بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم کشاورزی
گروه علوم دامی
(فیزیولوژی دام)

عنوان:

اثر سطوح آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی کیفیت اسپرم قوچ در طول ذخیره‌سازی در ۵ درجه سانتی‌گراد

از:
پری روستا

استاد راهنما:
دکتر اردشیر محیط

استادان مشاور:
دکتر محمد روستائی علی‌مهر
مهندس فریدون طالبی

شهریور ۹۲

تقدیم به:

معلمان ، استادان و **معماران** باورهایم.

تقدیم به:

خطوط مبهم پیشانی **پدر** فداکارم،
غزل ناب هستی‌ام، استوارترین کوه تاریخ بودنم،
به رسم بوسه‌ای بر دستان با صفایش.

تقدیم به:

شانه‌های بی دریغ **مادر** مهربانم، آن شکیبه بی ادعا،
زیباترین حکایت زندگی‌ام،
به شوق طنین روح انگیز دعای خیرش.

تقدیم به:

پهناوران اقلیم عشق،
برادر و **خواهران** مهربانم که در عین عطوفت و آسمانی بودن،
والاترین پشتوانه زندگی‌ام هستند

نگارش این اثر فرصتی را فراهم آورد تا از تمامی آموزگاران ونقش آفرینان صحنه زندگیم یاد کرده و مراتب سپاس و قدر دانی خود را به ایشان اعلام دارم اما پیش از همه باید آفریدگار یکتایی را سپاس گویم که موهبت هستی و مجال اندیشیدن را به من ارزانی فرمود و من همواره او را شاکر و ساجدم.

واجب است همراهان همیشگی وپشتیبانان خستگی ناپذیرم پدر و مادر عزیزم که وجودم را از ایشان به ودیعت دارم سپاس بگذارم که همدلی هایشان توان مضاعفی به من بخشید .

از تلاش ها ورهنمود های ارزنده وسازنده استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر اردشیر محیط که در طول انجام تحقیق همیشه یار ویاور بنده بوده و همواره از تجارب ایشان بعنوان گره گشای مشکلات بهره مند بوده ام ، کمال تشکر وقدر دانی را دارم ازدکتر محمد روستایی علی رغم مشغله کاری زیاد ، هیچ سوالی از جانب بنده را بی پاسخ نگذاشته اند، از صمیم قلب سپاسگذاری میکنم و .از همکاری و مساعدت های فراوان مشاور محترم آقای مهندس فریدون طالبی که در فراهم سازی امکانات لازم جهت انجام آزمایشات تلاش بسیار کرده اند صمیمانه تشکر میکنم .

با امتنان از اساتید بزرگوار و داوران محترم جناب آقای دکتر محمدی و دکتر حسین زاده که زحمت باز خوانی این پایان نامه را بر عهده داشتند از صمیم قلب تشکر مینمایم.

در نهایت از دوستان عزیزم که در انجام این تحقیق مرا به هر نحوی یاری رساندند. کمال تشکر وقدر دانی دارم و برای آنها آرزوی سلامتی و توفیق روز افزون دارم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی ..... ج
چکیده انگلیسی ..... چ
مقدمه ۲

فصل اول -کلیات و مرور منابع

۱-۱-دستگاه تولید مثلی قوچ ۵
۱-۱-۱-لوله‌های اسپرم ساز ۵
۱-۱-۱-سلو ل‌های بینابینی ۵
۱-۲-وظایف بیضه‌ها. ۵
۱-۲-۱-تولید سلو ل‌های جنسی نر(اسپرماتوزوآ). ۵
۱-۲-۲-ترشحات هورمونی. ۵
۱-۳-چگونگی و مراحل ساخته شدن و تولید اسپرماتوزوآ ۶
۱-۴-شکل شناسی اسپرماتوزوآ ۶
۱-۵-فیزیولوژی تولید مایع منی ۶
۱-۶-متابولیسم اسپرم ۷
۱-۶-۱-متابولیسم فروکتوز و سوربیتول ۸
۱-۶-۲-متابولیسم گلیسرول وگلیسرل فسفریل کولین ۹
۱-۶-۳-متابولیسم فسفولیپیدها ۹
۱-۶-۴-رابطه بین متابولیسم، تحرک و باروری ۹
۱-۷-عوامل موثر برزنده مانی اسپرم در خارج از بدن حیوان ۹
۱-۷-۱-دما ۹
۱-۷-۲-فشاراسمزی ۱۰
۱-۸-روش‌های نگهداری مایع منی ۱۰
۱-۸-۱-ذخیره به حالت جامد ۱۰
۱-۸-۲-ذخیره بصورت مایع ۱۱
۱-۹-سیستم ارزیا ۱۱
۱-۱۰-ویزگی های کیفی اسپرم ۱۳
۱-۱۰-۱-تحرک اسپرم ۱۳
۱-۱۰-۲-غشا پلاسمایی اسپرم ۱۴
۱-۱۰-۳-زنده مانی ۱۴
۱-۱۱ - رقیق‌کننده‌های منی ۱۴
۱-۱۲-آلاینده‌های مایع منی و اثرات آنها ۱۶
۱-۱۳-استرس اکسیداتیو. ۱۹
۱-۱۳-۱-تأثیرROS بر تحرک اسپرم ۲۰
۱-۱۳-۲-آسیب DNA بوسیله ROS ۲۰
۱-۱۳-۳-پراکسیداسیون لیپیدی (LPO) ۲۰
۱-۱۴-آپوپتوز اسپرم ۲۱

۱-۱۵-آنتی‌بیوتیک‌ها.....۲۲
۱-۱۶-تاریخچه ۲۳
۱-۱۷-گروه‌های آنتی‌بیوتیکی.....۲۳
۱-۱۸-مکانیسم عمل آنتی‌بیوتیک‌ها.....۲۴
۱-۱۸-۱-آنتی‌بیوتیک‌هایی که جلوگیری از سنتز دیواره‌ی سلولی می‌کنند.....۲۴
۱-۱۸-۲-آنتی‌بیوتیک‌هایی که از وظایف غشای سلولی ممانعت به عمل می‌آورد.....۲۴
۱-۱۸-۳-آنتی‌بیوتیک‌هایی که از سنتز پروتئین‌ها جلوگیری می‌کنند عبارتند ۲۴
۱-۱۸-۴-آنتی‌بیوتیک‌هایی که از سنتز اسیدهای نوکلئیک جلوگیری می‌کنند. ۲۴
۱-۱۹-مقاومت بر علیه آنتی‌بیوتیک‌ها ۲۵
۱-۱۹-۱-غیر فعال شدن داروی آنتی‌بیوتیک.. .....۲۵
۱-۱۹-۲-تغییر نفوذپذیری داروی آنتی‌بیوتیک.. .....۲۵
۱-۱۹-۳-تغییر جایگاه.....۲۵

فصل دوم -مواد و روشها

۲-۱-محل انجام پژوهش ۲۸
۲-۲-حیوانات مورد استفاده در این پژوهش.....۲۸
۲-۳-آماده سازی رقیق‌کننده برپایه تریس(هیدروکسی متیل-آمینومتان). ۲۸
۲-۴-روش تهیه رقیق‌کننده شیر پس چرخ.. .....۲۹
۲-۵-روش های آماده سازی رنگ ائوزین‌نگروزین ۲۹
۲-۶-روش آماده سازی محلول هیپواسموتیک... .....۳۰
۲-۷ مراحل جمع آوری مایع منی و ذخیره کردن... .....۳۰
۲-۷-۱-آماده سازی مهبل مصنوعی.....۳۰
۲-۷-۲-نمونه گیری. ۳۰
۲-۷-۳-ارزیابی اولیه منی.... .....۳۱
۲-۷-۴-ذخیره سازی.. .....۳۱
۲-۸-ارزیابی نمونه‌ها بعد از ذخیره سازی. ۳۲
۲-۸-۱-بررسی تحرک. ۳۲
۲-۸-۲-سلامت غشاء اسپرم توسط تست هیپواسموتیک.. .....۳۳
۲-۸-۳-زنده‌مانی اسپرم... .....۳۳
۲-۹-طرح آزمایشی تجزیه وتحلیل داده ها ۳۴

فصل سوم -نتایج و بحث

۳-۱- اثرات مستقل آنتی‌بیوتیک‌ها بر صفات کیفی اسپرم.۳۶ .....۳۶
۳-۲- اثرات مستقل رقیق کننده‌ها بر صفات کیفی اسپرم.....۴۲ .....۴۲
۳-۳- اثرات متقابل آنتی‌بیوتیک‌ها بر صفات کیفی اسپرم..... .....۴۲
۳-۴-نتیجه گیری کلی ۴۸
۳-۵-پیشنهادها.... .....۴۹
منابع..... .....۵۰

فهرست جدول ها

جدول۱-۱-مقایسه ترکیبات منی درگونه های مختلف..... ۸
جدول ۱-۲- قابلیت های سیستم CASA..... ۱۳
جدول ۲-۱- رقیق‌کننده تریس بر اساس ۱۰۰ میلی لیتر..... ۲۹
جدول۲-۲-رقیق کننده skim milk براساس ۱۰۰ میلی لیتر..... ۲۹
جدول۲-۳ -ترکیبات محلول رنگی رنگ ائوزین نگروزین..... ۳۰
جدول۳-۱- مقایسه سطوح آنتی‌بیوتیک‌ها و بلوک‌ها برتحرک کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده‌مانی اسپرم در زمان صفر ذخیره سازی(LSMean± SE) .....۳۹..... ۳۹
جدول۳-۲- مقایسه سطوح آنتی‌بیوتیک‌ها و بلوک ها برتحرک کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده مانی اسپرم در زمان ۲۴ ذخیره سازی (LSMean± SE) ۳۹
جدول۳-۳- مقایسه سطوح آنتی‌بیوتیک‌ها و بلوک‌ها برتحرک کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده مانی اسپرم در زمان۴۸ ذخیره سازی(LSMean± SE) ۴۰
جدول۳-۴- مقایسه سطوح آنتی بیوتیک‌ها و بلوک‌ها برتحرک کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده مانی اسپرم در زمان ۷۲ ذخیره سازی(LSMean± SE) ۴۰
جدول۳-۵- مقایسه اثرات متقابل آنتی بیوتیک ها برتحرک کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده مانی اسپرم در زمان صفر ذخیره سازی(LSMean± SE) ۴۵
جدول۳-۶- مقایسه اثرات متقابل آنتی‌بیوتیک‌ها برتحرک کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده مانی اسپرم در زمان ۲۴ ذخیره سازیLSMean± SE) ۴۵
جدول۳-۷ - مقایسه اثرات متقابل آنتی‌بیوتیک ها برتحرک کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده مانی اسپرم در زمان ۴۸ ذخیره سازی(LSMean± SE) ۴۶
جدول۳-۸- مقایسه اثرات متقابل آنتی بیوتیک ها برتحرک کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامت غشا پلاسمایی، زنده مانی اسپرم در زمان۷۲ ذخیره سازی(LSMean± SE) ۴۶

فهرست شکل‌ها

شکل۲-۱- لام هموسایتومتر..... ۳۲
شکل۲-۲- سلامتی غشا پلاسمایی..... ۳۳
شکل ۲-۳- زنده مانی ۳۴
نمودار۵-۱- مقایسه اثرات متقابل تیمارها بر زنده مانی اسپرم درطی ذخیره سازی..... ۶۰
نمودار۵-۲- مقایسه اثرات متقابل تیمارها بر تحرک پیش رونده اسپرم درطی ذخیره سازی... ۶۱
نمودار۵-۳- مقایسه اثرات متقابل تیمارها برتحرک کل اسپرم اسپرم درطی ذخیره سازی..... ۶۲
نمودار۵-۴- مقایسه اثرات متقابل تیمارها بر سلامت غشا پلاسمایی اسپرم درطی ذخیره سازی..... ۶۳

اثر سطوح آنتی بیوتیک های مختلف روی کیفیت اسپرم قوچ در طول ذخیره سازی در ۵ درجه‌سانتی‌گراد

پری روستا

چکیده

به منظور مطالعه‌ی اثر آنتی بیوتیک‌های مختلف روی کیفیت اسپرم از یک آزمایش فاکتوریل درقالب بلوک‌های کامل تصادفی، با ۳ عامل هریک در۲ سطح شامل جنتامایسین G (μg/ml 5 و 0)، لینکومایسینL (μg/ml 10 و 0)، آمپی‌سیلینA (μg /ml 2.5 و0) و۲ بلوک با ۴ مشاهده در هر واحد آزمایشی انجام شد که رقیق‌کننده بر پایه تریس به عنوان بلوک اول و رقیق‌کننده شیر پس‌چرخ به عنوان بلوک دوم در نظر گرفته شد. جهت انجام این تحقیق ۴ راس قوچ تالشی به‌تصادف انتخاب و منی به دست آمده از هر قوچ بصورت جداگانه به نسبت ۱ به ۱ با رقیق‌کننده بدون آنتی‌بیوتیک مخلوط شد. سپس نمونه‌ها با تحرک بالای ۸۰٪ و غلظت بالای $۲/۹ \times ۱۰^{۹}$ با هم مخلوط شده به ۸ قسمت مساوی تقسیم شدند. به هر قسمت رقیق‌کننده‌ی متفاوت از نظر سطوح آنتی‌بیوتیک افزوده شد. دمای نمونه‌ها از۳۷ درجه به آهستگی به ۵ درجه رسانده شد. ارزیابی اسپرم در زمان‌های صفر،۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت بعد از ذخیره‌سازی انجام شد. اثرات متقابل آنتی‌بیوتیک‌ها بر کیفیت اسپرم معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). درصد تحرک‌کل، تحرک پیش‌رونده، سلامتی غشا پلاسمایی و زنده‌مانی اسپرم در تیمار ۱۰ .g. l a به‌طور معنی-داری از سایر تیمارها بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). از این تحقیق استنتاج می‌شود که استفاده از لینکومایسین در سطح 10 μg/ ml بیشترین تاثیر را در حفظ کیفیت اسپرم در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد داشت.

واژگان کلیدی: آنتی‌بیوتیک، تحرک‌کل اسپرم، تحرک پیش‌رونده، سلامتی غشا پلاسمایی، زنده‌مانی

Effect of different levels of antibiotics on ram spermatozoa quality during storage at 5℃

Pari rousta

Abstract

To study effects, different antibiotics on quality sperm a completely randomized block design with factorial arragngment , including Gentamycin (0 , 5 µg/ml) Lincomycin (0 , 10µg / ml) and Ampicillin (0, 2.5 µg/ml) with 2 blocks and 4 observations in each plot was performed.Tris-based and skimmed milk-based diluents were considered as block 1 and block 2 respectively. For this study, four Taleshi rams were randomly selected and semen obtained from each ram separately wiht ratio of 1 to1 was mixed with diluent without antibiotics. Then samples wiht higher motility than 80% and concentration grathers than 2/9 $\times 10^9$, were pooled and were divided into 8 equal parts.The different levels of antibiotics were added to each parts. sample temperature were reduced slowly from 37 ° C to 5 ° C. Samples were assessed in time 0 ،24،48 and 72 hours of storage. The interactions between antibiotics on sperm quality were significant ($P<0.05$). Total motility, progressive motility, plasma membrane integrity and viability of sperm in $a_0g_0l_{10}$ were significantly higher than other treatments ($P<0.05$). From this study we concluded that using Lincomycin 10µg / ml had the most effect on quality of spermatozoa at 5 ° C .

Key words: Antibiotics, Total motility sperm, Progressive motility, Health plasma membrane, Viability

مقدمه

نگهداری صحیح اسپرم، دارای مزایای بسیار زیادی در صنعت دام، بویژه در رابطه با حفاظت مواد ژنتیکی با ارزش و انتقال آنها به گله‌های گوسفند با استفاده از تلقیح مصنوعی است که نتیجه آن افزایش بهره ژنتیکی و کنترل بیماری در داخل جمعیت گوسفندان خواهد بود [Evans and Maxwell, 1987 Holt, 1988]. به‌طورکلی در طول ذخیره‌سازی اسپرم ، باکتری‌های آلوده کننده متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که ممکن است، pH رقیق‌کننده را کاهش دهند. لذا pH داخلی اسپرم عموما با pH رقیق‌کننده ارتباط مستقیم دارد [Gatti et at., 1993]. وقتی pH منی پایین می‌آید متابولیسم و تحرک اسپرم را کاهش می-دهد [Gadea, 2003]. رقیق‌کننده استفاده شده برای ذخیره‌سازی، شامل مقادیر فراوانی از مواد مغذی لازم برای ادامه فعالیت اسپرم و زنده‌مانی اسپرم در محیط آزمایشگاهی است. اما این مواد به باکتری‌ها نیز اجازه رشد می‌دهند. آلودگی باکتریایی مایع منی به دلایل سیستماتیک، عفونت های مجاری ادراری و یا در طی جمع‌آوری مایع منی و پردازش آن اتفاق می‌افتد. حیوان آلوده می‌تواند باکتری و ویروس‌ها را از طریق تلقیح مصنوعی انتقال داده و در نتیجه بیماری را سریع گسترش دهد ,.et al [Martnez 2001 ; Mayer, 2009]. برخی از باکتری‌ها مثل مایکوپلاسما می‌توانند ازطریق شیر و زرده تخم مرغ افزوده شده به مایع منی، اسپرم را آلوده کنند و تاثیر سوئی روی کیفیت آن بگذارند. افزودن آنتی‌بیوتیک‌ها به رقیق‌کننده منی به‌منظور جلوگیری ازگسترش جمعیت میکروارگانیسم‌ها و همچنین به عنوان یک اقدام پیشگیرانه در برابر انتقال باکتری‌های بیماریزا و کاهش جمعیت میکروب‌های غیر بیماریزا که منی را آلوده کرده اند، انجام می‌شود. با این وجود برخی از مشکلات در رابطه با مقاومت باکتری‌های مایع منی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها ذکر شده‌است [Shin et al., 1988]. تاکنون ۲۰ گونه از باکتری‌های هوازی که مهمترین آنها اشریشیاکولی، پروتئوس‌میرابلیس، انتروباکتریا، استافیلوکوکوس اپیدرمیس و استافیلوکوکوس اورئوس هستند، در منی شناسایی شده‌اند. مشخص شده است که هرچه تعداد باکتری‌ها کمتر باشد نسبت بالاتری از تحرک اسپرم در طول ذخیره‌سازی مشاهده می‌شود [Salamon and Maxwell. 2000]. برای به حداقل رساندن عوارض باکتری‌ها از آنتی-بیوتیک‌ها استفاده می‌شود. بسیاری از میکروب‌ها بیماری‌زا نیستند ولی می‌توانند برای کسب مواد غذایی با اسپرم رقابت کنند و محصولات فرعی متابولیکی تولید کنند که تاثیرات نامطلوبی روی قدرت زنده‌ماندن و تحرک اسپرم دارند [Wolff et al.,1993]. امکان دارد به‌وسیله‌ی فعالیت سلول‌های سفید سمینال پلاسما و واکنش سلول در برابر عوامل میکروبی، یا تحت تاثیر مستقیم سویه‌های بیماریزای باکتریایی در سلول تولید کننده گامت فرایندهایی مانند تخریب در روند اسپرماتوژنز، انسداد لوله منی و نقص در عملکرد اسپرم بوجود آید [Sanocka et al., 2005]. باکتری‌های مضر از طریق ایجاد چسبندگی در اسپرم و آگلوتیناسیون باعث تغییرات مرفولوژی درغشا پلاسمایی و آکروزوم می‌شوند [Diemer et al., 2000]. میکروارگانیسم‌ها به طور مستقیم در عمکرد تولید مثلی جنس نر اثر می‌گذارند و باعث کاهش توانایی آکروزوم اسپرم، تغییرات در مرفولوژی از

طریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال از طریق پاسخ‌های التهابی به عفونت می‌شوند [Okazaki et al., 2010]. جیسوزلیوز و همکاران [Jesos Luis et al., 2010] حساسیت باکتری‌های مایع منی را نسبت به چندین آنتی بیوتیک بررسی کردند و نشان داده شد که باکتری‌ها به جنتامایسین حساسیت بیشتری نسبت به دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. به علاوه آزاویل و اسماعیل [Azawi1 and Ismaeell , 2012]. گروهی دیگر از آنتی‌بیوتیک‌ها را به مایع منی افزودند و گزارش کردند که بالاترین درصد تحرک مربوط به نمونه‌های مخلوط شده با لینکومایسین است. با توجه به اینکه در آزمایشات قبلی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و لینکومایسین در کنار یکدیگر مورد مقایسه قرار نگرفته‌اند این آزمایش به مرحله اجرا درآمد تا موثرترین نوع آنتی‌بیوتیک و دوز آن جهت افزودن به رقیق‌کننده اسپرم مشخص شود.

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱ - دستگاه تولید مثلی قوچ

دستگاه تناسلی دام نر، شامل کیسه بیضه (اسکروتوم) بیضه‌ها، اپیدیدیم یا جنب بیضه، غدد ضمیمه و قضیب یا آلت تناسلی حیوان نر است. بیضه‌ها عضو اصلی تولید مثل حیوان نر هستند و به وسیله کیسه بیضه، پوشیده می‌شوند. بافت بیضه‌ها، از دو قسمت تشکیل شده‌اند که شامل لوله های اسپرمساز و سلول‌های بینابینی است [باتوانی ۱۳۹۰].

۱-۱-۱- **لوله‌های اسپرم ساز** [1]**:** این لوله‌ها از سلول‌های پارانشیمی تشکیل شده اند. در این لوله‌ها، پدیده اسپرماتوزوآسازی[2] انجام می‌شود. لوله‌های اسپرم ساز، حدود ۹۰ درصد بافت بیضه‌ها را تشکیل می‌دهند و در حیوانات نر سالم و بالغ، همیشه مملو از اسپرماتوزوآهایی هستند که در مراحل مختلف رشد هستند. لوله‌های اسپرم ساز، از سلول‌های اسپرماتوگونی که سلول مادری تولید اسپرماتوزوآهستند و سلول‌های سرتولی[3] که حفاظت از سلول‌های مادری تولیدکننده اسپرماتوزوآ را به عهده دارند تشکیل شده است. سلول‌های سرتولی، هم چنین دارای ترشّحات مغذّی، برای تغذیه اسپرماتوزوآها هستند [Senger, 2003].

۱-۱- ۲ - سلو ل‌های بینابینی : این سلول‌ها در بین لوله‌های اسپرم ساز قرار دارند و حاوی رگ‌های خونی، اعصاب و رگ-های لنفی می‌باشند. سلول‌های بینابینی هورمون‌های آندروژن (تستوسترون و استروژن) تولید می‌کنند. این هورمون‌ها، شامل تستوسترون و آندوسترون می‌باشد. تستوسترون را، هورمون نرینگی می‌نامند. این هورمون از طرفی، سبب بروز صفات ثانویّه جنسی (آثار بلوغ) در حیوانات نر می‌شود و از طرفی دیگر، با افزایش سوخت و ساز موادغذایی در بدن، سبب رشد و نمو سریع حیوانات در زمان بلوغ می‌شود. به علاوه سلول‌های بینابینی و رگ‌های شبکه وسط بیضه [4]، وظیفه جمع آوری اسپرماتوزوآ و انتقال به مجاری برنده اسپرم را دارند. مجاری برنده، در دیواره‌شان، سلول‌های ترشّحی مژه دار نیز وجود دارند. تحرّک مژه‌ها، باعث کمک به خروج اسپرماتوزوآ از مجاری برنده[5] به قسمت بعدی می‌شود [Senger, 2003].

۱- **۲- وظایف بیضه‌ها :** بیضه‌ها، عهد ه دار دو وظیفه اصلی هستند:

۱ -۲-۱- تولید سلو ل‌های جنسی نر(اسپرماتوزوآ)

۱-۲-۲ - ترشحات هورمونی: ترشحات هورمونی بیضه‌ها، هرگز با اسپرماتوزواهای تولید شده مخلوط نمی‌شوند. این ترشّحات، در رشد جسمی و به وجود آمدن صفات جنسی، مؤثر هستند [وفایی سیاح ۱۳۹۰].

۱-۳- چگونگی و مراحل ساخته شدن و تولید اسپرماتوزوآ

1 .Seminiferous Teubul
2 .Spermatogenesis
3 .Sertoly cells
4 .Rete testis
5 .Efferent Ducts

تولید اسپرماتوزوآ و مراحل ساخته شدن آن را پدیده اسپرماتوژنز نامیده می‌شود، پس « گونادوسیت[1] » سلول‌های پایه ای (مادری) اسپرماتوزوآ که در بیضه جنین از تولّد نوزاد نر، تکثیر می‌یابد و تبدیل به سلول‌های دیگری به نام اسپرماتوگونی [2] می‌شوند. سلول‌های اسپرماتوگونی، پس از بلوغ طی مراحلی تکامل می‌یابند و تبدیل به اسپرماتوزوآ می‌شوند [محمود زاده ۱۳۸۹].

تبدیل اسپرماتوگونی به اسپرماتوزوآ، طی چهار مرحله صورت می‌گیرد که عبارتند از:

مرحلۀ اوّل : در این مرحله سلول اسپرماتوگونی تبدیل به اسپرماتوسیت اوّلیه می‌شود.

مرحلۀ دوم : اسپرماتوسیت اوّلیه در اثر اوّلین تقسیم میوزی (کاهش کروموزومی) تبدیل به اسپرماتوسیت ثانویّه می‌شود [باتوانی ۱۳۹۰].

مرحلۀ سوم : در این مرحله، اسپرماتوسیت ثانویّه طی دومین تقسیم میوزی، تبدیل به اسپرماتید می‌شود.

مرحلۀ چهارم : این مرحله تکامل را دگردیسی، تبدیل اسپرماتید به اسپرماتوزوآ می‌گویند [هاشمی و حسنی ۱۳۸۰].

۱-۴ شکل شناسی اسپرماتوزوآ

ساختمان اسپرماتوزوآ بالغ، از سه قسمت سر،گردن و دم تشکیل شده است سر اسپرم درگوسفند بیضی شکل و هسته‌ای پهن دارد که کروماتین آن متراکم است. کروماتین از DNA ساخته شده است که با پروتئین ویژه‌ای به نام پروماتین[3] ترکیب پیچیده‌ای را تشکیل می دهد. شکل ظاهری اسپرماتوزوآی گوسفند، حدود ۶۰ میکرون درازا و۵ /۰میکرون قطر دارد [2003 Senger,].

۱- ۵ - فیزیولوژی تولید مایع منی

منی[4]، عبارتست از مایعی که در موقع آمیزش از آلت تناسلی حیوان نر خارج می‌شود. قسمت عمده این مایع (حدود ۷۰ ٪) از سلول های جنسی(گامت نر) می‌باشد و باقیمانده آن، مربوط به ترشّح غدد ضمیمه دستگاه تولیدمثلی حیوان نر است. این ترشّحات در زمان انزال (تخلیه منی به بیرون) با اسپرماتوزوآ مخلوط می‌شوند. اسپرم در طی عبور از دستگاه تناسلی، مثلا اپیدیدیم تغییراتی می‌کند و آنتی ژن‌های سطحی آن از طریق تغییر در تجزیه گلوکز تغییر می‌کند. اما در زمان انزال نیز تغییراتی همچون تغییر در بارالکتریکی سطحی، تغییر در توان پیوند غشا با لکتین و تغییر در لیپیدهای غشا رخ می‌دهد

1 .Gonodocyte
2 .Spermatogonia
3 .Promatin
4.Semen

[محمود زاده ۱۳۸۹]. ترشحات غدد ضمیمه[1] (غده پروستات، غدد وزیکولی، غددکوپر) دارای مواد مغذی برای حیات اسپرماتوزوآها است. اسپرماتوزوآها، انرژی لازم را برای تحرّک خود از متابولیسم این مواد، به دست می‌آورند [وفایی سیاح ۱۳۹۰].

۱- ۶ - متابولیسم اسپرم

در منی حداقل ۴ ماده وجود دارد که می‌توانند بطور مستقیم به عنوان منبع انرژی برای تحرک اسپرم مورد استفاده قرار گیرند. اینها عبارتند از فروکتوز، سوربیتول،گلیسرول فسفریل کولین(GPC) و فسفولیپید. سه ماده اول در پلاسمای منی یافت می‌شوند ولی فسفولیپید در اسپرم موجود است [Martie et al., 2003]. GPC زمانی می‌تواند شکسته شده و مورد استفاده قرار گیرد که در دستگاه تناسلی حیوان ماده تحت تاثیر آنزیم مترشحه از دستگاه تناسلی حیوان ماده قرار گیرد. جذب اکسیژن یا تنفس منی، انعکاسی از اکسیداسیون این مواد بوده و بین ۵ تا ۲۰ میکرولیتر به ازای ۱۰۰ میلیون اسپرماتوزوآ در ساعت می-باشد. اسید لاکتیک که در منی جمع می‌شود، از متابولیسم اجزای پلاسمای منی توسط اسپرم ایجاد می‌شود. علاوه بر اینها، اسپرم مواد دیگری از جمله اسید پیرورویک و استیک را متابولیسم می‌کند. اسپرم پستانداران انرژی را از طریق چرخه کربس وگلیکولیز بوسیله مصرف گلوگز، فروکتوز و سایر مواد به‌دست می‌آورد [Rigau et al., 2001]. بیشتر ATP مورد نیاز اسپرم در چرخه تنفسی تولید می‌شود. مولکولهای حامل پر انرژی NADH و FADH2 در لایه داخلی غشا میتوکندری ها الکترون های خود را به چرخه فسفوریلاسیون اکسیداتیو منتقل می‌کنند. اسپرم دارای فرآیند زیستی از جمله چرخه کربس، گلیکولیز، بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب و هگزو منوفسفات است [Hayakawa et al., 1989]. لاکتات دهیدروژناز آنزیمی است که در واکنش گلیکولیز و گلوکونئوژنز شرکت می‌کند که به سلول اجازه می‌دهد بر کمبود موقت اکسیژن غلبه کند و انرژی مورد نیاز خود را به وسیله این آنزیم تامین کند [Yu et al., 2001]. مناسبترین pH برای متابولیسم اسپرم ۶ تا۸ :pH است [محمود زاده ۱۳۸۹]. سایر اجزای منی در جدول زیر ذکر شده است.

1.Accessory glands

خصوصیات	گوسفند	گاو
گلیسرول فسفریل کولین	۱۶۵۰	۳۵۰
pH	۷/۳- ۶/۹	۷/۳- ۶/۹
سدیم	۱۷۸±۱۱	۲۲۵±۱۳
پتاسیم	۸۹±۴	۱۵۵ ±۶
کلسیم	۶±۲	۴۰±۲
منیزیوم	۶±۰/۸	۸±۰/۳
کلر	۸۴	۱۷۴-۳۲۰
فروکتوز	۲۵۰	۴۶۰-۶۰۰
سوربیتول	۷۲	۱۴۰-۱۰

جدول۱-۱) مقایسه ترکیبات منی درگونه های مختلف (رشیدی و همکاران ۱۳۸۶)

۱-۶-۱ - متابولیسم فروکتوز و سوربیتول

سوربیتول یک قند مونو ساکاریدی است و شبیه به گلیسرول است که در آن گروه آلدئیدی بوسیله گروه الکلی جایگزین شده‌است که در تثبیت غشا پلاسمایی اسپرم نقش دارد [Cooper et al., 1999]. سوربیتول و فروکتوز توسط غدد وزیکولی ترشح می‌شوند. درحالی که GPC در اپیدیدیم اضافه می‌شود [Maria et al., 2005]. متابولیسم فروکتوز توسط اسپرم از طریق یک سلسله واکنش‌های بیوشیمیایی که در اغلب بافتهای حیوانی مشترکند انجام می‌شود. فروکتوز فسفات، تریوز فسفات واسید پیرووِیک واسطه‌هایی در تبدیل فروکتوز به اسید لاکتیک می‌باشند و اسید لاکتیک تجمع می یابد. اگرچه در حضور اکسیژن به گاز کربنیک و آب اکسید می شود. مرحله اکسیداسیون از طریق چرخه کربس انجام می‌شود. بطور مثال در شرایط نگهداری اسپرم در یک لوله آزمایش باریک و بلند، فروکتوز تماما به اسید لاکتیک تبدیل شده که این اسید تجزیه نمی‌شود و تجمع می‌یابد. در شرایط بی هوازی اسپرم برای کسب انرژی فقط وابسته به شکستن فروکتوز و تبدیل آن به اسید لاکتیک است. در شرایط فراهم بودن فروکتوز کافی، اسپرم گاو نر و قوچ به راحتی تحت شرایط بی هوازی زنده می‌مانند. از طرف دیگر اسپرم خوکی حتی در شرایط فراهمی فروکتوز از بین می‌رود. تصور می‌شود که علت این امر کاهش قدرت متابولیسم فروکتوز به اسید لاکتیک است. که نمی‌تواند بدون اکسیژن بیشتر مصرف شود. سوربیتول و فروکتوز را به منظور بهبود نگهداری اسپرم به رقیق‌کننده اضافه می‌کنند و گزارش شده هنگامی که سوربیتول به اسپرم موش اضافه می‌شود احتمالا از طریق فسفریلاسیون تیروزین تحرک آن حفظ می‌شود [Cao et al., 2009]. سوربیتول موجود درپلاسمای منی توسط اسپرم گاو نر و قوچ به فروکتوز تبدیل می‌شود و برای این تبدیل آنزیم سوربیتول دهیدروژناز که در حضور اکسیژن فعال می‌شود ضروری است. شواهد

نشان می‌دهد که بخشی از اسید پیرویک حاصل از فروکتوز، توسط اسپرم گاو نر و قوچ تبدیل به اسید استیک و دی‌اکسید کربن می‌شود [Frenette et al., 2006].

۱-۶-۲- متابولیسم گلیسرول وگلیسرل فسفریل کولین

غلظت گلیسرول بر ویژگی فیزیکوشیمایی سیتوپلاسم (ساختار ویسکوزیته سیتوپلاسم)، نفوذپذیری، استحکام غشا و پیوند غیر کووالان پروتئین‌های متصل به سطح اسپرم اثر می‌گذارند [Hammersted and Graham, 1990]. اسپرم گاو نر و قوچ تحت شرایط هوازی قادر به مصرف گلیسرول می‌باشند. از گلیسرول به عنوان یکی از اجزا رقیق کننده‌های منی و برای جلوگیری از تشکیل بلورهای یخ در سلول اسپرم، در انجماد استفاده می‌شود. احتمالا گلیسرول در مرحله تریوز فسفات وارد چرخه گلیکولیز می‌شود و به اسید لاکتیک تبدیل می‌شود. دراین مرحله به اکسیژن نیاز است و اسید لاکتیک تولید شده می-تواند بیشتر اکسیده گردد. غلظت GPC در مایع جنب بیضه شاخص مهمی از کارکرد بیضه حیوانات اهلی است همچنین مقدار اندکی ازGPC بوسیله اندام‌های ضمیمه جنسی تولید می‌شود [Urbany et al., 2005]. اسپرم قادر به استفاده از GPC نبوده ولی دردستگاه تناسلی حیوان ماده (حیوانات اهلی)، که جز کولین GPC را جدا کرده و فسفوگلیسرول آزاد شده شبیه گلیسرول توسط اسپرم مصرف می‌شود [Senger, et al., 2003]. GPC سبب افزایش طول عمر اسپرم و همراه با کارنیتین ، گلیکوپروتئین و گلوتامات در تکامل اسپرم نقش دارد و همچنین از ظرفیت پذیر شدن زود هنگام اسپرم (تا رسیدن به دستگاه تولید مثل ماده جلوگیری می‌کند [Holt et al., 1988].

۱-۶-۳ متابولیسم فسفولیپیدها

علاوه بر فروکتوز، سوربیتول وگلیسرول فسفوریل کولین، یک فسفولیپید دیگری درون اسپرم (احتمالا پلاسمینوژن) وجود دارد که در حالت فقدان ۳ منبع انرژی موجود در پلاسمای منی، توسط اسپرم مصرف می‌شود [Senger, et al., 2003].

۱-۶-۴- رابطه بین متابولیسم، تحرک و باروری

شدت هیدرولیز فروکتوز و تنفس با تحرک اسپرم رابطه دارد. آدنوزین تری فسفات (ATP) و آدنوزین تری فسفاتاز (ATP ase) در اسپرم وجود دارند و عامل واکنش‌های تولید انرژی و تحرک اسپرم می‌باشند[هاشمی وحسنی ۱۳۸۰].

۱-۷ - عوامل موثر برزنده مانی اسپرم در خارج از بدن حیوان

۱-۷-۱ - دما

با افزایش دمای منی میزان متابولیسم افزایش و زنده‌مانی اسپرم کاهش می‌یابد. با افزایش دمای منی به ۵۰ درجه اسپرم حیوانات اهلی بصورت برگشت ناپذیری تحرک خود را از دست می‌دهند [Pontbrand et al., 1989].

اگر دمای نگهداری اسپرم برابر با دمای بدن حیوان باشد اسپرم بعد از انزال تنها برای چند ساعت زنده می‌ماند. به‌خاطر اینکه منابع انرژی در دسترس آنها به پایان می‌رسد و یا اینکه غلظت اسید لاکتیک به اندازه‌ای افزایش می‌یابد که برای اسپرم کشنده است با کاهش دما میزان متابولیسم به طور موقت کاهش می‌یابد [Pursel et a., 1999].

pH - ۲ -۷-۱

دامنه مناسب برای اسپرم قوچ ۶/۹ تا۷/۳ است افزایش یا کاهش pH می‌تواند آسیب‌های جبران ناپذیری بر اسپرم وارد کند در کل اسپرم باید در محیطی قرار گیرد که نوسانات pH نداشته باشد [Redringuez et al., 1994].

۱-۷-۳ - فشاراسمزی

اسپرم در محیط‌های ایزوتونیک (هم اسمز با فشار اسپرم) بیش‌ترین فعالیت متابولیکی را خواهند داشت ولی به‌طور کلی اسپرم محیط هیپرتونیک را بهتر از محیط هیپوتونیک تحمل می‌کند [Redringuez et al., 1994].

۱-۸ روش‌های نگهداری مایع منی

۱-۸-۱ ذخیره به حالت جامد

در مطالعات نشان داده شده است که درگونه‌های مختلف به دلیل تفاوت در ترکیبات لیپیدی غشا، واکنش‌ها به تنش گرمایی متفاوت است. اسپرم قوچ به دلیل داشتن نسبت بالاتری اسیدهای چرب غیر اشباع و نسبت کمتری از کلسترول به فسفولیپید در غشا پلاسمایی [Evans and Maxwell, 1987]. نسبت به شوک سرما از سایر گونه‌ها مانند گاو، خرگوش و انسان حساس‌تر است [Bucak et al., 2009]. بنابراین مستعد آسیب‌های پراکسیداتیو بخصوص بعد از انجماد، اختلال در غشا، اختلال در عملکرد سلول وکاهش تحرک و توانایی قابلیت لقاح برای تلقیح مصنوعی می‌شود [Maxwell and Watson., 1996] .اسپرم خواص فیزیکی و بیوشیمیایی دارد که در طی مراحل انجماد و یخ گشایی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. ازجمله آزاد سازی گلوتامیک اگزالواستیک ترانس آمیناز (GOT) ، از دست دادن لیپوپروتئین‌ها و اسیدهای آمینه، کاهش فعالیت فسفاتاز، کاهش پروتئین‌های دارای اتصال ضعیف با کلسترول، افزایش سدیم وکاهش پتاسیم، غیر فعال شدن آنزیم‌های هیالورونیداز، آکروزین، از دست دادن پروستا گلاندین‌ها، کاهش سنتز ATP، ADP و کاهش فعالیت پروتئولیتیک آکروزوم است [Salamon and Maxwell, 2000]. که در نهایت با ایجاد تنش‌های فیزیکی و شیمیایی، تغییر در ترکیب لیپیدی غشاپلاسمایی [Schiller et al., 2000] و کاهش اندازه سر، افزایش بلوغ غشاهای اسپرم و افزایش واکنش آکروزومی می‌شود [Neild et al., 2003]. در طول فرآیند انجماد، اسپرم در معرض تغییرات دما قرار می‌گیرد که منجر به ایجاد استرس فیزیکی، شیمیایی و تغییرات در ترکیبات لیپیدی غشا پلاسمایی می‌شود [Perez-pe et al., 2002]. کاهش اندازه سر [Gravance et al., 1998]

، خارج شدن باقی مانده‌های فسفاتیدیل سرین [Glander and Schaller, 1999]، ترکیب لیپیدی غشا اسپرم، عوامل اصلی تعیین کننده زنده مانی، پراکسیداسیون لیپیدی و شوک سرما در اسپرم هستند. شوک سرما ناشی از انجماد نقش مهمی در ساختار غشا و وضعیت اتصال غشای پلاسمایی گامت نر و ماده دارد [Mustafa et al., 2008]. ذخیره‌سازی به‌صورت انجماد سبب آسیب‌های ساختاری و غیر ساختاری به اسپرم از جمله خسارت به غشا [Aboagla and Terada., 2004]، میتوکندری [Yin et al., 1998]، افزایش آسیب اکسیداتیو [Bucak et al., 200]، آسیب اکروزوم [Petyim and Choavaratana, 2006]و آسیب DNA [Yin et al., 1998] بعد از یخ گشایی می‌شود.

فرآیند انجماد و ذخیره‌سازی طولانی مدت باعث آسیب شدید و مرگ حدود ۶۰ در صد سلول اسپرم می‌شود [Courtens and Paqaignon, 1985]. توانایی نگهداری اسپرم نقش مهمی در تلقیح مصنوعی دارد و ذخیره سازی طولانی مدت باعث تغییرات غشایی ناشی از انتقال فاز است که زمانی که غشا سرد می‌شود رخ می‌دهد [Eva et al., 2010]. انجماد به دلیل تشکیل یخ درون سلولی باعث آسیب به اسپرم می‌شود [Mazur, 1984]. به علاوه در فرآیند انجماد تنش اسمزی اتفاق می‌افتد [Holt, 2000 ; Morris et al., 2007]. علاوه بر این خروج کلسترول از غشا منجر به سازکار علامت دهی جهت ظرفیت پذیری اسپرم می‌شود [Flesch et al., 2001] به همین دلیل تلقیح منی یخ گشایی شده از طریق واژن با نتایج رضایت بخشی همراه نیست. درگوسفند تلقیح مصنوعی منی یخ گشایی شده تنها از طریق شاخ رحم به کمک روش لاپاراسکوپ منتج به باروری قابل قبول می‌شود. در واقع می‌توان ادعا کرد که انجماد منی قوچ و به‌دست آوردن نتیجه مطلوب در گوسفند، مشکل تر از سایر دام‌ها است [Abdelhakeam et al., 1991].

۱-۸-۲ - ذخیره بصورت مایع

برای موفقیت در حفاظت از اسپرم باید روشی استفاده کرد که باعث کاهش یا جلوگیری از متابولیسم اسپرم شود بدون اینکه باروری را تحت تاثیر قرار دهد [Maxwell and Salamon, 1993]. بنابراین با تمرکز بر روی روش‌هایی برای بهبود و عملکرد غشا در دمای پایین می‌توان آسیب‌های وارده به اسپرم را به حد اقل رساند [Eva et al., 2010]. روش معمول برای ذخیره منی به صورت مایع، نگهداری در دمای صفر تا ۵ درجه است این محدوده درجه حرارتی است که فعالیت اسپرم برگشت پذیر است [Jesos Łuis et al., 2010]. برخی محققان ادعا کردند که ذخیره در دمای ۵ تا ۱۵ درجه برای نگهداری مایع منی مناسب است در حالیکه محققان دیگر گزارش کردند که بقای اسپرم گاو و قوچ در دمای ۵ درجه بیشتر است. مطالعات اخیر بیشتر روی ذخیره‌سازی اسپرم قوچ به صورت مایع متمرکز شده است. عموما اسپرم بصورت مایع در دماهایی ۵،۱۰و۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود که در قوچ بهترین درجه حرارت ۵ درجه می‌باشد [Salamon and Maxwell, 2000].