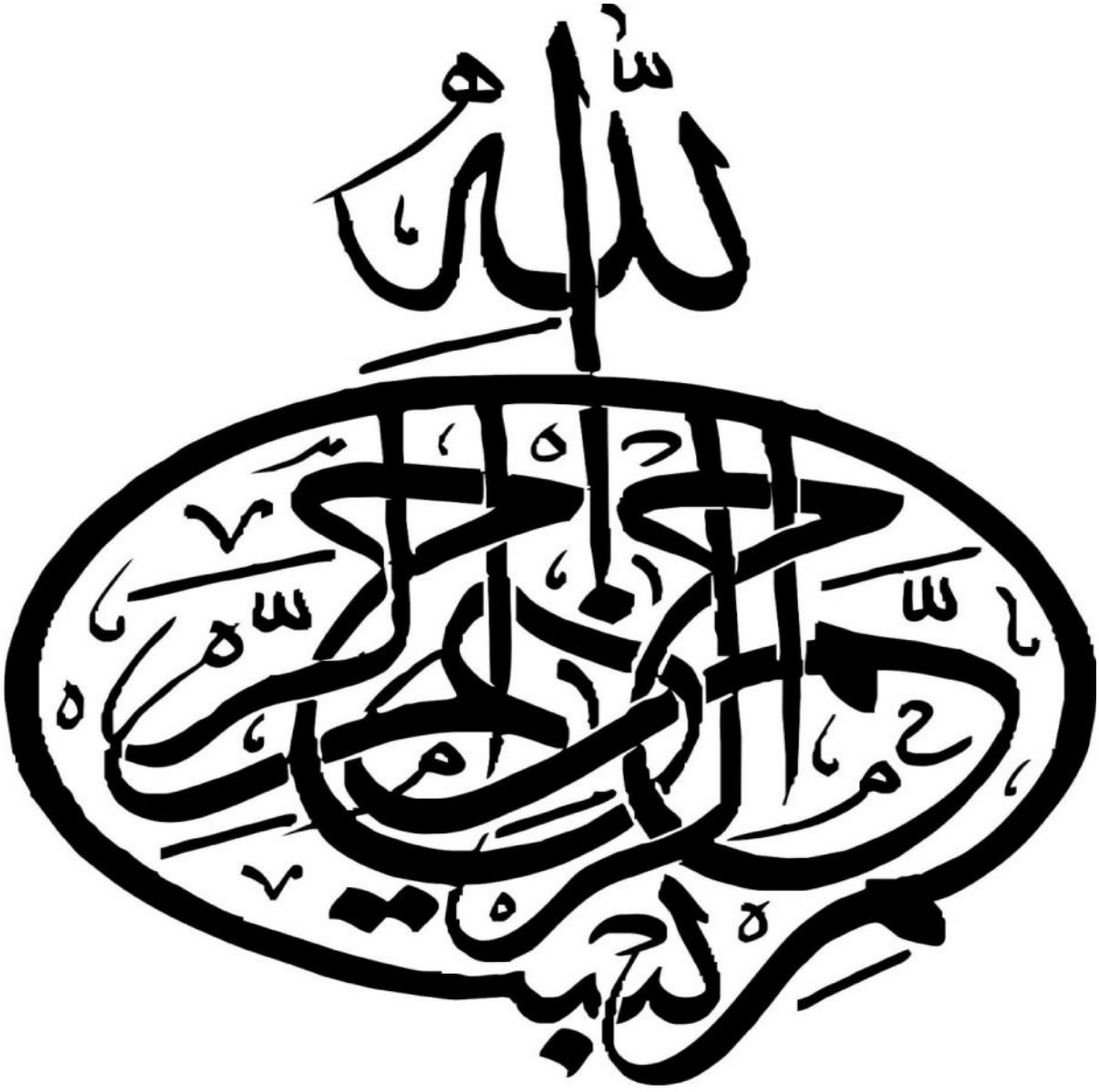


دانشکده علوم کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

اثر رقیق‌کننده، زرده تخم‌مرغ و سرما بر ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ تالشی در ۵°C

از:
آزاده محمدی

استادراهنما:
دکتر محمد روستایی علی‌مهر

بهمن ۱۳۹۱

دانشکده علوم کشاورزی
گروه علوم دامی
(فیزیولوژی دام)

عنوان:

اثر رقیق‌کننده، زرده تخم‌مرغ و سرما بر ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ تالشی در ۵°C

از:
آزاده محمدی

استادراهنما:
دکتر محمد روستایی علی‌مهر

استاد مشاور:
مهندس مختار مهدی‌زاده اسطلخ کوهی

بهمن ۱۳۹۱

تقدم بـ:

ماجد مهريون

و

خواهر عزيز

تقدیر و تشکر

ستایش خداوندی را سزاست که از اسرار نهان آگاه است و نشانه‌های آشکاری در سراسر جهان بر وجود او شهادت می‌دهند. هرگز برابر چشم بینندگان ظاهر نمی‌گردد. نه چشم کسی که او را ندیده می‌تواند انکارش کند و نه قلبی که او را شناخت می‌تواند مشاهده‌اش نماید. در والایی و برتری از همه پیشی گرفته. پس، از او برتر چیزی نیست، و آنچنان به مخلوقات نزدیك است که از او نزدیك‌تر چیزی نمی‌تواند باشد. مرتبه بلند او را از پدیده‌هایش دور نساخته، و نزدیکی او با پدیده‌ها او را مساوی چیزی قرار نداده است. عقل‌ها را بر حقیقت ذات خود آگاه نساخته اما از معرفت و شناسایی خود باز نداشته‌است. پس اوست که همه نشانه‌های هستی بر وجود او گواهی می‌دهند و دل‌های منکران را بر اقرار به وجودش واداشته‌است، خدایی که برتر از گفتار تشبیه‌کنندگان و پندار منکران است.

ستایش می‌کنم خداوند را برای تکمیل نعمت‌های او و تسلیم بودن در برابر بزرگی او و ایمن ماندن از نافرمانی او. و در رفع نیازها از او یاری می‌طلبم، زیرا آن کس را که خدا هدایت کند، هرگز گمراهنگردد، و آن را که خدا دشمن دارد هرگز نجات‌نیابد و هر آن کس را که خداوند بی‌نیاز گرداند نیازمند نخواهد شد.

خداوند بلند مرتبه سنجیده‌کار؛

خانواده‌ام را در پناه خود آرام بدار که طی مراحل اجرایی و تئوری این اثر حمایت‌های بی‌دریغشان آرامش بخش خاطر نگرانم بود و محبت خود را از آقای دکتر محمد روستایی که فرامینش در لحظه لحظه انجام پایان نامه راهنمای راه‌گشا بود دریغ نکن.

در انتها از تمام کسانی که به هر طریقی یاریم کردند بی‌نهایت متشکرم.

آزاده محمدی

بهمن۱۳۹۱

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

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

فصل اول- کلیات و مرور منابع

۱-۱-لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم.....۴
۱-۱-۱-فسفولیپیدها.....۴
۱-۱-۲- لیپیدهای خنثی.....۵
۱-۱-۳-گلیکولیپیدها.....۶
۱-۲-پراکسیداسیون لیپیدهای غشا پلاسمایی.....۸
۱-۲-۱-اثرات مخرب پراکسیداسیون لیپیدها بر عملکرد اسپرم.....۱۰
۱-۳-تاثیر شوک سرما بر غشا پلاسمایی اسپرم.....۱۱
۱-۳-۱-علت حساسیت به شوک سرما.....۱۲
۱-۴-ذخیره‌سازی اسپرم به صورت مایع.....۱۳
۱-۴-۱-ذخیره‌سازی در سرما.....۱۴
۱-۵-رقیق‌کننده‌های مورد استفاده برای ذخیره‌سازی.....۱۵
۱-۵-۱-رقیق‌کننده‌های بر پایه تریس.....۱۶
۱-۵-۲-رقیق‌کننده‌های بر پایه شیر.....۱۷
۱-۶-نقش زرده تخم‌مرغ در حفاظت از اسپرم طی ذخیره‌سازی.....۱۸
۱-۶-۱-مکانیسم جدید محافظت از اسپرم به وسیله LDL-EY و کازئین شیر.....۱۹

فصل دوم- مواد و روش‌ها

۲-۱-نمونه‌گیری.....۲۵
۲-۲-رقیق‌سازی، سردکردن، ذخیره‌سازی.....۲۵
۲-۳-ارزیابی اسپرم.....۲۷
۲-۴-تجزیه تحلیل آماری داده‌ها.....۲۹

فصل سوم- نتایج و بحث

۳-۱-تجزیه واریانس آنالیز ادغام شده.....۳۱
۳-۲-نتایج و بحث.....۳۵
۳-۳-نتیجه گیری کلی.....۳۹
۳-۴-پیشنهادات.....۴۳

منابع..... ۴۷
پیوست‌ها..... ۵۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱-واکنش کلاهکی..... ۶
شکل۱-۲-ظرفیت‌پذیری..... ۷
شکل۱-۳-تغییر فاز لیپیدهای غشای پلاسمایی طی کاهش دما..... ۱۱
شکل۱-۴-نقش LDL-EY و کازئین شیر در حفاظت از اسپرم..... ۲۳
شکل۲-۱-رقیق و ذخیره‌سازی اسپرم..... ۲۶
شکل۲-۲-بررسی سلامت غشای پلاسمایی..... ۲۷
شکل۲-۳-بررسی سلامت غشا کلاهک..... ۲۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱-۱-اثر رقیق‌کننده‌ها، زرده تخم‌مرغ، سرما و زمان بر تحرک پیش‌رونده اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۳۱
جدول۳-۱-۲- اثر رقیق‌کننده‌ها، زرده تخم‌مرغ، سرما و زمان بر سلامت غشا پلاسمایی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۳۲
جدول۳-۱-۳- اثر رقیق‌کننده‌ها، زرده تخم‌مرغ، سرما و زمان بر زنده‌مانی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ..... ۳۳
جدول۳-۱-۴- اثر رقیق‌کننده‌ها، زرده تخم‌مرغ، سرما و زمان بر سلامت غشا کلاهک اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۳۴
جدول۳-۲-۱- اثر متقابل رقیق‌کننده‌ها وزرده تخم‌مرغ بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا کلاهک اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۳۵
جدول۳-۲-۲-اثر متقابل زرده تخم‌مرغ و سرما بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا کلاهکی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۳۹
جدول۳-۲-۳-اثر متقابل رقیق‌کننده‌ها و سرما بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا کلاهکی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۴۱
جدول۳-۲-۴- اثر متقابل رقیق‌کننده و زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده، زنده‌مانی، سلامت غشا پلاسمایی و کلاهکی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۴۲
جدول ۳-۲-۵- اثر روش کاهش دما بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا کلاهک اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۴۲
جدول ۳-۲-۶- اثر زمان ذخیره‌سازی بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی و سلامت غشا کلاهک اسپرم پوشش‌دارشده قوچ.....۴۴

اثر رقیق‌کننده، زرده تخم‌مرغ و سرما بر ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ تالشی در ۵°C

چکیده

به منظور تعیین اثر رقیق‌کننده‌های تریس و شیر پس‌چرخ، زرده تخم‌مرغ و روش سردکردن بر اسپرم پوشش‌دارشده دو آزمایش انجام شد. در آزمایش اول از رقیق‌کننده تریس و در آزمایش دوم از رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ جهت رقیق کردن نمونه‌ها استفاده شد. در هر دو آزمایش منی از سه راس قوچ با استفاده از واژن مصنوعی متصل به لوله حاوی تریس- فروکتوز- ۱۵٪ زرده تخم‌مرغ جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تجمیع، سانتریفیوژ و مایع رویی حذف شد. رسوب رقیق شد و به دو بخش و هر بخش به پنج قسمت مساوی تقسیم شد و به هر قسمت صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ اضافه شد. نیمی از تیمارها به صورت تدریجی سرد شد و نیم دیگر در معرض شوک سرما قرار گرفت سپس نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دما ۵°C ذخیره شد. تحرک پیش‌رونده اسپرم، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی (هوخست بیس بنزامید ۳۳۲۵۸) و واکنش کلاهکی (آلکسافلور-۴۸۸) در ساعت صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ بررسی شد. نتایج نشان داد اثر متقابل رقیق‌کننده و زرده تخم‌مرغ بر تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی و کلاهکی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). در حضور ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ تحرک پیش‌رونده اسپرم پوشش‌دارشده و سلامت غشا کلاهک در رقیق‌کننده تریس (۵۹/۷۵۰±۲/۰۰۴، ۷۳/۱۰۰±۱/۱۳۸، $P<۰/۰۵$) بیشتر از رقیق-کننده شیر پس‌چرخ (۴۹/۷۵۰±۲/۰۰۴، ۶۹/۷۲۵±۱/۱۳۸، $P<۰/۰۵$) بود. در حضور ۱۰٪ زرده تخم‌مرغ سلامت غشا پلاسمایی اسپرم در رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ (۷۳/۳۷۵±۱/۳۹۱، $P<۰/۰۵$) بیشتر از رقیق‌کننده تریس (۶۴/۸۰۰±۱/۳۹۱، $P<۰/۰۵$) بود. بنابراین جهت ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ در دما ۵°C استفاده از ۲۰٪ زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده تریس پیشنهاد می‌شود.

کلید واژه: پوشش‌دارکردن، شیر پس‌چرخ، تریس، شوک سرما

مقدمه

ذخیره‌سازی منی حیوانات خانگی و حفظ بلند مدت باروری آن مستلزم کاهش متابولیسم اسپرم از طریق کاهش دما است [Maxwell and Stojanov, 1996]. کاهش دما منجر به بروز تغییرات برگشت‌ناپذیر در اسپرم اکثر پستانداران بخصوص قوچ می‌شود [Quinn et al., 1980]. وجود مقادیر کم کلسترول در غشای پلاسمایی اسپرم قوچ علت حساسیت زیاد آن در برابر خسارت‌های ناشی از کاهش دما است [Darin-Bennett and White, 1977]. مایع منی حاوی گروهی از پروتئین‌ها است که طی انزال به کولین فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم متصل می‌شوند و خروج کلسترول و فسفولیپید را از غشا تحریک می‌کنند [Manjunath et al., 1987]. در نتیجه سبب افزایش حساسیت اسپرم به خسارت‌های ناشی از کاهش دما طی ذخیره‌سازی خواهند شد [Manjunath and The´rien, 2002]. پوشش‌دارکردن اسپرم با رقیق‌کننده حاوی زرده تخم‌مرغ روش مناسبی جهت جداسازی سریع مایع منی است. در این روش مدت زمان مواجهه اسپرم و مایع منی از طریق جمع‌آوری اسپرم در لوله حاوی رقیق‌کننده تریس – زرده تخم‌مرغ به حداقل می‌رسد [De pauw et al., 2003].

کاهش دما و شوک سرما طی ذخیره‌سازی از طریق اعمال تغییرات فیزیکی و بیوشیمایی توانایی باروری اسپرم را کاهش می‌دهد [Holt and North, 1986]. روش‌های مختلفی جهت کاهش خسارت‌های ناشی از شوک سرما طی ذخیره سازی پیشنهاد شده است. کنترل سرعت سرد شدن و استفاده از زرده تخم‌مرغ از جمله ابزار مقابله با آسیب‌های شوک سرما هستند. به همین دلیل زرده تخم‌مرغ به عنوان ترکیب اصلی جهت تهیه رقیق‌کننده‌های منی مطرح بود [Jones and Martin, 1973].

ذخیره‌سازی منی نیازمند استفاده از رقیق‌کننده‌ای است که از اسپرم در برابر تغییرات اجتناب ناپذیر ناشی از ذخیره-سازی محافظت کند [Gill et al., 2011]. رقیق‌کننده‌هایی مانند تریس- فروکتوز، گلوکز- سیترات و ... همچنین رقیق‌کننده-هایی مانند شیر پس‌چرخ جهت ذخیره‌سازی اسپرم انزالی قوچ در حالت مایع مورد بررسی قرارگرفته‌اند [Maxwell and Salamon, 1993]. تریس سبب حفظ بهتر کیفیت منی ذخیره‌شده در آزمایشگاه می‌شود [Paulenz et al., 2002] در مقابل نرخ باروری منی ذخیره‌شده در شیر پس‌چرخ بیشتر است [Maxwell and Salamon, 1993; Paulenz et al., 2003].

اثر مقادیر مختلف زرده تخم‌مرغ در رقیق‌کننده تریس و شیر پس‌چرخ بر اسپرم پوشش‌دارشده قوچ طی ذخیره‌سازی در سرما مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین هدف از این تحقیق تعیین بهترین رقیق‌کننده و غلظت زرده تخم‌مرغ جهت ذخیره‌سازی اسپرم پوشش‌دارشده قوچ در ۵°C است.

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱- لیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم

لیپیدها مهمترین ترکیبات تاثیرگذار بر سیالیت غشای پلاسمایی اسپرم هستند و در ادغام اسپرم و اووسیت به عنوان حد واسط دخالت دارند [Stubbs and Smith, 1984]. اسپرم بالغ دارای مجموعه‌ای از ارگانل‌های مهم جهت سنتز (مانند شبکه آندوپلاسمی و دستگاه گلژی) و تجزیه (مانند لیزوزوم‌ها و پراکسی‌زوم‌ها) لیپید است. ترکیبات لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم گونه‌های مختلف پستانداران شناسایی شده است. هرچند تنوع قابل توجهی بین گونه‌های مختلف وجود دارد در کل غشای پلاسمایی شامل ۷۰٪ فسفولیپید، ۲۵٪ لیپید خنثی و ۵٪ گلیکولیپید است [Flesch and Gadella, 2000].

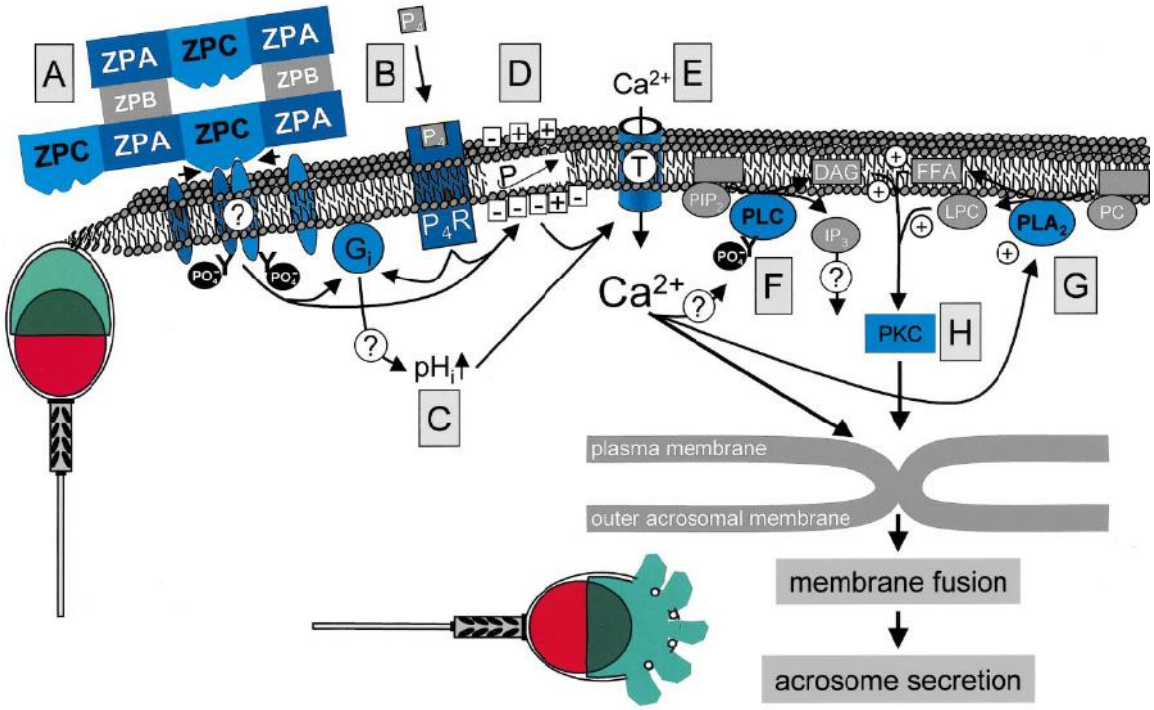
۱-۱-۱- فسفولیپیدها

به انواع فسفوگلیسرولیپیدها[1] و اسفینگومیلین[2] تقسیم می‌شوند. بیشترین لیپیدهای غشای پلاسمایی هستند. مهمترین فسفولیپیدها عبارتند از فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانول آمین [Lenzi et al., 1996]. توزیع نامتقارن فسفولیپیدها در غشای پلاسمایی اسپرم قوچ به اثبات رسیده است بر این اساس آمینوفسفولیپیدها بیشتر در لایه داخلی غشا و کولین فسفولیپیدها بیشتر در لایه خارجی غشا جای گرفته‌اند. وجود آمینوفسفولیپیدها در غشای پلاسمایی نشان دهنده حرکت فسفولیپیدها در لایه‌های غشای پلاسمایی و تفکیک متقاطع آن‌ها طی فرایند ترکیب در زمان باروری است [Muller et al.,1994]. بررسی الگوی اسید چرب فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی اسپرم انسان وجود مقادیر قابل توجهی از اسیدهای چرب غیر اشباع را ثابت کرد. سه گروه از اسیدهای چرب غیر اشباع بر اساس اولین پیوند دو گانه نسبت به انتهای آمین یعنی n=۳ ، n=۶ ، n=۹ در غشای پلاسمایی اسپرم دسته‌بندی شده‌اند. آلفالینولئیک اسید (C18:3 *n*-3)، لینولئیک اسید (C18:2 *n*-6) و اولئیک اسید (C18:1 *n*-9) منشا اسیدهای چرب گروه‌های مختلف هستند. اسیدهای چرب زنجیر بلند غیر اشباع فسفولیپیدهای غشای پلاسمایی از متابولیسم لینولئیک (C18:2 *n*-6) و آلفالینولئیک اسید (C18:3 *n*-3) مشتق می‌شوند. اسیدهای چرب غیر اشباع با سیالیت و انعطاف‌پذیری غشا در ارتباط هستند [Meizel and Turner, 1983; Israelachvili et al., 1980]. بعلاوه اسیدهای چرب غیر اشباع پیش ماده پروستاگلاندین فاکتور اساسی جهت تحرک اسپرم هستند. مشخص شده که پروستاگلاندین E و ۱۹- هیدروکسی پروستاگلاندین E با تحرک اسپرم در ارتباط هستند. اسپرم پستانداران بخصوص انسان دارای مقادیر زیادی از دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) است. این اسید چرب غیر اشباع در تنظیم سیالیت غشا و اسپرماتوژنزیس [Haidl and Opper, 1997; Hall et al., 1991; Ollero et al., 2000] حائز اهمیت است.

[1] Phosphoglycerolipids
[2] Sphingomielin

۱-۱-۲- لیپیدهای خنثی

ترکیب لیپیدهای خنثی غشای پلاسمایی گونه‌های مختلف پستانداران، حیوانات و حتی انزال‌های مختلف بسیار متنوع است. این فاکتور متغیر مهم مقدار کلسترول غشا پلاسمایی اسپرم است. اسپرم انسان حاوی مقادیر قابل توجه (۴۰mol به ازای کل لیپیدها) و اسپرم خوک و قوچ دارای مقادیر بسیار کم (mol ۲۲ به ازای کل لیپیدها) کلسترول است. کلسترول به عنوان مهمترین تنظیم‌کننده سیالیت و نفوذپذیری غشای پلاسمایی شناخته شده است. به نظر می‌رسد مقدار این استرول با طول ظرفیت‌پذیری در ارتباط است [Flesch and Gadella, 2000]. درحقیقت ثابت شده است که کلسترول طی ظرفیت‌پذیری (شکل ۱-۲) از غشاپلاسمایی اسپرم حذف می‌شود. خروج کلسترول طی ظرفیت‌پذیری باعث ورود مقادیر زیادی از کلسیم به داخل سلول خواهدشد. افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی نقشی اساسی در بروز واکنش کلاهکی (شکل ۱-۱) دارد [Zaneveld et al., 1991]. واکنش کلاهکی به اسپرم کمک می‌کند تا به زونا پلوسیدا نفوذکرده با غشای اووسیت ترکیب شود. زونا به دو رسپتور در غشای پلاسمایی اسپرم متصل می‌شود: رسپتور متصل به G تحریکی که فسفولیپاز Cβ1 را فعال می‌کند و رسپتور تیروزین کیناز متصل به فسفولیپاز Cγ. اتصال به رسپتور، آدینلات سیکلاز را فعال کرده منجر به افزایش غلظت cAMP و فعالیت پروتئین کیناز می‌شود. پروتئین کیناز کانال وابسته به ولتاژ کلسیم را در غشای داخلی کلاهک فعال می‌کند. این کانال کلسیم را از داخل کلاهک به سیتوزول آزادمی‌کند. افزایش نسبی کلسیم در ابتدا منجر به فعال سازی فسفولیپاز Cγ می‌شود [Sanocka and Kurpisz, 2004]. دی آسیل گلیسرول و اینوزیتول تری فسفات محصولات هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول بیس فسفات توسط فسفولیپاز C منجر به انتقال پروتئین کیناز به غشای پلاسمایی و آغاز فعالیت آن می‌شود. پروتئین کیناز کانال وابسته به ولتاژ کلسیم را بازکرده باعث افزایش دوباره غلظت کلسیم می‌شود. G تحریکی و پروتئین کیناز همچنین می‌توانند جایگزین کننده Na^+/H^+ را فعال کنند و سیتوزول را قلیایی نمایند. پروتئین کیناز همچنین فسفولیپاز A_2 را فعال کرده منجر به تولید اسید آراشیدونیک از فسفولیپیدهای غشا می‌شود [Sanocka and Kurpisz, 2004]. اسید آراشیدونیک به وسیله آنزیم‌های سیکلواکسیژناز و لیپوکسیژناز به پروستاگلاندین و لوکوترین تبدیل می‌شود. افزایش غلظت کلسیم و pH منجر به ترکیب غشا و اگزوسیتوز کلاهک می‌شود [Breitbart and Spungin, 1997]. علاوه بر کلسترول مقادیر ناچیزی از دسمواسترول، کلسترول سولفات و کلستریل استر نیز در اسپرم پستانداران یافت می‌شود [Ben-Shackar et al., 1992].



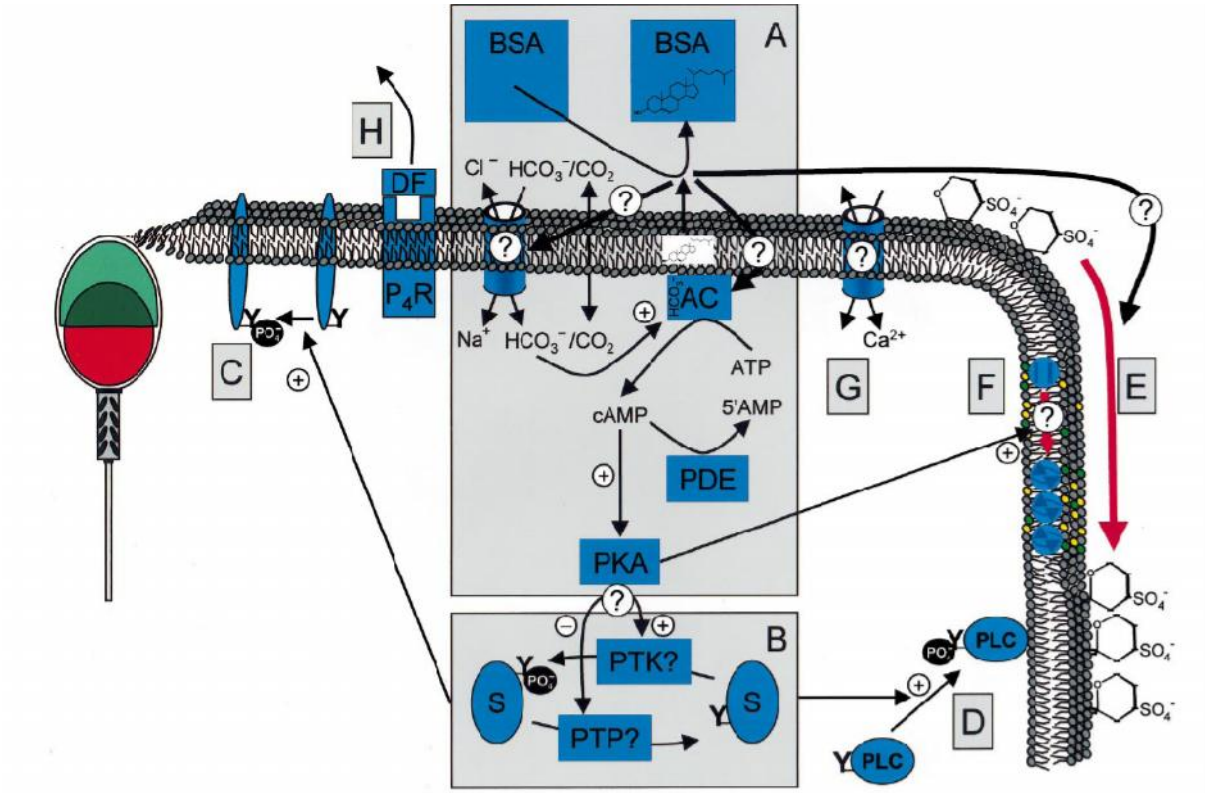
شکل۱-۱- واکنش کلاهکی: (A) پروتئین‌های ZP (بخصوص ZPC) به رسپتورهای ZP سطح اسپرم متصل می‌شوند و اگریگیشن و فسفریلاسیون تیروزین (Y) را القا می‌کنند. (B) محیط اطراف ZP حاوی سطوح بالایی از پروژسترون است که می‌توانند به رسپتورهای غیر ژنومی (P_4R) سطح اسپرم متصل شوند. ZP و پروژسترون بر سلول اسپرم اثر دوگانه دارند. (C) سطح pH داخل سلولی از طریق پروتئین‌های G افزایش می‌یابد و (D) پتانسیل غشا پلاسمایی دپلاریزه می‌شود. (E) قلیایی شدن داخل سلول اسپرم و دپلاریزه شدن غشا منجر به انتقال کلسیم از طریق کانال‌های وابسته به ولتاژ نوع T می‌شوند. (F) سطح بالای کلسیم داخل سلولی PLC را فعال می‌کند که طی ظرفیت پذیری به سمت غشا پلاسمایی منتقل شده است. PLC سبب تبدیل PIP2 به DAG و IP3 می‌شود. (G) افزایش سطح کلسیم PLA_2 را فعال می‌کند که PC را به LPC و اسیدهای چرب فرار (FFA) تجزیه می‌کند. (H) نقش IP_3 مشخص نیست. اما DAG، FFA و LPC سبب فعال شدن PKC می‌شوند. افزایش سطح کلسیم و فعال شدن PKC جهت ترکیب غشا پلاسمایی ب لایه داخلی کلاهک ضروری است و در نهایت منجر به ترشح آنزیم‌های کلاهکی می‌شود [Flesch and Gadella, 2000].

۱-۱-۳- گلیکولیپیدها

درحالت طبیعی از افزودن یک گروه گلیکوزیدیک به سر آمید شکل می‌گیرد. تنها استثناء در مهره‌داران است که در اسپرم و سلول‌های شوان یافت می‌شود [Vos et al., 1994]. حدود ۶۸٪ از سمینولیپیدها ساختار ۱-O-هیدروکسیل، ۲-O-هگزادکانویل، ۳-۳′ –سولفوگالاکتوزیل گلیسرول[1] دارند. جز سمینولیپیدها مقادیر ناچیزی از دیگر گلیکولیپیدها در غشا پلاسمایی اسپرم یافت می‌شود [Gadella et al., 1992]. پس از انزال سمینولیپیدها تحت تاثیر آریل‌سولفاتازهایی که از غدد ضمیمه ترشح می‌شوند دسولفاته خواهندشد [Gadella et al., 1993]. اعتقاد بر این است که سمینولیپیدها و نوع دسولفاته آن‌ها در مرحله خاصی از باروری دخالت دارند. سولفوگالاکتوزیل گلیسرولیپید [Weerachatyanukul et al., 2001] به

[1] 1-O-hexadecyl, 2-O hexadecanoyl, 3-3′-sulfogalactosyl glycerol

همراه لیزو فسفاتیدیل کولین [Riffo et al., 1997] توانایی باروری اسپرم را تحریک، تغییر در ترکیب زونا پلوسیدا را القا و در اوولما ترکیب اسپرم و تخمک را امکان پذیر می‌کنند.



شکل۱-۲-ظرفیت پذیری در اسپرم پستانداران: A)بیکربنات از طریق کانال یونی یا انتشار به عنوان دی‌اکسیدکربن وارد سلول می‌شود. بیکربنات داخل سلولی با آدنیلات سیکلازترکیب می‌شود و همزمان با تولیدcAMP، پروتئین کینازA (PKA) را فعال می‌کند. نقش خروج کلسترول در فعال کردن پروتئین کینازA مشخص نیست. احتمالا جریان کلسترول منجر به افزایش ورود بی‌کربنات می‌شود یا آدنیلات سیکلاز را تحت تاثیر قرار می‌دهد. پروتئین کیناز A، فسفریلاسیون تیروزین (Y) سوبستراهای مختلف (S) را از طریق فعال کردن پروتئین تیروزین کیناز(PTK) یا ممانعت از پروتئین تیروزین فسفاتاز(PTP) القا می‌کند. (c) پروتئین کینازA فعال شده توسط بی‌کربنات تیروزین فسفریلاسیون پروتئین‌های متصل شونده به زونا پلوسیدا اسپرم و سایر پروتئین‌های غشا را انجام می‌دهد. (D) فسفولیپاز C سیتوزولیک از مسیر پروتئین کینازA-بیکربنات تیروزین فسفریله می‌شود. فسفولیپازCتیروزین فسفریله به غشاپلاسمایی نقل مکان می‌کند. (E) فعالیت PKA تغییرات غشاپلاسمایی مانند بازآرایی جانبی سمینولیپید و نقل مکان آمینوفسفولیپیدها را القا می‌کند. (F) آمینوفسفولیپیدها به وسیله فعالیت وابسته به PKA یک اسکرامبلاز منتقل می‌شود. به احتمال زیاد جریان کلسترول نیز در این انتقال دخالت می‌کنند. (G) ورود مقادیر اندکی از کلسیم به سلول اسپرم احتمالا نقش مهمی در ظرفیت پذیری دارد. (H) فاکتورهای دکپسیته کننده از سطح سلول اسپرم حذف می‌شوند و پوشش رسپتورهایی مانند رسپتور پروژسترون برداشته می‌شود [Flesch and Gadella, 2000].

در کل لیپیدهای موجود در غشا پلاسمایی اسپرم در تنظیم بلوغ، اسپرماتوژنزیس، ظرفیت‌پذیری، واکنش کلاهکی و بخصوص در ترکیب غشا طی باروری دخالت دارند [Zeron et al., 2002]. از زمان جمع‌آوری منی تا تلقیح آن به دستگاه تناسلی ماده اسپرم در معرض انواع مختلفی از عوامل مضر محیطی قرار می‌گیرد. استفاده از اسپرم در برنامه‌های لقاح داخل

آزمایشگاهی[1] (IVF) و یاجمع آوری و آماده سازی اسپرم برای تلقیح مصنوعی حیوانات خانگی آن‌ها را درمعرض استرس اکسیداتیو و خسارت‌های ناشی از کاهش دما قرار می‌دهد. تولید ترکیبات فعال اکسیژن[2] ROS، از طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشا پلاسمایی و کاهش دما از طریق القای تغییرات فیزیکی و بیوشیمیایی در نتیجه تخریب غشا منجر به کاهش تحرک و سلامت ژنومی اسپرم خواهند شد [Bilodeau et al., 2001].

۱-۲- پراکسیداسیون لیپیدهای غشای پلاسمایی

اسپرم سلول توانمندی است که می‌تواند در شرایط سخت خارج از محیط بدن تا مدتی هرچند کوتاه به حیات خود ادامه دهد [de Lamirande and Gagnon, 1995a]. اکسیژن برای حمایت از حیات ضروری است اما متابولیت‌های آن عملکرد اسپرم را تغییر می‌دهند و یا می‌توانند حیات سلول را تهدیدکنند. ترکیبات فعال اکسیژن (ROS) عناصر اکسیدکننده بسیار فعالی هستند که در دسته رادیکال‌های آزاد طبقه‌بندی می‌شود. رادیکال آزاد ترکیبی با یک یا تعداد بیشتری تک الکترون[3] است. آنیون سوپر اکسید ($O^{\bullet -2}$)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2، محصول دیسموتاسیون خودبه خودی یا آنزیمی $O^{\bullet -2}$)، رادیکال‌های پراکسیل (ROO^{-}) و رادیکال بسیار فعال هیدروکسیل (•OH، ناشی از واکنشی که آهن آن را کاتالیز می‌کند شامل H_2O_2 یا $O^{\bullet -2}$ و H_2O_2) جزء متداول‌ترین ترکیبات فعال اکسیژن هستند [de Lamirande and Gagnon, 1995a] که مشخص شده عملکرد اسپرم را تحت تاثیر قرارمی‌دهند [Aitken and Clarkson, 1987; Alvarez et al., 1987; de Lamirande and Gagnon, 1995b]. ترکیبات فعال اکسیژن با فسفولیپیدهای غشاپلاسمایی واکنش می‌دهند و سبب تولید پراکسید اسیدهای چرب [Jones et al., 1979] و محصولات دیگری مانند هیدروکسی آلکنیل‌ها [Windsor et al., 1993] و مالون‌آلدهید [Jones et al., 1979; Alvarez et al., 1987] می‌شوند که همچنین دارای اثرات مضر بر تحرک و توانایی باروری اسپرم هستند. درواقع همه ترکیبات سلولی (لیپیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و قندها) به صورت بالقوه می‌توانند هدفی برای ترکیبات فعال اکسیژن باشند [de Lamirande and Gagnon, 1995a]. گستردگی تغییرات القا شده به وسیله ترکیبات فعال اکسیژن تنها به ماهیت و مقدار این ترکیبات وابسته نسیت [Alvarez and Storey, 1989; de Lamirande and Gagnon, 1992; Aitken et al.,1993] بلکه زمان و استمرار مواجهه با این ترکیبات [de Lamirande and Gagnon, 1992] و فاکتورهای خارج سلولی مانند دما و ترکیب محلول مورد استفاده برای ذخیره‌سازی (غلظت یون‌های مختلف، حذف کننده‌های اکسیژن و ترکیبات فعال اکسیژن) نیز دخالت دارد [Alvarez and Storey, 1983]. ترکیبات فعال اکسیژن مولکول‌هایی کوچک، نفوذپذیر و اختصاصی هستند که پاسخ‌های یونی، متابولیکی و سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهند

[1] In vitro fertilization
[2] Reactive Oxigen Species
[3] Unpaired electrons

و شواهدی وجوددارد که ثابت می‌کند این ترکیبات در غلظت‌های پایین به عنوان مولکول‌های انتقال پیام عمل می‌کنند [Schreck et al., 1991; Fialkow et al., 1994].

اسپرم و مایع منی جهت خنثی یا تنظیم‌کردن اثر این ترکیبات دارای سیستم‌های حذف‌کننده شامل سیستم‌های آنزیمی سوپراکسید دسموتاز [Alvarez et al., 1987; Nissen and Kreysel, 1983]، کاتالاز [Jeulin et al., 1989]، گلوتاتیون پراکسیداز/ردوکتاز [Alvarez and Storey, 1989] همچنین انواع مختلفی از پیش‌ماده‌هایی با فعالیت شبیه به سوپراکسید دسموتاز یا کاتالاز [Zini et al., 1993]، مانند آلبومین [de Lamirande and Gagnon, 1995a; Alvarez and Storey, 1983]، گلوتاتیون [de Lamirande and Gagnon, 1995a]، پیرووات [de Lamirande and Gagnon, 1995a; de Lamirande and Gagnon,1992]، تورین و هایپوتورین [Alvarez and Storey, 1983]، ویتامین E [Chow, 1991]، ویتامینC [Dawson et al., 1992] است. اهمیت حذف کننده‌های ترکیبات فعال اکسیژن بخصوص سوپراکسید دسموتاز به وسیله همبستگی مثبت بین غلظت سوپراکسید دسموتاز در اسپرم و درصد و مدت زمان تحرک اسپرم در منی فاش می‌شود [Alvarez et al, 1987].

حضور ترکیبات فعال اکسیژن در منی بازتابی است از عدم تعادل بین تولید این ترکیبات به وسیله عناصر سلولی و متابولیسم ROS، به عبارت دیگر افزایش تولید ترکیبات فعال اکسیژن توسط سلول در مقابل کاهش ظرفیت حذف این ترکیبات [Zini et al., 1993]. ترکیبات فعال تولید شده به وسیله اسپرم غیرطبیعی تحرک اسپرم‌های طبیعی موجود در محیط را تحت تاثیر قرارنمی‌دهد [Plante et al., 1994]. این وضعیت می‌تواند ناشی از این حقیقت باشد که در حالت طبیعی غلظت‌های پایین این ترکیبات توسط اسپرم تولیدمی‌شوند و تنها یک سوم از آن‌ها به خارج از سلول آزادمی‌شوند [Plante et al, 1994]. ترکیبات فعال اکسیژن می‌توانند به وسیله اجزای مختلف منی مانند اسپرم غیرمتحرک یا اسپرم غیرطبیعی از نظر مورفولوژی و عملکرد همچنین لکوسیت‌ها [Aitken and Clarkson, 1988; Iwasaki and Gagnon, 1992; Plante et al., 1994] تولید شوند. از طرف دیگر مایع منی و اسپرم متحرک تحت شرایط طبیعی مقادیر پاتولوژیک ترکیبات فعال اکسیژن را تولیدنمی‌کنند [Iwasaki and Gagnon, 1992]. غلظت ترکیبات فعال اکسیژن طی آماده‌سازی منی تحت تاثیر عواملی مانند استمرار وجود مایع منی و روش‌های شستن اسپرم تغییر می‌یابد. آماده‌سازی اسپرم به وسیله ترکیبی از مراحل سانتریفیوژ و رقیق‌سازی مجدد سبب القای تولید ترکیبات فعال اکسیژن می‌شود [Aitken and Clarkson, 1988; Iwasaki and Gagnon, 1992; Alvarez et al., 1993]. منشا ترکیبات فعال اکسیژن تولید شده توسط اسپرم حیوانات نابارور و یا اسپرم قرارگرفته در معرض سانتریفیوژ مشخص نیست. اگرچه دخالت دو سیستم تولید کننده ROS محتمل است: ۱) NADPH اکسیداز در سطح غشا پلاسمایی اسپرم [Aitken et al., 1992] و دیافوراز (اکسیداسیون و احیا وابسته به NADH میتوکندریایی، [Gavella and Lipovac, 1992]). اولین اثر ترکیبات فعال اکسیژن پراکسیداسیون

لیپیدهای غشا پلاسمایی است [Rao et al., 1989]. پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع غشای اسپرم یک واکنش شیمیایی خود به خودی است که می‌تواند با کاهش یکپارچگی و عملکرد غشا منجر به اختلال در عملکرد سلول شود. مرحله اول پراکسیداسیون که راه اندازی[1] نامیده می‌شود شامل جداسازی اتم‌های هیدروژن از اسیدهای چرب غیر اشباع است. مرحله دوم، تکثیر، شامل تشکیل رادیکال آلکیل لیپید[2] است. این رادیکال‌ها به سرعت با اکسیژن واکنش‌داده رادیکال پراکسیل لیپید[3] را تولید می‌کنند. رادیکال پراکسیل قادر به جداسازی اتم هیدروژن از اسیدهای چرب غیر اشباع به همراه تشکیل هیدروپراکسید لیپید و رادیکال لیپید است. از آنجایی که رادیکال‌های آلکیل و پراکسیل مجددا ساخته می‌شوند سیکل تکثیر به صورت نامحدود و یا تا زمانی که پیش ماده در محیط وجود داشته باشد و یا واکنش رادیکال-رادیکال به پایان رسد ادامه می یابد [Sanocka and Kurpisz, 2004].

۱-۲-۱- اثرات مخرب پراکسیداسیون لیپیدها بر عملکرد اسپرم

پراکسیداسیون لیپید در غشاهای سلولی باعث بروز اختلال در عملکرد غشا، کاهش سیالیت، غیر فعال شدن رسپتورها و آنزیم‌های متصل به غشا و افزایش نفوذپذیری به یون‌ها خواهدشد. مقادیر پاتولوژیک ROS که توسط نوتروفیل‌ها و یا اسپرم تولید می‌شود می‌تواند منجر به ناباروری شود [de Lamirande and Gagnon, 1995a]. غلظت‌های بالای هیدروژن پراکسید باعث القای پراکسیداسیون لیپید و مرگ سلول خواهدشد. افزایش محصولات ROS در اسپرم با کاهش پتانسیل غشای میتوکندری همراه است. ارتباط مثبتی بین افزایش خسارت‌های اسپرم به وسیله ROS و سطوح بالای سیتوکروم C، کسپاز ۹ و ۳ وجوددارد که منجر به بروز مرگ برنامه‌ریزی شده و ناباروری جنس نر می‌شود. تولید اضافه رادیکال‌های آزاد باعث بروز اختلال در اسپرمیوژنزیس و آزادسازی اسپرم غیرطبیعی با سیتوپلاسم اضافه از اپتلیوم ژرمینال می‌شود. سیتوپلاسم اضافه دارای آنزیم‌هایی است که تولید ROS را توسط سیستم اکسیداسیون و احیا غشای پلاسمایی اسپرم تحریک می‌کنند و منجر به بروز استرس‌های اکسیداتیو مانند کاهش تحرک و پتانسیل باروری و تخریب DNA در هسته اسپرم می‌شود. هیدروژن پراکسید با توجه به زمان و دز تغییر مخرب غشای پلاسمایی و هموستازی داخل سلولی را به همراه‌داشته مستقیما بر عملکرد سلول بخصوص باروری اثر می‌گذارد [Oehninger et al., 1995]. اثرات فرعی استرس اکسیداتیو بر پارمترهای حرکتی اسپرم به صورت معنی‌داری با جابجا شدن فسفاتیدیل سرین در غشای پلاسمایی اسپرم در ارتباط است [Kemal Duru et al., 2000].

[1] Initiation
[2] lipid alkyl radical
[3] lipid peroxyl radical