بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ی علوم دامی گرایش فیزیولوژی

عنوان

اثرات غنی‌سازی رقیق‌کننده اسپرم با ترهالوز و رافینوز در نگهداری سمین منجمد قوچ

استاد راهنما

دکتر غلامعلی مقدم

استادان مشاور

دکتر حسین دقیق‌کیا - دکتر اکبر تقی‌زاده

پژوهشگر

پریسا دولتی دورباش

شهریور ماه ۹۳

سپاسگزاری

همیشه دستان ربنایم را به سوی کسی می گیرم که مهربانی نگاهش را باور کرده ام و امروز که اینجایم و از بیکران دانش خدا، به قدر بضاعتم آموخته ام تمام قامت می ایستم و بلندترین شکرانه ام را قنوت می شوم.

و قدم های مادرم که یادم داد، نماندن را، دویدن را و رسیدن را، می بوسم.

و از پدرم ممنونم که روی پا ایستادنم را قانون کرد.

از استاد راهنمای عالمم، جناب آقای دکتر غلامعلی مقدم که صبورانه نکات دانایی شان را برایم کنار گذاشتند، تا جانانم از دانستن، بی-حساب ممنونم.

همین طور از کمک های شایان جناب آقای دکتر سید عباس رأفت بی نهایت سپاسگزارم. از اساتید مشاورم جناب آقای دکتر حسین دقیق کیا و جناب آقای دکتر اکبر تقی زاده کمال سپاس و قدردانی را دارم. مراتب قدردانی خود را از داور محترم این پایان نامه، سرکار خانم دکتر مرضیه ابراهیمی اعلام می دارم.

از تمامی همکلاسی های بزرگوارم مخصوصاً جناب آقای مهندس احمدیان ممنونم. همین طور از آقای مهندس چراغی تشکر ویژه می نمایم.

در آخر از خدای یگانه ام، برای تمامی چشم های آشنا و ناآشنایی که کوچه های رفتنم به حضور روشنشان نور گرفته است، یک آسمان بهار می-طلبم.

نام خانوادگی دانشجو: دولتی دورباش **نام:** پریسا

عنوان پایان‌نامه: اثرات غنی‌سازی رقیق‌کننده اسپرم با ترهالوز و رافینوز در نگهداری سمین منجمد قوچ

استاد راهنما: دکتر غلامعلی مقدم

استادان مشاور: دکتر حسین دقیق‌کیا- دکتر اکبر تقی‌زاده

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد **رشته:** علوم دامی **گرایش:** فیزیولوژی

دانشگاه: تبریز **دانشکده:** کشاورزی **تاریخ فارغ‌التحصیلی:** ۹۳/۶/۱۸

تعداد صفحه:۸۷

کلید واژه: تلقیح مصنوعی، ترهالوز، رافینوز، منی منجمد

چکیده

از زمانی که تلقیح مصنوعی برای اولین بار در نظر گرفته شد، حفظ مایع منی در دام‌های اهلی مورد توجه قرار گرفت. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر افزودن سطوح مختلف ترهالوز و رافینوز روی مدت زمان ذخیره منی منجمد قوچ می‌باشد. دراین طرح از سه رأس قوچ نژاد قزل، دو رأس قوچ با ترکیب ژنتیکی قزل- مرینو و دو رأس قوچ با ترکیب ژنتیکی مرینو- مغانی برای اسپرم‌گیری استفاده شد. دو هفته قبل از شروع طرح قوچ‌ها برای اسپرم‌گیری با واژن مصنوعی عادت‌دهی شدند. نمونه‌گیری از اوایل مرداد ماه شروع و به صورت هر هفت روز یک‌بار در فصل تولید مثلی انجام گرفت. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه یک ارزیابی اولیه بر اساس حجم، رنگ، pH، جوشان قلیان، تحرک موجی، حرکت پشرونده، غلظت، زنده و مرده انجام گرفته و نمونه‌های قابل قبول رقیق‌سازی شده و پس از رقیق‌سازی نمونه‌ها منجمد شده و داخل نیتروژن مایع نگهداری شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۵ روز برای پارامترهایی چون درصد اسپرم‌های زنده و غیر طبیعی، درصد تحرک و حرکت پیش‌رونده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ادامه چکیده پایان‌نامه...

درصد اسپرم‌های زنده و غیر طبیعی به کمک رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین، درصد تحرک به طور مشاهده‌ای و به کمک میکروسکوپ نوری (×۱۰) و درصد حرکت پیشرونده (×۴۰) نیز با میکروسکوپ نوری تعیین شدند. نتایج حاضر نشان دادند سطح ۷۵ میلی‌مولار ترهالوز و رافینوز (به ترتیب ۷۷/۲۶±۰/۷۳ و ۷۵/۴۴±۰/۷۶) بیشترین درصد اسپرم زنده را نسبت به گروه شاهد (۷۱/۱۱±۰/۸۰) داشتند، این در حالی است که تفاوت سطح ۷۵ میلی مولار ترهالوز و رافینوز با هم معنی‌دار نبود. بین سطح ۵۰ میلی‌مولار دو قند نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، از سوی دیگر سطح ۱۰۰ میلی‌مولار دو قند باهم تفاوت معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). سطوح ۱۰۰ (به ترتیب ۵۳/۹۰±۱/۹۹ و ۴۷/۱۴±۱/۸۹) و ۷۵ (به ترتیب ۵۳/۲۴±۱/۹۸ و ۴۶/۴۳±۱/۸۷) میلی‌مولار ترهالوز بیشترین درصد تحرک و حرکت پیشرونده را نشان دادند، و گروه شاهد نیز کمترین درصد تحرک و حرکت پیشرونده (به ترتیب ۲/۰۰± ۴۱/۳۳ و ۳۵/۵۳±۱/۸۹) را داشت (P<۰/۰۵). برای درصد اسپرم‌های غیرطبیعی سطوح ۱۰۰ و ۷۵ میلی‌مولار رافینوز (به ترتیب۸/۵۸±۰/۲۸ و ۸/۹۲±۰/۲۸) کمترین درصد و گروه شاهد نیز بیشترین درصد اسپرم‌های غیر طبیعی (۹/۷۱±۰/۲۸) را دارا بودند (P<۰/۰۵). نتایج این پژوهش نشان دادند می‌توان از دو قند ترهالوز و رافینوز برای نگهداری ۱۵ روزه‌ی اسپرم قوچ استفاده کرد.

فهرست مطالب

مقدمه..... ۱

۱- بررسی منابع ۳

۱-۱- تلقیح مصنوعی ۳

۱-۱-۱- استفاده از منی منجمد ذوب شده..... ۴

۱-۱-۲- ارزیابی منی..... ۴

۱-۲- انجماد اسپرم ۵

۱-۲-۱- روش‌های انجماد..... ۸

۱-۲-۲- ذوب منی..... ۱۰

۱-۳- علل مرگ اسپرم ۱۱

۱-۳-۱- شوک دمایی..... ۱۱

۱-۳-۲- استرس اکسیداتیو..... ۱۳

۱-۳-۳- استرس اسمزی..... ۱۶

۱-۴- روش‌های نگهداری منی ۱۷

۱-۴-۱- ذخیره در دمای محیط با غیر فعال سازی برگشت پذیر اسپرم..... ۱۷

۱-۴-۲- رقیق‌سازی..... ۱۸

۱-۴-۳- انواع رقیق‌کننده..... ۱۹

۱-۵- حفاظت‌کننده‌ها ۲۱

۱-۵-۱- زرده تخم مرغ..... ۲۱

۱-۵-۲- گلیسرول..... ۲۳

۱-۶- استفاده از قندها به عنوان حفاظت‌کننده ۲۳

۱-۶-۱- ترهالوز..... ۲۶

۱-۶-۲- رافینوز ۲۹
۲- مواد و روش‌ها ۳۲
۲-۱- دام و محل آزمایش ۳۲
۲-۲ -مشخصات محل و زمان اسپرم‌گیری ۳۲
۲-۳- واژن مصنوعی ۳۲
۲-۴- جمع‌آوری و ارزیابی ۳۳
۲-۴-۱- ارزیابی حجم ۳۳
۲-۴-۲- pH منی ۳۴
۲-۴-۳- رنگ و تراکم ۳۴
۲-۴-۴- تحرک اسپرم ۳۴
۲-۴-۵- درصد اسپرم‌های مرده و غیر طبیعی ۳۵
۲-۴-۶- غلظت ۳۶
۲-۵- رقیق‌سازی ۳۶
۲-۵-۱- محاسبه جرم‌مولی ۳۷
۲-۶- ارزیابی پس از ذوب ۳۸
۲-۶-۱- تحرک ۳۸
۲-۶-۲- حرکت پیشرونده ۳۸
۲-۶-۳- درصد اسپرم‌های زنده، مرده و ناهنجار ۳۸
۲-۷- تجزیه‌ی آماری ۳۹
۳- نتایج و بحث ۴۱
۳-۱- درصد اسپرم‌های زنده ۴۲

۳-۱-۱- تأثیر سطوح مختلف قندها ۴۲
۳-۱-۲- تأثیر زمان‌های مختلف ارزیابی ۴۴
۳-۱-۳- تأثیر نژادهای مختلف ۴۹
۳-۲- درصد تحرک ۵۰

۳-۲-۱- تأثیر سطوح مختلف قندها ۵۰
۳-۲-۲- تأثیر زمان‌های مختلف ارزیابی ۵۳
۳-۲-۳- تأثیر نژادهای مختلف ۵۸
۳-۳- درصد حرکت پشرونده ۵۹

۳-۳-۱- تأثیر سطوح مختلف قند ۵۹
۳-۳-۲- تأثیر زمان‌های مختلف ارزیابی ۶۱
۳-۳-۳- تأثیر نژادهای مختلف ۶۵
۳-۴- درصد اسپرم‌های غیر طبیعی ۶۶

۳-۴-۱- تأثیر سطوح مختلف قند ۶۶
۳-۴-۲- تأثیر زمان‌های مختلف ارزیابی ۶۸
۳-۴-۳- تأثیر نژادهای مختلف ۷۲
۳-۵- ضرایب همبستگی بین صفات ۷۳

۳-۶- نتیجه‌گیری ۷۵

۳-۷- پیشنهادات ۷۶

منابع و مآخذ ۷۷

نمودار ۳-۱- درصد اسپرم‌های زنده (LSM±SE) در نژادهای مختلف ۵۰
نمودار ۳-۲- درصد تحرک (LSM±SE) در نژادهای مختلف ۵۹
نمودار ۳-۳- درصد حرکت پیشرونده (LSM±SE) در نژاد های مختلف ۶۶

نمودار ۳-۴- درصد اسپرم‌های غیرطبیعی (LSM±SE) در نژادهای مختلف ۷۳

شکل ۱-۱- تغییرات دمایی هنگام انجماد منی در داخل استراوها ۹

شکل ۱-۲- مکانیسم حفاظت اسپرم توسط زردهی تخممرغ و شیر ۲۲

شکل ۱-۳- غشای بیولوژیکی (فسفولیپید دولایه). ۲۷

شکل ۱-۴- مکانیسم مطرح شدهی ترهالوز برای حفظ مواد زیستی ۲۸

شکل ۱-۵- ساختار مولکول ترهالوز ۲۸

شکل ۱-۶- ساختار مولکول رافینوز ۲۹

شکل ۲-۱- واژن مصنوعی استفاده شده برای اسپرم‌گیری ۳۳

شکل ۲-۲- لوله مدرج برای اندازه‌گیری حجم نمونه ۳۴

شکل ۲-۳- نمونه رنگ آمیزی شده با ائوزین- نیگروزین ۳۵

شکل ۲-۴- لام توما برای اندازه‌گیری غلظت ۳۶

شکل ۲-۵- فلاسک برای ذوب منی منجمد ۳۸

مقدمه

به طور کلی ثابت شده که انجماد منی پستانداران موجب کاهش باروری در مقایسه با منی تازه می‌شود. برخلاف آنچه پنداشته می‌شود اسپرم قوچ به خوبی اسپرم گاو تنش‌های فرآوری را تحمل نمی‌کند. تعداد اسپرم زنده مورد نیاز در زمان تلقیح، به روش تلقیح و محل تخلیه اسپرم بستگی دارد. به طور کلی شمار اسپرم زنده مورد نیاز برای دستیابی به باروری بهینه در میش چند برابر شمار اسپرمی است که در گاو تلقیح می‌شود. از فاکتورهای مؤثر بر زنده‌مانی اسپرم، حساسیت به شوک سرمایی، نسبت خنک‌سازی، ترکیبات رقیق‌کننده‌ها و فشار اسمزی می‌باشد. پایداری غشا، عدم تخریب اکسیداتیو، سالم بودن رسپتورهای غشایی و ساختار هسته از صفات زنده‌مانی اسپرم می‌باشند. به طورکلی بیش از ۵۰-۴۰ درصد اسپرم‌ها تحت انجماد با بهترین پروتوکل‌ها نمی‌توانند زنده بمانند. برای غلبه بر مشکل قابلیت‌زیست اسپرم در انجماد برای بعضی از گونه‌ها از تلقیح لاپاراسکوپی استفاده می‌شود، که هزینه بالایی دارد. یکی از دلایل اصلی مرگ اسپرم تشکیل یخ داخل سلولی است که قابلیت‌زیست و یکپارچگی غشای منی منجمد-ذوب شده را کاهش می‌دهد. آب نقش مهمی را در نگهداری ساختار و تمامیت عملکرد غشا بیولوژیکی بازی می‌کند. حذف این آب با دهیدراسیون یا انجماد اغلب موجب تغییرات وسیع ساختاری و عملکردی در غشای بیولوژیکی می‌شود. بسیاری از ارگانیسم‌ها هنگام قرار گرفتن در شرایطی که می‌تواند غشا را تغییر دهد ترکیباتی را جمع می‌کنند که از تغییرات تخریبی غشا در طی کاهش آب جلوگیری می‌کند. یکی از این ترکیبات ترهالوز است، که دی‌ساکاریدی متشکل از دو گلوکز می‌باشد که به طور طبیعی در غلظت بالا در بسیاری از ارگانیسم-های توانایی که به طور کامل در دهیدراسیون زنده می‌مانند یافت می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد اضافه کردن قندهایی مانند ترهالوز، رافینوز و در کل استفاده از رقیق‌کننده‌های هایپرتونیک می‌تواند اسپرم را از آسیب‌های حین انجماد محافظت کند. با توجه به موارد بیان شده، هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر افزودن سطوح مختلف قند ترهالوز و رافینوز بر نگهداری منی منجمد قوچ می‌باشد.

فصل اول

بررسی منابع

۱- بررسی منابع

۱-۱- تلقیح مصنوعی

از زمانی که تلقیح مصنوعی برای اولین بار در نظر گرفته شد، حفظ مایع منی در دام‌های اهلی مورد توجه قرار گرفت (سالامون و مکس‌ول، ۱۹۹۵). تلقیح مصنوعی یکی از ابزارهای مهم در رابطه با پیشرفت مدرن تولید حیوانات می‌باشد. از طریق تلقیح مصنوعی (AI[1]) انزال یک نر برتر ژنتیکی برای تلقیح چندین ماده برای توزیع ژن مطلوب کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین AI با حذف ارتباط فیزیکی حیوانات، گسترش بیماری‌هایی که از طریق جنسی منتقل می‌شوند، را محدود می‌نماید. انجماد موفق منی مزایای تلقیح مصنوعی را نسبت به جفت‌گیری طبیعی افزایش می‌دهد. ذخیره طولانی مدت به انتقال منی در فواصل بیشتر، اجازه قرنطینه منی کمک می‌نماید و استفاده طولانی از نرهای با ژرم‌پلاسم برتر حتی پس از مرگ‌شان را قادر می‌سازد (بیلی و همکاران، ۲۰۰۰). منی تازه رقیق شده‌ی قوچ عمر باروری کوتاه مدتی دارد، در حالیکه باروری منی منجمد شده فقط با لاپاراسکوپی قابل قبول می‌باشد و همین امر استفاده‌ی گسترده از تلقیح مصنوعی در گوسفند را محدود می‌نماید. اگرچه تحقیقات مختلفی در رابطه با رقیق‌کننده اسپرم قوچ و پروتکل‌های انجمادی توسعه یافته است ولی نتایج بدست آمده قابل مقایسه با منی تازه و جفت‌گیری طبیعی نیست. موفقیت تلقیح مصنوعی با اسپرم منجمد بستگی به فیزیولوژی اسپرم منتقل شده و قابلیت‌زیست آن در دستگاه تناسلی ماده دارد. نسبت خنک‌سازی و انجماد، انواع پروتکل‌های انجمادی، نسبت رقیق‌سازی، دمایی که گلیسرول به منی اضافه می‌شود، زمان تعادل با حفاظت‌کننده‌ها، نسبت ذوب از فاکتورهای مهم برای موفقیت تلقیح مصنوعی با منی منجمد می‌باشد (سویلو و همکاران، ۲۰۰۷).

تلقیح مصنوعی موفق، متأثر از پارامترهای متعددی می‌باشد که یکی از اصلی‌ترین پارامترها دسترسی به اسپرم‌های بارور می‌باشد که اسپرم‌های بارور تنها در یک فرآیند انجماد موفق بدست می-

[1]- artificial insemination

آیند (واتسون، ۲۰۰۰)، همچنین بستگی به توانایی جمع‌آوری مؤثر، ارزیابی و نگهداری منی؛ از نرهای با کیفیت برای استفاده در تولید دزهای بیشتر تلقیح می‌باشد (فردیناند و همکاران، ۲۰۱۲).

صنعت گوسفند هنوز قادر به استفاده‌ی بسیاری از تکنولوژی‌های کمکی تولید مثلی مخصوصاً تلقیح مصنوعی به عنوان دام صنعتی نشده‌است که از علل آن نقص در جمع‌آوری، انجماد و تلقیح منی منجمد قوچ می‌باشد. علاوه بر این نرهایی که به طور معمول برای اسپرم‌گیری و انجماد منی استفاده می‌شوند هنوز نیاز به بهینه سازی پروتکل‌های انجمادی و پرورشی برای منی قوچ دارند (پوردی و همکاران، ۲۰۱۰).

۱-۱-۱-استفاده از منی منجمد ذوب شده

تلقیح داخل سرویکس منی منجمد قوچ به طور معنی‌داری دارای باروری پایین می‌باشد. پایین بودن توانایی باروری در نتیجه‌ی ناکافی بودن روش‌های انجمادی یا نقص در جابجایی و انتقال می-باشد (هگ‌دوشاوا و همکاران، ۲۰۱۲). در گونه‌های پستانداران از دست دادن باروری در نتیجه‌ی انجماد با تلقیح تعداد زیادی اسپرم در همه‌ی گونه‌های اهلی جبران می‌شود (بارباس و ماسکارن‌هاس، ۲۰۰۹). تلقیح داخل رحمی یا اویدوکتی با میش‌های سوپراوولاسیون شده نسبت آبستنی و درصد تخم بارور شده با منی منجمد ذوب شده تقریباً ۲۰٪ کمتر از منی تازه می‌باشد. باروری منی منجمد از طریق تلقیح داخل سرویکس یا واژن قابل قبول نمی‌باشد (بیلی و همکاران، ۲۰۰۰). با وجود تحقیقات قابل توجه برای بهینه سازی انجماد اسپرم قوچ هنوز هم روش بسیار مخربی می‌باشد، تخلیه‌ی اسپرم نزدیک محل لقاح از طریق تلقیح لاپاروسکوپی تنها روش قابل اعتماد برای رسیدن به باروری قابل قبول می‌باشد. در حالیکه این تکنولوژی در بسیاری از کشورها مقرون به صرفه نبوده و نیاز به بهبود بیشتر این تکنولوژی وجود دارد (غلامی و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-۱-۲- ارزیابی منی

لازم است روش‌های جدید فراوری منی قوچ قبل از کاربرد در مزرعه امتحان شوند و بنابراین

ارزیابی آزمایشگاهی مورد نیاز می‌باشد. و در بین ارزیابی‌های ویژگی منی پارامترهای تحرک، تحمل اسمزی، درصد اسپرم‌های زنده- مرده و ناهنجار قابل اطمینان می‌باشند (گون‌دوغان، ۲۰۰۹). به طور مرسوم ارزیابی آزمایشات اصلی منی استاندارد در بسیاری از مراکز تلقیح مصنوعی با استفاده از میکروسکوپ نوری برای تخمین اسپرم‌های زنده و متحرک (و حرکت پیش‌رونده) انجام می‌گیرد. اگرچه این روش مفید می‌باشد ولی به طور کامل قابل اعتماد نیست زیرا تعداد اسپرم کمتری ارزیابی می‌شود. ولی ارزیابی تحرک از طریق آنالیز اسپرم به کمک کامپیوتر[۲] قابل اعتماد و قابل تکرار می‌باشد (پریس و همکاران، ۲۰۰۴). حجم انزال، حرکت توده‌ای، حرکت پیشرونده، غلظت اسپرم در هر انزال و درصد اسپرم‌های غیر طبیعی از مهمترین ویژگی‌های منی برای ارزیابی می‌باشد (آل‌گالبان و همکاران، ۲۰۰۴). تحرک اسپرم برای عبور از طریق سرویکس، اتصالات لوله‌های رحمی و نفوذ از توده‌ی کومولوس و زوناپلوسیدای تخمک ضروری می‌باشد (ساری‌اوزکان و همکاران، ۲۰۱۴). ارزیابی تحرک اسپرم، مورفولوژی و عملکرد آکروزوم یک معیار اساسی در کیفیت منی قبل از عمل تلقیح مصنوعی می‌باشد. و به طور کلی نشان داده شده که انجماد موجب کاهش تحرک اسپرم با ارزیابی مشاهده‌ای و کامپیوتری می‌شود. نشان داده شده‌است که کاهش تعداد اسپرم‌های نرمال در انزال‌ها منجر به کاهش باروری می‌شود. بنابراین باروری پایین نمونه‌های منی منجمد ممکن است در نتیجه‌ی کاهش تعداد اسپرم‌های نرمال در این نمونه‌ها باشد. از طرف دیگر حضور کلاه آکروزومی در فرایند لقاح مهم بوده و نیز با باروری منی منجمد مرتبط می‌باشد (دورادو و همکاران، ۲۰۱۰).

۱-۲- انجماد اسپرم

انجماد به عنوان تکنیکی برای ذخیره منی قوچ دارای مزایای بسیاری می‌باشد، اگرچه فرایند انجماد و ذوب برخی اثرات مضر در ساختار اسپرم و آسیب عملکردی و بیوشیمیایی القا می‌کند. تخریب غشای پلاسمایی اسپرم در نتیجه‌ی از دست دادن برگشت‌ناپذیر عملکرد آن می‌باشد. به دلیل بالا بودن میزان اسیدهای چرب اشباع در غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران نسبت به استرس

[2]- computer-assisted sperm analysis (CASA)

اکسیداتیو حساس‌تر می‌باشند. زنده ماندن اسپرم در نتیجه‌ی انجماد و ذوب تحت تأثیر بسیاری از فاکتورها از جمله ترکیبات محیط انجماد می‌باشد (نالی و آرفیانتی، ۲۰۱۱). مدیریت سلول‌های تولید مثلی (مثل اسپرم یا اووسیت) و بافت (مانند بافت بیضه یا تخمدان) به صورت غیر منجمد به علت مشکلات همزمان‌سازی حیوان دهنده و گیرنده و احتمال انتقال عوامل بیماری‌زای عفونی که در مجموع کاربرد گسترده‌ی این تکنیک را محدود می‌کند. سلول‌ها و بافت‌های منجمد شده می‌توانند تقریباً بدون تغییر در عملکرد یا اطلاعات ژنتیکی برای قرن‌ها ذخیره شوند. فرایند انجماد بر اساس ویژگی‌های فیزیکی سلولی به منظور نگهداری قابلیت زیست و محدود نمودن خسارت وارده به غشا که ممکن است در طی قرار گرفتن در شرایط غیر فیزیولوژیکی مانند دمای زیر صفر، تشکیل یخ، غلظت بالای یون‌ها و املاح اتفاق بیوفتد انجام می‌گیرد (وو، ۲۰۱۲). اسپرم اولین نوع سلول بود که با موفقیت منجمد و ذوب شد و سالهاست که به طور تجاری برای تلقیح مصنوعی برای چندین گونه‌ی حیوانی توسعه یافته است (کاری و واتسون، ۱۹۹۴). انجماد اسپرم پستانداران مزایای بسیاری را به صنعت دام به ویژه در رابطه با ارزیابی ژنتیکی و انتخاب برنامه‌ها از جمله در طرح‌های مرجع پدر ارائه می‌دهد (بیرن و همکاران، ۲۰۰۰). انجماد اسپرم استراتژی اساسی برای حفظ منبع بانک ژنوم می‌باشد. در مجموع بیوتکنولوژی تولید مثل مانند AI منجر به تولید فرزندان بیشتر از جفت انتخاب شده و بنابراین حصول اطمینان از تنوع ژنتیکی و کاهش فاصله‌ی بین نسل‌ها می‌باشد (آپو و همکاران، ۲۰۱۲).

تکنیک انجماد و پروتکل‌های IVF در تحقیقات ژنتیکی و تولید حیوانات ترانس ژن مهم می‌باشند. به استثناء منی گاو نر به طور کلی باروری سلول اسپرم منجمد پایین می‌باشد و پیشنهادات بسیاری برای توسعه‌ی تکنیک‌های انجمادی به منظور بهبود قابلیت زیست اسپرم پیشنهاد شده‌است. با این حال انجماد اسپرم موجب تشکیل کریستال یخ داخل سلولی آسیب‌های خنک‌سازی و اسمزی که موجب تخریب سلول اسپرم شده شکستگی سیتوپلاسم یا حتی تأثیر بر روی اسکلت سلولی و ژنوم مربوط به ساختار می‌شود. انجماد روشی برای حفظ ژرم پلاسم می‌باشد که در بخش کشاورزی، آبزی-

پروری، بیو تکنولوژی و نگهداری گونه‌های در معرض خطر می‌باشد (بارباس و ماسکارن‌هاس، ۲۰۰۹). انجماد مایع منی و تلقیح مصنوعی دارای مزایای زیادی برای صنعت دام می‌باشد. در حالیکه بزرگترین مانع بهره‌وری منی منجمد در بسیاری از گونه‌ها خنک‌سازی، انجماد و ذوب که در کل به ساختار غشای سلول آسیب می‌زنند، منجر به کاهش قابلیت زیست و تحرک اسپرم و تحرک اسپرم‌های ذوب شده می‌شوند. در نتیجه باروری پس از تلقیح مصنوعی در مقایسه با منی تازه در اکثر گونه‌ها ضعیف‌تر می‌باشد (پریس و همکاران، ۲۰۰۴).

امروزه اسپرم بسیاری از گونه‌ها به طور موفقیت‌آمیز در دمای ۱۹۶ °C- نیتروژن مایع ذخیره و با باروری قابل قبولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. موفقیت انجماد اسپرم در طی چند دهه‌ی گذشته به آرامی پیشرفت کرده و امروزه نسبتاً استاندارد سازی شده، با این حال انجماد حتی با تکنیک‌های روز نیز بر روی عملکرد و باروری اسپرم اثر مخرب دارد. به طور کلی قابلیت زیست اسپرم ۵۰٪ کاهش می‌یابد در حالیکه ظرفیت باروری تا هفت برابر تحت تأثیر قرار می‌گیرد. اندامک‌های مختلف اسپرم تحت تأثیر اثرات مخرب انجماد قرار می‌گیرند. القای واکنش زودرس آکروزومی، تغییر عملکرد میتوکندری، کاهش تحرک و اختلال در تراکم کروماتین که همگی باروری و قابلیت زیست اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهند (لما، ۲۰۱۰). انجماد اسپرم پستانداران دارای مزایای زیادی برای صنعت دام به ویژه در رابطه با ارزیابی و انتخاب ژنتیکی مثل برنامه‌ی پدران مرجع می‌باشد. اما فرایند انجماد و ذوب موجب آسیب‌هایی مثل شوک سرمایی، استرس اسمزی، تشکیل کریستال یخ و تخریب اکسیداتیو شده که موجب آسیب انجمادی و از دست دادن قابلیت زیست و باروری اسپرم می‌شود (غلامی و همکاران، ۲۰۱۲). در طی فرایند انجماد اسپرم پستانداران، قرار گرفتن در معرض تغییرات دمایی منجر به استرس فیزیکی و شیمیایی، تغییر ترکیبات لیپیدی غشای پلاسمایی، کاهش اندازه‌ی سر و خروج بقایای فسفاتیدیل سرین می‌شود. این تغییرات به بلوغ سلول، حفاظت‌کننده‌ی استفاده شده و نسبت خنک‌سازی و انجماد- ذوب بستگی دارد. با وجود پیشرفت در انجماد اسپرم پستانداران موفقیت انجماد اسپرم قوچ نسبت به اسپرم گاو کمتر بوده است (نور و همکادان ۲۰۱۰).

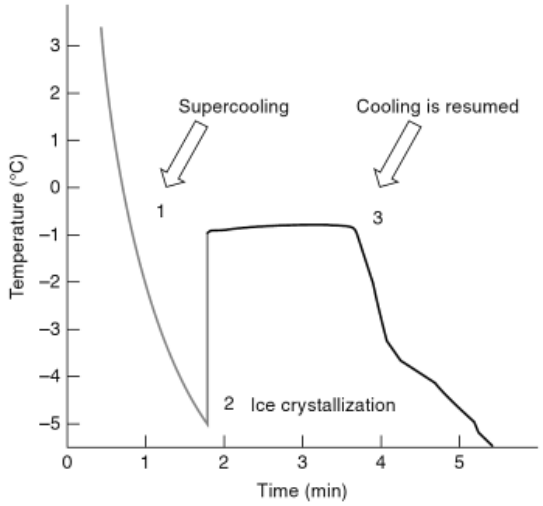
۱-۲-۱- روش‌های انجماد

دو روش برای انجماد گامت استفاده می‌شود: انجماد آهسته و انجماد سریع. در انجماد آهسته غلظت پایینی از حفاظت‌کننده‌ها که دارای اثراتی چون مسمومیت شیمیایی و شوک اسمزی می‌باشند استفاده می‌شود. انجماد سریع یک روش سریع بوده که شوک سرمایی را کاهش می‌دهد اما معمولاً انجام نمی‌شود زیرا انتقال گرما در سلول اسپرم خیلی آهسته است تا بدون خطرات ناشی از اثرات تبلور اجازه‌ی انجماد دهد. کاهش دما از دمای طبیعی تا ۴ °C موجب کاهش فعالیت‌های سلولی و افزایش طول عمر سلول اسپرم می‌شود، و عملکرد نرمال سلول پس از ذوب بر می‌گردد. نسبت انجماد باید به اندازه‌ای آهسته باشد تا اجازه خروج آب سلول از طریق اسمز شود، و از تشکیل یخ داخل سلولی که موجب آسیب غیر قابل برگشت به سلول اسپرم می‌شود جلوگیری کند (باربا‌س و ماسکارن-هاس، ۲۰۰۹). نسبت سریع خنک‌سازی زمان لازم برای انتقال آب از غشای دو لایه را نداده و احتمال تشکیل یخ داخل سلولی افزایش می‌یابد (رادولف و همکاران، ۱۹۸۵).

بر اساس گزارش یوسال و بوکاک (۲۰۰۹) خنک‌سازی اسپرم قوچ با نسبت آهسته (حدود ۰/۵ درجه‌سانتیگراد در دقیقه از دمای ۵ تا ۲۵- و از دمای ۲۵- تا ۱۳۰- حدود ۵۰- درجه در دقیقه) دارای ویژگی بهتری پس از ذوب نسبت به خنک‌سازی سریع (حدود ۱۰ درجه‌سانتیگراد در دقیقه از دمای ۵ تا ۲۵- و از دمای ۲۵- تا ۱۳۰- حدود ۵۰- درجه در دقیقه) می‌باشد (یوسال و بوکاک، ۲۰۰۹).

همانطور که در شکل ۱-۱ نشان داده شده‌است وقتی دما افت می‌کند، آب تا این مرحله مایع می‌باشد تا اینکه کریستال یخ القا می‌شود، این مرحله سوپر کولیینگ (مرحله‌ی۱) گفته می‌شود. کریستال یخ در بعضی از نقاط زیر نقطه‌ی انجماد به طور تصادفی تشکیل می‌شود. تصادفی بودن این مرحله احتمالاً به علت سازمان‌بندی داخل مولکول‌های آب می‌باشد، که به صورت خوشه‌ای و زنجیره-های اولیه واکنش می‌دهند. این یک واکنش گرمازا بوده تا گرمای آزاد شده به طور معنی‌داری دمای نمونه را افزایش دهد (مرحله‌ی دوم). بسته به نمونه‌ی منجمد شده و تکنیک استفاده شده برای

خنک‌سازی، دمای نمونه برای چند دقیقه قبل از انجماد در آن دما باقی می‌ماند، یا حتی می‌تواند دمای انتقال قبل از سرگیری انجماد را افزایش دهد. این دما، وقتی که استراوهای حاوی منی در بخار نیتروژن سرد منجمد می‌شوند به صورت رویه‌ی ثابت می‌باشد.



شکل ۱-۱- تغییرات دمایی هنگام انجماد منی در داخل استراوها (پاولی و همکاران، ۲۰۱۴)

مشکل اصلی سلول در طی خنک‌سازی که باید بر آن فائق آمد، فاز تبدیل آب به یخ می‌باشد. آب نقش مهمی در زندگی سلول دارد، و به عنوان یک حامل داخل سلولی و خارج سلولی ساختارهای آب دوست مانند پروتئین‌ها، متابولیت‌ها و یون‌ها عمل می‌کند. در طی تغییرات فاز انجماد و ذوب غلظت محلول در داخل و خارج سلول به طور قابل توجهی متفاوت بوده و بنابراین بزرگترین مشکل بیولوژیکی مربوط به انجماد می‌باشد. مواد محلول در محیط آبی که دمای سلول‌ها به زیر نقطه‌ی انجماد آب خالص (صفر درجه) یعنی ۱۵ °C- تا ۱۰- برده می‌شود، آب خارج سلولی محیط منجمد شده و غلظت محلول‌ها افزایش می‌یابد. این فشار اسمزی ایجاد شده موجب جریان حلال داخل سلولی به خارج غشا می‌شود. این نیاز به آب خارج سلول منجر به کاهش آب داخل سلول و در نتیجه دهیدراسیون سلول می‌شود که این فرایند برای حفاظت سلول از تشکیل یخ داخل سلولی که موجب مرگ سلول می‌شود ضروریست. میزان دهیدراسیون بستگی به میزان خنک‌سازی دارد. اگر خنک-سازی خیلی سریع باشد دهیدراسیون کامل نشده و یخ داخل سلولی شکل می‌گیرد. در این مورد

تغییر حجم یا اسمزی وجود ندارد اما موقع ذوب ممکن است به غشا و اندامک‌های داخل سلولی آسیب وارد شود. در مقابل اگر خنک‌سازی خیلی آهسته باشد آب خارج سلولی قبل از آب داخل سلولی منجمد شده و درنتیجه از غشای سلول محافظت می‌کند. و محیط خارج سلولی هایپرتونیک شده و موجب جریان آب داخل سلول به بیرون شده و در نتیجه موجب دهیدراسیون بیش از حد می-شود. در انجماد سریع نسبت کاهش دما تقریباً ۲۰ °C در دقیقه بوده و در انجماد آهسته تا دمای ۵ درجه سانتیگراد ۰/۵ °C تا ۱ در دقیقه و سپس با نسبت ۱۰ °C تا ۱ در دقیقه تا دمای ۸۰ °C- خنک شده و پس از آن در نیتروژن مایع غوطه ور می‌شوند (پاولی و همکاران، ۲۰۱۴).

۱-۲-۲- ذوب منی

انجماد و ذوب منی موجب کاهش تحرک، قابلیت زیست و حرکت پیش‌رونده در دستگاه تناسلی ماده می‌شود و آن‌هم موجب کاهش باروری می‌شود. پس از تلقیح داخل سرویکس منی منجمد ذوب شده نسبت به منی تازه آسانتر از دستگاه تناسلی حذف می‌شود. ذوب منی منجمد موجب افزایش بلوغ غشای اسپرم و واکنش ظرفیت پذیری آکروزوم می‌شود. این تغییرات ممکن است تحرک را تحت تأثیر قرار ندهد ولی طول عمر، توانایی ارتباط با دستگاه تناسلی ماده و باروری اسپرم را کاهش می‌دهد (بارباس و ماسکارن‌هاس، ۲۰۰۹). مطالعات بیولوژی انجماد نشان داده‌اند که هر بخش از فرآوری مانند نسبت خنک‌سازی، نسبت گرم کردن و دمای تولید شده در بافت ممکن است مضر باشد. دوره ذوب نباید سریع باشد که این بقاء سلول را افزایش می‌دهد و طولانی شدن مدت ذوب به علت افزایش تأثیر املاح و رشد بیشتر کریستال یخ موجب آسیب سلول می‌شود (گیج و باوست، ۱۹۹۸). در روش‌ها ذوب منی منجمدکه فاز مهمی در بقاء اسپرم می‌باشد. در طی ذوب منی مجمد دمای بحرانی عبور بین ۱۵- و ۶۰- می‌باشد. به طور کلی منی قوچ و بز در دمای ۳۸-۴۲ °C در طی ۳۰ ثانیه ذوب می‌شود، اما ذوب در دمای بالاتر (۶۰-۷۵ °C) برای تحرک، تمامیت آکروزوم و باروری اسپرم نیز مشابه می‌باشد (بارباس و ماسکارن‌هاس، ۲۰۰۹).

۱-۳- علل مرگ اسپرم

آسیب انجماد- ذوب به علت تغییرات بیش از حد در اسپرم شامل اثرات شبه ظرفیت پذیری، کاهش در تمامیت غشای پلاسمایی و آکروزوم، کاهش ناهمگن جمعیت اسپرم‌ها، کاهش تحرک و توانایی عبور از موکوس سرویکس در آزمایشگاه می‌باشد. این تغییرات موجب آسیب توانایی اسپرم هنگام انتقال در دستگاه تناسلی ماده و باروری اووسیت شده و در نتیجه باروری در بدن موجود زنده کاهش می‌یابد (لیحی و همکاران، ۲۰۱۰). به طور کلی فرض بر این می‌باشد که کاهش کیفیت اسپرم در مراحل جمع‌آوری، رقیق‌سازی و ذخیره‌سازی می‌باشد (دورادو و همکاران، ۲۰۱۰).

۱-۳-۱- شوک دمایی

خنک‌سازی یک عامل استرس‌زای بزرگی می‌باشد که یکی از نتایج آن تغییر جهت اتصالات فسفولیپیدی غشا و شکل گیری متفاوت آن می‌باشد که منجر به مختل شدن عملکرد غشا و نفوذیری آن می‌شود. پاسخ اسپرم به استرس افت درجه حرارت شوک سرمایی نامیده می‌شود. پاسخ استرس توسط اسپرم در واکنش به افت درجه حرارت نشان داده شده است به عنوان شوک سرد نامیده می شود. به طور کلی، آسیب شوک سرمایی خود موجب کاهش در سوخت و ساز سلولی، تغییر نفوذ پذیری غشاء، از دست دادن اجزای داخل سلولی، از دست دادن غیر قابل برگشت حرکت اسپرم‌ها و افزایش تعداد اسپرم مرده می‌شود (لما، ۲۰۱۰). به طور کلی آسیب اسپرم قبل از انجماد و پس از ذوب به عوامل مختلفی از جمله شوک سرمایی، آسیب انجمادی، استرس اکسیداتیو، تغییر در ترکیبات غشایی، مسمومیت شیمیایی حفاظت‌کننده‌های انجمادی و استرس اسمزی نسبت داده شده است. حساسیت اسپرم به این عوامل مخرب بستگی به دمای به کار رفته و نیز واکنش بین ترکیبات شیمیایی، دما و اسملالیته محیط رقیق‌کننده دارد. بنابراین تعیین بهترین دمای فراوری اسپرم، اسمولالیته و ترکیبات رقیق‌کننده منجر به توسعه‌ی بهتر پروتکل‌های انجمادی می‌شوند (وریسلی و همکاران ۲۰۰۹).