بسم الله الرحمن الرحیم

**دانشگاه شهید چمران اهواز**
**دانشکده دامپزشکی**

۹۲۷۹۸۹۳

پایان‌نامه دکترای عمومی دامپزشکی

عنوان:

# تاثیر رقیق کننده عاری از سرمامحافظ حاوی کلسترول لود شده با بتاسیکلودکسترین بر شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی بز

استاد راهنما:

**دکتر فرید براتی**

استاد مشاور:

**دکتر محمدرضا تابنده**

نگارش:

**هدی کتانباف‌زاده**

**مهر ماه ۱۳۹۲**

**بسمه تعالی**

**دانشگاه شهید چمران اهواز**

دانشکده دامپزشکی

**(نتیجه ارزشیابی پایان نامه‌ی دکتری عمومی)**

پایان‌نامه‌ی خانم **هدی کتانباف‌زاده** دانشجوی رشته: **دامپزشکی** از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی: **۸۵۷۹۴۹** تحت عنوان: **تاثیر رقیق کننده عاری از سرمامحافظ حاوی کلسترول لود شده با بتاسیکلودکسترین بر شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی بز،** جهت اخذ مدرک: **دکتری عمومی دامپزشکی** در تاریخ: **۱۳۹۲/۷/۲۸** توسط هیأت محترم داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و با درجه: **ممتاز** به تصویب رسید.

| ۱ | **اعضای هیأت داوران** | **مرتبه علمی** | **سمت** | **امضا** |
|---|---|---|---|---|
| | دکتر فرید براتی | دانشیار | استاد راهنما | |
| | دکتر محمدرضا تابنده | استادیار | استاد مشاور | |
| | دکتر سعد گورانی‌نژاد | دانشیار | استاد داور | |
| | دکتر قدرت الله محمدی | استادیار | استاد داور | |
| | دکتر رضا آویزه | استاد | استاد ناظر | |
| ۲ | دکتر مهرزاد مصباح | دانشیار | مدیر گروه | |
| ۳ | دکتر بابک محمدیان | دانشیار | معاون پژوهشی دانشکده | |
| ۴ | دکتر مسعود قربانپور | استاد | مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه | |

# گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان‌نامه: **تاثیر رقیق کننده عاری از سرمامحافظ حاوی کلسترول لود شده با بتاسیکلودکسترین بر شیشه‌ای شدن اسپرم اپیدیدیمی بز**

اینجانب **هدی کتانباف‌زاده** دانشجوی **دکترای عمومی رشته‌ی دامپزشکی** دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران به شماره دانشجویی **۸۵۷۹۴۹** تحت راهنمایی **دکتر فرید براتی** و مشاوره **دکتر محمدرضا تابنده**، گواهی می‌دهم که:

۱- تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی شخص اینجانب بوده و صحت و اصالت تمام مطالب مندرج در آن را تایید می‌کنم.

۲- در صورت استفاده از آثار دیگران، مشخصات کامل آن‌ها را در منابع ذکر نموده‌ام.

۳- تاکنون مطالب درج شده در این پایان‌نامه، توسط اینجانب یا شخص دیگری به منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعد از این نیز نخواهد شد.

۴- در تدوین متن پایان نامه، شیوه‌نامه مصوب دانشکده را رعایت نموده‌ام.

۵- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و مقالات مستخرج از آن، ذیل نام دانشگاه شهید چمران اهواز (Shahid Chamran University of Ahvaz) به چاپ خواهد رسید.

۶- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان‌نامه تاثیرگذار بوده‌اند (اساتید راهنما و مشاور) در مقالات مستخرج از آن رعایت خواهد شد.

۷- در صورت استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آن‌ها، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مندرج در منشور موازین و اصول اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری رعایت شده است.

در صورت اثبات تخلف از مندرجات فوق، مسئولیت هر گونه پاسخگویی به اشخاص حقیقی و حقوقی و مراجع ذیصلاح بر عهده اینجانب بوده و دانشگاه شهید چمران هیچ مسئولیتی بر عهده نخواهد داشت. همچنین در صورت تضییع حقوق و منافع دانشگاه، حق پیگیری موضوع در مراجع ذیصلاح و اعمال قوانین مربوطه برای دانشگاه شهید چمران در حال و آینده محفوظ بوده و اینجانب مسئول پرداخت کلیه خسارات وارده خواهم بود.

هدی کتانباف‌زاده

۹۲/۷/۲۸

**مالکیت نتایج و حق نشر**

کلیه‌ی حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به غیر نیست. استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

سپاس **خداوندی** که به انسان آموخت آنچه را که نمی دانست. او که در سایه ی لطف و رحمتش تمام سختی ها به آسانی بدل شد. به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم.

"وقتی تو نیستی نه هست های ما چونانکه باید ندنه بایدها، هر روز بی تو روز مباداست" مرحوم قیصر امین پور

**این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به**

**پدر و مادر عزیزم** پر معناترین واژگان هستی آنان که هر لحظه نفس کشیدنم وام دار رنج ها، محبت ها، دلسوزی ها و حمایتهایشان می باشد. آنان که دعای خیرشان بدرقه راهم شد و راز و نیازشان رمز موفقیتم.

**همسر عزیزم** تکیه گاهم، که در کنارش به خدا نزدیکترم و با همراهی او عبور از این مسیر برایم میسر است.

**یگانه برادر و دو خواهرم** آنان که وجودشان شادی بخش و صفایشان مایه آرامش من است.

همواره سعادت روز افروزشان را از خداوند متعال خواهانم.

**پدر و مادر مهربان، همسرم** آنان که لطف و محبتشان باعث دلگرمی و دعای خیرشان بدرقه راهم بود.

و همه آنان که بی هیچ چشم داشتی در زندگی مرا یاری نموده اند.

## باسپاس فراوان از اساتید بزرگوار و ارجمندم

جناب آقای دکتر **فرید براتی** که با راهنمایی های ارزنده شان از هیچ کوششی در هدایت این مطالعه دریغ ننمودند.

همچنین جناب آقای دکتر **محمدرضا تابنده** که با مشاوره های ارزشمند خود مرا در این امر یاری نمودند.

و با تشکر از جناب آقای دکتر **سعد گورانی نژاد** و جناب آقای دکتر **قدرت الله محمدی** به پاس قبول زحمت داوری این پایان نامه و جناب آقای دکتر **رضا آویزه** که زحمت نظارت بر حسن اجرای این پایان نامه را تقبل نمودند.

و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند.

باشد که این، کم ترین بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

چکیده..... ۱
**فصل اول: مقدمه و هدف..... ۳**
**فصل دوم – مروری بر منابع..... ۷**
الف– اصول سرد کردن و انجماد..... ۸
ب– در معرض سرما محافظ قرار دادن سلول و بافت..... ۹
ب–۱– اسپرماتوزوآ..... ۹
ج– سرد کردن نمونه‌ها تا دماهای زیر صفر..... ۱۰
ج–۱– سرمامحافظ‌ها..... ۱۰
ج–۱–۱– انواع سرمامحافظ‌ها..... ۱۱
ج–۱–۲– مکمل‌های محلول سرمامحافظ..... ۱۳
ج–۱–۳– حجم سرمامحافظ..... ۱٤
د– سرعت سرد کردن..... ۱٤
هـ– تکنیک‌های مختلف انجماد..... ۱۷
هـ–۱– انجماد آهسته..... ۱۷
هـ–۲– انجماد سریع..... ۱۸
هـ–۳– شیشه‌ای شدن..... ۱۸
هـ–۳–۱– تکنیک‌های مختلف شیشه‌ای شدن اسپرم..... ۱۹
هـ–۳–۲– مزایا و معایب شیشه‌ای شدن..... ۲۰
و– نحوه‌ی بسته‌بندی..... ۲۱
ز– گرم شدن..... ۲۱
ح– صدمات القا شده در سلول در طی فرایند انجماد..... ۲۲
ط– تاریخچه‌ی شیشه‌ای شدن اسپرم..... ۲٤
ی– اثر کلسترول بر انجماد اسپرم..... ۲۵
ی–۱– اضافه کردن کلسترول به غشای سلول با استفاده از سیکلودکسترین..... ۲۷
ی–۲– سیکلودکسترین..... ۲۸

ی-۳- تاریخچه‌ی استفاده از کلسترول بارگذاری شده با سیکلودکسترین در انجماد اسپرم.....۲۸
**فصل سوم- مواد و روش کار.....۳۰**
الف- مواد و وسایل استفاده شده.....۳۱
الف-۱- مواد.....۳۱
الف-۲- وسایل.....۳۲
ب- آماده سازی محیط و محلول‌ها.....۳۲
ب-۱- محیط تریس به همراه BSA ۱٪.....۳۲
ب-۲- محلول PBS.....۳۳
ب-۳- محلول سوکروز.....۳۳
ب-٤- آماده‌سازی متیل‌بتاسیکلودکسترین.....۳۳
ج- نمونه‌گیری از حیوانات و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه.....۳٤
د- استخراج اسپرم اپیدیدیمی.....۳٤
هـ- آنالیز اسپرم قبل از انجام روش شناورسازی.....۳۵
هـ-۱- ارزیابی میکروسکوپی تحرک اولیه‌ی اسپرم.....۳۵
هـ-۲- تخمین درصد زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین.....۳۵
هـ-۳- بررسی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا.....۳٦
و- شناورسازی.....۳٦
ز- آنالیز اسپرم پس از انجام روش شناورسازی.....۳۷
ز-۱- محاسبه‌ی غلظت اسپرم به روش هموسیتومتری.....۳۷
ز-۲- ارزیابی میکروسکوپی تحرک اسپرم پس از شناورسازی.....۳۸
ز-۳- تخمین درصد زنده‌مانی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین نگروزین.....۳۸
ز-٤- بررسی ناهنجاری‌های مورفولوژیکی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا.....۳۸
ز-۵- بررسی درصد قطعه قطعه شدن DNA اسپرم.....۳۸
ح- طرح آزمایشی.....٤۰
ح-۱- آزمایش اول.....٤۰

ح-۱-۱- آماده‌سازی محیط و محلول‌ها قبل از فرایند شیشه‌ای شدن..... ٤٠
ح-۱-۲- اضافه کردن CLC و محلول سوکروز..... ٤٠
ح-۱-۳- فرایند شیشه‌ای شدن..... ٤١
ح-۱-٤- گرم شدن..... ٤٣
ح-۱-٤-۱- استراو..... ٤٣
ح-۱-٤-۲- ۹٦ ول ایمونو پلیت..... ٤٣
ح-۱-٥- آنالیز اسپرم پس از شیشه‌ای شدن..... ٤٣
ح-۲- آزمایش دوم..... ٤٤
ح-۲-۱- آماده‌سازی محیط و محلول‌ها قبل از فرایند شیشه‌ای شدن..... ٤٤
ح-۲-۲- تعیین غلظت‌ها، اضافه کردن CLC و محلول سوکروز..... ٤٤
ط- آنالیز آماری..... ٤٥
**فصل چهارم- نتایج..... ٤٦**
الف- آزمایش اول..... ٤٧
الف-۱- تحرک اسپرم..... ٤٧
الف-۱-۱- اثر کلسترول بر تحرک اسپرم..... ٤٨
الف-۱-۲- اثر سوکروز بر تحرک اسپرم..... ٤٨
الف-۱-۳- اثر محمل بر تحرک اسپرم..... ٤٩
الف-۱-٤- اثر تداخلی کلسترول، سوکروز و محمل بر تحرک اسپرم..... ٤٩
الف-۲- زنده‌مانی..... ٥٢
الف-۲-۱- اثر کلسترول بر زنده‌مانی اسپرم..... ٥٣
الف-۲-۲- اثر سوکروز بر زنده‌مانی اسپرم..... ٥٣
الف-۲-۳- اثر محمل بر زنده‌مانی اسپرم..... ٥٤
الف-۲-٤- اثر تداخلی کلسترول، سوکروز و محمل بر زنده‌مانی اسپرم..... ٥٤
الف-۳- ناهنجاری‌های سر اسپرم..... ٥٧
الف-٤- ناهنجاری‌های قسمت میانی اسپرم..... ٥٨

الف-۵- ناهنجاری‌های دم..... ۵۸
الف-۵-۱- اثر کلسترول بر ناهنجاری‌های دم اسپرم..... ۵۹
الف-۵-۲- اثر سوکروز بر ناهنجاری‌های دم اسپرم..... ۵۹
الف-۵-۳- اثر محمل بر ناهنجاری‌های دم اسپرم..... ٦۰
الف-۵-٤- اثر تداخلی کلسترول، سوکروز و محمل بر ناهنجاری‌های دم اسپرم..... ٦۰
الف-٦- قطره‌ی پروتوپلاسمی..... ٦۲
الف-٦-۱- اثر کلسترول بر قطره‌ی پروتوپلاسمی اسپرم..... ٦۲
الف-٦-۲- اثر سوکروز بر قطره‌ی پروتوپلاسمی اسپرم..... ٦۳
الف-٦-۳- اثر محمل بر قطره‌ی پروتوپلاسمی اسپرم..... ٦۳
الف-٦-٤- اثر تداخلی کلسترول، سوکروز و محمل بر قطره‌ی پروتوپلاسمی اسپرم..... ٦٤
الف-۷- قطعه قطعه شدن DNA..... ٦٦
الف-۷-۱- اثر کلسترول بر قطعه قطعه شدن DNA..... ٦۷
الف-۷-۲- اثر سوکروز بر قطعه قطعه شدن DNA..... ٦۸
الف-۷-۳- اثر محمل بر قطعه قطعه شدن DNA..... ٦۸
الف-۷-۷- اثر تداخلی کلسترول، سوکروز و محمل بر قطعه قطعه شدن DNA..... ٦۹
ب- آزمایش دوم..... ۷۰
ب-۱- تحرک اسپرم..... ۷۰
ب-۱-۱- اثرغلظت بر تحرک اسپرم..... ۷۱
ب-۱-۲- اثر محمل بر تحرک اسپرم..... ۷۲
ب-۱-۳- اثر تداخلی غلظت و محمل بر تحرک اسپرم..... ۷۲
ب-۲- زنده‌مانی اسپرم..... ۷۳
ب-۲-۱- اثر غلظت بر زنده‌مانی اسپرم..... ۷٤
ب-۲-۲- اثر محمل بر زنده‌مانی اسپرم..... ۷٤
ب-۲-۳- اثر تداخلی غلظت و محمل بر زنده‌مانی اسپرم..... ۷٤
ب-۳- ناهنجاری‌های سر..... ۷۵

ب-۳-۱- اثر غلظت اسپرم بر ناهنجاری‌های سر اسپرم..... ۷۶
ب-۳-۲- اثر محمل بر ناهنجاری‌های سر اسپرم..... ۷۶
ب-۳-۳- اثر تداخلی غلظت اسپرم و محمل بر ناهنجاری‌های سر اسپرم..... ۷۷
ب-٤- ناهنجاری‌های قسمت میانی..... ۷۸
ب-٤-۱- اثر غلظت بر ناهنجاری‌های قسمت میانی اسپرم..... ۷۸
ب-٤-۲- اثر محمل بر ناهنجاری‌های قسمت میانی اسپرم..... ۷۹
ب-٤-۳- اثر تداخلی غلظت اسپرم و محمل بر ناهنجاری‌های قسمت میانی اسپرم..... ۷۹
ب-۵- ناهنجاری‌های دم..... ۸۱
ب-۵-۱- اثر غلظت بر ناهنجاری‌های دم اسپرم..... ۸۱
ب-۵-۲- اثر محمل بر ناهنجاری‌های دم اسپرم..... ۸۲
ب-۵-۳- اثر تداخلی غلظت اسپرم و محمل بر ناهنجاری‌های دم اسپرم..... ۸۲
ب-٦- قطره‌های پروتوپلاسمی..... ۸۳
ب-٦-۱- اثر غلظت بر قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم..... ۸٤
ب-٦-۲- اثر محمل بر قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم..... ۸٤
ب-٦-۳- اثر تداخلی غلظت اسپرم و محمل بر قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم..... ۸٤
ب-۷- قطعه قطعه شدن DNA..... ۸۵
**فصل پنجم- بحث و نتیجه‌گیری..... ۸٦**
نتیجه‌گیری نهایی..... ۹٤
پیشنهادها..... ۹۵
منابع..... ۹٦
چکیده انگلیسی..... ۱۱۱

۲-۱: مثال‌هایی از انواع سرمامحافظ‌هایی که برای انجماد سلول به کار می‌روند (Critser و همکاران، ۱۹۹۷)..... ۱۱

٤-۱: اثر کلسترول، سوکروز و نوع محمل بر درصد تحرک اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ۵۱

٤-۲: اثر کلسترول، سوکروز و نوع محمل بر درصد زنده‌مانی اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ٥٦

٤-۳: اثر کلسترول، سوکروز و نوع محمل بر درصد ناهنجاری‌های دم در اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ٦١

٤-٤: اثر کلسترول، سوکروز و نوع محمل بر درصد قطره‌های پروتوپلاسمی اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ٦٦

٤-۵: اثر کلسترول، سوکروز و نوع محمل بر درصد قطعه قطعه شدن DNA در اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ۷۰

٤-٦: اثر غلظت‌های مختلف اسپرم و محمل بر درصد تحرک اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ۷۳

٤-۷: اثر غلظت‌های مختلف اسپرم و محمل بر درصد زنده‌مانی اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ۷۵

٤-۸: اثر غلظت‌های مختلف اسپرم و محمل بر درصد ناهنجاری‌های سر در اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ۷۷

٤-۹: اثر تداخلی غلظت‌های مختلف اسپرم و محمل بر درصد ناهنجاری‌های قسمت میانی اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ۸۰

٤-۱۰: اثر غلظت‌های مختلف اسپرم و محمل بر روی درصد ناهنجاری‌های دم در اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ۸۳

٤-۱۱: اثر غلظت‌های مختلف اسپرم و محمل بر روی درصد قطره‌های پروتوپلاسمی در اسپرم اپیدیدیمی بز در فرایند شیشه‌ای شدن (LSMean±S.E.M)..... ۸۵

# فصل اول

# مقدمه و هدف

## فصل اول- مقدمه و هدف

تلقیح مصنوعی به عنوان یک روش قابل قبول در انتقال سریع ژن‌های مفید در جمعیت-های مختلف دامی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Barbas و Mascarenhas، ۲۰۰۹). از ملزومات تلقیح مصنوعی تهیه‌ی بانک‌های اسپرم می‌باشد که همگی بر اساس روندهای انجماد اسپرم پایه گذاری شده‌اند (Bagchi و همکاران، ۲۰۰۸). در انسان این فناوری می‌تواند در موارد بیماران سرطانی تحت شیمی‌درمانی به عنوان راهکاری برای حفاظت از باروری مورد توجه قرار می‌گیرد (Sanger و همکاران، ۱۹۹۲؛ Di Santo و همکاران، ۲۰۱۱). در حیات وحش و گونه‌های در حال انقراض این فناوری می‌تواند به حفظ ذخایر ژنتیکی آن‌ها کمک نماید (James و همکاران، ۲۰۰۲).

انجماد اسپرم اپیدیدیمی، یکی از حوزه‌های مهم تکنولوژی‌های تولیدمثل است و اهمیت زیادی در تحقیقات تولیدمثل گونه‌های در خطر و وحشی دارد (James و همکاران، ۲۰۰۲). اسپرم ذخیره شده در دم اپیدیدیم معمولا دارای کیفیت مناسبی است و دارای سطوح بالایی از اسپرم بالغ می‌باشد و توانایی بارور کردن تخمک را دارد (Blash و همکاران، ۲۰۰۰؛ Friedemann و

همکاران، ۲۰۰۲). از سوی دیگر اسپرم اپیدیدیمی به عنوان یک منبع مناسب جهت تهیه‌ی جرم پلاسم و سلول‌های بنیادی مطرح است (An، ۲۰۰۰). اسپرم اپیدیدیمی گونه‌های مختلف دامی از جمله بز (حسین زاده، ۱۳۹۱)، گاومیش (Barati و همکاران، ۲۰۰۹)، اسب (Tiplady و همکاران، ۲۰۰۲) و انسان (Patrizio، ۲۰۰۰) با موفقیت منجمد شده است. در برنامه‌های معمول انجماد جهت محافظت از اسپرم می‌بایست از دستگاه‌های قابل برنامه‌ریزی استفاده نمود که هزینه‌های بالایی دارند (Isachenko و همکاران، ۲۰۱۱) و از طرف دیگر جهت حفاظت از غشای سلولی می‌بایست از سرمامحافظ‌های شیمیایی مانند گلیسرول و اتیلن‌گلیکول استفاده کرد که بسیار سمی هستند (Isachenko و همکاران، ۲۰۰۳) و یا از سرمامحافظ‌های با منشاء بیولوژیک استفاده کرد که خطر انتقال بیماری‌ها را دارند. برای حل مشکلات فوق استفاده از شیشه‌ای کردن هم ارزان قیمت‌تر و هم موثرتر از روش‌های معمول است. این روش با موفقیت در انجماد تخمک و جنین مورد استفاده قرار گرفته است(شایق،۱۳۸۹؛ Kasai و Edashige، ۲۰۰۷). اخیرا مطالعات انجام شده، نشان داده‌اند که اسپرم را نیز می‌توان با روش شیشه‌ای کردن منجمد نمود و بعلاوه حذف سرمامحافظ‌های معمول نیز تاثیر نامطلوبی بر روند شیشه‌ای سازی اسپرم نداشته است (Xianfeng و همکاران، ۲۰۰۷؛ Isachenko و همکاران، ۲۰۱۲).

فرایند انجماد منجر به تغییر در ساختار غشا می‌شود، بنابراین پروتئین و لیپیدهای وابسته به آن آسیب دیده و در نتیجه سبب از دست دادن نفوذپذیری انتخابی غشا و تغییر در سیالیت غشا می‌شود. همچنین در طی روند انجماد میزان کلسترول غشای سلول کاهش می‌یابد (Cormier و Bailey، ۲۰۰۳). از سوی دیگر مطالعات انجام شده نشان دهنده‌ی این است که در گونه‌هایی که نسبت کلسترول به فسفولیپید غشا بیشتر است (مانند انسان و خرگوش) نسبت به گونه‌هایی که

این نسبت کمتر است ( مانند نریان، گاو وقوچ) مقاومت بیشتری در برابر فرایند انجماد وجود دارد (Darin-Bennett و White، ۱۹۷۷؛ Watson، ۲۰۰۰). با توجه به این اطلاعات، غنی سازی غشای اسپرم با کلسترول قبل از انجماد ممکن است صدمات ایجاد شده در طی انجماد را کاهش دهد (Moore و همکاران، ۲۰۰۵). کلسترول در محلول‌های آبی غیر قابل حل است، اما می‌توان آن را با استفاده از سیکلودکسترین وارد غشای سلول کرد (Navratil و همکاران، ۲۰۰۳؛ Belmonte و همکاران، ۲۰۰۵).

هدف از مطالعه‌ی حاضر شیشه‌ای سازی اسپرم اپیدیدیمی بز و بررسی امکان حذف سرمامحافظ‌های نفوذ کننده و بررسی اثر استفاده از کلسترول بارگذاری شده با متیل‌بتا-سیکلودکسترین در محافظت از غشای سلول در برابر آسیب‌های ناشی از فرایند شیشه‌ای شدن می باشد.

هدی کتانباف‌زاده

مهر ماه ۱۳۹۲، اهواز

# فصل دوم

# مروری بر منابع

# فصل دوم- مروری بر منابع

## الف- اصول سرد کردن و انجماد

فرایند انجماد یک فرایند بیوشیمیایی و بیوفیزیکی است. انتقال سلول از دمای بدن به دمای ۱۹۶- درجه‌ی سانتی‌گراد نیازمند استفاده از ترکیباتی است که بتواند آب موجود در سلول را در زمان وارد شدن به دمای زیر صفر، از سلول خارج نماید. این ترکیبات که به طور عمده ترکیباتی ماکرومولکول می‌باشند، سرمامحافظ[1] نامیده می‌شوند. این فرایند دارای چند مرحله‌ی حساس است که عبور موفقیت‌آمیز از همه‌ی آن‌ها برای حیات سلول لازم است (Gao و همکاران، ۱۹۹۷؛ Leibo و songsasen، ۲۰۰۲؛ Mazur، ۱۹۶۵)

۱. قرار دادن سلول‌ها یا بافت‌ها در معرض سرمامحافظ

۲. سرد کردن نمونه تا دماهای زیر صفر

۳. ذخیره‌سازی در دمای زیر ۱۳۰-

٤. گرم کردن و ذوب شدن

1. Cryoprotectant agents (CPAs)

۵. سرانجام رقیق کردن و برداشتن سرمامحافظ‌ها قبل از انکوباسیون.

## ب- در معرض سرما محافظ قرار دادن سلول و بافت

پروتکل‌های زیادی برای انجماد سلول‌ها در بسیاری از بافت‌ها به کار برده شده است. تنوع در نوع سرمامحافظ، غلظت آن‌ها و همچنین اثرات متقابل سرعت سرد کردن و گرم کردن بر یکدیگر را، می‌توان تنظیم کرد. یک پروتکل جهانی، برای همه‌ی انواع سلول‌ها به دلیل تفاوت گونه‌ها و انواع مختلف سرمامحافظ غیر قابل اجرا است. دلایل آسیب و مرگ سلولی ناشی از انجماد کاملا شناخته شده نیست. سلول‌ها چندین تغییر را در طول مراحل انجماد در محیط متحمل می‌شوند: سلول با از دست دادن آب پاسخ اسمزی می‌دهد، آب به یخ تبدیل شده و محلول غلیظ‌تر می‌شود و می‌تواند رسوب کند.

### ب-۱- اسپرماتوزوآ

سرمامحافظ‌ها مواد شیمیایی با وزن مولکولی پایین و بسیار نفوذپذیرهستند که برای محافظت از اسپرم از آسیب انجماد به وسیله‌ی کریستال یخ استفاده می‌شوند. ٤ نوع سرمامحافظ شناخته شده‌ی اصلی وجود دارد: گلیسرول[1]، اتیلن‌گلیکول[2]، دی‌متیل‌سولفوکساید[3] و ۲،۱- پروپاندیول[4]. سرمامحافظ‌ها از طریق کاهش نقطه‌ی انجماد یک ماده، کاهش مقدار نمک و املاح موجود در فاز مایع نمونه و کاهش تشکیل یخ درون اسپرم عمل می‌کنند (Royere و همکاران، ۱۹۹٦). معمولا سرمامحافظ‌ها هم حجم با مایع منی به آن اضافه می‌شوند و سپس به آرامی در دمای محیط مخلوط شده و پس از آن به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار می‌گیرند تا تعادل مناسب بین سلول و محیط برقرار شود. گلیسرول نفوذپذیرترین سرمامحافظ

1. Glycerol
2. Ethyleneglycol
3. Dimethyl sulphoxide (DMSO)
4. 1,2-propanediol

است که به طور گسترده در انجماد اسپرم انسان استفاده می‌شود و سبب اثر بر روی ساختار غشا، نفوذپذیری و پایداری دو لایه‌ی لیپیدی غشا، ارتباط پروتئین‌های سطحی و متابولیسم سلولی می-شود. این عمل سبب نتیجه‌ی نامطلوب در غشا و ساختار آکروزوم می‌شود و منجر به انجماد اسپرم با کیفیت پایین می‌شود (Di Santo و همکاران، ۲۰۱۱). مطالعات شرمن نشان داد که استفاده از گلیسرول ممکن است باعث تغییرات چند از قبیل: حضور غشای مواج، تغییر در غشای داخلی آکروزوم و هسته‌ی غیر یکنواخت و نامنظم در تیغه‌های میتوکندری شود (شرمن، ۱۹۹۰). پس از این مشاهدات دیگر مواد محافظ مانندDMSO مطرح شدند که دارای اثرات مضر بر روی اسپرم انسان در زمان استفاده در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد هستند. ۲،۱-پروپاندیول به میزان کمی در انجماد اسپرم استفاده می شود (Di Santo و همکاران، ۲۰۱۱).

## ج- سرد کردن نمونه‌ها تا دماهای زیر صفر

### ج-۱- سرمامحافظ‌ها

در اواخر سده‌ی ۱۹٤۰، هنگامی که پلگ و همکارانش در دانشگاه کمبریج، ناخواسته، بطری‌های مواد شیمیایی را که برچسب اشتباهی زده شده بود به کار بردند، به طورتصادفی توانایی محافظتی گلیسرول را کشف کردند. با این کشف اتفاقی، آن‌ها توانستند از طریق سرد کردن، اسپرماتوزوای ماکیان و گاو را با موفقیت محافظت کنند (Polge و همکارانش، ۱۹٤۹). از زمان آن اکتشاف اولیه دریافتند که ترکیبات زیادی با وزن مولکولی بالا، سلول‌ها را در برابر آسیب انجماد حفظ می‌کنند. افزودنی‌های سرمامحافظ الاستیسیته‌ی غشای سلول را افزایش می‌دهند.