کیفیت اسپرم می‌شود و عامل اصلی کاهش کیفیت اسپرم در زمان ذخیره‌سازی، زمان مجاورت مایع منی با اسپرم است و تغییرات درجه حرارت در درجه دوم اهمیت قرار دارد.

**واژه‌های کلیدی:** مایع منی، اسپرم پوشش دار شده، شوک سرمایی، قوچ تالشی

## Abstract

### Study of the effect of different levels of seminal plasma in cold shock on egg yolk coated spermatozoa in Taleshi ram

Reza Rajabi Toostani

The purpose of this study was the effect of different levels of seminal plasma on egg yolk coated sperm and epididymal sperm in with and without cold shock conditions. Ejaculated samples were collected with artificial vagina from 4 Taleshi rams with an average weight of  $50 \pm 2.3$  kg and 3 to 5 years old. After collecting of ejaculated samples, coated samples was collected. For preparation of epididymal samples testis of three rams was separated by local anesthesia and surgical method, for extraction were transferred to laboratory. Epididymal and coated samples were transferred and pooled separately in laboratory after initial evaluation and divided into 3 aliquots. After that was added 0, 50 and 100% seminal plasma to each part. Samples were diluted with Tris-egg yolk diluent, so the final concentration of each aliquot was  $600 \times 10^6$  sperm per milliliter. Progressive motility, viability and plasma membrane integrity percentages were evaluated after 0, 12, 24 and 36 hours preservation in 5 °C. 0% seminal plasma treatment had higher progressive motility, viability and plasma membrane integrity percentage rather than other treatments ( $P < 0.05$ ). In ejaculated samples progressive motility, viability and plasma membrane integrity in same levels of seminal plasma hasn't shown significant difference in cold shock and without cold shock conditions ( $P > 0.05$ ). Also in epididymal samples progressive motility and plasma membrane integrity in same levels of seminal plasma hasn't shown significant difference in cold shock and without cold shock conditions ( $P > 0.05$ ). In conclusion, reducing the vicinity of seminal plasma with sperm can improve sperm quality and vicinity time is main factor of reducing sperm quality during storage time and temperature changes are secondary.

**Key words:** Seminal plasma, Coated spermatozoa, Cold shock, Taleshi ram

# مقدمه

تحقیق درباره تلقیح مصنوعی در گوسفند از ابتدای قرن ۲۰ و با مطالعه بر روی رقیق کننده‌ها و تولیدمثل گوسفند آغاز و باعث توسعه استفاده از تلقیح مصنوعی در حیوانات مزرعه‌ای شد. امروزه روش‌های ذخیره‌سازی منی و تلقیح مصنوعی در دام‌های تولید کننده امکان تولید نتاج بیشتر از یک والد و باروری دام‌های ماده در زمان‌ها و مکان‌های مختلف را فراهم نموده است. علیرغم عدم موفقیت تلقیح مصنوعی با اسپرم ذخیره شده در گوسفند، نیاز به شناسایی روش مناسب ذخیره‌سازی اسپرم قوچ در برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفند به شدت احساس می‌شود. به همین منظور مطالعات زیادی بر رقیق‌سازی و سرد کردن اسپرم قوچ انجام گرفته ولی متأسفانه توفیق چندانی حاصل نشده است [Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. 2000].

مایع منی به‌عنوان محیط طبیعی جهت حرکت و تغذیه اسپرم‌ها در روند انتقال اسپرم به دستگاه تناسلی ماده در زمان جفت‌گیری واجد اهمیت است. مشخص شده است که مجاورت اسپرم با پروتئین‌های مایع منی در زمان انزال سبب خروج کلسترول از غشای اسپرم و کاهش نسبت کلسترول به فسفولیپید غشا می‌شود [Heise, A., et al. 2010]. از آنجائیکه بین حساسیت اسپرم به شوک سرما (سرد کردن ناگهانی) و نسبت کلسترول به فسفولیپید غشا ارتباط مستقیمی وجود دارد، بنابراین مایع منی بعنوان عامل مهم تاثیرگذار بر حساسیت اسپرم مطرح است [Varisli, O., et al. 2009]. دی‌پاو و همکاران (۲۰۰۳) برای اولین بار گزارش کردند پوشش دادن اسپرم با زرده تخم مرغ باعث عدم تماس مایع منی با غشا اسپرم شده و از خروج کلسترول از غشا جلوگیری می‌کند. محافظت اسپرم به وسیله کمپلکس لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین با پروتئین‌های مایع منی یک مکانیسم جدیدی برای محافظت اسپرم است.

سردسازی و انجماد باعث ایجاد آسیب در اسپرم می‌شود که نتیجه آن از هم‌گسیختگی لیپیدهای غشا، آسیب به میتوکندری و از بین رفتن سلامت غشای پلاسمایی و آکروزومی است [Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. 2000]. در واقع اسپرم طی مراحل سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی در معرض تغییرات دمایی قرار می‌گیرد که با ایجاد تنش‌های فیزیکی و شیمیایی باعث تغییر ترکیب لیپیدی غشای پلاسمایی می‌شود [Schiller, J., et al. 2000; Pérez-Pé, R., et al. 2002]. اگر منی رقیق نشود و اسپرم بطور مداوم در معرض غلظت بالای پروتئین‌های مایع منی قرار بگیرد و چربی به‌طور مداوم از غشا حذف شود نتیجه آن کاهش مقاومت اسپرم به شوک سرما و انجماد است و تغییر ساختار غشا که لازمه شروع ظرفیت‌پذیری است بوقوع می‌پیوندد.

از آنجائیکه تاکنون اثر سطوح مختلف مایع منی در شوک سرما بر اسپرم پوشش داده شده قوچ با زرده تخم‌مرغ مورد بررسی قرار نگرفته، بنابراین بررسی اثر مایع منی بر حساسیت اسپرم در استرس‌های ناشی از رقیق‌سازی و سرد کردن با بکارگیری روش پوشش‌دار کردن اسپرم با استفاده از بافر حاوی لیپوپروتئین‌های زرده تخم‌مرغ جهت حذف اثرات مایع منی بر اسپرم انزالی قوچ ضروری به نظر می‌رسد.

# فصل اول

## مروری بر منابع

### ۱-۱- خصوصیات و فواید مایع منی

مایع منی مخلوطی از ترشحات غدد ضمیمه جنسی (غدد وزیکول سمینال، غده پروستات که در قوچ از نوع منتشره است، غدد کوپر، آمپولا) و مجاری و ابران است. مایع منی به عنوان وسیله حمل اسپرم‌ها است که در خلال انزال آنها را از دستگاه تناسلی جابجا می‌کند. همچنین محیط بافری و محیط غنی غذایی را برای کمک به حیات اسپرم‌ها بعد از تخلیه شدن در دستگاه تناسلی حیوان ماده فراهم می‌کند [Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 1987].

مایع منی قوچ‌ها روشن یا کدر بوده و ممکن است به تناسب غلظت زیاد اسپرم‌های موجود در آن به رنگ سفید و کرم باشد. در صورتیکه مایع منی بزهای نر، غالباً ممکن است رنگ زرد داشته باشد که به احتمال زیاد ناشی از ریوفلاوین ترشح شده به وسیله غدد وزیکول سمینال است. ماده اصلی مایع منی هم در قوچ و هم در بز نر آب است (حدود ۷۵٪)، ولی دارای مواد آلی و معدنی متعددی بوده که حفاظت و نگهداری اسپرم‌ها را به عهده دارند. مایع منی، مایع خنثی و ایزوتونیک است [Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 1987].

اگرچه مایع منی دارای مقدار قابل ملاحظه‌ای یونهای سدیم، پتاسیم و کلراید است ولی فشار اسمزی منی برخلاف سایر مایعات بدنی بیشتر توسط مواد آلی تامین می‌شود. مواد آلی اصلی که در منی قوچ و بز نر وجود دارند عبارتند از فروکتوز، سوربیتول، اینوزیتول، اسیدسیتریک، گلیسیریل فسفریل کولین، فسفولیپیدها، پروستاگلاندین‌ها و پروتئین‌ها است. فروکتوز ماده قندی است که به آسانی قابل متابولیسم بوده و منبع اصلی انرژی را برای اسپرم‌های موجود در منی فراهم می‌کند. pH مایع منی به وسیله یک سیستم بافری مرکب<sup>۲</sup> نزدیک به ۷ نگهداری می‌شود. محیط بافری مایع منی، اسپرم‌ها را در مقابل تغییرات سریع pH که برای حیات آنها مضر است محافظت می‌نماید. پروستاگلاندین‌ها در مایع منی بعضی از گونه‌ها مشاهده شده، اما در منی قوچ‌ها و بزهای نر با غلظت زیادی (بیشتر از ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) وجود دارند. اینکه چرا پروستاگلاندین‌ها قادر به تحریک انقباضات شدید ماهیچه‌ای رحمی هستند، دلیل روشنی وجود ندارد، و مشخص شده که آنها می‌توانند به حمل و نقل اسپرم‌ها در دستگاه تناسلی حیوان ماده کمک نمایند [Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 1987].

- 
1. Ampulla
  2. Complex buffering system

### ۱-۱-۱- نقش مایع منی در ظرفیت پذیری اسپرم

روند ظرفیت پذیری اسپرم شامل فراگیری یک پوشش کربوهیدراتی است که گلیکو کالیکس<sup>۱</sup> را تشکیل می دهد. [Schroeter, S. et al. 1999]. اکثر کربوهیدرات هایی که به پروتئین ها متصل می شوند و ترکیبات گلیکو پروتئینی را تشکیل می دهند، به وسیله غدد ضمیمه جنسی و بافت های دیگر سیستم تولید مثلی جنس نر تولید می شوند. تشکیل گلیکو کالیکس برای حصول ظرفیت پذیری کامل و توانایی باروری اسپرم ضروری است [Schroeter, S. et al. 1999]. در انسان، غدد ضمیمه جنسی ۵- نوکلئوتیداز<sup>۲</sup> ترشح می کند که نوکلئوتیدها را به فسفات و نوکلئوتید هیدرولیز می کند و در طی زمان ظرفیت پذیری در تغییر سطح غشای اسپرم نقش دارد [Konrad, L., et al. 1998]. همچنین ظرفیت پذیری اسپرم انسان بوسیله آمیدهای تری پتید (مشابه با ساختار مولکولی هورمون آزاد کننده تیروتروپین<sup>۳</sup>) مایع منی افزایش می یابد [Khan, Z., et al. 1992].

در گاو و موش صحرایی القای ظرفیت پذیری اسپرم در مجرای تناسلی ماده به کمک پروتئین های باندشونده هپارین<sup>۴</sup> که به وسیله غدد ضمیمه جنسی ترشح می شوند، صورت می گیرد [Nass, S.J., et al. 1990; Sanz, L., et al. 1992]. از طرفی معتقدند پروتئین های باند شونده هپارین در مایع منی، خود را به سطح اسپرم (به ویژه به چربی هایی که حاوی گروه فسفریل کولین هستند) منتقل می کنند [Calvete, J.J., et al. 1997]. بنابراین گلايکوز آمینو گلیکان های شبه هپارین در جنس ماده به عنوان محرک ظرفیت پذیری اسپرم عمل می کنند [Nass, S.J., et al. 1990]. همچنین مایع منی گاو حاوی پروتئین های<sup>۵</sup> گوناگونی است که به فسفولیپیدهای غشای سلول اسپرم منتقل می شوند و باعث تنظیم تغییرات اسپرم در حین ظرفیت پذیری اسپرم می شوند [Desnoyers, L. and Manjunath, P. 1992; Therien, I., et al. 1995].

کلسیم در مایع منی منشا پروستاتی دارد و ترشح آن به وسیله پروتئین وابسته به هورمون پاراتیروئید پروستاتی<sup>۶</sup> تنظیم می شود [Iwamura, M., et al. 1994]. فسفولیپاز<sup>۲</sup> A<sub>2</sub> کشف شده در مایع منی گاو در حین انزال به سطح اسپرم منتقل می شود اما عملکرد آن هنوز نامشخص است، ممکن است نقشی در ظرفیت پذیری اسپرم داشته باشد [Ronkko, S., et al. 1991]. در خوک غدد ضمیمه جنسی، اسپرم ادهسین<sup>۷</sup> A<sub>WN</sub> را تولید می کنند که ماهیت آن پروتئینی است و به محض انزال به سطح اسپرم منتقل

1. Glycocalyx
2. 5'-nucleotidase
3. Thyrotropin releasing hormone
4. Heparin-binding proteins
6. Bovine seminal plasma protein
7. Prostatic parathyroid hormone-related protein
8. Spermadhesin A<sub>WN</sub>

می شود. اسپرم ادهسین ها باعث ظرفیت پذیری اسپرم و اتصال اسپرم به غشای زونا می شوند [Sanz, L., et al. 1992; Calvete, J.J., et al. 1993].  
[et al. 1993; Teixeira, D.I.A., et al. 2002]

### ۱-۱-۲- نقش مایع منی در تحرک اسپرم

در پستانداران، پروستات هورمون پیتیدی کلسی تونین را در مایع منی ترشح می کند [Davis, N.S., et al. 1989]. مقدار پایین کلسی تونین مایع منی در انسان با کاهش تحرک اسپرم رابطه دارد، اگر مقدار کلسی تونین افزایش یابد، میزان تحرک اسپرم افزایش می یابد [Mungan, N.A., et al. 2001]. همچنین افزایش تحرک اسپرم با غلظت گلوکوتایون (سیستین حاوی تری پتید) در مایع منی انسان رابطه دارد [Raijmakers, M.T.M., et al. 2003]. اگرچه عمدتاً کارنیتین در کبد و کلیه ها سنتز می شود، همچنین از اپیدیدیم نیز می تواند ترشح شود [Ruiz Pesini, E., et al. 2001]. در مجرای تناسلی نر، کارنیتین موجود در مایع منی تحرک اسپرم را افزایش می دهد [Costa, M., et al. 1994, Vitali, G., et al. 1995] و احتمالاً از طریق فعالیت های تنفسی این کار را انجام می دهد [Ruiz Pesini, E., et al. 2001].

کاهش pH مایع منی به زیر ۷/۵ به طور معنی داری تحرک اسپرم را کاهش می دهد [Bencic, DC., et al. 2000]. pH مایع منی به وسیله بی کربنات تولید شده توسط غدد جنسی، بالای ۷/۵ نگه داشته می شود. در حالیکه تنظیم سطوح بی کربنات مایع منی در اسب به وسیله فعالیت آنزیمی ایزوآنزیم های کربنیک آنهیدراز سیتوزولی نوع ۱، ۲ و ۳ که به وسیله غدد وزیکول سمینال، پروستات و کوپر ترشح می شود انجام می گیرد [Asari, M., et al. 1996].

پروستازوم ها<sup>۱</sup> در مایع منی وزیکول هایی هستند که به وسیله غده پروستات ترشح می شوند و حاوی کلسترول، اسفنگومیلین، کلسیم و آنزیم های مختلفی هستند [Kravets, F.G., et al. 2000]. پروستازوم ها تحرک اسپرم را تحت شرایط pH پایین بهبود می دهند [Arienti, G., et al. 1999] که این ممکن است بر روی نتیجه رقابت اسپرم در حالیکه pH در واژن اسیدی است اثرگذار باشد [Arienti, G., et al. 1999]. همچنین تحرک اسپرم می تواند به وسیله غلظت بالای پروتئین فیرونکتین در مایع منی کاهش یابد [Wennemuth, G., et al. 2001].

در گاو غدد وزیکول سمینال، کوپر و پروستات آنزیم های هیدرولیتیک، مانند گلیکوزیدازها، اگزوپتیدازها و فسفولیپازها را تولید می کنند که در مایع منی ترشح می شوند. عملکرد این آنزیم ها هضم پروتئین های مایع منی و پروتئین های سطح اسپرم است که نتیجه

---

1. Cytosolic carbonic anhydrase isoenzyme (CA-I, CA-II, and CA-III)  
2. Prostasome

آن تسهیل تحرک اسپرم است [Vanha-Pettula, T., et al. 1990]. همچنین ریلاکسین، کلسی تونین، کارنیتین، فیبرونکتین، آنژیوتنسن و اکسی توسین و گلوکاتایون ترشح شده از پروستات در مایع منی تحرک اسپرم را تسهیل می کنند [Davis, N.S., et al. 1989; Bani, D. 1997; Watson, E.D., et al. 1999; O'Mahony, O.A., et al. 2000; Mungan, N.A., et al. 2001; Ruiz 2003]. همچنین در گاو، پروتئین های اسیدی مایع منی تحرک اسپرم را افزایش می دهند [Schoeneck, C., et al. 1996]. در حالیکه در پرندگان، تحرک اسپرم به وسیله گلوکتامات موجود در مایع منی تسهیل می شود [Froman, D. 2003].

اندوتلین در مایع منی انسان ممکن است انتقال اسپرم را در مجرای تناسلی نرتسهیل کند و همچنین ممکن است به وسیله تحریک انقباض میومترיום باعث جابجایی اسپرم شود [Casey, M.L., et al. 1992]. پروتئین های تحریک کننده ماهیچه صاف دیگری مانند آنتی ژن ویژه پروستات<sup>۱</sup> هم ممکن است در انتقال اسپرم کمک کنند [Fichter, J., et al. 1996]. برادی کینین در مایع منی ممکن است در انتقال اسپرم به عنوان شل کننده عضلات صاف کمک کند [Charlesworth, M.C., et al. 1999].

### ۱-۱-۳- نقش مایع منی در محافظت اسپرم

اسپرم ها وقتی وارد مجرای تناسلی ماده می شوند سیستم ایمنی ماده آنها را به عنوان اجسام خارجی شناسایی می کند و آنها را از بین می برد [Birkhead, T.R., et al. 1993; Poiani, A. 2002]. فعالیت سلول های کشنده طبیعی به وسیله پروستاگلاندین های مایع منی می تواند سرکوب شود، در حالیکه تکثیر و ازدیاد لنفوسیتها می تواند به وسیله پلی آمین های اسپرمین<sup>۲</sup> و اسپرمیدین<sup>۳</sup>، پروتئین A پلاسمای وابسته به آبستنی<sup>۴</sup> و کمپکس های روی و پپتید-روی متوقف شود. مولکول های دیگر مایع منی که می توانند در سیستم تولید مثلی جنس ماده باعث کاهش سیستم ایمنی شوند شامل ترانس گلوکوتامیناز، پروتئین های، اپیتاها، ایمونو گلوبولین ها، ترانسفرین، لاکتوفرین، آلفا-۲-ماکرو گلوبولین، بتا-۲-ماکرو گلوبولین و آنتی ژن های اسپرم است [Alexander, N.J. and Anderson, D.J. 1987].

همچنین پروستازوم های مایع منی توانایی جلوگیری از ازدیاد لنفوسیتها را دارند [Kelly, R.W., et al. 1991]. مایع منی انسان حاوی کورتیکواستروئیدهای باند شونده به ترانس کورتین، بتا اندورفین و هورمون آدرنو کورتیکوتروپین است که روی سیستم ایمنی جنس ماده اثرات تنظیم کننده دارند [Brotherton, J. 1990]. در حالیکه اسید فسفاتاز در مایع منی از عملکرد ایمنی

1. Prostat specific antigen
2. Spermin
3. Spermidine
4. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPPA)

نوتروفیل‌ها و سلولهای کشنده طبیعی جلوگیری می‌کند [Mukhopadhyay, N.K., et al. 1989]. اینترلوکین‌ها (مانند IL-12, SIL-6R, 2R, SIL-6R) و فاکتور نکروزکننده تومور<sup>۱</sup> در مایع منی انسان کشف شده [Husset, F., et al. 1993; Huleihel, M., et al. 1999] که می‌توانند اسپرم را در مجرای تناسلی جنس ماده در مقابل سیستم ایمنی جنس ماده محافظت کند. همچنین، کاتکول آمین‌هایی مانند آدرنالین، نورآدرنالین، ۴و۳ دی هیدروکسی فیل آلانین<sup>۲</sup> و ۴و۳ دی هیدروکسی فیل استیک اسید<sup>۳</sup> که در مایع منی انسان به غلظت بالاتری نسبت به خون یافت می‌شوند در تنظیم فعالیت ایمنی مجرای تناسلی ماده نقش دارند [Bazar, K.A., et al. 2004].

اسپرم‌ها ممکن است در رحم به وسیله رادیکالهای آزاد اکسیژن دچار آسیب اکسیداتیو شوند [Chen, H., et al. 2002]. در مایع منی اسکوربات، اورات، آلومین، گلوکاتیون و تائورین عمل محافظتی در مقابل آسیب اکسیداتیو به اسپرم‌ها را دارند [Gavella, M., et al. 1996; Raijmakers, M.T.M., et al. 2003]. در مایع منی گاو، پروتئین‌های اسیدی می‌توانند اسپرم‌ها را از آسیب اکسیداتیو محافظت کنند [Einspanier, R., et al. 1994; Schoeneck, C., et al. 1996]. استروئیدهای مایع منی مانند دی‌هیدرواپی‌اندروسترون و بعضی از متابولیت‌های آن که ویژگی‌های آنتی اکسیداتیو دارند در مایع منی انسان شناسایی شدند [Hampl, R., et al. 2003]. همچنین مایع منی ماکیان حاوی مولکول‌های آنتی اکسیدانی مانند ویتامین C و E است [Breque, C., et al. 2003]. اسپرم‌ها ممکن است به وسیله گلیکو کالیکس تولید شده به وسیله ترشحات بیضه‌ها، مجاری و ابران، اپیدیدیم‌ها و غدد ضمیمه جنسی محافظت شوند [Schroeter, S., et al. 1999].

### ۱-۱-۴- نقش مایع منی در ذخیره‌سازی اسپرم

نقش مولکول‌های مایع منی در روند ذخیره‌سازی اسپرم در مهره‌داران کمتر شناخته شده است، اما ذخیره‌سازی اسپرم، با مکانیسم‌های کنترل تحرک اسپرم که قبلاً به آنها اشاره شد رابطه دارد [Froman, D., et al. 2003]. نشان داده شده است که حذف سریع مایع منی بعد از جمع‌آوری منی یکی از روش‌های موجود برای بهبود تحرک و توان باروری اسپرم یخ‌کشایی شده خوک است [Kawano, N., et al. 2004]. اکازاکی و همکاران نشان دادند که حذف مایع منی بلافاصله بعد از جمع‌آوری منی و اضافه کردن ۱۰ درصد مایع منی به اسپرم یخ‌کشایی شده راه مناسبی برای بازیابی توان باروری اسپرم در خوک است.

1. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)
2. 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)
3. 3,4-dihydroxy-phenyl acetic acid (DOPAC)

گزارش شده است که حذف سریع مایع منی در اسب برای محافظت اسپرم در برابر سرما ضروری است [Amann, R.P. and Pickett, B.W. 1987]. همچنین نشان داده شده است که مایع منی باروری اسپرم اپیدیدیمی تازه اسب را بهبود می بخشد اما باعث بهبود اسپرم اپیدیدیمی که قبل از انجماد در معرض مایع منی قرار گرفته باشد نمی شود [Heise, A., et al. 2006]. در حالیکه یخ‌گشایی اسپرم اسب در مایع منی باروری را بهبود می بخشد [Alghamdi, A.S., et al. 2005]. درصد تحرک بیشتری در اسپرم‌های منجمد شده انسان با ۵۰ تا ۷۵ درصد مایع منی در مقایسه با نمونه‌های ۰ تا ۲۵ درصد مایع منی بدست آمد [Ben, W.X., et al. 1997]. بطور مشابه درصد تحرک بیشتری در اسپرم‌های منجمد اسب در زمانیکه حاوی ۲۰ درصد مایع منی بودند در مقایسه با حذف مایع منی مشاهده شد [Katila, T., et al. 2002].

### ۱-۱-۵- واکنش آکروزومی

در پستانداران، واکنش آکروزومی در اسپرم‌هایی که با غشای زونا در تماس هستند رخ می دهد که نتیجه آن ترکیب آکروزوم با غشای اسپرم است، بنابراین باعث تماس گیرنده‌های باند شونده در اسپرم و تخمک می شود [Wassarman, P.A., et al. 2004]. در خوک اسپرم ادهسین AWN، به وسیله غدد ضمیمه جنسی تولید شده و در سطح اسپرم قرار می گیرد و باعث چسبیدن اسپرم به غشای زونا، می شود [Sanz, L., et al. 1992].

واکنش آکروزومی در گاو به وسیله پروتئین‌های مایع منی انجام می شود [Desnoyers, L. and Manjunath, P. 1992]. بعضی از پروتئین‌های مایع منی توانایی پیوند با کالمودولین را در حضور کلسیم دارند [Manjunath, P., et al. 1993]. کالمودولین‌ها در انتقال داخل سلولی کلسیم نقش مهمی دارند و در شروع واکنش آکروزومی نقش اصلی را بر عهده دارند. از آنجائیکه فسفولیپاز<sub>2</sub> در مایع منی گاو در هنگام انزال به سطح اسپرم پیوند می یابد ممکن است در واکنش آکروزومی نقش داشته باشد [Ronkko, S., et al. 1991].

### ۱-۲- اثرات نا مطلوب مایع منی

سه اثر نا مطلوب ترکیبات مایع منی عبارتند از:

۱- خود ایمنی: احتمالاً منجر به عدم باروری می شود. غدد ضمیمه جنسی مولکول‌های بسیاری را در مایع منی ترشح می کنند که سطح اسپرم را می پوشانند و می توانند به عنوان آنتی ژن توسط سیستم ایمنی جنس نر شناسایی شوند (مانند MHS-5 ترشح شده به وسیله وزیکول سمینال در انسان) [Flickinger, C.J., et al. 1990]. گلیکوپروتئین‌های مایع منی مانند اسپرم ادهسین‌ها (دیمر