دانشگاه کردستان

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

عنوان:

اثرات روغن ماهی، ال- کارنیتین و ویتامین E بر روی خصوصیات انجماد منی بزهای مرخز

پژوهشگر:

پروین میهن پرست

استاد راهنما

دکترعباس فرشاد

اساتید مشاور:

دکتر قربانعلی صادقی

دکتر عثمان عزیزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم دامی گرایش فیزیولوژی

آذر ۱۳۸۹

کلیه حقوق مادی و معنوی مترتب بر نتایـج مطالعات،

ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این

پایان‌نامه (رسـاله) متعلق به دانشـگاه کردستان است.

تعهد نامه

اینجانب پروین میهن پرست دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم دامی گرایش فیزیولوژی دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی گروه علوم دامی تعهد می نماییم که محتوای این پایان نامه نتیجه تلاش و تحقیقات خود بوده و از جایی کپی برداری نشده و به پایان رسانیدن آن نتیجه تلاش و مطالعات مستمر اینجانب و راهنمایی و مشاوره اساتید بوده است.

با تقدیم احترام

پروین میهن پرست

۱۳۸۹/ ۹ / ۲۰

دانشگاه کردستان

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته علوم دامی گرایش فیزیولوژی

عنوان:

اثرات روغن ماهی، ال- کارنیتین و ویتامین E بر روی خصوصیات انجماد منی بزهای مرخز

پژوهشگر:

پروین میهن پرست

در تاریخ / / ۱۳ توسط کمیته تخصصی وهیات داوران زیر مورد بررسی قرار گرفت و با نمره ..... و درجه ..... به تصویب رسید.

هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱ـ استاد راهنما	دکتر عباس فرشاد	استادیار دانشگاه کردستان	
۲ـ استاد مشاور	دکتر قربانعلی صادقی	دانشیار دانشگاه کردستان	
۳ـ استاد مشاور	دکتر عثمان عزیزی	استادیار دانشگاه کردستان	
۴ـ استاد داور خارجی	دکتر شمس الدین احمدی	استادیار دانشگاه کردستان	
۵- استاد داور داخلی	دکتر امجد فرزین پور	استادیار دانشگاه کردستان	

مهر و امضاء گروه: مهر و امضاء معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده:

دکتر جلال رستم زاده دکتر بهمن بهرام نژاد

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس بی کران خداوندی را که یاریم گردانید تا با بهره از گستره بی انتهای لطفش گذر از مرحله ای دیگر از زندگانیم را تجربه نمایم. خداوندی را که بر هر نعمت حق سپاسی برای بندگان مقرر فرموده است. لذا این تقدیر را ابتدا با قدردانی از زحمات پدر، مادر و همسر عزیزم که نفسم با نفسشان گرم و قلبم با تپش قلبشان در تپش است آغاز می کنم، آنان که همواره دورنمای ساحل حمایتشان مرا از غرق شدن در امواج متلاطم ناامنی ها رهانیده است.

از استاد راهنما و مشاورین پایان نامه ام، جناب آقای دکتر عباس فرشاد و آقایان دکتر قربانعلی صادقی و دکتر عثمان عزیزی به خاطر زحمات و رهنمودهایشان در طی انجام این پایان نامه تشکر و قدردانی مینمایم.

از آقایان مهندس محمودی و مهندس ظهرابی و خانم مهندس مفاخری و سایر پرسنل محترم ایستگاه دامپروری سنندج به خاطر زحمات فراوانی که متحمل شده اند صمیمانه سپاسگزارم.

از تمامی دوستان و دانشجویان عزیز به ویژه خانم مهندس سارا عقیلی، آقای مهندس یاسر حسینی و خانم مهندس منصوره کریمی که آشنایی و همراهیشان فرصتی تکرار ناشدنی بود کمال تشکر و قدردانی را دارم.

پروین میهن پرست

۸۹/۹/۲۰

تقدیم به :

پدر و مادر عزیزم:

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که دراین سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است. آنان که فیض وجودشان مشق عشق زندگی ام است.

و همسر مهربانم:

به پاس قلب بزرگ و محبت های بی دریغش، به او که از بدو ورود به زندگی ام همواره یارو یاورم بوده است.

چکیده

هدف از این پژوهش ارزیابی کیفیت انجماد اسپرم بزهای مرخز با رقیق کننده های: شاهد، روغن ماهی، ال- کارنیتین، ویتامین E ، روغن ماهی + ال- کارنیتین، روغن ماهی + ویتامین E ، و ترکیب سه ماده روغن ماهی + ال- کارنیتین + ویتامین E می باشد. نمونه های منی گرفته شده از ۴ بز مورد آزمایش با هم مخلوط و سپس برای پارامترهای جنبایی، جنبایی پیشرونده و سلامت آکروزوم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه های منی به هفت قسمت مساوی تقسیم و با رقیق کننده پایه تریس- اسیدسیتریک – گلوکز (همراه با ۵ درصد گلیسرول و ۲/۵ درصد زرده تخم مرغ) با مکمل های: روغن ماهی (۰/۵ میلی گرم درمیلی لیتر)، ال- کارنیتین (۰/۵ میلی گرم درمیلی لیتر)، ویتامین E (۰/۵ میلی گرم درمیلی لیتر)، روغن ماهی + ال- کارنیتین (۰/۵ میلی گرم درمیلی لیتر)، روغن ماهی + ویتامین E (۰/۵ میلی گرم درمیلی لیتر)، روغن ماهی + ال- کارنیتین + ویتامین E (۰/۵ میلی گرم درمیلی لیتر) رقیق شدند. رقیق کننده شاهد، بدون افزودنی بود. دمای نمونه های منی رقیق شده در خلال ۲-۳ ساعت به ۵ درجه سانتیگراد رسانیده شد سپس در پایوت های فرانسوی ۰/۲۵ میلی لیتری و روی بخار نیتروژن مایع یخ زده شدند. نمونه های منی با قرار دادن پایوت ها در آب ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ ثانیه برای ارزیابی میکروسکوپی یخ گشایی شدند. آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS بر اساس طرح بلوک کامل تصادفی چند مشاهده ای انجام شد. دراین آزمایش بهترین نتایج با رقیق کننده حاوی ۰/۵ میلی گرم روغن ماهی + ال- کارنیتین + ویتامینE (۳۵/۶۶٪ جنبایی، ۲۸/۵۵٪ جنبایی پیشرونده، ۳۹/۹۱٪ زنده مانی و ۵۴/۶۶٪ سلامت آکروزوم) به دست آمد. این تیمار در مقایسه با تیمار شاهد میزان جنبایی، جنبایی پیشرونده، زنده مانی و سلامت آکروزوم را به طور معنی داری افزایش داد ($p<۰/۰۵$). همچنین در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی موجب بهبود معنی داری در ویژگیهای اسپرم پس از یخ گشایی شد ($p<۰/۰۵$). نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیب سه ماده روغن ماهی+ ال- کارنیتین+ ویتامین E ممکن است موجب بهبود کیفیت منی بز مرخز شود.

کلمات کلیدی : روغن ماهی ، ال- کارنیتین، ویتامین E، انجماد، منی، بز مرخز

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول (پیشینه و تاریخچه تحقیق).....

۱-۱- انجماد ۴

۱-۱-۱- اهمیت نگهداری منی منجمد..... ۴

۱-۲- فیزیولوژی منی..... ۵

۱-۳- غشاء پلاسمایی اسپرم..... ۵

۱-۳-۱- لیپیدهای غشاء پلاسمایی اسپرم ۶

۱- ۴- مکانیسم عمومی لیپوپراکسیداسیون و اشکال فعال اکسیژن..... ۷

۱-۴- ۱- سیستم های آنزیمی و غیر آنزیمی پلاسمای منی ۹

۱ -۵- رقیق کننده ها و نقش آنها در انجماد..... ۹

۱-۵-۱- رقیق کننده های محافظ و حفاظت کننده ها..... ۱۱

۱-۵-۲- PH منی و سیستم های بافری..... ۱۱

۱-۵-۳- قندها ۱۲

۱-۵-۴- محافظت کننده ها..... ۱۲

۱-۶- یخ زدن و یخ گشایی نمونه های منی ۱۳

۱-۷- اسیدهای چرب غیر اشباع..... ۱۴

۱-۷-۱- روغن ماهی و نقش آن در کیفیت اسپرم..... ۱۴

۱-۸- ویتامین E ۱۵

۱-۸-۱- ویتامین E و اثر آن روی اشکال فعال اکسیژن..... ۱۶

۱-۸-۲- نقش ویتامین E در بهبود خصوصیات منی..... ۱۷

۱-۸-۳- ویتامین E و کاهش بهبود خصوصیات منی..... ۱۸

۱-۸-۴- دیگر آنتی اکسیدانها ۱۸

۱-۹- آشنایی با ال- کارنیتین ۱۹

۱-۹-۱- اثر ال-کارنیتین بر روی تولیدمثل ۲۰

۱-۹-۲-اثر ال-کارنیتین در کیفیت منی..... ۲۱

۱-۱۰- اثر ترکیبی روغن ماهی، ویتامین E، ال-کارنیتین..... ۲۲

فصل دوم: مواد و روش ها.....

۲-۱- مکان و حیوانات مورد آزمایش..... ۲۳

۲-۲- تغذیه و مدیریت حیوانات مورد آزمایش ۲۳

۲-۳- اسپرم گیری و ارزیابی منی قبل از انجماد..... ۲۴

۲-۴- ترکیب رقیق کننده ها و رنگ های مورد استفاده در آزمایش..... ۲۵

۲-۴-۱- آماده سازی رقیق کننده های آزمایش..... ۲۵

۲-۴-۲- رقیق کردن نمونه های منی..... ۲۶
۲-۴-۲-۱- روش رقیق کردن..... ۲۶
۲-۵- روش انجماد اسپرم..... ۲۷
۲-۵-۱- روش ذوب کردن منی منجمد..... ۲۷
۲-۶- روش تهیه ائوزین نیگروزین..... ۲۸
۲-۷- روش تهیه فرمالین سیترات..... ۲۸
۲-۸- ارزیابی منی پس از یخ گشایی..... ۲۸
۲-۸-۱- درصد اسپرم های جنبا و دارای جنبایی پیشرونده ۲۸
۲-۸-۲- تعیین درصد اسپرم های زنده ۲۹
۲-۸-۳- تعیین سلامت آکروزوم..... ۲۹
۲-۹- روش آماری در تجزیه و تحلیل داده ها..... ۲۹
۲-۹-۱- مدل آماری..... ۳۰
فصل سوم: نتایج وبحث.....
نتایج ۳۱
۳-۱- ارزیابی نمونه ها پیش از یخ زدن..... ۳۱
۳-۱-۱- ویژگیهای فیزیولوژیکی منی قبل از انجماد..... ۳۱
۳-۲- اثرات عوامل آزمایشی بر جنبایی و جنبایی پیشرونده اسپرم پس از یخ گشایی..... ۳۲
۳-۳- اثرات عوامل آزمایشی بر زنده مانی اسپرم پس از یخ گشایی..... ۳۲
۳-۴- اثرات عوامل آزمایشی بر سلامت آکروزوم اسپرم پس از یخ گشایی ۳۲
بحث..... ۳۵
نتیجه گیری و پیشنهادات..... ۴۲
نتیجه گیری..... ۴۲
پیشنهادات..... ۴۲
منابع..... ۴۳
پیوست ها.....

مقدمه

اسپرماتوزوآ سلولی با تخصص یافتگی بالا برای ذخیره و انتقال مواد ژنتیکی می باشد. این سلول دارای قابلیت جنبایی بالا و باروری اووسیت بوده و در طول اسپرماتوژنز بلوغ آن در اپیدیدیم و نهایتا در دستگاه تناسلی ماده اتفاق می افتد. در طول چند سال گذشته روشهایی ارائه شده اند که قادرند اسپرم را به صورت رضایت بخش برای نگهداری نامحدود گامت ها با داشتن قابلیت باروری و خلق بانکهای اسپرم منجمد کنند [۳۲]. مواد ژنتیکی اسپرم یخ زده در سطح بین المللی می تواند به آسانی مبادله گردد و باعث می شود که تلقیح مصنوعی هم در فصل تولیدمثلی و هم غیر تولیدمثلی انجام گرفته و عمر تولیدمثلی حیوان نر ارزشمندی را که پیشتر وجود داشت، وسعت بخشد [۴ ، ۵ و ۳۳]. با این حال عمل آوری منی به منظور ذخیره و تلقیح مصنوعی فاکتورهای آسیب دهنده به غشای پلاسمایی را افزایش می دهد به ویژه زمانی که منی برای زمان های طولانی ذخیره می گردد [۱۰]. آسیب غشای پلاسمایی اسپرم، منجر به از دست دادن برگشت ناپذیر جنبایی و باروری اسپرم می-گردد. ترکیب ویژه ای از فسفولیپیدها و غلظت معنی داری از اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر در غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران وجود دارند [۱۶]. نقش این اسیدهای چرب در کمک به سیالیت غشاء، تنظیم حرکت سلول و میزان ظرفیت پذیری سلول اسپرم گزارش شده است [۱۵]. از طرفی از دست دادن این لیپیدها تاثیرات عمیقی روی نفوذ پذیری یونی و سیالیت غشای پلاسمایی خواهد گذاشت [۱۶]. جنبایی اسپرم و سلامت غشاء دو فاکتور مهم باروری می باشند، به گونه ای که حین فرایند یخ زدن و یخ گشایی، غشاهای اسپرم برای نفوذ به تخمک ممکن است آسیب ببینند، بنابراین به طور معنی داری جنبایی اسپرم کاهش یافته و نهایتا روی فرایند باروری اثر منفی می-گذارد. این کاهش ناشی از آسیب غشای اسپرم در اثر پراکسیداسیون لیپید در هنگام انجماد می باشد [۱۳]. اختلاف گونه ها در حساسیت اسپرم به سرد سازی، یخ زدن، و یخ گشایی به میزان زیادی به محتوی اسیدهای چرب بلند زنجیر غیر اشباع غشای پلاسمایی اسپرم نسبت داده می شود، که به پراکسیداسیون لیپید به دلیل وجود اشکال فعال اکسیژن (از قبیل رادیکالهای هیدروپراکسید، آلکوکسیل، پراکسیل) حساس بوده و کاهش کیفیت اسپرم را به دنبال خواهد داشت. فرایند انجماد

باعث افزایش غلظت اشکال فعال اکسیژن می گردد، به ویژه زمانی که اسپرم ها تغییر شکل داده یا می میرند. پراکسیداسیون لیپید زمانی آغاز می گردد که اسپرم توسط اشکال فعال اکسیژن مورد حمله قرار گیرد که نتایج آن از دست دادن اسید های چرب غیر اشباع بلند زنجیر غشاء پلاسمایی و سپس، کاهش در زنده مانی و قابلیت باروری آن خواهد بود. روغن ماهی یکی از منابع مهم اسیدهای چرب بلند زنجیر امگا-۳ محسوب می شود. این روغن از بافتهای چرب بدن ماهی گرفته می شود [۱۴ ، ۱۵و۷۶]. مطالعاتی در رابطه با استفاده از این روغن برای بهبود ویژگیهای منی صورت گرفته است. کوکت و همکاران (۲۰۰۸) افزودن روغن ماهی به رقیق کننده را و روک (۲۰۰۱) و دولت پناه و همکاران (۲۰۰۸) نیز استفاده از این منبع اسید چرب در جیره را بهبود پارامترهای کیفی منی گزارش کرده اند. اسپرماتوزوآ شبیه تمام سلول های زنده تحت شرایط هوازی برای زندگی به اکسیژن نیازمند است اما متابولیسم اکسیداتیو مولکولهای زیستی می توانند قابلیت سمی شدن داشته باشند، زیرا میزان بالایی از اشکال فعال اکسیژن تولید گشته که می تواند عملکرد سلول را تحت تاثیر قرار دهد [۱۲]. آنتی اکسیدانها مولکول هایی هستند که در غشاهای سلولی واقع شده اند و قادرند اکسیداسیون مولکولهای دیگر را کند یا متوقف سازند [۳۴ و ۳۵ و ۴۳]. اگر چه واکنش های اکسیداسیون برای زندگی ضروری هستند ولی می توانند آسیب رسان نیز باشند از این رو گیاهان و حیوانات از سیستمهای پیچیده ای از انواع چندگانه آنتی اکسیدان ها نگهداری می کنند که شامل گلوتاتیون، ویتامین C، ویتامین E و به همان اندازه آنزیم هایی مانند کاتالاز، سوپر اکسیداز دیسموتاز و پراکسیدازهای مختلف می باشند. سطوح پایین آنتی اکسیدانها یا بازدارندگی آنزیم های آنتی اکسیدان باعث استرس اکسیداتیو می شود که ممکن است به سلولها آسیب رسانده و باعث مرگ آنها گردد [۳۴ و ۴۳]. ویتامین E یک اصطلاح عمومی برای توکوفرولها و توکوترینولها می باشد. این ویتامین از خانواده آلفا، بتا، گاما و دلتا توکوفرول هاست و به عنوان یک ویتامین محلول در چربی محسوب می شود که اسیدهای چرب را از آسیب ناشی از پراکسیداتیو در سلول های بدن از طریق برداشت واسطه های رادیکال های آزاد محافظت کرده و از تخریب بافتهای بدن جلوگیری می کند. تاکنون بیشترین مطالعات درباره استفاده از مکمل ویتامین E فقط استفاده از آلفاتوکوفرول سنتتیک می باشد [۴۳ و ۴۵]. مطالعات متعددی اثرات سودمند اضافه کردن توکوفرول به محیط رقیق کننده در تعدادی از گونه ها از جمله اسب و بوقلمون را گزارش کرده اند. همچنین اضافه کردن ویتامین E به رقیق کننده تریس- زرده تخم مرغ، جنبایی، جنبایی پیشرونده، سلامت غشای پلاسمایی و DNA اسپرم یخ زده- یخ گشایی شده گربه را بهبود بخشید [۵ و ۷۲].

ال- کارنیتین (۳- هیدروکسی-۴ – N – تری متیل آمینوبوتیرات) ماهیتاً اسیدآمینه ای ضروری می باشد که نقشی مهم به عنوان کوفاکتور در تولید انرژی سلولی در ماتریکس میتوکندری بازی می- کند. این ماده به دو شکل ایزومر L و D موجود بوده که از لحاظ بیولوژیکی فرم L فعال می باشد.

سنتز این ماده از طریق لیزین و متیونین تنظیم می گردد. ال- کارنیتین در انتقال گروههای اسیل فعال شده به غشای داخلی میتوکندری نقش دارد و برای بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب بلند زنجیر در میتوکندری همه سلول ها مورد نیاز است. اخیرا مشخص شده است که غلظت ال- کارنیتین در پلاسمای منی با کیفیت منی مرتبط می باشد [۲۳ و ۵۶]. ال- کارنیتین از غشاهای سلولی در برابر اکسیداتیو محافظت می نماید این ماده از طریق انتشار غیر فعال به اسپرم وارد می گردد و منجر به تولید انرژی متابولیکی مورد نیاز سلول های اسپرم برای حرکت پیشرونده آنها می شود [۲۳ ، ۲۹ ، ۳۶ ، ۴۴ و ۷۴]. در مطالعه ای که توسط کامپانیلو (۱۹۸۹) انجام گرفت مشخص گردید که استعمال ال- کارنیتین در انسان می تواند روی کیفیت اسپرم به ویژه جنبایی آن تاثیر مثبت داشته باشد. استعمال آن در خروس باعث افزایش غلظت اسپرم و کاهش پراکسیداسیون لیپید گشته است و نشان داده اند که در خوک ها باعث بهبود خصوصیات منی شده است [۱۸ و ۶۳]. همچنین گزارش کرده- اند که استفاده از ال- کارنیتین در جیره بزهای مرخز موجب بهبود درصد جنبایی اسپرم پس از انجماد شده است [۳]. از آنجائیکه انجماد منی بز با وجود پلاسمای منی به دلیل اثر متقابل آن با زرده تخم مرغ و ایجاد مواد سمی برای اسپرم دارای مشکلاتی می باشد، از همین رو گرایش زیادی در بین دانشمندان برای استفاده از تکنیک‌های جدید جهت افزایش کیفیت اسپرم بز پس از یخ‌گشائی وجود دارد. تاکنون مطالعاتی در رابطه با استفاده از روغن ماهی، ال- کارنیتین و ویتامین E در رقیق کننده های منی بز صورت نگرفته است. با توجه به تاثیر مثبت این مواد بر روی جنبایی، زنده مانی و سلامت آکروزوم سلول اسپرم در مطالعات دولت پناه و همکاران (۲۰۰۸) و محبوب و همکاران (۱۳۸۹) بر روی بزهای مرخز و تحقیقات اتساحین و همکاران (۲۰۰۸) و یوسال و همکاران (۲۰۰۹) بر روی گونه های مختلف [۳، ۹، ۲۵ و۶۰]، استفاده از آنها می تواند سودمند باشد. لذا هدف از این پژوهش، استفاده از ویتامین E و ال- کارنیتین (منابع آنتی اکسیدان) و روغن ماهی (منبع اسیدهای چرب امگا-۳) در غلظت های ۰/۵ میلی گرم در هر میلی لیتر رقیق کننده پایه برای انجماد اسپرم بز مرخز می باشد.

فصل اول

مرور منابع (پیشینه پژوهش ها)

۱-۱- انجماد[1]

انجماد اسپرم یکی از روشهای بیوتکنولوژی می باشد که در جهت حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی و نیز گسترش تجارت ژن استفاده شده و از اهمیت بالایی بر خوردار است. این تکنیک، بخصوص در شرایط بحرانی می تواند نقش بسزایی داشته باشد. زنده مانی اسپرم بعد از انجماد و یخ گشایی به عوامل مختلفی از قبیل تکنیک انجماد، ترکیب رقیق کننده ها[2]، رقیق کردن، سرعت کاهش دما و روش یخ گشایی بستگی دارد. لذا انجماد بر روی سلامتی غشاء اسپرم تاثیر می گذارد [۱۴ ،۱۵ ، ۲۱ ، ۲۲ و ۲۷]. انجماد اسپرم باعث انتشار گسترده مواد ژنتیکی ارزشمند حتی در گله های کوچک به منظور تلقیح مصنوعی می گردد که افزایش میزان سود ژنتیکی را در بر خواهد داشت. انجماد و یخ- گشایی اسپرم مرتبط با کاهش جنبایی سلول، زنده مانی و ظرفیت باروری می باشد [۹]. به طوری که در بسیاری از گونه ها در طول فرایند انجماد، ۵۰٪ از زنده مانی اسپرم از دست رفته، که نشانی از آسیب غشاء پلاسمایی اسپرم در این گونه ها در طول انجماد و یخ گشایی می باشد [۴].

فرایند انجماد موجب استرس فیزیکی و شیمیایی بر روی غشاء اسپرم شده و در نتیجه باعث کاهش زنده مانی و قابلیت باروری اسپرم می گردد [۱۷ و ۶۰]. یوسال و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کرده اند که اسپرم یخ زده- یخ گشایی شده قوچ در زمان انجماد آسیب جدی می بیند، بنابراین به میزان بالایی ظرفیت باروری آن کاهش می یابد. بعلاوه ثابت شده است که انجماد روی قسمتهای مختلف سلول اسپرم از جمله میتوکندری، ایجاد واکنش آکروزومی[3] و کاهش استحکام کروماتین اسپرم اثر می گذارد [۳۲و۶۰].

۱- ۱- ۱- اهمیت نگهداری منی منجمد

وقتی که منی منجمد شده و در ۱۹۶- درجه سانتیگراد ازت مایع نگهداری شود، واکنش های متابولیکی اسپرماتوزوآ کاملا متوقف می شود. این کار، امکان نگهداری منی برای مدت طولانی، در نتیجه ذخیره ژنها برای استفاده آینده و تضمین در مقابل از دست دادن نرهای منحصر به فرد را امکان پذیر می نماید. همچنین حمل و نقل داخلی و بین المللی منی آسان شده و می توان آن را خارج از

[1] - Cryopreservation
[2]- Diluents
[3] - Acrosome Reaction

دوره تولیدمثل[1]، جمع آوری و ذخیره نمود. در نتیجه وقتی کـه منـی بـصورت منجمـد ذخیـره شـود، استفاده از نرها، گسترش خیلی زیادی می یابد [۲۸].

۱-۲- فیزیولوژی منی

منی آمیزه ای از سلولهای اسپرم و مایعی به نام پلاسمای منی می باشد. اسـپرم هـا در لولـه هـای اسپرم ساز ساخته می شوند و مایع منی، آمیزه ای از تراوش های غده های تناسلی پیوست اسـت کـه در اصل بوسیله غدد وزیکول سمینال و با مشارکت کمتر قسمت هایی مثـل بیـضه هـا، جنـب بیـضه، مجرای وابران و دیگر غدد ضمیمه ترشح شده، می باشد. مایع منی دارای سـه فعالیـت اساسـی مـی- باشد:

۱- به عنوان وسیله نقلیه اسپرماتوزوآ، در خلال انزال آنها را از دستگاه تناسلی جابجا می کند.

۲- به عنوان یک محیط فعالیتی جهت نگهداری اسپرماتوزوآهای غیر متحرک قبلی عمل می کند.

۳- محیط بافری و محیط غنی غذایی برای کمک به حیات اسپرماتوزوآ بعد از تخلیه شدن در دستگاه تناسلی حیوان ماده را فراهم می کند.

مایع منی بزهای نر غالبا ممکن است رنگ زرد داشته باشد که به احتمال زیاد ناشی از ریبوفلاوین ترشح شده بوسیله غدد ویزیکول سمینال می باشد. ماده اصلی مایع منی دارای ۷۵٪ آب بوده، ولی دارای مواد آلی و معدنی متعددی بوده که حفاظت و نگهداری اسپرماتوزوآ را به عهده دارند. مایع منی معمولا مایعی خنثی و ایزوتونیک می باشد و PH آن بوسیله سیستم بافری نزدیک به درجه ۷ نگهداری می شود. ویژگی مشخص مایع منی بز نر داشتن آنزیمی(فسفولیپازA) است که از غده کوپر ترشح می شود وقتی که محیط رقیق کننده منی محتوی زرده تخم مرغ باشد این آنزیم می تواند باعث از بین رفتن لیستین زرده تخم مرغ شده و در نتیجه محیط سمی برای اسپرماتوزوآ تولید نماید. این کار باعث دلمه ای شدن محیط رقیق کننده می گردد. و به همین دلیل این آنزیم را آنزیم لخته کننده یا دلمه ای کردن زرده تخم مرغ[2] می گویند [۲ ، ۲۸ و۵۸].

۱- ۳- غشای پلاسمایی اسپرم

غشای پلاسمایی اسپرم، غیر متجانس بوده و دارای ۵ بخش ویژه به نام هـای: آکـروزوم ، بخـش استوایی، بخش اصلی، ناحیه قطعه میانی و دم می باشد. تفاوت بین این نـواحی، مـرتبط بـا عملکـرد فیزیولوژیکی مختلف آنها می باشد. قبل و بعد از انزال غشای پلاسمایی متحمل چنـدین تغییـر مـی- گردد که می تواند تغییر درجه اشباع اسیدهای چرب و در نریان ها کاهش کلـسترول کـه نتیجـه اش

[1]- Reproduction
[2]- Egg Yolk Coagulation Enzyme

کاهش مشخصی در نسبت کلسترول به فسفولیپید بوده باشد [۱۰ و۱۶]. سلامت غشاء پلاسمایی برای زنده مانی و قابلیت باروری اسپرم ضروری می باشد [۴۸ و ۵۵]. بنابراین برای یک باروری موفقیت آمیز، سلول اسپرم باید با یک آکروزوم سالم نگهداری شود تا بتواند به زوناپلوسیدای تخمک متصل گردد و متحمل واکنش آکروزومی برای آزادسازی آنزیم های آکروزوم گردد [۴۸]. از دست دادن سلامتی غشاء می تواند منجر به افزایش نفوذپذیری غشاء و از دست رفتن توانایی آن در تنظیم غلظت های داخل سلولی یون هایی که در کنترل تحرک اسپرم دخالت دارند، شود [۱۲]. در تغییرات سلامت غشاء پلاسمایی، جریان یونها در داخل و خارج غشاء تغییر می کند. تعادل درست یونی برای تولید ATP[1] میتوکندریایی ضروری است. به علاوه تولید انرژی ATP در اطراف میتوکندری[2] یک فرایند وابسته به غشاء می باشد. هر گونه آسیب یا تغییر در غشاهای سلولی می تواند اثرات منفی روی تولید ATP در میتوکندری بگذارد. بدون انرژی کافی ATP ، اسپرم تحرک پیشرونده ندارد [۱۳].

۱- ۳- ۱ – لیپیدهای غشاء پلاسمایی اسپرم

در غشای اسپرم پستانداران و غیر پستانداران، اسیدهای چرب طبیعی، کلسترول، فسفولیپیدها (اساسا" لسیتین، سفالین و اسفنگو میلین) و گلیکولیپیدها موجود می باشند. کلسترول آزاد و فسفولیپیدها در حدود ۸۰٪ از لیپید های اسپرم را تشکیل می دهند [۲۵]. در طول مطالعاتی که بر روی بیوشیمی اسپرم پستانداران و غیر پستانداران صورت گرفت، وجود اسیدهای چرب طبیعی، کلسترول، فسفولیپیدها و گلیکو لیپیدها ثابت شده است. نمونه واقعی از ساختار لیپید در اسپرم انزال شده، فقط بعد از بلوغ در اپیدیدیم به دست می آید، که اولین بار با بیضه قوچ و اسپرم انزال شده ثابت گردید. بازسازی کامل ساختار غشاء، شامل پروتئین ها و لیپیدها در قوچ، خوک گینه ای و خرگوش در طول عبور از سر اپیدیدیم مشاهده شده است. آنالیز نمونه های اسیدچرب، فسفولیپیدهای غشاء و پلاسمالوژن[3] اسپرم انسانی، سطوح معنی داری از اسیدهای چرب غیر اشباع را ثابت کرده است [۴۲]. ترکیب لیپید غشای پلاسمایی اسپرم پستانداران به طور قابل ملاحظه ای با دیگر سلول های سوماتیک پستانداران اختلاف دارد. سلول های اسپرم شامل میزان بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر است [۱۹ ، ۲۱ و ۵۴]. ترکیب لیپید غشای پلاسمایی اسپرم تاثیر معنی داری روی خصوصیات عملکردی اسپرم دارد [۴ ، ۹ و ۶۱]. فسفولیپیدهای غشاء پلاسمایی اسپرم پستانداران از لحاظ خصوصیات شامل بخشهای بسیار بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر

به ویژه سری امگا – ۳ می باشند. در بیشتر پستانداران، اسید چرب غالب، دکوساهگزانوئیک اسید می باشد، اگر چه در چندین گونه، آیکوساپنتانوئیک اسید اغلب یک ترکیب مهم از غشاهای سلولی

[1]- Adnosine Triphosphate
[2]- Mitochondria
[3] - Plasmalogen

منی می باشد [۲۵]. نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع به اشباع در غشای اسپرم نشخوارکنندگان کوچک نسبت به دیگر گونه ها بیشتر است، که در این شرایط غشاها حساسیت بیشتری به آسیب پراکسیداتیو در حضور اشکال فعال اکسیژن خواهند داشت [۲۱و۵۴]. روک و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند ارتباط مثبت معنی داری بین فسفولیپیدهای (22:6(n-3 و غلظت هایی از اسپرماتوزوآ با مورفولوژی نرمال وجود دارد [۶۳]. کاهش محتوی اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر، تعداد اسپرم، تحرک، و ظرفیت باروری اسپرم را در پرندگان و پستانداران کاهش داد [۲۵]. به نظر می رسد اسیدهای چرب نقش مهمی در متابولیسم اسپرم بازی می کنند [۵۳]. منشا داخلی اسیدهای چرب از فسفولیپیدهای پلاسموژنیک به وجود می آید، برای مثال نشان داده اند که نگهداری تنفس اسپرم گاوی در عدم سوبستراهای گلیکوژنیک و اسیدهای چرب اگزوژن، از طریق اکسیده شدن فسفولیپیدهای پلاسموژنیک توسط اسپرم صورت می گیرد [۵۴].

۱- ۴ – مکانیسم های عمومی لیپوپراکسیداسیون[1] و اشکال فعال اکسیژن

تغییرات در ساختمان لیپید غشاء، شرط اصلی برای آسیب شناسی اسپرم در بسیاری از بیماریهای جنسی می باشد. در حقیقت اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر و کلسترول، آماج اصلی برای رادیکال های آزاد بوده و رابطه عکس بین پراکسیداسیون لیپید و تحرک اسپرم به طور روشن مشخص شده است [۴۲]. رادیکال های آزاد به صورت مولکول هایی با الکترون های غیر جفت شده می باشند که فورا با دیگر رادیکال های آزاد یا غیر رادیکالها واکنش می دهند [۴۲]. بر طبق یافته-های تریولانینگسی و همکاران (۲۰۰۸) رادیکال های آزاد اتم ها یا مولکول های بسیار ناپایداری هستند که از یک یا تعداد بیشتری الکترون های جفت شده عبور نموده بنابراین الکترون های جفت نشده بیشتری به وجود می آید. این ترکیبات با دیگر اتم ها یا مولکول ها مانند اسیدهای چرب غیر-اشباع، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و یا لیپوپلی ساکاریدها واکنش می دهند. اثرات منفی پراکسیداسیون لیپید روی سلول های سوماتیک، بازدارندگی اکسیداتیو و متابولیسم گلیکولیز، تجزیه اریتروسایتها، اکسیداسیون سولفییدریل و جلوگیری از عمل آنزیم SH (سولفیدریل پراکسیداز)، تعدیل پروتئین ها و اسیدهای آمینه، آسیب های غشایی و غیر فعال کردن باندهای آنزیم های غشایی می باشد [۷۳]. یکی از تغییرات اصلی در طول انجماد اسپرم افزایش حساسیت به اشکال فعال اکسیژن بوده که در پراکسیداسیون لیپید شرکت می کنند. بیشترین اشکال فعال اکسیژن، یون سوپراکسید[2]، پراکسید هیدروژن، رادیکال های پراکسیل، رادیکالهای هیدروکسیل، اکسید نیتریک و یون پراکسی نیتریت هستند. در آسیب شناسی اسپرم توجه ویژه ای به رادیکال های اکسیژن شده است. این اشکال می توانند باعث تغییرات در غشای پلاسمایی، کاهش تحرک و قابلیت باروری

[1]- Lipoperoxidation
[2]- Superoxid

اسپرم گردند [۴۱و۴۲]. مولکول اکسیژن، دارای دو الکترون آزاد غیر جفت شده بوده که دارای چرخش موازی و تعدادی کوانتوم یکسان می باشد. بنابراین نتیجه احیا تک الکترون، تولید رادیکال های یونی سوپراکسید می باشد. در سلول های هوازی بیشترین منابع مهم از یون سوپراکسید، زنجیر های انتقال الکترون از میتوکندری و شبکه رتیکولوم آندوپلاسمی، میکروزوم ها و غشای پلاسمایی می باشد. برای هر چهار الکترون تغذیه شده در داخل کمپلکس سیتوکروم اکسیداز، مولکول اکسیژن به دو ملکول آب احیا می شود. در محیط کوچکی از غشاهای سلولی، تشکیل رادیکال های هیدروکسی پروکسیل از رادیکال های یونی سوپر اکسید مطلوب می باشد. رادیکال مذکور یکی از اکسیدانهای بسیار قوی است که ممکن است از سوپر اکسیدانهای فسفولیپیدهای غشاء فراوان تر باشد، این رادیکال قادر است اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر را پر اکسید کرده و باعث شروع واکنش های زنجیره ای گردد. پر اکسید هیدروژن نیز یکی از با ثبات ترین واسطه های احیاء اکسیژن است که در طول احیاء یک ظرفیتی اکسیژن تولید گردیده و می تواند در فرایندهای التهاب زا دخالت داشته باشد [۴۲]. اشکال فعال اکسیژن [۶ ، ۷ ، ۵۴ و ۷۳] در انزال از طریق اسپرم و به وسیله لوکوسیتهایی که در منی غیر فیلتر شده یافت می شود تولید می گردد. این مواد می توانند موجب پراکسیداسیون لیپید و جلوگیری از تحرک اسپرم، آسیب پروتئین و اسید نوکلئیک [۵۴ و ۷۲] شوند که ممکن است منجر به آپوپتوزیس و مرگ سلول گردد. اشکال فعال اکسیژن در حالت عادی در اعمال جنبشی اسپرم و به همان اندازه در ظرفیت پذیری و فرایندهای فعالیت زا از طریق تحریک داخل سلولی تولید cAMP[1] و فسفوریلاسیون تیروزین دخیل می باشند. زمانی که اشکال فعال اکسیژن در غلظت های اندک پیدا شود به عنوان میانجی های عملکرد اسپرم های سالم عمل می نمایند ولی در صورتیکه به میزان زیادی تولید گردند، سم زیادی را به سلول وارد می نمایند [۱۳]. اسیدهای چرب برای نگهداری عملکرد نرمال اسپرم و اسپرماتوزوآهایی که قادر به سنتز ترکیبات غشاهایشان نیستند ضروری می باشند. اشکال فعال اکسیژن می توانند به طور غیر مستقیم از طریق کاهش دفاع آنزیمی، استرس اکسیداتیو[2] تولید کنند. مکانیسم های اکسیداتیو نقش کلیدی در کنترل فیزیولوژیکی عملکرد اسپرم پستانداران بازی می کنند. مقادیر کوچکی ازاشکال فعال اکسیژن به منظور حصول توانایی باروری اسپرم ضروریند [۴۹]. به گونه ای که تولید غلظت های پایینی از پراکسید هیدروژن و یون سوپر اکسید ممکن است نقش عملکردی در کنترل وقایع سیگنالی ظرفیت پذیری و ترکیب اووسیت- اسپرم داشته باشد [۱۲]. توانایی برای تولید اشکال فعال اکسیژن در اسپرم های غیر نرمال افزایش می یابد، به ویژه در سلول هایی که دارای سیتوپلاسم باقیمانده می باشند. اسپرم های با قطرات سیتوپلاسمی محتوی میزان بالایی از آنزیم های سیتوپلاسمی شامل گلوکز- ۶-

[1]- Adnosine Monophosphate
[2]- Oxidative Stress

فسفات دی هیدروژناز می باشند. این آنزیم مسئول جریان گلوکز به واسطه تغییر جهت منوفسفات تک قندی به هگزوز و تولید کمکی NADPH[1] می باشد. گفته می شود که NADPH تولید شده از طریق این سیستم به عنوان منبع اصلی الکترون های مسئول، در تولید یون سوپر اکسید توسط اسپرم انسان نقش دارد. در نتیجه پراکسیداسیون لیپید، غشای پلاسمایی اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیر خود را ازدست داده وتولید پر اکسید هیدروژن[2]، آلکوکسیل و رادیکال های پر اکسیل می کند. این رادیکال ها واکنش زنجیره ای پر اکسیداسیون لیپید را پیشرفت داده و نهایتا منجر به تولید سیتوتوکسیک آلدوئیدها مانند مالون دیالدهید و ۴- هیدروکسی نونانول می گردند [۱۲ ، ۶۰ و ۶۱].

۱- ۴- ۱- سیستم های آنزیمی و غیر آنزیمی پلاسمای منی

پلاسمای منی[3] شامل ۳ سیستم حفاظت کننده آنزیمی در برابر آسیب ناشی از اشکال فعال اکسیژن می باشد. این سیستم ها عبارتند از سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز/ سیستم ردوکتاز [۱۲ ، ۴۲ و ۴۹] می باشد. همچنین غلظت های معنی داری از آنتی اکسیدانتهای شیمیایی مانند اسید آسکوربیک، توکوفرول یا ویتامین E ، گلوتاتیون احیا شده [۱۲و۴۲]، آلبومین، تائورین و هیپوتائورین نیز در پلاسمای منی وجود دارند که به عنوان سیستم های غیر آنزیمی شناخته می شوند [۱۷]. در شرایط آزمایشگاهی، پلاسمای منی به طور معنی داری زیان حاصل از اکسیداسیون رادیکال آزاد آهن کاتالیز شده را کاهش می دهد. درشرایط بدن، همبستگی بین سوپر اکسید دیسموتاز در مایع منی و تحرک سلول اسپرم گزارش شده است [۴۲].

۱- ۵- رقیق کننده ها و نقش آنها در انجماد

رقیق کننده های مورد استفاده برای انجماد منی بز باید دارای خصوصیات مشابه با رقیق کننده-هایی باشند که برای منی تازه استفاده می شوند، یعنی دارای خاصیت بافری در مقابل تغییرات PH بوده و دارای منبع انرژی باشند [۲۸]. به علاوه آنها باید دارای عوامل محافظت کننده (زرده تخم مرغ) غشای سلولی درخلال سرد کردن تا ۵ درجه سانتیگراد و در خلال یخ زدن (معمولا گلیسرول) باشند [۲۸]. نتایج نشان داده که اضافه کردن تخم مرغ به رقیق کننده، نقش حفاظت کنندگی در طول مرحله انجماد اسپرم بز دارد [۲۶ ، ۲۸ و۵۸]. زرده تخم مرغ ترکیبی رایج از رقیق کننده ها برای سردسازی و انجماد منی در گونه های مختلف در طول ۶۰ سال گذشته می باشد. نشان داده اند که زرده تخم مرغ از آسیب سلول اسپرم در طول فرایندهای سرد سازی و انجماد جلوگیری می کند و همچنین دارای اثرات حفاظتی در برابر عوامل تعیین کننده محیطی مانند تغییرات PH و فشار اسمزی یا

[1]- Nicotinamide Adenine Dinucleotide
[2]- Hydrogen Peroxide
[3]- Semen Plasma