



موسسه تحقیقات علوم دینی



سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

استفاده از فناوری‌های تولید مثلی در پرورش گوسفند

جلد چهارم

انجماد و ارزیابی کیفیت اسپرم

نویسندگان

رضا مسعودی - فاطمه زارعی - نادر اسدزاده

۱۴۰۰

سرشناسه	: مسعودی، رضا، ۱۳۶۴.
عنوان و نام پدیدآور	: استفاده از فناوری‌های تولیدمثلی در پرورش گوسفند/ نویسندگان رضا مسعودی، فاطمه زارعی، نادر اسدزاده، همکار مجید توکلی؛ تهیه‌شده در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، دفتر شبکه دانش و رسانه‌های ترویجی.
مشخصات نشر	: تهران: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، معاونت آموزش و ترویج کشاورزی، نشر آموزش کشاورزی، ۱۴۰۰.
مشخصات ظاهری	: ۴ج: مصور (بخشی‌رنگی)، جدول، نمودار.
شابک	: ج ۱: ۹۷۸-۶۲۲-۷۹۴۹-۵۸-۲؛ ج ۲: ۹۷۸-۶۲۲-۷۹۴۹-۵۵-۱؛ ج ۳: ۹۷۸-۶۲۲-۷۹۴۹-۵۷-۵؛ ج ۴: ۹۷۸-۶۲۲-۷۹۴۹-۵۶-۸.
وضعیت فهرست نویسی	: فیبا
یادداشت	: کتابنامه
مندرجات	: ج ۱: همزمان سازی فحلی و تخمک‌ریزی. ج ۲: تلقیح مصنوعی. ج ۳: سونوگرافی. ج ۴: انجماد و ارزیابی کیفیت اسپرم.
موضوع	: گوسفندها — تولید مثل
موضوع	: Sheep — Reproduction
شناسه افزوده	: زارعی، فاطمه، ۱۳۶۳.
شناسه افزوده	: اسدزاده، نادر، ۱۳۴۸.
شناسه افزوده	: توکلی، مجید، ۱۳۵۷. همکار
شناسه افزوده	: موسسه تحقیقات علوم دامی کشور. دفتر شبکه دانش و رسانه‌های ترویجی
شناسه افزوده	: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. معاونت آموزش و ترویج کشاورزی. نشر آموزش کشاورزی
رده‌بندی کنگره	: SF ۷۶۸۲
رده‌بندی دیویی	: ۶۳۶/۳۰۸۹۲۶
شماره کتابشناسی ملی	: ۸۷۶۵۴۶۹
اطلاعات رکورد کتابشناسی	: فیبا

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۷۹۴۹-۵۶-۸

ISBN:978-622-7949-56-8

عنوان: استفاده از فناوری‌های تولیدمثلی در پرورش گوسفند

جلد چهارم انجماد و ارزیابی کیفیت اسپرم

نویسندگان: رضا مسعودی، فاطمه زارعی و نادر اسدزاده

صفحه آرایی: استودیو آرنگ

مدیر داخلی: ویدا همتی

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور - دفتر شبکه دانش و رسانه‌های ترویجی

ناشر: نشر آموزش کشاورزی

شمارگان: ۱۰۰۰

نوبت چاپ: اول / ۱۴۰۰

قیمت: ۱۰۰۰۰ تومان

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز فن آوری اطلاعات و اطلاع رسانی کشاورزی ۶۰۳۱۲ به تاریخ ۱۴۰۰/۰۷/۰۶ است.

نشانی: تهران، بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، پلاک ۱ و ۲، معاونت ترویج،

صندوق پستی: ۱۱۱۳ - ۱۹۳۹۵، تلفکس: ۲۲۴۱۳۹۲۳ - ۰۲۱



تقدیم بہ روح آسمانی استاد فرہیختہ

دکتر حمید کرام

کہ الفبای علم فیزیولوژی تولید مثل را از او آموختیم

فهرست مطالب

مقدمه.....	۳
فصل اول: تاریخچه انجماد اسپرم.....	۹
فصل دوم: مکانیسم انجماد، مزایا و محدودیت‌ها.....	۱۵
فصل سوم: روش‌های انجماد اسپرم.....	۲۵
فصل چهارم: رقیق‌کننده‌ها و حفاظت‌کننده‌های انجمادی.....	۳۵
فصل پنجم: ارزیابی کیفیت اسپرم پیش از انجماد.....	۵۱
فصل ششم: مراحل انجماد اسپرم گوسفند.....	۷۳
فصل هفتم: ارزیابی کیفیت اسپرم پس از انجماد.....	۸۷
منابع.....	۱۲۱



پرورش گوسفند در ایران دارای قدمتی طولانی است، اما بازده تولید مثلی در اغلب اکوتیپ‌های گوسفند در کشور ما به جهت پایین بودن نرخ چندقلوزایی و عدم استفاده بهینه از فناوری‌های نوین تولید مثلی پایین بوده و در شرایطی حتی موجب عدم صرفه اقتصادی پرورش گوسفند شده است. یکی از مهم‌ترین فناوری‌ها جهت افزایش کارایی تولید مثل، تلقیح مصنوعی می‌باشد. از جمله مزایای تلقیح مصنوعی می‌توان به بهبود بهداشت گله، افزایش ایمنی در گله، کاهش هزینه‌های نگهداری حیوانات نر، آسان‌تر شدن ورود ژنوم جدید، افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی در گله و افزایش تولید حیواناتی با توان تولیدی بالاتر اشاره نمود. با وجود آنکه تلقیح مصنوعی در گوسفند با اسپرم تازه و منجمد قابل انجام است، اما با توجه به محدودیت‌هایی از قبیل کمبود قوچ با ویژگی‌های خاص در گله، دشواری همزمان‌سازی اسپرم‌گیری و تلقیح در گله، عدم امکان استفاده مفید از قوچ‌های برتر در سطح وسیع‌تر و محدودیت در حمل و نقل اسپرم، تلقیح با اسپرم تازه با مشکلاتی همراه است. بنابراین برای غلبه بر این مشکلات باید از اسپرم منجمد استفاده نمود. از جمله مزایای انجماد اسپرم، ذخیره بلند مدت اسپرم، امکان انتقال آن به نقاط مختلف و ذخیره

اسپرم قوچ‌های برتر می‌باشد. در فرایند انجماد دمای سلول به زیر صفر درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد. تنش‌های شیمیایی، اسمزی و مکانیکی در طول فرایند انجماد اسپرم موجب بروز تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عملکردی در آن شده که در نتیجه زنده‌مانی و باروری اسپرم بعد از انجماد و یخ‌گشایی تحت تاثیر قرار می‌گیرد و درصد اسپرم زنده کاهش می‌یابد؛ بنابراین باروری پایین از مشکلات کار با اسپرم منجمد است. تکنیک انجماد اسپرم در طول چند دهه اخیر پیشرفت چشمگیری داشته است. اما علی‌رغم پیشرفت‌های انجام شده در زمینه افزایش بهره‌دهی و اصلاح راندمان تولید مثل گوسفند، این تکنیک در صنعت پرورش گوسفند و متناسب با نیاز به افزایش تولیدات دامی توسعه نیافته است. برای پیشرفت در این زمینه باید دانش ما درباره اصول و روش‌های مختلف انجماد و انواع رقیق‌کننده‌ها و افزودنی‌های انجمادی مناسب افزایش یابد؛ به این منظور در دستنامه حاضر روش‌های مختلف انجماد و ارزیابی تغییرات اسپرم در طول فرایند انجماد و یخ‌گشایی مورد بررسی قرار گرفته است.

فصل اول

تاریخچه انجماد اسپرم



تاریخچه انجماد اسپرم گوسفند

تلقیح مصنوعی در گوسفند و گاو در ابتدای قرن بیستم (۱۹۱۲-۱۹۰۷) برای اولین بار توسط ایوانوف روسی با مطالعه بر روی رقیق‌کننده‌ها و روش‌های رقیق‌سازی آغاز گردید که منجر به کاربرد آزمایشی تلقیح مصنوعی در گوسفند شد. بعد از جنگ جهانی اول و در اوایل سال ۱۹۳۰ در شوروی، میلوانوف تلقیح مصنوعی را با استفاده از منی تازه و رقیق‌شده قوچ‌های با نژاد برتر و با هدف تولید انبوه گوسفندان پایه‌گذاری کرد.

مطالعات اولیه بر روی اثرات دمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد بر روی زنده‌مانی اسپرم متعلق به فیزیولوژیست ایتالیایی به نام اسپالانزایی (۱۷۸۰) است. وی ویال‌های حاوی منی پستانداران را در برف قرار داد و بعد از ذوب در دمای اتاق توانست اسپرم‌های زنده را مشاهده نماید. برنستین در سال ۱۹۳۷ با استفاده از گلیسرول و در دمای ۲۱- درجه سانتی‌گراد موفق به انجماد اسپرم پستانداران از جمله گوسفند و پرندگان اهلی شد. در ادامه موفقیت پژوهشگران در انجماد اسپرم پستانداران، مطالعات مختلف نشان داد که محلول یک مولار گلیسرول می‌تواند محافظ خوبی برای اسپرم پستانداران (خرگوش، خوک، گاو، قوچ و اسب) در فرآیند انجماد و یخ‌گشایی باشد. کشف خصوصیات

حفاظتی گلیسرول پیشرفت عظیمی در تکنیک انجماد اسپرم پستانداران بوجود آورد که در پی آن آزمایش‌های متعددی را در خصوص انجماد اسپرم گوسفند به همراه داشت. بعد از آنکه ایمنس و همکاران در سال ۱۹۵۰ توانستند انجماد اسپرم گوسفند را با استفاده از گلیسرول در محیط رقیق‌کننده انجام دهند، تا امروز مطالعات بسیاری در زمینه بهبود روش‌های انجماد اسپرم گوسفند از جمله ذخیره‌سازی انجمادی منی گوسفند با انواع رقیق‌کننده‌ها، روش‌های انجماد و یخ‌گشایی، انواع صدمات انجمادی و اثرات آن بر باروری انجام شده است.

قدیمی‌ترین منی منجمد گوسفند

دکتر استیون سالامون استاد دانشگاه سیدنی در سال ۱۹۶۸ یک مخزن اسپرم منجمد از سه نژاد گوسفند پشمی معروف استرالیا شامل Merryville، Ledgworth و Boonoke تهیه نمود. هدف از اجرای پروژه مذکور بررسی امکان نگهداری اسپرم برای طولانی مدت در نیتروژن مایع بود. در سال ۲۰۱۸ به مناسبت پنجاهمین سال انجماد اسپرم‌ها و نیز یکصدمین سالگرد تولد دکتر سالامون، اسپرم‌ها یخ‌گشایی شده و بعد از بررسی فراسنجه‌هایی چون زنده‌مانی، تحرک و سلامت DNA، به گوسفند مرینو تلقیح شد. از ۵۶ راس میش تلقیح شده، ۳۴

راس معادل ۶۱ درصد میش‌ها آبستن شدند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایشات فراسنجه‌های حرکتی، زنده‌مانی و سلامت DNA اسپرم ۵۰ ساله معادل اسپرم امروزی است که تنها ۱۲ ماه منجمد شده باشد. این نتایج نشان داد که ذخیره انجمادی طولانی مدت اسپرم روشی ایمن و قابل اعتماد برای حفاظت از ژن‌های برتر و استفاده از آن‌ها در توسعه صنعت دامپروری می‌باشد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- قوچ بونوک معروف به Sir Fred متولد ۱۹۵۹ یکی از گوسفندانی که در جمع‌آوری منی در سال ۱۹۶۸ مورد استفاده قرار گرفت



شکل ۲- دکتر سالامون در حال تلقیح مصنوعی سرویکال منی جمع‌آوری شده در سال ۱۹۶۸



فصل دوم

مکانیسم انجماد، مزایا و
محدودیت‌ها



علم انجماد

کرایوبیولوژی^۱ علم مطالعه تأثیر دمای پایین بر اشکال مختلف حیات است. اثر سرما بر موجودات زنده به دو شکل نابودی کامل آن‌ها و یا حفظ حیات است که هر دو اثر در طبیعت قابل مشاهده می‌باشد. مرگ در اثر انجماد رویدادی رایج در طوفان‌های زمستانی است؛ در حالی که در میان حیوانات خونسرد سرمای زمستان منجر به خواب زمستانی عمیق می‌شود. بر این اساس حفاظت انجمادی^۲ شاخه‌ای از علم کرایوبیولوژی است که به حفظ و نگهداری طولانی مدت سلول و بافت در دمای بسیار پایین، بدون از بین رفتن قابلیت زنده‌مانی آن‌ها می‌پردازد؛ به گونه‌ای که هر زمان سلول یا بافت یخ‌گشایی شود کمترین تغییر را متحمل شده باشد.

مکانیسم انجماد

مکانیسم انجماد بر این اصل استوار است که هرگاه آب موجود در سلول در اثر کاهش مناسب حرارت و توقف حرکات مولکولی به یخ تبدیل گردد، تقریباً تمام واکنش‌های بیولوژیکی و شیمیایی در سلول زنده به طور چشمگیری کاهش می‌یابد؛ نتیجه این فرایند پدیده‌ای است که می‌تواند منجر به حفظ طولانی مدت سلول‌ها و بافت‌ها شود. دمایی که این هدف

1- Cryobiology

2- Cryopreservation

را برای کرایوبیولوژیست فراهم می کند دمای ۱۹۶- درجه سانتی گراد نیتروژن مایع است. در این دما به دلیل عدم وجود انرژی حرارتی کافی و محیط آبی که برای انجام واکنش های شیمیایی ضروری است، اساسا هیچ فعالیت بیوشیمیایی رخ نمی دهد؛ با این حال انجماد برای اکثر موجودات زنده کشنده است. به منظور تحقق یک انجماد موفق باید بروز دو رخداد در روند انجماد به حداقل ممکن برسد. این رخدادها شامل شوک مکانیکی در اثر تشکیل کریستال یخ و شوک اسمزی در اثر پدیده اثر محلول می باشند که در ادامه به طور مختصر به بررسی این دو رخداد می پردازیم.

۱- تشکیل کریستال یخ و شوک مکانیکی

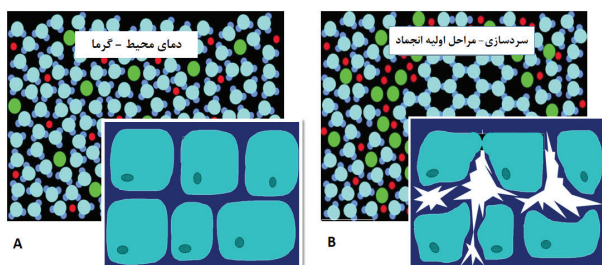
تشکیل کریستال یخ در روند انجماد به خواص فیزیکی و شیمیایی مولکول آب وابسته است. تبدیل حالت مایع به جامد در آب حاصل تجمع بیش از پیش مولکول های آب در کنار هم و تغییر پیوندهای هیدروژنی مولکل آب است که منجر به شکل گیری کریستال یخ می شود. این تغییر موجب افزایش فضای بین مولکول ها و در نتیجه کاهش دانسیته و وزن یخ نسبت به آب می شود. به این دلیل است که کریستال یخ نسبت به آب فضای بیشتری اشغال می کند. در نهایت با افزایش اندازه کریستال یخ و اعمال فشار بر دیواره سلولی موجب از هم گسیخته شدن آن می شود (شکل ۳).

۲- پدیده اثر محلول و شوک اسمزی

در روند انجماد تشکیل یخ در مایع خارج سلولی آغاز می‌شود. با افزایش تشکیل کریستال یخ و خروج آب از محیط خارج سلول، غلظت مواد نامحلول و الکترولیت‌ها در مایع اطراف سلول افزایش می‌یابد. در این حالت یک شیب غلظت در دو طرف دیواره سلول ایجاد می‌شود و آب در پاسخ به نیروی اسمزی از سلول خارج می‌شود. به این پدیده اثر محلول گفته می‌شود که منجر به بروز شوک اسمزی در سلول می‌شود. با ادامه این فرایند سلول تقریباً دهیدراته^۱ (آبگیری) و چروکیده^۲ می‌شود. دهیدراته شدن، سازمان‌دهی سلول و برهم‌کنش مولکولی وابسته به آب را بر هم می‌زند. برخی از اجزا داخل سلولی برای ممانعت از برهم‌کنش با یکدیگر به طور طبیعی از هم جدا نگه داشته می‌شوند، اما این اجزا در اثر چروکیدگی سلولی با یکدیگر تماس پیدا می‌کنند و تخریب می‌شوند (شکل ۳). برعکس این وضعیت در طول یخ‌گشایی سلول بروز می‌کند. با افزایش دما، آب از حالت کریستالی خارج شده و مایع می‌شود، در نتیجه محیط خارج سلول نسبت به داخل سلول رقیق شده و آب به شدت وارد سلول می‌شود. حاصل این پدیده، شوک اسمزی ناشی از آبگیری است که منجر به پاره شدن غشا سلول می‌شود.

1- Dehydration

2- Shrink



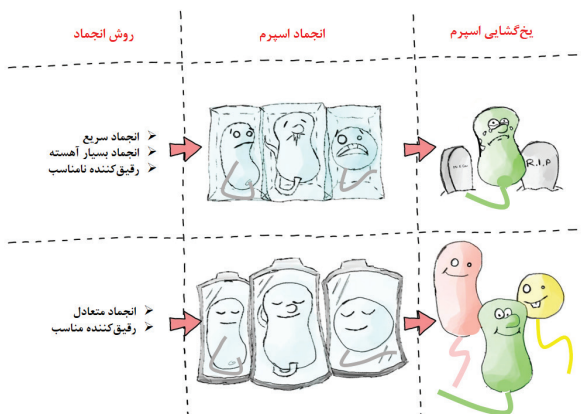
شکل ۳- تغییرات مولکول آب در فاز انتقال از آب به یخ. A: پراکندگی یکنواخت مولکول‌های آب در میان سایر مولکول‌های محلول در دمای معمولی، B: تجمع مولکول‌های آب در کنار هم برای شکل‌گیری کریستال یخ و اعمال فشار بر سلول‌ها

حفاظت انجمادی اسپرم

حفاظت انجمادی اسپرم، شامل فرایندهای مختلف از جمله قرار دادن اسپرم‌ها در معرض مواد محافظ انجمادی^۱، کاهش دما به زیر صفر درجه سانتی‌گراد، ذخیره اسپرم در نیتروژن مایع برای توقف واکنش‌های متابولیکی اسپرم، یخ‌گشایی و بازگشت به حالت طبیعی فیزیولوژیکی اسپرم است. حفاظت انجمادی اسپرم ابزار مفیدی برای مطالعات جنین‌شناسی آزمایشگاهی و تلقیح مصنوعی است و بخش اساسی و ضروری در فناوری‌های تولید مثلی محسوب می‌شود. امروزه انجماد اسپرم قوچ با مشکلاتی از جمله کاهش زنده‌مانی و تحرک اسپرم بعد از فرایند انجماد و

1- Cryoprotectant agent

یخ‌گشایی مواجهه است. کیفیت نهایی اسپرم منجمد شده متأثر از فاکتورهای متعددی از قبیل کیفیت منی، نوع و غلظت اجزای موجود در محیط انجماد و روش انجماد تغییر می‌کند. در حال حاضر مطالعات بسیاری بر روی بهبود تکنیک‌های انجماد اسپرم قوچ در حال انجام است.



شکل ۴- نتیجه روش‌های مختلف انجماد اسپرم

صدمات انجمادی اسپرم

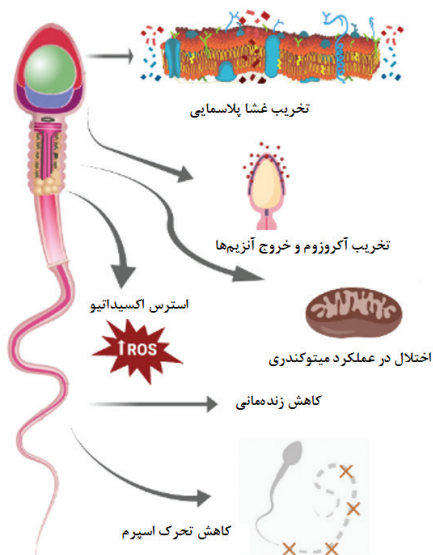
علی‌رغم استفاده از پروتکل‌های پیشرفته برای انجماد، پارامترهای کمی و کیفی اسپرم قوچ پس از یخ‌گشایی در مقایسه با نمونه قبل از انجماد چندان رضایت‌بخش نبوده و میزان باروری حاصل از اسپرم منجمد در مقایسه با نمونه تازه آن کمتر است. بخشی از صدمات انجمادی اسپرم و

آسیب به سلول ها در ارتباط با تغییرات فاز آب در دمای پایین بروز می کند که ناشی از رویدادهای کرایوبیولوژیک مانند شوک مکانیکی ناشی از کریستال یخ و شوک اسمزی ناشی از اثر محلول است. این آسیب ها اصولا غشا پلاسمایی، اسکلت سلولی و هسته اسپرم را تحت تاثیر قرار می دهند. شوک انجمادی می تواند منجر به پارگی غشا آکروزومی و غشا پلاسمایی اسپرم گردد. این تغییرات در ساختار غشا، عملکردهایی همچون ظرفیت پذیری، واکنش آکروزوم و نفوذپذیری اسپرم به تخمک را مختل می کند.

در طول فرایند انجماد شوک اکسیداتیو نیز عملکرد سلول را مختل می نماید. اسپرم مانند تمام سلول هایی که در شرایط هوازی زندگی می کنند با مصرف اکسیژن در زنجیره تنفس میتوکندری، ATP مورد نیاز خود را تامین می کند، اما متابولیت های اکسیژن نظیر رادیکال های آزاد اکسیژن که در این مسیر تولید می شود می توانند برای بقا سلول مضر باشند. رادیکال آزاد اصلی ترین عامل استرس شیمیایی طی فرآیند انجماد و یخ گشایی است. رادیکال آزاد یک مولکول به شدت واکنش گر با یک الکترون جفت نشده است که برای رسیدن به تعادل به همه مولکول های زیستی شامل لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک حمله می کند. وقتی رادیکال آزاد باند دوگانه اسید چرب غیراشباع را مورد

حمله قرار می‌دهد به این فرایند پراکسیداسیون لیپید گفته می‌شود. از آنجایی که غشا پلاسمایی اسپرم دارای اسیدهای چرب غیراشباع فراوان است، بنابراین شرایط برای آسیب پراکسیداسیون مساعد است. عدم تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد در سلول منجر به ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو می‌شود. بنابراین رادیکال‌های آزاد تولید شده در سلول باید به طور پیوسته غیرفعال شود به طوری که غلظت آن‌ها همیشه در حد بسیار اندکی که برای عملکرد طبیعی سلول لازم است باقی بماند. اما اسپرم در انتهای فرایند تمایز مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهد و از آنجایی که بیشتر آنزیم‌ها در سیتوپلاسم سلول قرار دارند با این حذف سیتوپلاسمی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی اسپرم کاهش می‌یابد؛ به این جهت در مقابل عوامل اکسیدکننده و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا حساس‌تر بوده و بیش از هر سلول دیگری مستعد آسیب در اثر استرس اکسیداتیو است. پراکسیداسیون لیپید موجب آسیب به غشا و تغییرات مخرب در عملکرد و ساختار مولکولی اسپرم به ویژه DNA می‌گردد. این امر به نوبه خود می‌تواند باعث کاهش تحرک اسپرم گردد. در واقع این کاهش تحرک اسپرم پس از انجماد علت اصلی باروری پایین منی منجمد در مقایسه با منی تازه می‌باشد. آسیب به غشا اسپرم اصولاً در طی فرآیند

انجماد در دماهای بین ۱۵- تا ۶۰- درجه سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد. این آسیب در مورد اسپرم قوچ بیشتر بین دماهای ۱۰- تا ۲۵- درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد. اصولاً آسیب‌های سرمایی، اسپرم قوچ را بیشتر از سایر گونه‌ها متاثر می‌سازد (شکل ۵).



شکل ۵- تغییرات ساختاری و عملکردی اسپرم در فرایند انجماد

فصل سوم

روش‌های انجماد اسپرم



روش‌های انجماد اسپرم

دانشمندان همواره در تلاش برای یافتن روش‌های نوین انجماد اسپرم با کمترین اثر منفی بر سلول هستند. همان‌طور که قبلاً گفته شد، مهم‌ترین اصل در فرآیند انجماد کاهش آسیب ناشی از تشکیل کریستال‌های یخ داخل و خارج سلولی است. از آنجا که میزان تشکیل کریستال یخ به سرعت و نرخ انجماد بستگی دارد، باید سرعت سردسازی سلول به نحوی تنظیم شود که تشکیل یخ به حداقل ممکن برسد. بر این اساس روش‌هایی برای انجماد اسپرم ابداع شده که در ادامه به شرح مختصر آن‌ها می‌پردازیم.

انجماد آهسته (Slow freezing)



تکنیک انجماد آهسته اولین بار در سال ۱۹۶۶ توسط برهمن و سوادا برای اسپرم انسان معرفی شد. این روش شامل سرد کردن تدریجی اسپرم در یک دوره ۲-۴ ساعته در ۲ یا ۳ مرحله می‌باشد که با استفاده از دستگاه فریزر و به طور اتوماتیک (شکل ۶، ۷ و ۸) و یا توسط قرارگیری در

بخار نیتروژن مایع به طور دستی (شکل ۹) انجام می‌شود. در این روش صرف زمان کافی برای سرد کردن، موجب خروج تدریجی آب از سلول شده و از تشکیل یخ درون سلولی جلوگیری می‌شود. به این منظور یک محافظ انجمادی نفوذپذیر با وزن مولکولی کم به مایع رقیق‌کننده منی افزوده می‌شود تا جایگزین آب درون سلولی شده و از تشکیل یخ در سلول‌های اسپرم در طول فرایند انجماد جلوگیری شود. نرخ سردسازی در انجماد آهسته به طور معمول ۱ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و در حضور غلظت‌های پایین حفاظت‌کننده انجمادی در حدود ۱ مول می‌باشد.

در انجماد آهسته، آب خارج سلولی به‌صورت کریستال‌های یخ منجمد شده و دو فاز ایجاد می‌کند که شامل بخش منجمد کریستال‌های یخ حاصل از آب خالص و بخش غیر منجمد که شامل تمام املاح، عوامل محافظ انجمادی و سلول‌ها می‌باشد. کاهش آب در اثر تشکیل یخ، اسمولاریته را در بخش غیر منجمد محلول افزایش می‌دهد و با بروز شوک اسمزی باعث آسیب به سلول می‌شود. علاوه بر این، تغییر در درجه حرارت باعث تغییر در وضعیت فیزیکی لیپیدهای غشا اسپرم می‌شود. این تغییرات موجب می‌شود غشا اسپرم یک فاز گذر از حالت مایع به حالت ژل داشته باشد که می‌تواند باعث آسیب به غشا اسپرم شود. بنابراین

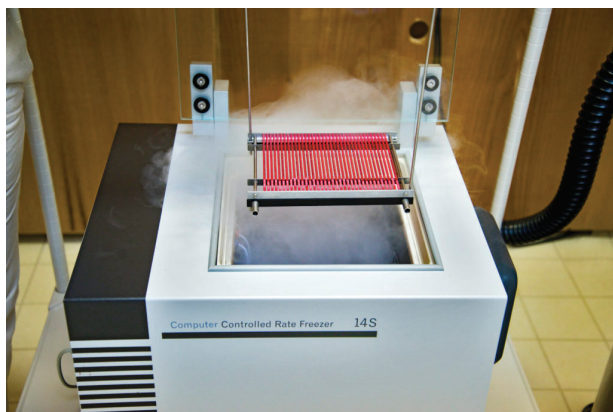
از جمله ایرادهای عمده این روش، سرعت انجماد پایین و طولانی بودن فرایند انجماد و همچنین نیاز به فریزرهای گران قیمت می‌باشد. با وجود این مشکلات، همچنان تکنیک انجماد آهسته روشی معمول برای نگهداری طولانی مدت اسپرم خصوصا اسپرم گوسفند محسوب می‌شود.



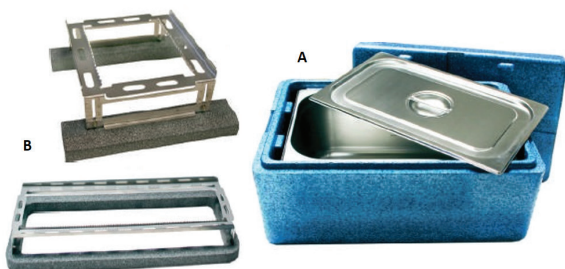
شکل ۶- دستگاه فریزر اتوماتیک انجماد اسپرم. دارای دامنه دمایی ۵۰+ تا ۱۵۰- درجه سانتی‌گراد و نرخ سردسازی قابل تنظیم بین ۶۰- تا ۰/۱ درجه سانتی‌گراد در دقیقه است. برحسب حجم دستگاه برای نیتروژن مایع تا ۳۰۰۰ پایوت را همزمان فریز می‌کند.



شکل ۷- راست: رک (Rack) و پایوت‌های چیده شده بر روی آن،
چپ: نمایی از رک و پایوت‌ها در فریزر اتوماتیک

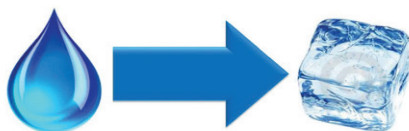


شکل ۸- نمایی از رک (Rack) و پایوت‌های روی آن در حال قرارگیری
در بخار نیتروژن مایع در فریزر اتوماتیک



شکل ۹- A: جعبه مخصوص انجماد آهسته اسپرم به روش دستی. بدنه از جنس فوم پلی استایرن و محفظه داخلی استیل، B: رک (Rack) مخصوص شناورسازی پایوت در نیتروژن مایع. داخل جعبه با نیتروژن مایع پر شده و رک در آن قرار می گیرد. پایوت ها بر روی رک چیده شده و ارتفاع آن ها از سطح نیتروژن مایع قابل کنترل است. پس از انجماد در بخار نیتروژن مایع، پایوت ها را به صورت دستی در نیتروژن مایع غوطه ور می کنند.

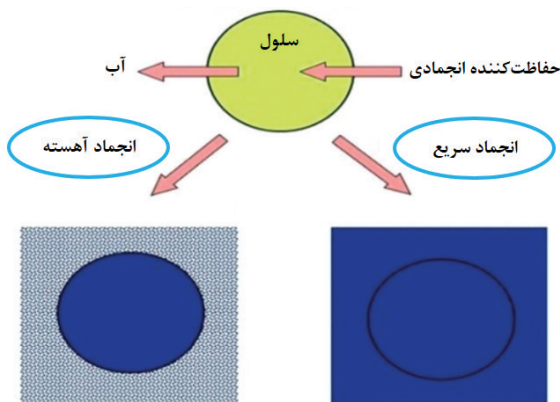
انجماد سریع (Rapid freezing)



انجماد سریع یا شیشه‌ای^۱ اولین بار در سال ۱۹۸۵ توسط شرمن برای اسپرم انسان ارائه شد. اساس این روش شیشه‌ای شدن سلول و محیط مایع اطراف آن بدون شکل گیری کریستال یخ است. در این روش پس از اینکه رقیق کننده به اسپرم اضافه شد، نمونه منی در پایوت کشیده

1- Vitrification

می‌شود و پایوت حاوی اسپرم در فاصله ۲۰-۱۵ سانتی متری بالای سطح نیتروژن مایع و در بخار آن (دمای ۸۰- درجه سانتی گراد) به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفته و سپس بلافاصله در نیتروژن مایع غوطه‌ور می‌شود. در طول انجماد سریع، آب به صورت ساختاری شیشه مانند و نه یخ، منجمد می‌شود. در این روش سرعت انجماد بسیار بالا و در حدود ۲۰۰۰۰ درجه سانتی گراد در دقیقه و غلظت مواد محافظ انجماد در حدود ۵/۵ مول است. این روش دارای مزایایی نسبت به انجماد آهسته می‌باشد، از جمله اینکه به حداقل تجهیزات نیاز دارد و در زمان کوتاه‌تری انجام می‌شود. در شکل ۱۰ دو روش انجماد آهسته و سریع مورد مقایسه قرار گرفته است.



عدم شکل‌گیری کریستال یخ در داخل و خارج سلول شکل‌گیری کریستال یخ در خارج سلول

شکل ۱۰- مقایسه تشکیل کریستال یخ در دو روش انجماد آهسته و سریع

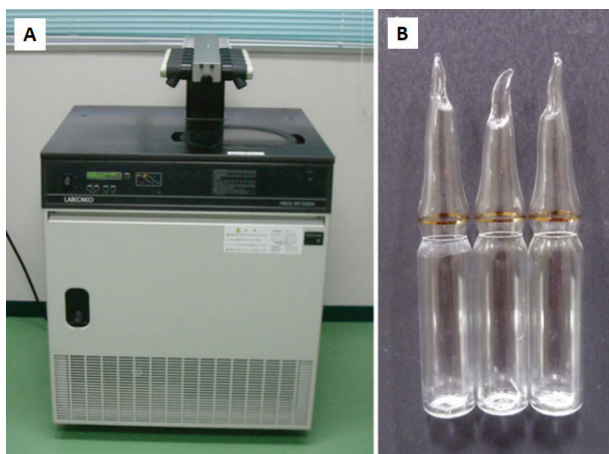
انجماد خشک (Freez-drying)

از آنجا که نگهداری همیشگی اسپرم در نیتروژن مایع در برخی شرایط مدیریتی و مکانی مشکل یا غیرممکن است، روش انجماد خشک یا Lyophilization به عنوان جدیدترین روش برای حفظ اسپرم ابداع شده است. با استفاده از روش انجماد خشک می‌توان اسپرم را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بدون نیاز به نیتروژن مایع و یا یخ خشک، منجمد کرده و در دمای معمول ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد حمل و نقل نمود. در حال حاضر این روش عمدتاً در حفاظت از مواد غذایی و داروها استفاده می‌شود.

این روش شامل حذف تمام رطوبت یا مولکول‌های آب در یک نمونه مایع منی است. برای این منظور بعد از رقیق نمودن منی، برای خارج کردن آب نمونه تحت شرایط خلا و دمای پایین (۱۵۰- درجه سانتی‌گراد) آن را در دستگاه مخصوص انجماد خشک^۱ قرار می‌دهند و بعد از پایان فرایند انجماد، نمونه خشک‌شده در آمپول‌های شیشه‌ای ذخیره می‌شود. آمپول حاوی نمونه خشک‌شده را می‌توان به مدت نامحدود در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. در زمان استفاده، نمونه خشک‌شده اسپرم با افزودن آب مقطر استریل دوباره آبدهی شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۱۱).

1- Ultra dry freezer

بزرگترین مزیت این روش این است که نمونه لیوفلیزه را می‌توان در ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره کرد و در دمای اتاق از انجماد خارج کرد. متأسفانه این روش اثر مخربی بر غشا اسپرم می‌گذارد و در نتیجه باعث کاهش تحرک و حیات سلول پس از یخ‌گشایی می‌شود. اما سلامت کلی ژنوم در این روش حفظ می‌شود و نسبت به انجماد در نیتروژن مایع آسیب کمتری به DNA وارد می‌شود. از روش انجماد خشک اسپرم‌ها به دلیل نیاز به وسایل نسبتاً مجهز، فقط در آزمایشگاه‌های تولید رویان آزمایشگاهی و در تلقیح داخل سیتوپلاسمی اسپرم^۱ (ICSI) یا تلقیح آزمایشگاهی^۲ (IVF) استفاده می‌شود.



شکل ۱۱- A: نمایی از دستگاه انجماد خشک اسپرم، B: نمونه اسپرم لیوفلیزه و ذخیره‌شده در آمپول شیشه‌ای

1- Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

2- In vitro fertilization (IVF)

فصل چهارم

رقیق‌کننده‌ها و حفاظت‌کننده‌های
انجمادی



رقیق‌سازی منی

اولین قدم برای ذخیره‌سازی منی در دمای پایین، رقیق‌سازی آن در یک رقیق‌کننده مناسب است. رقیق‌سازی منی به دلایل فنی و زیست‌شناختی مهمی انجام می‌شود. علت فنی این کار افزایش حجم نمونه منی است؛ به گونه‌ای که بتوان تعداد اسپرم مورد نیاز برای هر بار تلقیح را در حجمی که کار کردن با آن آسان باشد در اختیار داشت. به این فرایند رقیق‌سازی گفته می‌شود. پلاسمای منی حاوی مقادیر نسبتاً بالایی از گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولپیدها و هورمون‌هاست. این مواد موجب محافظت از اسپرم بعد از انزال شده و انتقال آن به دستگاه تناسلی ماده را تسهیل می‌کنند؛ اما پلاسمای منی به تنهایی توانایی حفاظت از اسپرم در مقابل صدمات ناشی از فرایند انجماد و یخ‌گشایی را ندارد و اصولاً اسپرم در منی رقیق‌نشده مدت کوتاهی زنده می‌ماند. بنابراین دلیل دیگر رقیق‌سازی، تامین مواد غذایی و محیط اسمزی و بافری مورد نیاز اسپرم در طول مدت نگهداری است. محلولی که برای رقیق‌سازی منی بکار برده می‌شود رقیق‌کننده^۱ یا اکستندر^۲ نام دارد. برخی از اصلی‌ترین وظایف رقیق‌کننده به شرح زیر است:

۱- رقیق‌سازی: یک ماده رقیق‌کننده به عنوان محیطی

1- Diluent

2- Extender

حامل برای سایر اجزای محلول رقیق کننده عمل نموده و منی تازه با نسبتی مشخص با آن رقیق می گردد. این مایع غالباً آب دوبار تقطیر و یا شیر استریل شده در دماهای فوق بالا است.

۲- محافظت در برابر شوک سرمایی: رقیق کننده باید اسپرم را در خلال سرد شدن (تا ۵ درجه سانتی گراد) در برابر شوک سرمایی محافظت نماید. زرده تخم، شیر و لسیتین برای به حداقل رساندن شوک سرمایی استفاده می شوند.

۳- محافظت در برابر انجماد: چنانچه اسپرم ها در برابر انجماد محافظت نشده باشند، با تشکیل کریستال های یخ در خلال فرایند انجماد دچار آسیب های ساختاری و نهایتاً مرگ خواهند شد. ترکیباتی مانند گلیسرول، دی متیل سولفو کساید و پروپاندیول با اتصال به مولکول های آب درون سلولی، سلول اسپرم را آب گیری نموده و موجب کاهش تشکیل کریستال های یخ می شوند.

۴- منبع انرژی: برای تامین نیازهای متابولیک اسپرم باید مواد مغذی مانند قندهای ساده (فروکتوز و گلوکز) زرده تخم مرغ و شیر به رقیق کننده اضافه شود.

۵- حفظ فشار اسمزی: غلظت اجزا تشکیل دهنده رقیق کننده منی مانند قندها و نمک ها باید به گونه ای تنظیم گردد که محیط اطراف اسپرم دارای اسمولاریته مشابهی با

داخل سلول اسپرم باشد و یا به عبارتی محیط ایزوتونیک باشد؛ زیرا در شرایط کاهش فشار اسمزی پیرامون اسپرم، مایعات خارج سلول وارد آن شده و سلول متلاشی می‌گردد. محلول ۲/۹ درصد سیترات سدیم و محلول ۰/۲ مولار تریس برای این منظور به کار می‌روند.

۶-محافظت در برابر میکروارگانیسم‌ها: با اضافه نمودن انواعی از آنتی‌بیوتیک‌های موثر می‌توان از رشد و انتشار برخی عوامل بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا در منی جلوگیری کرد. عوامل غیر بیماری‌زا با آنکه موجب بیماری نمی‌شوند با این حال با سلول‌های اسپرم برای استفاده از مواد مغذی محیط رقابت می‌کنند و به این صورت دارای اثرات منفی بر بقا اسپرم هستند. برخی از رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در رقیق‌کننده‌های منی شامل پنی‌سیلین، استرپتومایسین، جنتامایسین و تایلوزین می‌باشد.

۷-دارای خاصیت بافری: یکی از عوامل مهمی که بقا اسپرم را متاثر می‌سازد میزان اسیدیته (pH) محیط پیرامون آن است. برای خنثی‌سازی اسیدلاکتیک حاصل از متابولیسم و ثابت نگه داشتن pH از مواد بافر مانند سیترات سدیم، تریس و شیر استفاده می‌شود.

انواع رقیق کننده های پایه

تلاش های قابل توجهی برای ابداع روش های رقیق سازی و ترکیب بهینه ای از عوامل رقیق کننده جهت حفظ تحرک، سلامت و استحکام غشا بعد از فرایند انجماد صورت گرفته است. در ادامه به تعدادی از رقیق کننده های پایه که تاکنون مورد استفاده قرار گرفته اند به اختصار اشاره می شود.

۱- رقیق کننده های بر پایه سیترات

سیترات (سیترات سدیم دی هیدرات) یا نمک ترش به عنوان بافر در سیستم های بیولوژیک کاربرد دارد. در ابتدا رقیق کننده های بر پایه بافر سیترات و قند برای انجماد منی قوچ مورد استفاده قرار گرفت. زیرا اثرات مثبت آن برای ذخیره انجمادی اسپرم گاو ثابت شده بود. نظرات متفاوتی در مورد وجود نوع قند در رقیق کننده های بر پایه سیترات وجود دارد. قندهای آرابینوز، فروکتوز و گلوکز از جمله قندهای مناسب برای این نوع رقیق کننده هستند. با ادامه تحقیقات، استفاده از رقیق کننده های هایپرتونیک مانند ترکیب فروکتوز-سیترات-زرده و ترکیب گلوکز-سیترات-زرده مورد توجه محققین قرار گرفت. امروزه نیز رقیق کننده بر پایه سیترات در بسیاری از مطالعات به عنوان یکی از رقیق کننده های اصلی و مناسب برای گوسفند مورد استفاده قرار می گیرد.

۲- رقیق‌کننده‌های بر پایه شیر

شیر کامل، پودر شیر، شیر پس‌چرخ^۱ (حاصل گرم کردن شیر در دمای ۹۵-۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) و یا سایر ترکیبات حاوی شیر سال‌هاست به عنوان رقیق‌کننده در نگهداری منی مورد استفاده قرار می‌گیرند. شیر یک محلول ایزوتونیک حاوی مواد و اجزای نگهدارنده مهم است. موفقیت این رقیق‌کننده در ارتباط با بخش پروتئینی آن است که به عنوان بافر در برابر تغییرت pH عمل نموده و قادر است اسپرم را در برابر آسیب‌های سرمایی حفظ کند. مهم‌ترین پروتئین شیر کازئین است که به صورت کلئید و به شکل میسل در شیر یافت می‌شود. این میسل‌ها در حضور گلیسرول اثر حفاظتی مناسبی روی اسپرم قوچ در فرایند سردسازی و انجماد نشان داده‌اند.

۳- رقیق‌کننده‌های بر پایه لاکتوز

لاکتوز یا قند شیر یک دی‌ساکارید مرکب از دو مونوساکارید گلوکز و گالاکتوز است. استفاده موفقیت‌آمیز از لاکتوز به عنوان بخش اصلی رقیق‌کننده‌های اسپرم گاو موجب استفاده از این ماده برای انجماد اسپرم قوچ شد؛ با این حال نتایج اولین انجماد اسپرم قوچ با رقیق‌کننده بر پایه لاکتوز رضایت‌بخش نبود. با گذشت زمان و بهینه‌سازی تکنیک انجماد، نتایج

1- Skim milk

استفاده از رقیق کننده بر پایه لاکتوز بهبود یافت.

۴- رقیق کننده های بر پایه ساکارز

ساکارز رایج ترین دی ساکارید گیاهی و یکی از محصولات اصلی فتوسنتز است که از اتصال دو مونوساکارید گلوکز و فروکتوز تشکیل شده است. محافظت بهتر ساکارز از کلاهدک آکروزوم اسپرم نسبت به گلوکز، فروکتوز و یا لاکتوز، سبب شد که به عنوان یکی از اجزا اصلی رقیق کننده ها مورد استفاده قرار گیرد. منی قوچ بر خلاف دیگر گونه ها به طور طبیعی حاوی مقدار بسیار کمی آنتی اکسیدان است؛ به همین دلیل امروزه به منظور جلوگیری از اکسیداسیون فسفولیپیدهای غشا اسپرم، آنتی اکسیدان های مصنوعی به رقیق کننده های بر پایه ساکارز اضافه می شود.

۵- رقیق کننده های بر پایه رافینوز

رافینوز^۱ یک تری ساکارید و حاصل اتصال دی ساکارید ساکارز و مونوساکارید گالاکتوز است. به عنوان بخشی از رقیق کننده منی برای اولین بار توسط ناگاس و همکاران در سال ۱۹۶۸ برای رقیق سازی منی گاو مورد استفاده قرار گرفت. آن ها توانستند این ایده را اثبات نمایند که قندهای با وزن مولکولی بالا نسبت به قندهای با وزن مولکولی پایین تر محافظت بهتری از اسپرم در برابر آسیب سرمایی ایجاد می کنند.

1- Raffinose

۶- رقیق کننده های بر پایه تریس

تریس (هیدروکسی متیل آمینومتان)^۱ بخش اصلی رقیق کننده های امروزی برای انجماد منی گاو، قوچ و سایر گونه ها است. این ماده دارای ظرفیت بافری و اسمزی بسیار خوبی می باشد و اثرات سمی آن در مقایسه با سایر بافرها کمتر است. مطالعات متعدد نشان می دهد که تریس به عنوان بهترین بافر برای رقیق سازی منی در اکثر گونه های پستانداران عمل می کند. بیشتر رقیق کننده های تجاری امروزی که برای رقیق سازی منی گاو و گوسفند مورد استفاده قرار دارند بر پایه بافر تریس ساخته می شوند.

۷- رقیق کننده های تجاری

رقیق کننده اویکسل (Ovixcell) و اوویپلاس (Ovipus):
از جمله رقیق کننده های تجاری مختص گوسفند هستند. این محلول ها برای رقیق سازی منی تازه و نیز انجماد اسپرم مناسب می باشند.

رقیق کننده تری لادیل (Triladyle) و بی لادیل (Biladyle):
رقیق کننده های مشترک در نشخوار کنندگان بزرگ و کوچک هستند. این رقیق کننده ها بر پایه تریس، اسید سیتریک و فروکتوز ساخته شده اند.

رقیق کننده آندرومد (Andromed): یک رقیق کننده

1- Hydroxymethyl aminomethane

تجاری مشترک بین نشخوارکنندگان و ساخت کشور آلمان است که تا کنون برای رقیق سازی و انجماد منی گاو، اسب، گوسفند و بز کوهی مورد بررسی قرار گرفته است.

رقیق کننده بیوکسل (Bioxcell): یکی دیگر از رقیق کننده های تجاری مشترک بین نشخوارکنندگان و ساخت کشور فرانسه است که در آن بخش زرده تخم مرغ با منابع lipid گیاهی جایگزین شده است. این محصول یک محیط رقیق سازی هموژنیزه، استاندارد و بدون آلودگی را برای رقیق سازی منی تمام پستانداران فراهم می کند (شکل ۱۲).



شکل ۱۲- نمونه هایی از انواع رقیق کننده تجاری اسپرم

حفاظت‌کننده‌های انجمادی

یک رقیق‌کننده استاندارد با کاهش تشکیل کریستال یخ در مرحله انجماد از سلول محافظت می‌نماید. بنابراین انتخاب یک حفاظت‌کننده انجمادی^۱ (CPA) مناسب مهم‌ترین بخش فرآوری انجمادی اسپرم است. مناسب بودن یک حفاظت‌کننده انجمادی برای اسپرم بستگی به توانایی آن در نفوذ به سلول، نوع سلول و همچنین غلظت آن دارد. تأثیر حفاظتی این ترکیبات از راه برهم‌کنش آن‌ها با آب داخل و خارج سلول میانجی‌گری می‌شود؛ با این حال سازوکار عمل هریک از این مواد به نحوه رفتار آن‌ها در ورود به سلول و یا عملکرد خارج سلولی‌شان بستگی دارد. بر این اساس می‌توان حفاظت‌کننده‌های انجمادی را به دو گروه حفاظت‌کننده‌های نفوذپذیر و حفاظت‌کننده‌های نفوذناپذیر تقسیم کرد.

۱- عوامل حفاظت‌کننده نفوذپذیر

حفاظت‌کننده‌های نفوذپذیر موادی با وزن مولکولی کم هستند که در دمای پایین انحلال‌پذیری بالایی در آب دارند. این ترکیبات می‌توانند از غشا پلاسمایی عبور کرده و جایگزین آب داخل سلولی شوند و سلول را آبگیری نمایند. مکانیسم عمل این ترکیبات مربوط

1- Cryoprotective agent

به کاهش غلظت الکترولیت ها و تا حدی کاهش فشار اسمزی در دماهای پایین است. اما از آنجا که سلول اسپرم نسبت به شوک اسمزی حساس است، در هنگام استفاده از حفاظت کننده نفوذپذیر اعمال دوره تعادل ضروری است؛ به این معنا که سلول برای رسیدن به تعادل با ماده نفوذپذیر و سازگاری با شوک اسمزی به زمان نیاز دارد؛ بنابراین مواد محافظ نفوذپذیر به آرامی به محلول اضافه می شوند تا بروز شوک اسمزی به حداقل ممکن برسد (شکل ۱۳). مزیت دیگر حفاظت کننده های نفوذپذیر، پایین بودن نقطه انجماد آنهاست که زمان بیشتری را برای آبگیری سلول فراهم می کند. علاوه بر این، از تجمع مولکول های آب با یکدیگر برای تشکیل کریستال های یخ درون سلولی جلوگیری می کنند.

گلیسرول (Glycerol)، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، اتیلن گلیکول (Ethylene glycol)، پروپیلن گلیکول (Pro-pylene glycol) و دی متیل استامید (Dimethylacetamide) عوامل حفاظت کننده انجمادی درون سلولی یا نفوذپذیر هستند (شکل ۱۴).



شکل ۱۳- پاسخ سلول به حفاظت کننده نفوذپذیر پس از دوره تعادل

حفاظت کننده های نفوذپذیر

الکلها

متانول
پروپیلن گلیکول
اتیلن گلیکول
گلیسرول
اریتریتول

آمیدها و ایمیدها

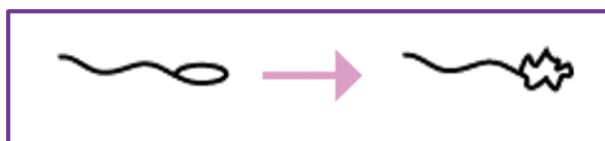
فرمامید
استامید
لاکتامید
بوتیر آمید
مالونامید

دی متیل سولفوکساید

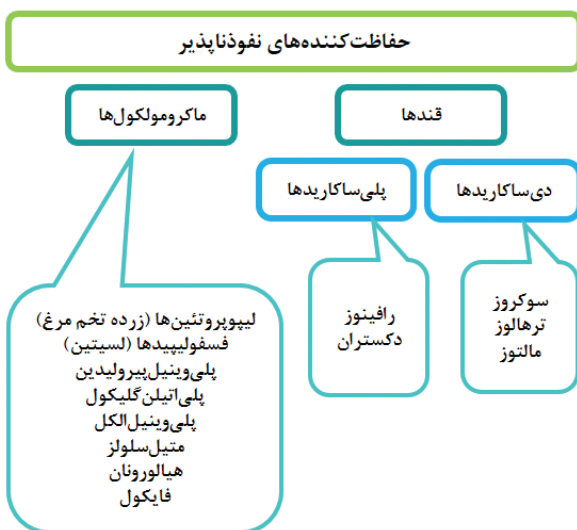
شکل ۱۴- انواع حفاظت کننده انجمادی نفوذپذیر

۲- عوامل حفاظت‌کننده نفوذناپذیر

به طور کلی حفاظت‌کننده‌های نفوذناپذیر پلیمرهایی با زنجیره‌های طویل و جرم مولکولی بالا هستند که قادر به عبور از غشا نبوده و نقش خود را در خارج سلول اعمال می‌کنند. این مواد با ویسکوزیته بالای خود اسمولاریته خارج سلول را افزایش داده و موجب خروج آب درون سلولی می‌شوند و به این صورت احتمال تشکیل کریستال یخ داخل سلولی را کاهش می‌دهند (شکل ۱۵). علاوه بر این ترکیبات نفوذناپذیر موجب تثبیت غشا سلول می‌شوند؛ به این صورت که به سطح غشا جذب شده و از راه نگهداری آب در فاز بی‌شکل، مانع از تشکیل کریستال یخ در مجاورت سلول می‌شوند. این عوامل عمدتاً شامل پروتئین‌ها و لیپوپروتئین‌های موجود در شیر و زرده تخم مرغ، منابع گیاهی مثل شیر سویا و شیر نارگیل، قندها و ترکیباتی با وزن مولکولی بالا مانند پلی‌ونیل‌پیرولیدون (Polyvinylpyrrolidone)، نشاسته، هیدروکسی‌اتیل (Hydroxyethyl)، پلی‌اتیلن‌گلیکول‌ها (Polyethyleneglycols) و دکستران‌ها (Dextrans) هستند (شکل ۱۶).

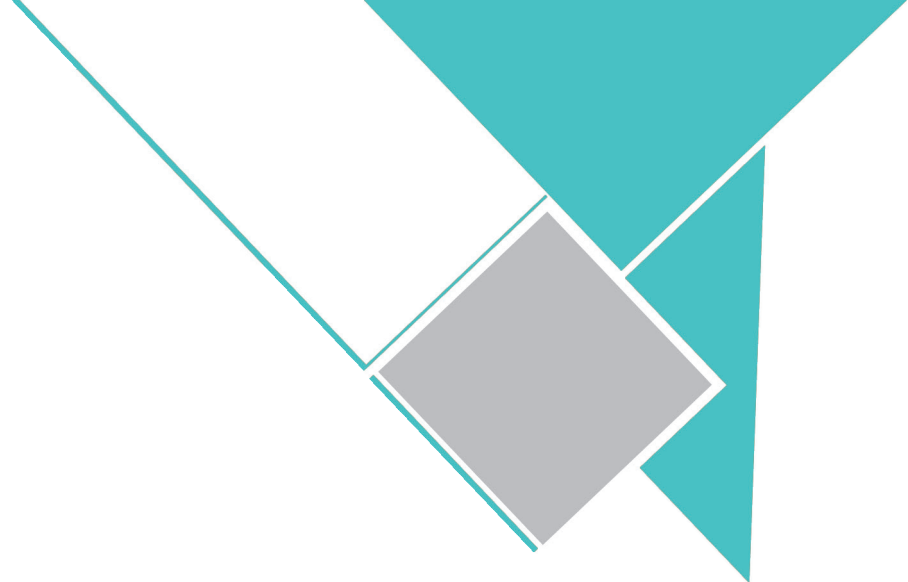


شکل ۱۵- پاسخ سلول به حفاظت کننده نفوذناپذیر



شکل ۱۶- انواع حفاظت کننده انجمادی نفوذناپذیر





فصل پنجم

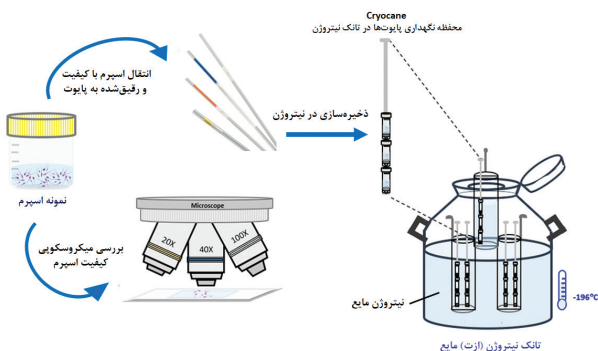
ارزیابی کیفیت اسپرم پیش از انجماد





پیش‌نیازهای انجماد منی

یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در اجرای موفق برنامه تلقیح مصنوعی گوسفند، کیفیت منی جمع‌آوری شده برای انجماد است. در واقع تلقیح کردن آخرین مرحله تکنولوژی تلقیح مصنوعی است که در آن اسپرم به دستگاه تولید مثل ماده منتقل می‌شود. پیش از این مرحله باید فرآیندهای اسپرم‌گیری، ارزیابی نمونه منی، آماده‌سازی اسپرم، انجماد و یخ‌گشایی برای تلقیح انجام شود (شکل ۱۷). در ادامه به طور مختصر مراحل جمع‌آوری و ارزیابی منی گوسفند را مورد بررسی قرار می‌دهیم.



شکل ۱۷- تصویر شماتیک فرآیند جمع‌آوری تا انجماد اسپرم

جمع‌آوری منی

وقتی نرهای جوان به خوبی تغذیه و مدیریت شوند، می‌توان منی آن‌ها را در سن مناسب و با موفقیت جمع‌آوری

نمود؛ این سن در گوسفند ۸-۷ ماهگی است. سریع ترین و بهداشتی ترین روش جمع آوری منی، اسپرم گیری با واژن مصنوعی است که امکان ۱-۲ بار منی گیری در روز را میسر می سازد. این روش در واقع شرایطی مانند جفتگیری طبیعی را شبیه سازی می نماید. شکل ۱۸ ساختمان واژن مصنوعی و اجزا سازنده آن را نشان می دهد. واژن مصنوعی دارای یک بدنه استوانه ای تو خالی است که غالبا از جنس پلاستیک فشرده یا کائوچو ساخته می شود و برای گوسفند معمولا ۱۰-۱۲ سانتی متر طول و ۵ سانتی متر قطر دارد. یک لوله لاستیکی و انعطاف پذیر استوانه ای به صورت یک آستر داخل بدنه قرار داده می شود و لبه های آن روی دو انتهای بدنه کائوچویی برگردانده شده و توسط نوارهای لاستیکی محکم می شود. در بدنه کائوچویی واژن، یک شیر قرار دارد که توسط آن آب گرم وارد فضای بین بدنه و آستر می شود و دمای مورد نیاز برای انزال را تامین می کند. این سیستم باید کاملا عاری از هرگونه نشت آب به لوله جمع آوری اسپرم باشد، زیرا اسپرم ها با کوچکترین تماس با آب از بین خواهند رفت. بخش دیگر واژن مصنوعی یک قسمت قیف مانند از جنس پلاستیک شفاف و انعطاف پذیر است که سمت پهن آن به بدنه واژن متصل می شود و انتهای باریک آن یک لوله جمع آوری منی قرار دارد. برای ایجاد محیطی مشابه واژن طبیعی دام

باید انتهای استوانه و آستر را که آزاد است تا ۳ سانتی متری لبه با ژل لغزنده کننده^۱ به خوبی آغشته کرد تا دخول آلت تناسلی تسهیل شده و از آسیب‌های احتمالی هم پیشگیری شود. علاوه بر این، محفظه داخلی واژن مصنوعی را با آب ۳۷-۴۵ درجه سانتی گراد تا نیمه پر می‌نمایند تا علاوه بر تامین دمای مطلوب، حس انعطاف‌پذیری واژن طبیعی را به آلت تناسلی دام نر القا نماید. همچنین از یک دمنده هوا برای انبساط قسمت آستر استفاده می‌شود. میزان انبساط ایده‌آل زمانی حاصل می‌شود که فرد عامل به راحتی و با اندکی فشار بتواند یکی از انگشتان خود را که آغشته به ژل لغزنده کننده است به داخل فضای واژن مصنوعی وارد نماید.

برای انجام اسپرم‌گیری، دام ماده در جایگاه مخصوص اسپرم‌گیری مهار می‌شود و دام نر به محل مقید کردن دام ماده یا مانکن انتقال داده می‌شود. باید توجه نمود که حیوان نباید دارای پشم بلند و کثیف به خصوص در ناحیه پشت باشد. شخص عامل که واژن مصنوعی را در دست می‌گیرد باید به صورت خم شدن و یا زانو زدن در طرف راست دام ماده قرار بگیرد و واژن مصنوعی را به موازات پهلوی آن گرفته و دهانه باز آن را با زاویه ۴۵ درجه رو به پایین و به طرف دام نر نگه دارد. وقتی دام نر به دام ماده نزدیک

1- Lubricant

می شود فرد عامل باید آمادگی لازم را داشته باشد؛ زیرا قوچ به سرعت بر روی میش پرش می نماید. لذا تجربه عامل او را قادر به مهار کردن آلت تناسلی قوچ می نماید. فرد عامل باید دست آزاد خود را در حوالی ناحیه بیرون آمدن آلت تناسلی و غلاف آن بدون آنکه با آلت تماس پیدا کند قرار دهد. با خارج شدن آلت تناسلی و پرش دام، فرد عامل از دست چپ استفاده کرده و به آرامی غلاف آلت را گرفته و آن را با دهانه واژن مصنوعی در یک راستا قرار داده و اجازه می دهد آلت تناسلی وارد واژن مصنوعی شود. غالباً زمان انزال در گوسفند بسیار کوتاه است و چند ثانیه بیشتر به طول نمی انجامد و با فرود قوچ از روی دام یا مانکن، آلت به حالت سیگموییدی خود در می آید و به داخل پوشش پوستی خود باز می گردد و بدین ترتیب از واژن مصنوعی خارج می شود (شکل ۱۹). بلافاصله بعد از اسپرم گیری باید واژن مصنوعی را در حدود ۱۵-۱۰ ثانیه به صورت عمودی و به سمت لوله جمع آوری منی نگه داشت تا حداکثر منی ممکن که بر روی دیواره قیف پلاستیکی چسبیده به لوله جمع آوری منتقل شود. در پایان، لوله حاوی منی را جدا نموده و در حمام آب گرم ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده و تحت شرایط عایق دمایی، رطوبتی و نوری برای طی مراحل ارزیابی و فرآوری به آزمایشگاه منتقل می نمایند.



شکل ۱۸- محافظ چرمی واژن مصنوعی و لوله جمع آوری منی



شکل ۱۹- اسپرم گیری با واژن مصنوعی

شرایط نگهداری و ابزار مورد نیاز ارزیابی منی

زندهمانی اسپرم پس از جمع آوری به شدت تحت تاثیر عوامل محیطی قرار دارد، بنابراین برای حفظ کیفیت مطلوب اسپرم باید در زمان جمع آوری و بعد از آن اقدامات مناسبی انجام گیرد. از جمله می توان به تمیز و سرپوشیده بودن محل آزمایش و بررسی اسپرم، وجود فضای کافی برای لوازمی مانند میکروسکوپ و حمام آب گرم (بن ماری) و اطمینان از استریل، خشک و گرم بودن (۳۷ درجه سانتی گراد) تمام ظروف مورد استفاده برای جمع آوری و ارزیابی منی اشاره کرد. از آنجا که هرگونه افزایش دما بالاتر از ۳۷ درجه سانتی گراد میزان متابولیسم اسپرم را افزایش داده و در نتیجه طول عمر اسپرم ها کوتاه می گردد، لذا منی تا زمان بررسی در محفظه ای عایق در برابر رطوبت، نور و هوا و در دمای ۳۰-۳۵ درجه سانتی گراد در حمام آب گرم نگهداری می شود. برای حصول نتیجه مطلوب از فرایند ارزیابی و فرآوری منی، وجود ابزار مناسب ضروری است. از جمله میکروسکوپ، حمام آب گرم (بن ماری)، سمپلر (ابزار نمونه برداری در مقادیر میکرولیتر)، انواع سرسمپلر، میکروتیوپ، رک سرسمپلر و میکروتیوپ، لام و لامل، لام نئوبار، انواع رنگ و مواد شیمیایی مورد نیاز برای ساخت رقیق کننده ها و رنگ ها (شکل ۲۵-۲۰).



شکل ۲۰- میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری برای نگهداری منی



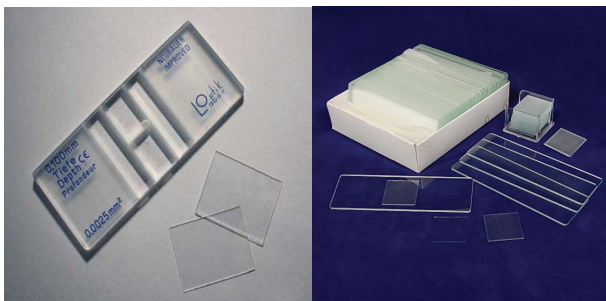
شکل ۲۱- سمپلر و انواع سرسمپلر برای جابجایی مایعات در مقیاس های مختلف



شکل ۲۲- رک نگهداری میکروتیوپ و سرسمپلر



شکل ۲۳- بالا: حمام آب گرم (بن‌ماری)، پایین: بن‌ماری حاوی آب و رک میکروتیوپ در آن



شکل ۲۴- راست: لام و لامل، چپ: لام نئوبار (برای شمارش تعداد اسپرم) و لامل



شکل ۲۵- میکروسکوپ نوری

ارزیابی منی



پس از جمع آوری منی و قبل از انجماد، باید کمیت و کیفیت آن مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف نهایی از ارزیابی منی تعیین میزان کیفیت آن برای تلقیح مصنوعی و در نهایت باروری است. انزال در قوچها از نظر کمیت و کیفیت متفاوت است. کمیت منی را تعداد اسپرم در هر انزال تعیین می کند و تعداد اسپرم هم وابسته به حجم و غلظت منی است. حرکت و شکل اسپرم (مورفولوژی) از خصوصیات کیفی منی است. این ویژگی ها به همراه رنگ و بوی منی بلافاصله بعد از اسپرم گیری مورد ارزیابی قرار می گیرند. هرچند هیچ آزمایشی به تنهایی قادر به تخمین دقیق باروری یک نمونه منی نمی باشد؛ با این وجود با آزمایش خصوصیات فیزیکی مختلف منی می توان تا حدی به توانایی باروری آن پی برد. به طور کلی نمونه منی قوچ که در آن بیش از ۷۵ درصد اسپرم ها متحرک بوده و کمتر از ۱۰

درصد آن‌ها دارای مورفولوژی غیر طبیعی باشند از کیفیت بالایی برخوردار است. در ادامه برخی روش‌های ارزیابی منی به اختصار شرح داده می‌شود.

رنگ و بوی منی

رنگ منی بلافاصله بعد از جمع‌آوری منی و در لوله ذخیره منی بررسی می‌شود. رنگ طبیعی منی در قوچ، سفید شیری یا کرم خامه‌ای می‌باشد. در صورت وجود خون در منی رنگ آن صورتی می‌شود که معمولاً به علت صدمات وارده به آلت تناسلی در ضمن جمع‌آوری منی می‌باشد. رنگ خاکستری یا قهوه‌ای منی بیانگر وجود آلودگی یا عفونت در مجرای تناسلی است. آلوده بودن منی با ادرار از طریق وجود بو و رنگ ادرار در منی تشخیص داده می‌شود. در این مرحله می‌توان منی را برای وجود ناخالصی‌های دیگر مانند مو، پشم، مدفوع و غیره بررسی کرد.

حجم منی

حجم منی انزال شده با لوله مدرج اندازه‌گیری می‌شود. به طور کلی حجم انزال در قوچ‌های بالغ ۰/۵-۲ میلی‌لیتر و در قوچ‌های جوان ۰/۷-۰/۵ میلی‌لیتر متغیر است. حجم منی انزال شده تحت تاثیر سن و شرایط

جسمانی قوچ، فصل، مهارت فرد جمع آوری کننده منی و دفعات اسپرم گیری در یک دوره زمانی متغیر می باشد. حجم هر انزال با افزایش تعداد دفعات اسپرم گیری در یک یا چند روز متوالی کاهش می یابد. زمانی که از قوچ بیش از ۳ بار در روز و یا برای مدت طولانی اسپرم گیری شود حجم انزال کاهش می یابد.

غلظت منی

غلظت منی به صورت تعداد اسپرم در هر میلی لیتر منی بیان می شود. از آنجا که مقدار رقیق سازی منی به غلظت (تعداد اسپرم در واحد حجم) آن بستگی دارد، برآورد دقیق غلظت منی بسیار مهم است. با شمارش دقیق تعداد اسپرم ها و تعیین حجم نهایی انزال می توان تعداد ماده های قابل تلقیح را محاسبه نمود. منی با کیفیت قوچ دارای $10^9 \times 6/5 - 3$ اسپرم در هر میلی لیتر است. انواعی از روش ها از قبیل استفاده از شکل ظاهری و میزان غلظت، هموسایتومتر^۱، اسپکتروفوتومتر^۲، آنالیز کامپیوتری اسپرم^۳ (CASA) و دستگاه الکترونیکی سلول شمار برای سنجش دقیق غلظت اسپرم استفاده می شود. غلظت منی به دو بخش تشکیل دهنده آن

1- Hemocytometer

2- Spectrophotometer

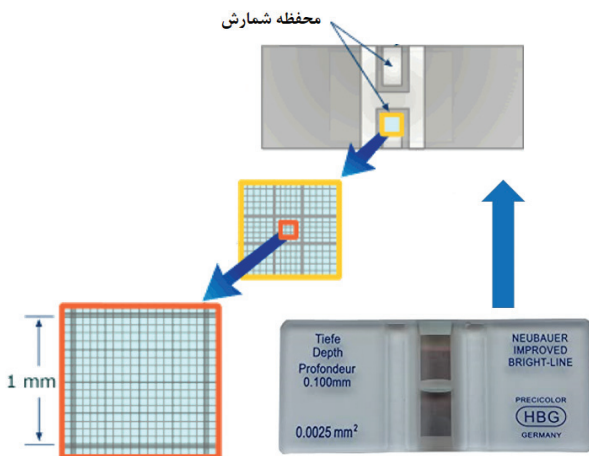
3- Computer assisted sperm analysis (CASA)

یعنی اسپرم و پلاسمای منی بستگی دارد. نمونه‌هایی با غلظت زیاد در مقایسه با نمونه‌های با غلظت کم و رقیق‌تر اسپرم بیشتری دارند. در شرایط مزرعه می‌توان از طریق مشاهده رنگ و بافت نمونه منی تا حدی به غلظت هر نمونه منی پی برد؛ هرچند این روش چندان دقیق نیست، اما روشی ساده و سریع برای تخمین غلظت اسپرم است. در این روش غلظت اسپرم قوچ به درجاتی تقسیم می‌شود که در جدول ۱ نشان داده شده است. در این روش نمونه‌های منی با درجه ۲-۰ نباید مورد استفاده قرار گیرند.

روش دیگر سنجش غلظت منی، استفاده از لام هموسایتومتر است. این لام وسیله‌ای برای شمارش گلبول قرمز و اسپرم است و از دو محفظه با ورودی ۷ شکل تشکیل شده که هر محفظه دارای خانه‌ای شطرنجی شکل با ابعاد 3×3 میلی‌متر است. ابتدا نمونه منی با محلول تثبیت‌کننده رقیق شده و مقداری از آن روی لام پخش می‌شود. این محلول با کشتن اسپرم‌ها مانع حرکت آن‌ها هنگام شمارش می‌شود. سپس تعداد اسپرم‌های موجود در هر محفظه شمارش شده و با استفاده از یک فرمول استاندارد غلظت نهایی منی محاسبه می‌شود (شکل ۲۶).

جدول ۱- غلظت منی قوچ بر مبنای تراکم اسپرم

تعداد اسپرم ($\times 10^9$)			
درجه	قوام	میانگین	دامنه
۵	خامه‌ای (کرمی) غلیظ	۵	۴/۵ - ۶
۴	خامه‌ای (کرمی)	۴	۳/۵ - ۴/۵
۳	خامه‌ای (کرمی) رقیق	۳	۲/۵ - ۳/۵
۲	شیری	۲	۱ - ۲/۵
۱	ابری	۰/۷	۰/۳ - ۱
۰	روشن (آبکی)	غیر معنی دار	کم

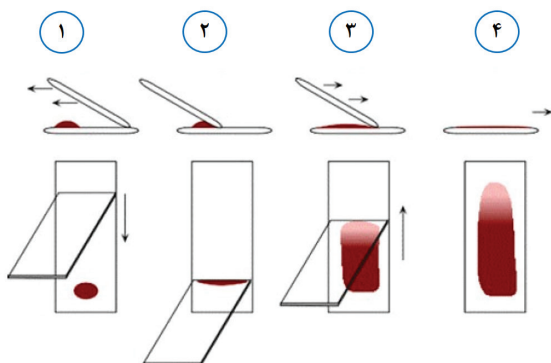


شکل ۲۶- لام هموسایتومتر (نئوبار) و نمایی از محل شمارش سلول‌ها بر روی لام

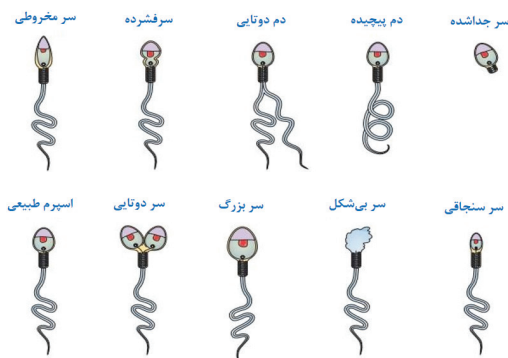
مورفولوژی اسپرم

بررسی شکل ظاهری (مورفولوژی) اسپرم آزمایش دقیقی برای سنجش کیفیت اسپرم است. تمام نمونه‌های منی حاوی تعدادی اسپرم غیر طبیعی هستند. بین ظاهر طبیعی اسپرم و تحرک آن همبستگی مثبتی وجود دارد. علاوه بر این ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم بیشترین ارتباط را با باروری حیوانات اهلی دارد. زمانی که تعداد اسپرم غیر طبیعی در منی به ۲۰ درصد یا بیشتر برسد باروری قوچ مورد تردید قرار می‌گیرد. به طور کلی منی با بیش از ۱۵ درصد اسپرم غیر طبیعی نباید برای تلقیح مصنوعی استفاده شود. برای بررسی مورفولوژی اسپرم، یک قطره محلول ۲/۹ درصد سیترات سدیم در گوشه لام گرم قرار داده می‌شود و یک قطره منی رقیق‌شده به آن اضافه می‌شود. با انتهای یک میله شیشه‌ای به آرامی این دو قطره را مخلوط کرده و سپس به کمک یک لام دیگر این ترکیب به صورت یک لایه بسیار نازک روی لام اول پخش می‌شود. بعد از خشک شدن گسترش تهیه شده، لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ ارزیابی می‌شوند. شکل ۲۷ مراحل آماده‌سازی لام برای ارزیابی ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم را نشان می‌دهد. اصولاً اشکال غیر طبیعی در اسپرم به دو دسته ناهنجاری‌های اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. منشا ناهنجاری‌های اولیه، بیضه و اختلال در فرایند اسپرم‌سازی

است؛ بنابراین این نوع ناهنجاری قابل جبران نیست. ناهنجاری‌های ثانویه طی عبور اسپرم از مجاری تناسلی و ذخیره‌سازی آن در اپیدیدیم و همچنین در مراحل فرآوری منی بروز می‌کنند. در شکل ۲۸ برخی ناهنجاری‌های اولیه و ثانویه مشاهده می‌شود.



شکل ۲۷- چگونگی تهیه گسترش منی برای ارزیابی ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم



شکل ۲۸- برخی ناهنجاری‌های مورفولوژی اسپرم

تحرک اسپرم

تحرک اسپرم یکی از مهم‌ترین نشانه‌های کیفیت و سلامت منی است. منظور از تحرک^۱ اسپرم، درصدی از اسپرم‌های موجود در نمونه منی است که توانایی حرکت و جابجا شدن در محیط را دارند. تحرک پیش‌رونده، شامل حرکت از نقطه‌ای به نقطه دیگر و تقریباً در یک خط راست است. برای ارزیابی تحرک اسپرم از دو روش حرکت موجی و حرکت انفرادی (پیش‌رونده) استفاده می‌شود.

حرکت موجی: حرکت موجی منی اولین بار توسط بلوم در سال ۱۹۴۲ مطرح شد. برای انجام این روش یک قطره منی تازه را بر روی یک لام تمیز (بدون لامل) و گرم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) قرار می‌دهند و با میکروسکوپ نوری حرکت موجی را مشاهده می‌نمایند. آنچه مشاهده می‌شود حرکت گردابی و توده‌ای اسپرم‌هاست که بر اساس سرعت حرکت اسپرم از ۵-۰ امتیازبندی می‌شود. توصیه می‌شود از نمونه‌هایی که امتیاز ۲ یا کمتر را کسب می‌نمایند در تلقیح مصنوعی استفاده نشود. در جدول ۲ معیارهایی برای ارزیابی حرکت موجی اسپرم‌ها ذکر شده است.

حرکت انفرادی (حرکت پیش‌رونده^۲): هرچه حرکت پیش‌رونده اسپرم بیشتر باشد، نمونه منی برای تلقیح

1- Motility

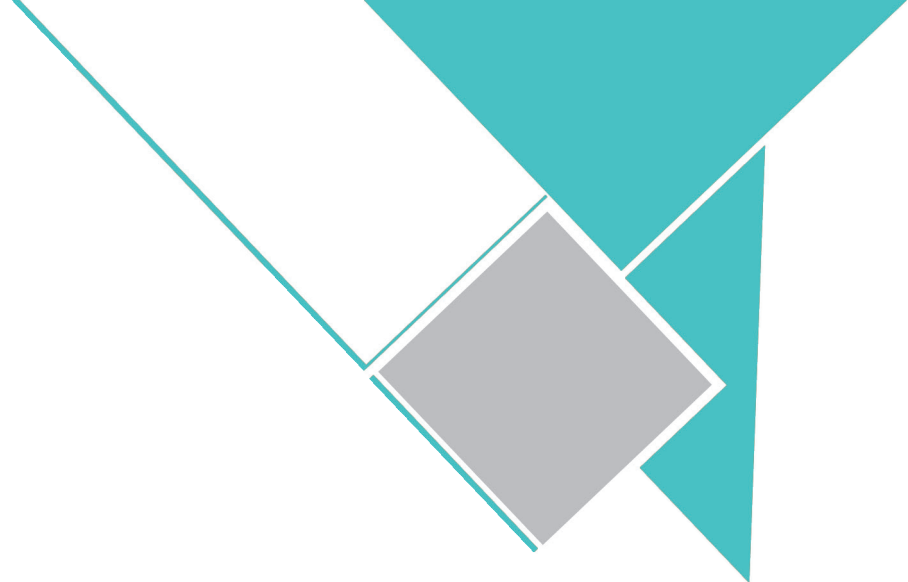
2- Progressive motility

مصنوعی مناسب‌تر است. برای بررسی این نوع تحرک باید از غلظت منی کاسته شود تا بتوان به بررسی انفرادی اسپرم‌ها پرداخت. برای حل این مشکل، از یک رقیق‌کننده ایزوتونیک مانند سرم فیزیولوژی یا سیترات سدیم ۲/۹ درصد استفاده می‌شود. سپس نمونه رقیق‌شده را روی یک لام شیشه‌ای قرار داده و با لام دیگر، نمونه گسترش داده می‌شود. سپس با استفاده از یک میکروسکوپ دارای صفحه گرم اقدام به بررسی نمونه می‌گردد. در این بررسی اسپرم‌هایی را که حرکت مستقیم و روبه جلو دارند مد نظر قرار می‌دهند. روش دیگر، ارزیابی کامپیوتری نمونه منی (CASA) است که علاوه بر امکان بررسی ویژگی‌های مختلف حرکتی اسپرم، می‌توان توسط آن شاخص‌های سرعت را هم مورد بررسی قرار داد. با آنکه این سیستم گران‌قیمت بوده و کار با آن دشوار است، با این حال تمامی انواع CASA دارای درجه صحت و اطمینان بالایی در گزارش ویژگی‌های مختلف اسپرم‌ها هستند.

جدول ۲- سیستم درجه‌بندی حرکت موجی اسپرم‌ها

امتیاز	کیفیت	ویژگی منی
۵	خیلی خوب	حرکات موجی بسیار متراکم و سریع است، به طوری که اسپرم‌ها به طور انفرادی قابل مشاهده نیستند. بیش از ۹۰ درصد اسپرم‌ها فعال هستند.
۴	خوب	با وجود حرکات شدید در نمونه، اما گردهای موجی مثل امتیاز ۵ وجود ندارد. ۷۰-۹۰ درصد اسپرم‌ها فعال هستند.
۳	متوسط	حرکات موجی اندک و آرامی وجود دارد و می‌توان اسپرم‌ها را به صورت انفرادی تشخیص داد. ۴۵-۶۰ درصد اسپرم‌ها فعال هستند.
۲	ضعیف	هیچ حرکت موجی مشاهده نمی‌شود، با این حال برخی حرکات اسپرم‌ها قابل مشاهده است. ۲۰-۴۰ درصد اسپرم‌ها فعال هستند.
۱	خیلی ضعیف	کمتر از ۱۰ درصد اسپرم‌ها فعال هستند و حرکات لغزشی ضعیفی در آن‌ها مشاهده می‌شود.
۰	مرده	هیچ تحرکی در اسپرم‌ها مشاهده نمی‌شود.





فصل ششم

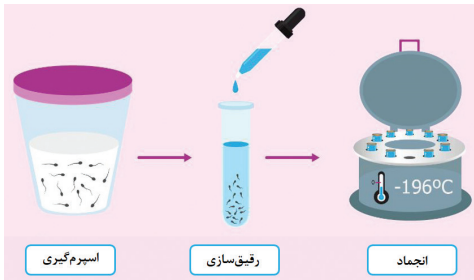
مراحل انجماد اسپرم گوسفند





فرآوری منی

پس از جمع‌آوری و ارزیابی اولیه نمونه منی، باکیفیت‌ترین منی وارد مرحله فرآوری می‌شود. فرآوری منی شامل مراحل رقیق‌سازی با رقیق‌کننده مناسب، سردسازی، انجماد و ذخیره اسپرم در نیتروژن مایع می‌باشد که در ادامه به طور مختصر توضیح داده می‌شود.



رقیق‌سازی منی

یکی از دلایل استفاده از تلقیح مصنوعی به جای آمیزش طبیعی استفاده بهینه از حیوان نر با ارزش ژنتیکی بالا برای بارور کردن تعداد زیادی حیوان ماده است؛ به طوری که تعداد اسپرم مورد نیاز برای هر بار تلقیح در حجمی معین تامین شود. به این فرایند رقیق‌سازی منی گفته می‌شود. میزان تحرک اسپرم و غلظت منی تعیین‌کننده میزان رقیق‌کننده لازم برای منی خواهد بود. منی با نمره ۵ در هر دو معیار تحرک و غلظت ممکن است بیش از نسبت ۴ به ۱

رقیق سازی شود، اما اغلب منی به نسبت ۲ به ۱ رقیق سازی می شود. منی با نمره ۲ نباید رقیق شود و فقط باید به صورت تازه و غیر رقیق شده استفاده شود.

برای رقیق سازی منی می توان از رقیق کننده های مصنوعی یا طبیعی استفاده کرد. رقیق کننده های مصنوعی شامل تریس یا سیترات که دارای خاصیت بافری هستند، گلوکز یا فروکتوز که منبع انرژی هستند و زرده تخم مرغ که برای محافظت از غشا پلاسمایی اسپرم در برابر شوک سرمایی است. در مزارع معمولاً شیر گاو در دسترس است و به عنوان یک رقیق کننده طبیعی کاربرد دارد. از شیر گاو به صورت پس چرخ نیز استفاده می شود. برای تهیه شیر پس چرخ، باید شیر به مدت ۱۰-۸ دقیقه تا دمای ۹۵-۹۲ درجه سانتی گراد حرارت داده شود و بعد از کاهش دمای آن تا حدود ۳۸ درجه سانتی گراد به منی اضافه شود (جدول ۳ و ۴). یک رقیق کننده مناسب، شامل ترکیباتی است که مواد غذایی مورد نیاز اسپرم را در مدت نگهداری تامین کند، در مقابل تغییرات pH مانند یک بافر عمل نماید، محیطی ایزوتونیک فراهم آورد و اسپرم را در مقابل سرمای ناگهانی محافظت کند.

جدول ۳- ترکیب چند رقیق کننده برای اسپرم گوسفند (منی مایع)

شیر (گرمادیده)		زرد- گلوکز- سیترات		زرد- تریس- فروکتوز	
مقدار	ترکیب	مقدار	ترکیب	مقدار	ترکیب
۱۰۰ میلی گرم	شیر هموزینه	۲/۳۷ گرم	سدیم سیترات	۳/۶۳۴ گرم	تریس آمینو متان
۱۰۰ میلی گرم	شیر پس چرخ	۰/۸ گرم	گلوکز	۰/۵ گرم	فروکتوز
		۲۰ میلی گرم	زرد تخم مرغ	۱/۹۹ گرم	اسید سیتریک
		۱۰۰ میلی لیتر	آب مقطر	۱۴ میلی گرم	زرد تخم مرغ
				۱۰۰ میلی لیتر	آب مقطر

به ازای هر میلی لیتر رقیق کننده، ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین و ۱ میلی گرم استرپتومایسین یا ۳۰۰ میکروگرم لینکومایسین و ۶۰۰ میلی گرم اسپیکتینومایسین به رقیق کننده افزوده می شود.

جدول ۴- ترکیب رقیق کننده رایج برای انجماد اسپرم گوسفند

مقدار	ترکیب
۲۴/۲ گرم	تریس آمینومتان
۱۳/۶ گرم	اسیدسیتریک
۱۰ گرم	فروکتوز
۶۴ میلی گرم	گلیسرول
۲۰۰ میلی گرم	زرده تخم مرغ
یک لیتر	آب مقطر

به ازای هر میلی لیتر رقیق کننده، ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین و ۱ میلی گرم استرپتومایسین یا ۳۰۰ میکروگرم لینکومایسین و ۶۰۰ میلی گرم اسپکتینومایسین به رقیق کننده افزوده می شود.

درجه رقیق سازی

پیش از رقیق کردن منی باید تعداد اسپرم و حجم مورد نیاز منی تعیین شود. امروزه منی مورد استفاده برای تلقیح مصنوعی در پایوت های پلاستیکی با ظرفیت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی لیتر عرضه می شود. نسبت رقیق سازی منی گوسفند به تعداد اسپرم فعال در نمونه و تعداد دوز مورد نیاز برای تلقیح بستگی دارد. نمونه هایی با غلظت و تحرک خوب (درجه ۵-۴) معمولاً به نسبت ۱ حجم منی به ۲ حجم رقیق کننده و یا ۱ به ۳ و ۱ به ۴ رقیق شده و برای تلقیح مصنوعی آماده می شوند.

روش رقیق سازی

بلافاصله بعد از جمع آوری و ارزیابی اولیه منی باید رقیق سازی صورت گیرد. برای جلوگیری از کاهش تدریجی باروری اسپرم ها، اسپرم و مایع رقیق کننده باید دمای یکسانی داشته باشند؛ بنابراین تا زمان رقیق سازی باید اسپرم و رقیق کننده در حمام آب گرم قرار گیرند. بر اساس درجه رقیق سازی، مایع رقیق کننده به منی اضافه می شود. بهتر است همیشه مایع رقیق کننده به منی اضافه شود، چون اضافه کردن منی به مایع رقیق کننده موجب کاهش تحرک اسپرم می شود. سپس مخلوط حاصل را به آهستگی هم زده و وارد مرحله سردسازی می شود.

سردسازی منی

یادآوری می شود که انجماد اسپرم در گوسفند به روش انجماد آهسته انجام می شود. بنابراین بعد از رقیق سازی منی، برای کاهش فعالیت متابولیکی اسپرم و متعادل شدن آن با ماده حفاظت کننده انجمادی، باید اسپرم را در یک دوره ۲-۱/۵ ساعته در دمای ۴-۵ درجه سانتی گراد خنک نمود و سپس در پایوته های ۰/۲۵ یا ۰/۵ میلی لیتری که در همین دما قرار دارند بسته بندی نمود (شکل ۲۹). می توان قبل از انجام سردسازی، منی را در پایوته ها بارگیری کرد؛

به این صورت که با انجام مکش، منی رقیق شده وارد پایوت می شود. یک انتهای پایوت با پودر پلی وینیل الکل که بین دو قسمت پنبه ای قرار دارد مسدود شده که به محض برخورد با منی از عبور هوا و رطوبت جلوگیری خواهد کرد. انتهای دیگر پایوت بعد از پر شدن با منی به طریق هیدروستاتیک یا اولتراسونیک مسدود می گردد. پایوت های محتوی منی به داخل ظروف آب ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل می شوند. سپس این مجموعه را به یخچال منتقل کرده تا به دمای ۵ درجه سانتی گراد برسد. دمای نمونه باید به تدریج و طی ۴-۱ ساعت از ۳۰ درجه سانتی گراد تا ۵ درجه سانتی گراد کاهش یابد.

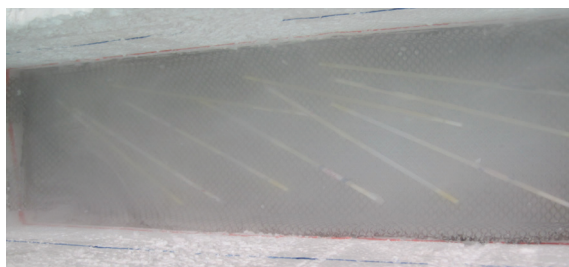
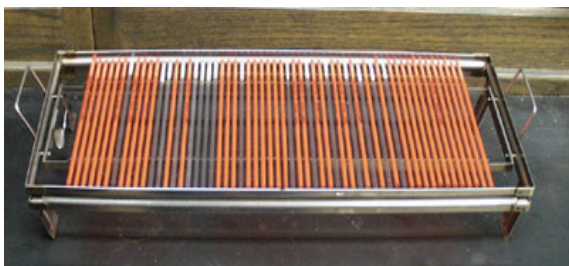


شکل ۲۹- انواع پایوت (نی) ذخیره سازی اسپرم

انجماد و ذخیره منی

اسپرم منجمد به اسپرمی اطلاق می‌شود که در دمای ۷۹- درجه سانتی‌گراد (یخ خشک، الکل یا سردخانه‌های مکانیکی) یا ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نیتروژن مایع (ازت مایع) منجمد شده و در مخزن‌های حاوی نیتروژن مایع نگهداری می‌شود. این اسپرم در نهایت به شکل یخ‌زده در اختیار دامدار قرار می‌گیرد تا در زمان تلقیح آن را یخ‌گشایی کرده و تلقیح مصنوعی انجام شود.

پس از اتمام دوره سردسازی پایوت‌های حاوی منی رقیق‌شده را بر روی یک سطح پایه‌دار (رک) به صورت افقی چیده و آن را به گونه‌ای روی ظرف حاوی نیتروژن مایع قرار می‌دهند که فاصله پایوت‌ها از سطح نیتروژن مایع ۴-۶ سانتی‌متر باشد (شکل ۳۰). بعد از طی ۱۰-۸ دقیقه قرارگیری در بخار نیتروژن مایع دمای پایوت‌ها به ۸۰- تا ۱۰۰- درجه سانتی‌گراد می‌رسد. سپس پایوت‌های منجمدشده به محفظه نگهداری پایوت (کانیستر) منتقل شده (شکل ۳۱ و ۳۲) و در نیتروژن مایع موجود در تانک نیتروژن غوطه‌ور و ذخیره می‌شوند (شکل ۳۳).



شکل ۳۰- بالا: پایوت های حاوی منی رقیق شده به صورت افقی روی رک چیده شده، پایین: نمایی از پایوت ها در بخار نیتروژن مایع



شکل ۳۱- تانک نیتروژن و کانسترهای (محفظه نگهداری پایوت) آن



شکل ۳۲- پایوت‌های منجمدشده در کانیستر تانک نیتروژن

زمانی که از یک فریزر قابل برنامه‌ریزی برای انجماد آهسته استفاده می‌شود، بعد از انتقال پایوت‌های خنک‌شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به فریزر، می‌توان طبق برنامه انجمادی زیر عمل کرد. در ابتدا دما را به میزان ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه تا رسیدن دما به ۱۲- درجه سانتی‌گراد کاهش داده و سپس تا رسیدن دما از ۱۲- به ۴۰- درجه سانتی‌گراد دما را به میزان ۴۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه کاهش می‌دهند و در نهایت برای رسیدن دما از ۴۰- به ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد دما را به میزان ۵۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه کاهش می‌دهند. بعد از رسیدن دمای پایوت‌ها به ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد، پایوت‌ها به داخل نیتروژن مایع منتقل شده و ذخیره می‌شوند (فصل ۳، شکل ۸-۶).



شکل ۳۳- انتقال پایوت های منی منجمد به تانک نیتروژن مایع

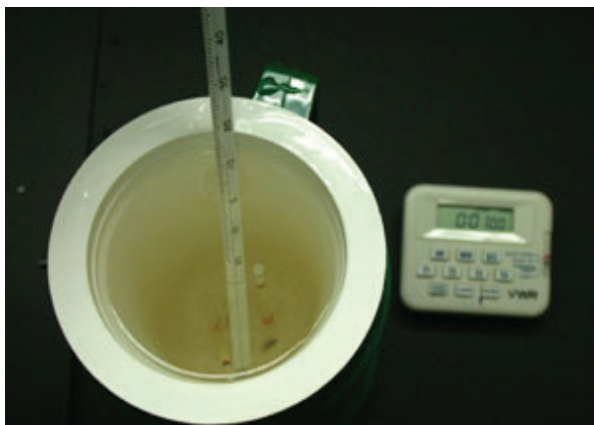
یخ گشایی منی

برای استفاده از منی منجمد شده برای تلقیح مصنوعی باید پایوت حاوی اسپرم گرم (یخ گشایی) شود. گرم کردن اسپرم منجمد برای تلقیح کار بسیار حساسی است. اگر گرم کردن در حرارت مناسب صورت نگیرد موجب مرگ اسپرم ها می شود. به این منظور بعد از بیرون آوردن پایوت از تانک نیتروژن (شکل ۳۴) به مدت ۴۰-۳۰ ثانیه در آب ۳۹-۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شود (شکل ۳۵). سپس پایوت را خشک کرده و لبه پرس شده آن را با قیچی بریده و در داخل تفنگ تلقیح مصنوعی قرار می دهند. برای مطالعه روش تلقیح مصنوعی در گوسفند به هندبوک استفاده از

فناوری‌های تولید مثلی در صنعت پرورش گوسفند - جلد دوم - روش‌های تلقیح مصنوعی و مزایای آن مراجعه نمایید.

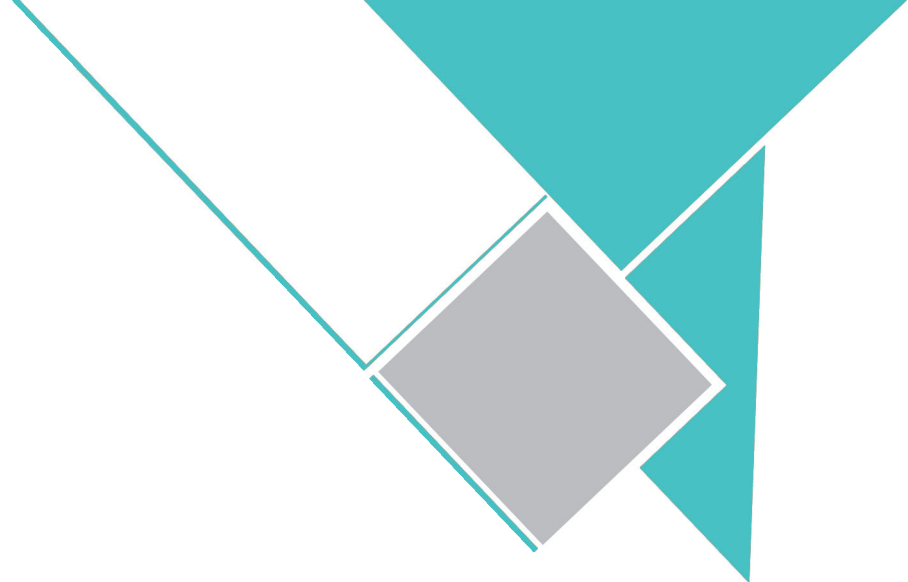


شکل ۳۴- خارج کردن پایوت‌های منجمد از تانک نیتروژن به منظور یخ‌گشایی



شکل ۳۵- یخ‌گشایی منی در آب ۳۷-۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰-۴۰ ثانیه





فصل هفتم

ارزیابی کیفیت اسپرم پس از انجماد





ارزیابی میکروسکوپی اسپرم پس از یخ‌گشایی

همان‌طور که در فصل قبل بیان شد، به منظور انتخاب منی با کیفیت برای ورود به مرحله انجماد، باید بررسی‌های کمی و کیفی اولیه بر روی آن انجام شود. فراسنجه‌هایی مانند تحرک، مورفولوژی، زنده‌مانی و سلامت غشا پلاسمایی قبل از انجماد مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و بهترین نمونه منی برای انجماد انتخاب می‌شود. عملکرد اصلی اسپرم انجام لقاح و باروری تخمک است؛ اما در طول فرایند انجماد و یخ‌گشایی سلول دچار تغییرات ساختاری و بیوشیمیایی متعددی می‌شود که می‌تواند باروری اسپرم را تحت تأثیر قرار دهد، بنابراین لازم است پس از یخ‌گشایی دوباره کیفیت آن مورد بررسی قرار گیرد.

بخش اول: آزمایشات اولیه ارزیابی کیفیت اسپرم

ارزیابی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم

تحرک^۱ یکی از مهم‌ترین نشانه‌های کیفیت و سلامت اسپرم و یک فاکتور مهم برای ارزیابی باروری آن است؛ زیرا تنها اسپرم‌های متحرک توانایی عبور از دستگاه تولید مثلی ماده و بارور کردن تخمک را دارا می‌باشند. منظور از تحرک اسپرم، درصدی از اسپرم‌های موجود در نمونه است

1- Motility

که توانایی حرکت و جابجا شدن در محیط را دارند. تحرک پیش‌رونده^۱، شامل حرکت از نقطه‌ای به نقطه دیگر و تقریباً در یک خط راست است.

۱- بررسی چشمی

برای بررسی تحرک اسپرم می‌توان از یک میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی ۴۰۰ استفاده کرد. ابتدا توسط سمپلر ۱۰ میکرولیتر از منی یخ‌گشایی‌شده را روی لام گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از لامل‌گذاری در زیر میکروسکوپ چند میدان دید در نمونه را به طور تصادفی بررسی کرده و اسپرم‌هایی که دارای حرکت و تحرک رو به جلو در یک خط نسبتاً مستقیم هستند را ثبت کرده و با محاسبه میانگین اسپرم‌های موجود در میدان‌های دید، درصد اسپرم دارای تحرک و تحرک پیش‌رونده تعیین می‌شود.

۲- نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز اسپرم (CASA)

امروزه ارزش تشخیصی پارامترهای حرکتی تنها توسط سیستم‌های آنالیز کامپیوتری قابل محاسبه می‌باشد. به این منظور برای بررسی فراسنجه‌های حرکتی اسپرم پس از انجماد و یخ‌گشایی، نرم‌افزار کامپیوتری آنالیز

1- Progressive motility

اسپرم^۱ (CASA) مورد استفاده قرار می‌گیرد. CASA یک سیستم پیشرفته و مجهز به یک میکروسکوپ سه چشمی فاز کنتراست، دوربین، صفحه گرم‌کن، کارت سخت‌افزاری برای تبدیل تصاویر بصورت دیجیتال، کامپیوتر و یک نرم‌افزار پیشرفته پردازش و آنالیز اسپرم است. با آنکه این سیستم گران‌قیمت بوده و کار با آن نیازمند آموزش است، با این حال تمامی انواع CASA دارای درجه صحت و اطمینان بالایی در گزارش ویژگی‌های مختلف اسپرم‌ها هستند. با استفاده از این روش ارزیابی، علاوه بر امکان بررسی ویژگی‌های مختلف حرکتی اسپرم می‌توان شاخص‌های سرعت را هم مورد بررسی قرار داد. امروزه سازمان جهانی بهداشت^۲ (WHO) مجموعه مشخصی از پارامترها را پیشنهاد کرده است که تمام سیستم‌های CASA از آن تبعیت می‌کنند (جدول ۵). عوامل متعددی از جمله آماده‌سازی نمونه، غلظت اسپرم و عمق بخش شمرده شده بر عملکرد این سیستم تاثیرگذار است. از این سیستم در سطح وسیعی برای ارزیابی اسپرم گونه‌های مختلف استفاده می‌شود. بنابراین بر اساس شرکت سازنده و گونه جانوری مورد مطالعه استانداردسازی و تنظیم خاص خود را نیاز دارد.

1- Computer-assisted sperm analysis (CASA)

2- World health organization

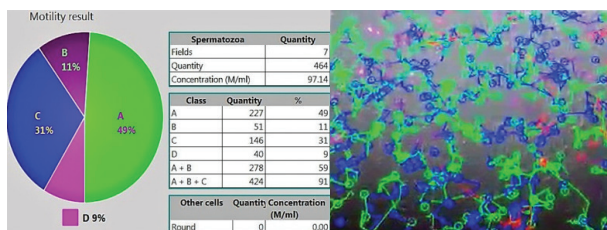
جدول ۵- فراسنجه‌های مورد ارزیابی در نرم‌افزار CASA

علامت اختصاری	فراسنجه‌های حرکتی اسپرم
TM ^۱	تحرك كل؛ درصد اسپرم‌های متحرك
PM ^۲	تحرك پيش‌رونده؛ درصد اسپرم‌های دارای تحرك رو به جلو
LIN ^۳	درصد خطی بودن حرکت اسپرم: VSL/ VCL
STR ^۴	راستی مسیر طی شده: میانگین VSL/ VAP
VCL ^۵	سرعت در مسیر منحنی (μm/s)
ALH ^۶	دامنه جابه‌جایی سر اسپرم (μm)
VAP ^۷	میانگین سرعت حرکت اسپرم در مسیر (μm/s)
VSL ^۸	سرعت در مسیر مستقیم (μm/s)

جهت ارزیابی، نمونه اسپرم یخ‌گشایی شده به میکروتیوب منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود. سپس با استفاده از سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام تخلیه شده و یک لامل روی آن قرار می‌گیرد. لام مورد نظر به زیر میکروسکوپ فاز کنتراست منتقل شده و فراسنجه‌های حرکتی اسپرم با استفاده از کامپیوتر مجهز به نرم‌افزار ارزیابی می‌شود.

1- Total motility	2- Progressive motility
3- Linearity	4- Straightness
5- Curvilinear velocity	6- Amplitude of lateral head displacement
7- Average path velocity	8- Straight line velocity

برای برآورد درصد تحرک اسپرم، سه میدان دید به صورت تصادفی گزینش شده و اجازه داده می شود تا سیستم در هر میدان دید ۵ بررسی و جمعاً ۱۵ بررسی برای هر نمونه انجام دهد (شکل ۳۶).

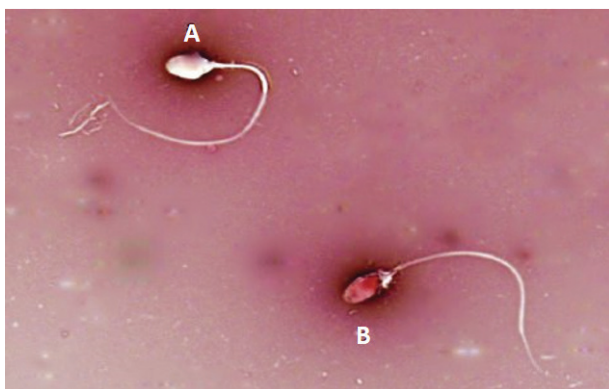


شکل ۳۶- سیستم آنالیز کامپیوتری (CASA) و نمایی از اسپرم های دارای تحرک و نحوه گزارش آنالیز

ارزیابی زنده ماننی اسپرم

برای ارزیابی زنده ماننی اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین- نیگروزین استفاده می شود. حیات اسپرم به سلامت غشا آن وابسته است. در صورت سالم بودن غشا هیچ رنگی به آن نفوذ نمی کند. رنگ ائوزین دارای بار منفی است و توسط بار منفی ناشی از اسیدسیالیک موجود در غشا پلاسمایی اسپرم زنده دفع می شود. بنابراین ائوزین توانایی عبور از غشا سالم را ندارد. ولی زمانی که غشا آسیب می بیند این ویژگی از بین رفته و ائوزین می تواند از غشا پلاسمایی اسپرم عبور کرده و موجب رنگی شدن اسپرم شود. همراه ائوزین یک رنگ زمینه مانند نیگروزین، فاست گرین و اوپال آبی برای مشاهده بهتر اسپرم ها استفاده می شود. برای ارزیابی نمونه، ۱۰ میکرولیتر اسپرم را روی یک لام گرم و تمیز قرار داده سپس ۱۰ میکرولیتر از رنگ ائوزین-نیگروزین بر روی آن ریخته و با هم مخلوط می شود. با قرار دادن لام دیگری بر روی نمونه، گسترشی از مخلوط آن ها بر روی لام تهیه می شود. پس از خشک شدن گسترش، لام به زیر میکروسکوپ منتقل شده و درصد زنده ماننی اسپرم ها با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی قرار می گیرد. اسپرم هایی که به رنگ قرمز یا صورتی تیره دیده

می‌شوند، سلول‌های مرده و اسپرم‌هایی که به رنگ سفید یا صورتی روشن هستند، سلول‌های زنده محسوب می‌شوند (ایوانس و مکسول، ۱۹۸۷) (شکل ۳۷).



شکل ۳۷- رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین، A: اسپرم زنده، B: اسپرم مرده

ارزیابی سلامت غشا پلاسمایی اسپرم

یکپارچگی و سلامت غشا اسپرم برای متابولیسم آن، کاپاسیته شدن، واکنش آکروزوم و اتصال به غشا پلاسمایی تخمک و انجام لقاح ضروری است. برای ارزیابی سلامت غشا اسپرم از آزمون تورم هایپواسموتیک^۱ (HOST test) استفاده می‌شود. این آزمایش بر اساس یک اصل ساده فیزیولوژیک و اسمولاریته محیطی که اسپرم در آن قرار می‌گیرد عمل می‌کند. اسمولاریته مورد نیاز برای اسپرم گوسفند ۳۲۰

1- Hypo-osmotic swelling test (HOST)

میلی اسمول در لیتر است و اسمولاریته محیط هاست ۱۰۰ میلی اسمول در لیتر است؛ بنابراین اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط هایپواسموتیک به سرعت واکنش اسمزی نشان داده و انتهای دم آن گره می خورد. این پدیده به علت ضعیف بودن اتصالات غشا در ناحیه دم نسبت به سر اسپرم است و موجب نفوذ آب و افزایش حجم در ناحیه دم می شود. بدیهی است که تنها اسپرم های با غشا سالم قادر هستند به این تغییر اسمزی واکنش نشان دهند و اسپرم های مرده در این محیط هیچ واکنشی نشان نمی دهند. در واقع پس از انجام این آزمایش اسپرم های با دم گره خورده به عنوان اسپرم های زنده و اسپرم هایی که دم آن ها صاف است به عنوان اسپرم مرده تلقی می شوند. به این منظور ۳۰ میکرولیتر اسپرم یخ گشایی شده با ۳۰۰ میکرولیتر محلول هاست مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از مخلوط را بر روی یک گوشه لام قرار داده و با لام دیگر به آرامی گسترش تهیه می شود. پس از خشک شدن گسترش، با استفاده از میکروسکوپ نوری تعداد ۲۰۰ اسپرم شمارش شده و سپس درصد اسپرم های با غشا سالم و آسیب دیده محاسبه می شود (رول و همکاران، ۱۹۹۴) (شکل ۳۸).

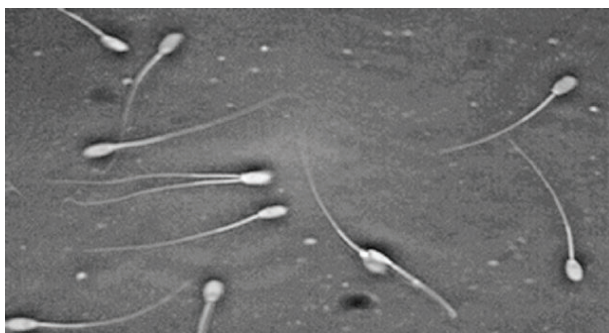


شکل ۳۸- اسپرم‌های با غشا سالم و دم گره‌خورده پس از آزمایش تورم هایپواسموتیک

ارزیابی مورفولوژی (ریخت‌شناسی) اسپرم

یکی از فراسنجه‌های مهم در ارزیابی آزمایشگاهی مایع منی، مورفولوژی یا ریخت‌شناسی اسپرم است. WHO چند روش رنگ‌آمیزی برای بررسی مورفولوژی اسپرم معرفی کرده است از جمله، رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو، رنگ‌آمیزی Shorr، Diff-quick، Hematoxylin Eosin، Toluidin Blue و Giemsa (نصر اصفهانی و همکاران، ۱۳۸۹) که اغلب برای اسپرم انسان کاربرد دارد؛ اما یکی از معمول‌ترین روش‌های بررسی مورفولوژی اسپرم دام استفاده از محلول هانکوک (HONCOCK) است. علاوه بر این در فصل ۵ به روش ساده استفاده از محلول ۲/۹ درصد سیترات سدیم برای بررسی مورفولوژی اسپرم اشاره شد.

محلول هانکوک از ۳ بخش شامل، فرمالین ۳۷ درصد (۶۲/۵ میلی لیتر)، محلول سدیم سالین (۱۵۰ میلی لیتر) و آب مقطر (۵۰۰ میلی لیتر) تشکیل شده است. برای ارزیابی اسپرم‌های غیرطبیعی، ۳۰ میکرولیتر منی یخ‌گشایی شده به میکروتیوب حاوی یک میلی لیتر محلول هانکوک اضافه می‌شود و سپس یک قطره از این مخلوط روی لام قرار گرفته و توسط لامل پوشانده می‌شود. لام تهیه شده توسط میکروسکوپ فاز کنتراست و با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و نتیجه به صورت درصد کل اسپرم‌های غیرطبیعی (آکروزوم غیرطبیعی، سر جدا شده، نقص‌های دم و قطعه میانی اسپرم) به کل اسپرم‌ها گزارش می‌شود (شرفی و همکاران، ۲۰۱۵) (شکل ۳۹).



شکل ۳۹- بررسی مورفولوژی اسپرم به روش هانکوک، اسپرم با دم دوتایی در تصویر دیده می‌شود

ارزیابی‌های اسپکتروفتومتری اسپرم

دستگاه اسپکتروفتومتر

دستگاه اسپکتروفتومتر^۱ یا طیف‌سنجی از برهم‌کنش بین نور و ماده جهت آنالیز مواد استفاده می‌کند. دستگاه‌های اسپکتروفتومتر فرابنفش/مرئی (UV/Vis) به عنوان پرمصرف‌ترین دستگاه‌های اسپکتروفتومتر در آزمایشگاه هستند که در آن‌ها با توجه به میزان عبور و جذب نور، غلظت مواد در یک نمونه تعیین می‌گردد. معمولاً منابع نوری قابل استفاده در این دستگاه یک لامپ هالوژن تنگستن، برای نور مرئی و یک لامپ دوتریم برای نور UV می‌باشد. اساساً این دستگاه برای اسپکتروفتومتری مایعات طراحی شده ولی نمونه‌های جامد شفاف و گازها را نیز می‌توان مورد آنالیز و بررسی قرار داد. اسپکتروفتومترها، با عبور طول موج‌های مشخصی از انرژی تابشی (نور) از یک آنالیت (ماده مورد بررسی در نمونه)، غلظت آن را در یک محلول تعیین می‌کنند. به دلیل تفاوت در ساختار ماده، تعداد و آرایش گروه‌ها، اتم‌ها و مولکول‌ها نور را در طول موج‌های خاص با الگوی طیف مشخص جذب می‌کنند. بر اساس قانون بیر-لامبرت مقدار نوری که در این طول موج مشخص جذب می‌شود مستقیماً با غلظت آن نمونه شیمیایی متناسب است (شکل ۴۰).

1- Spectrophotometer



شکل ۴۰- دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis و سل (Cuvette) دستگاه که محل قرارگیری نمونه محلول است.

ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپید توسط اسپکتروفتومتری

یکی از مهم ترین رخداد های انجماد اسپرم افزایش تولید رادیکال های آزاد در طول فرآوری و سرد سازی می است. نتیجه واکنش رادیکال های آزاد با لیپید های غشا اسپرم، بروز استرس اکسیداتیو است. محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید های غشا مالون دی آلدئید^۱ (MDA) است، بنابراین اندازه گیری این ماده بعد از یخ گشایی معیاری برای قضاوت درباره وضعیت اکسیداتیو سلول است. اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید توسط

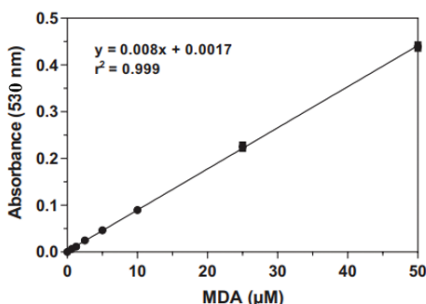
1- Malondialdehyde (MDA)

تیوباربیوتوریک اسید^۱ یکی از رایج ترین روش های بررسی نرخ پراکسیداسیون لیپیدها توسط اسپکتروفتومتری است. در این روش یک مولکول مالون دی آلدئید با دو مولکول تیوباربیوتوریک اسید واکنش می دهد، فرآورده این واکنش مولکولی صورتی رنگ است که بیشترین جذب نوری را در طول موج ۵۳۰ نانومتر دارد.

برای انجام آزمایش، یک میلی لیتر منی یخ گشایی شده با یک میلی لیتر تری کلرواستیک اسید^۲ ۲۰ درصد با هم مخلوط و به داخل لوله ریخته شده و در $g \times 900$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ می شود. پس از سانتریفیوژ، یک میلی لیتر از محلول بالای لوله با یک میلی لیتر تیوباربیوتوریک اسید در میکروتیوب آمیخته می شود. این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در صفحه گرم ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار می گیرد. نمونه پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سرد شده و سپس جذب نوری در طول موج ۵۳۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری می شود. جذب نوری نمونه های مختلف یادداشت می شود و در پایان نتایج حاصل از دستگاه اسپکتروفتومتری را در فرمول منحنی استاندارد قرار داده و غلظت مالون دی آلدئید محاسبه می شود (شرفی و همکاران، ۲۰۱۵) (شکل ۴۱).

1- Thiobarbituric acid

2- Trichloroacetic acid



شکل ۴۱- نمونه منحنی استاندارد غلظت مالون دی آلدئید در طول موج ۵۳۰ نانومتر

بخش دوم: ارزیابی فلورسنت و فلوسایتمتری کیفیت اسپرم میکروسکوپ فلورسنت

میکروسکوپ فلورسنت نوع خاصی از میکروسکوپ نوری است که منبع نور آن به جای نور مرئی (۷۰۰-۴۰۰ نانومتر)، پرتوهای فرابنفش (۴۰۰-۱۰ نانومتر) است (شکل ۴۲). برای مشاهده نمونه توسط این نوع میکروسکوپ باید بخش‌ها یا ملکول‌های ویژه‌ای در داخل سلول با مواد فلورسنت رنگ‌آمیزی شود. مواد فلورسنت نور را در طول موج فرابنفش جذب می‌کنند و در طول موج بلندتری در طیف مرئی تابش می‌کنند. از این رنگ‌ها به عنوان برچسب فلورسنتی مولکول‌های زیستی (مثل انواع آنتی‌بادی، پپتیدها، پروتئین‌ها و غیره) جهت شناسایی و تصویربرداری از بخش‌های خاص سلول استفاده می‌شود. برخی از رنگ‌های مورد استفاده در

آزمایشات اسپرم، به همراه طول موج دریافتی و تابشی آنها در شکل ۴۳ نشان داده شده است.



شکل ۴۲- میکروسکوپ فلورسنت

رنگ فلورسنت	طول موج دریافتی	طول موج تابشی
Hoechst 33342	352 nm	455 nm
DAPI	359 nm	461 nm
MitoTracker Green	490 nm	512 nm
Fluorescein	493 nm	513 nm
SYBR Green I	498 nm	522 nm
FITC	495 nm	517 nm
CFDA	495 nm	517 nm
Acridine Orange	431 nm	520 nm
Rhodamine 123	507 nm	529 nm
MitoTracker Orange	551 nm	575 nm
JC-1	592 nm	595 nm
MitoTracker Red	578 nm	599 nm
Propidium Iodide	538 nm	619 nm

شکل ۴۳- برخی رنگ‌های رایج در آزمایشات ارزیابی اسپرم به روش فلورسنت

دستگاه فلوسایتومتری

دنیای امروز نیازمند به کارگیری تکنولوژی‌های مدرن برای افزایش سرعت، دقت و سهولت انجام آزمایشات است. کار با میکروسکوپ فلورسنت زمان‌بر است و در یک نمونه تعداد کمی در حدود ۱۰۰ سلول در دقیقه قابل شمارش و ارزیابی است؛ علاوه بر این محاسبات آن ذهنی انجام می‌شود و دقت فرد عامل بر نتایج گزارش شده موثر است. بنابراین برای رفع نقایص میکروسکوپ فلورسنت تکنیک فلوسایتومتری توسعه یافت. فلوسایتومتر می‌تواند در هر ثانیه ۵۰۰۰-۵۰۰۰۰ سلول را بررسی و شمارش نماید و دقتی بسیار بالا در حد تشخیص یک سلول سرطانی در میان ۱۰۰۰۰-۱۰۰۰۰۰ سلول عادی را دارا می‌باشد.

فلوسایتومتری تکنیکی با دقت و سرعت بالا است که به کمک آن سلول‌های موجود در مایعات بیولوژیک با استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت و تابش نور لیزر شناسایی می‌شوند. این تکنیک بر اساس پراکنده‌سازی نور توسط سلول‌های مورد آزمایش و انتشار فلورسنت از آن‌ها استوار است. دستگاه فلوسایتومتری به نحوی طراحی شده که قادر است تعداد زیادی سلول و ذرات بیولوژیکی مانند هسته‌های جدا شده سلولی، کروموزوم‌ها و میکروارگانیسم‌ها را در محیط مایع با استفاده از اشعه لیزر، آنالیز نموده و خواص فیزیکی آن‌ها مانند

اندازه نسبی و شکل را مشخص نماید. ویژگی‌هایی که توسط فلوسایتومتری قابل اندازه‌گیری است شامل شناسایی و شمارش دقیق سلول‌ها جهت ارزیابی شاخص‌های سلولی، اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، مطالعه فعالیت آپوپتوزی (مرگ سلولی) و طیف گسترده‌ای از پروتئین‌های داخل سلولی و یا متصل به غشا و نیز وضعیت DNA و RNA سلول می‌باشد (شکل ۴۴).



شکل ۴۴ - دستگاه فلوسایتومتری

آزمایشات تخصصی اسپرم به روش فلوسایتومتری و فلورسنت

روش‌های ارزیابی سطح استرس اکسیداتیو - غلظت
رادیکال آزاد

رنگ آمیزی DCFH-DA و DHR-123

ارزیابی رادیکال آزاد در اسپرم توسط دو نشانگر اصلی
DCFH-DA^۱ و DHR-123^۲ انجام می‌شود. نشانگر DCFH-DA،

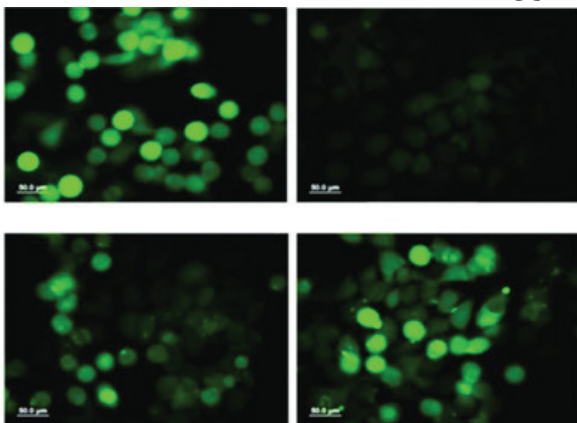
1- Dichlorodihydrofluorescein diacetate 2- Dihydrorhodamine 123

حساسیت بالایی نسبت به H_2O_2 دارد. این رنگ به طور غیرفعال وارد سلول شده و در اثر عملکرد استراز سلولی گروه دی استات آن جدا شده و ترکیب غیر فلورسنت DCFH تولید می شود. در حضور پراکسید هیدروژن رنگ DCFH به DCF اکسید شده و رنگ فلورسنت سبز از خود ساطع می کند. این ترکیب قادر به خروج از سلول نیست و با میکروسکوپ فلورسنت قابل مشاهده و با دستگاه فلوسایتومتری قابل اندازه گیری است (شکل ۴۵ و ۴۶). نمونه اسپرم توسط بافر PBS شستشو داده شده و غلظت نهایی آن به $10^6 \times 5-3$ اسپرم در هر میلی لیتر می رسد. سپس ۲۵ میکرومول رنگ DCFH-DA به سوسپانسیون اسپرم اضافه شده و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری می شود. پس از شستشو ۲ میکرولیتر پروپیویدیم آیویدید^۱ (PI) به نمونه اضافه شده و میزان ROS تولیدی به وسیله دستگاه فلوسایتومتری اندازه گیری می شود (محفوظ و همکاران، ۲۰۰۹).

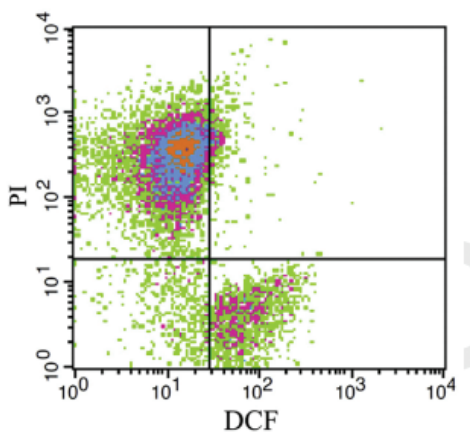
رنگ DHR-123، مشتق غیر فلورسنت رنگ رودامین ۱۲۳ (Rhodamine 123) است. DHR-123 با ورود به سلول توسط رادیکال سوپراکسید، به شکل رودامین ۱۲۳ سبز رنگ اکسید می شود. این رنگ کاتیونی تمایل بالایی برای تجمع در میتوکندری دارد و نسبت به روش DCFH-DA حساسیت

1- Propidium iodide

بالاتری برای تشخیص رادیکال آزاد در سلول دارد (روته و همکاران، ۱۹۸۸).



شکل ۴۵- تصویر میکروسکوپ فلورسنت از آزمایش تعیین غلظت رادیکال آزاد (H_2O_2) توسط رنگ آمیزی DCFH-DA



شکل ۴۶- هیستوگرام فلوسایتومتری تعیین غلظت رادیکال آزاد توسط DCFH-DA به همراه رنگ PI

روش های ارزیابی یکپارچگی آکروزوم اسپرم

ارزیابی آکروزوم بعد از یخ‌گشایی از این جهت مهم است که آسیب‌های ناشی از انجماد ممکن است واکنش آکروزوم را در بعضی از اسپرم‌ها تحریک کرده باشد و یا ناحیه آکروزوم آن‌ها آسیب دیده باشد. در این صورت اسپرم قادر به اتصال به تخمک نبوده و علی‌رغم داشتن تحرک، بارور نیست. برای ارزیابی وضعیت آکروزوم روش‌های مختلفی وجود دارد که اساس اکثر آن‌ها رنگ‌آمیزی با رنگ‌های فلورسنت می‌باشد. رنگ‌آمیزی PSA-FITC (کلودل و همکاران، ۲۰۱۲)، PNA-FITC (لی و همکاران، ۲۰۱۰)، FITC-PNA/PI (آلوارز و همکاران، ۲۰۱۲)، رنگ‌آمیزی CTC کلرتراسایکلین فلورسنت (پرز و همکاران، ۱۹۹۶) و رنگ‌آمیزی مروسیانین ۵۴۰^۱ (M540) (لانگنر و همکاران، ۱۹۹۳).

رنگ‌آمیزی لکتین‌های نخود

در این روش لکتین‌های گیاه نخود شامل PNA^۲ و PSA^۳، توسط رنگ‌های فلورسنت FITC^۴ و یا ترکیبی از FITC-PI نشاندار می‌شوند. این لکتین‌ها تمایل به اتصال به قندهای سطح غشا اسپرم خصوصا در ناحیه آکروزوم دارند و در صورتی

1- Merocyanine 540

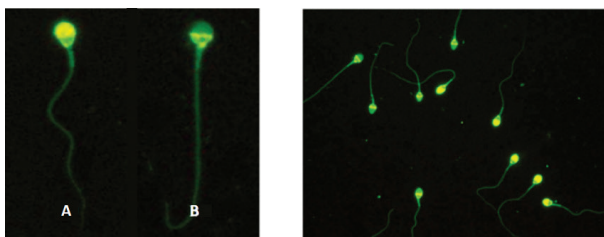
2- Peanut agglutinin (PNA)

3- Pisum sativum agglutinin (PSA)

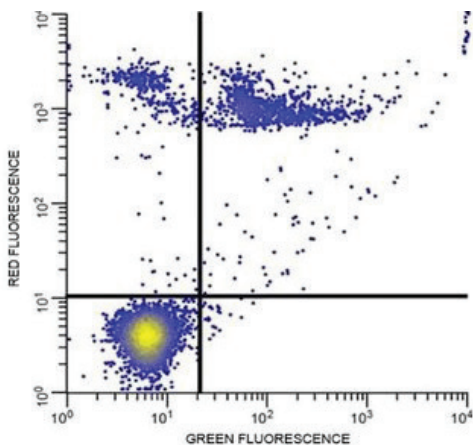
4- Fluorescein isothiocyanate (FITC)

که آکروزوم سالم باشد تمام سطح سر اسپرم خصوصاً در بخش آکروزوم توسط رنگ FITC سبز رنگ می‌شود. اما اگر واکنش آکروزوم رخ داده باشد فقط یک کمر بند سبز رنگ در ناحیه میانی سر اسپرم دیده می‌شود. برای انجام این رنگ‌آمیزی، ۲۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپرم با دور $1200 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. پس از برداشتن پلت رویی و تنظیم غلظت اسپرم به میزان یک میلیون اسپرم در میلی‌لیتر، ۱۰ میکرولیتر از نمونه سوسپانسیون اسپرم را در ۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد حل کرده و محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد تا تثبیت شود. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول اسپرم و اتانول روی لام قرار می‌گیرد به طوری که بتوان یک گسترش از آن تهیه کرد. پس از خشک شدن اتانول، ۲۰ میکرولیتر PSA (۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) روی لام قرار داده و لام به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار می‌گیرد. سپس لام ۱۵ بار در آب مقطر غوطه‌ور شده و به لام اجازه داده می‌شود تا خشک شود و بعد با گلیسرول پوشش داده شده و تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید با میکروسکوپ فلورسنت با بزرگنمایی ۴۰۰ ارزیابی می‌شود. اسپرم‌های با سر سبز به عنوان اسپرم با آکروزوم دست نخورده و سالم و اسپرم‌های با کمر بند سبز به عنوان اسپرم با آکروزوم تخریب

شده در نظر گرفته می شود (دیس و همکاران، ۲۰۰۹). علاوه بر این دستگاه فلوسایتومتری هم قادر به آنالیز این آزمایش می باشد (شکل ۴۷ و ۴۸).



شکل ۴۷- تصویر میکروسکوپ فلورسنت از آزمایش تعیین واکنش آکروزوم با استفاده از رنگ آمیزی PSA-FITC
A: اسپرم سالم و بدون انجام واکنش آکروزوم، B: اسپرم با آکروزوم تخریب شده در اثر واکنش آکروزوم



شکل ۴۸- گراف فلوسایتومتری واکنش آکروزوم با استفاده از رنگ آمیزی PSA-FITC

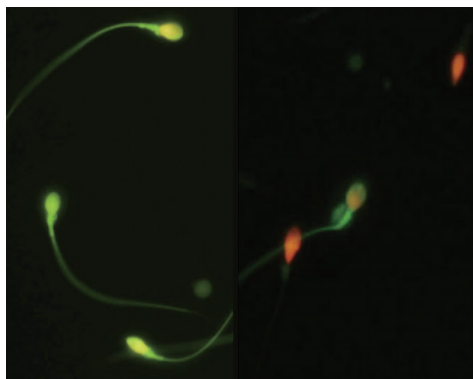
روش‌های ارزیابی پتانسیل غشا میتوکندری اسپرم مطالعات نشان داده اسپرم‌هایی که دارای پتانسیل غشا میتوکندری (MMP)^۱ بالاتری هستند، تحرک و عملکرد بهتری نسبت به سایر اسپرم‌ها دارند؛ اما پتانسیل غشا میتوکندری در اثر استرس اکسیداتیو و همچنین در طول فرایند انجماد دچار افت شدیدی می‌شود. بنابراین پتانسیل غشا میتوکندری شاخصی با ارزش برای تعیین سلامت و عملکرد اسپرم بعد از انجماد است. انواع مختلف رنگ‌های فلورسنت برای بررسی فعالیت میتوکندری مورد استفاده قرار گرفته از جمله، رودامین ۱۲۳ (Rhodamine 123) (شرفی و همکاران، ۲۰۱۵)، انواع میتوترکر (Mitotracker Red و Mitotracker Orange) (هالیپ و همکاران، ۲۰۰۵) و JC-1 (فراکزک و همکاران، ۲۰۱۲).

رنگ آمیزی Rhodamine 123-PI

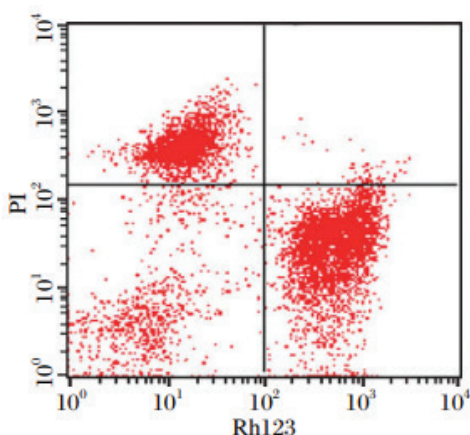
رودامین ۱۲۳ یک نشانگر فلورسنت کاتیونی است که به غشا داخلی میتوکندری متصل می‌شود. جذب آن به وسیله میتوکندری به پتانسیل غشا میتوکندری بستگی دارد. رودامین به طور فعال وارد زنجیره تنفسی میتوکندری شده و تجمع آن در میتوکندری باعث تولید فلورسنس سبز رنگ می‌شود. فقدان فلورسنس نشان‌دهنده نقص در پتانسیل غشا میتوکندری است (شکل ۴۹).

1- Mitochondrial membrane potential

برای اندازه گیری میزان فعالیت میتوکندری ابتدا پایوت اسپرم را یخ گشایی کرده و بعد از سانتریفیوژ، ۵۰۰ میلی لیتر بافر تریس به نمونه منی افزوده می شود؛ سپس ۱۰ میکرولیتر رودامین اضافه شده و نمونه در مکان تاریک و در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری می شود. بعد از طی این زمان، ۱۰ میکرولیتر PI به نمونه اضافه کرده و میزان فعالیت میتوکندریایی نمونه ها به وسیله میکروسکوپ فلورسنت و یا دستگاه فلوسایتومتری اندازه گیری می شود. در نمودار دستگاه فلوسایتومتر، نمونه رودامین مثبت و PI منفی ($R123^+/PI^-$) به عنوان اسپرم دارای میتوکندری فعال و نمونه رودامین مثبت و PI مثبت ($R123^+/PI^+$) به عنوان اسپرم دارای میتوکندری غیر فعال در نظر گرفته می شود (شرفی و همکاران، ۲۰۱۵) (شکل ۵۰).



شکل ۴۹- تصویر میکروسکوپ فلورسنت آزمایش فعالیت میتوکندری با استفاده از رنگ آمیزی Rhodamine 123-PI اسپرم های مرده و بدون فعالیت در اثر نفوذ رنگ PI نارنجی دیده می شوند.



شکل ۵۰- گراف فلوسایتومتری فعالیت میتوکندری با استفاده از رنگ آمیزی Rhodamine 123-PI

روش‌های ارزیابی زنده‌مانی اسپرم

رنگ‌های فلورسنت مختلفی برای ارزیابی زنده‌مانی اسپرم استفاده می‌شود. این رنگ‌ها به دو گروه تقسیم‌بندی می‌شوند، گروه رنگ‌های غیر قابل نفوذ به غشا که فقط می‌توانند از غشا سلول مرده و آسیب دیده عبور نمایند و نمایان شدن آن‌ها در زیر میکروسکوپ نشانه آسیب یا مرگ سلولی است، مانند رنگ‌های PI، TOTO، YoPro-1، ToPro-3 و Hoechst 3358. گروه دوم رنگ‌های استیله فاقد خاصیت فلورسنتی هستند که قادر به عبور از غشا سالم بوده و در داخل سلول به رنگ فلورسنت تبدیل می‌شوند،

مانند رنگ‌های SYBR-14 و CFDA، CAM، SYTO-1. اغلب محققین ترجیح می‌دهند از ترکیب رنگ‌های دوتایی فلورسنت برای دستیابی به نتایج دقیق‌تر استفاده نمایند مانند ترکیب رنگ‌های SYBR-14/PI، YO-PRO-1/PI، AnnexinV-FITC/PI و AnnexinV-PE/7-ADD.

رنگ آمیزی Annexin V-FITC

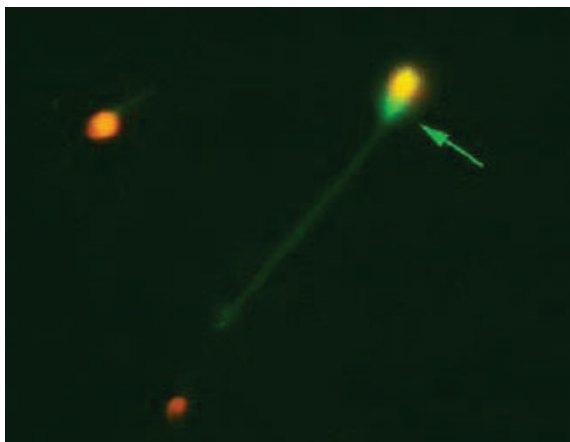
در این آزمایش از فسفاتیدیل سرین غشا به عنوان یک نشانگر برای تشخیص زنده بودن یا آپوپتوز^۱ (مرگ برنامه ریزی شده سلول) اسپرم استفاده می شود. در حالت طبیعی در اسپرم زنده و سالم این فسفولیپید در سمت داخل غشا پلاسمایی اسپرم قرار دارد. در حالی که در طول فرآیند آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین از سطح سیتوپلاسمی غشا پلاسمایی به سطح خارج سلولی تغییر مکان می دهد و حضور آن در سطح غشا پلاسمایی اسپرم نشانه اولیه وقوع آپوپتوز است. Annexin V در حضور یون کلسیم تمایل زیادی به اتصال به فسفاتیدیل سرین غشا اسپرم دارد و به همین دلیل می تواند به عنوان یک نشانگر در تشخیص آپوپتوز مورد استفاده قرار گیرد. اگر Annexin V به یک ماده فلورسنت متصل باشد می توان با دستگاه فلوسایتومتر مراحل آپوپتوز را تشخیص داد. در این روش به طور معمول از Annexin V

1- Apoptosis

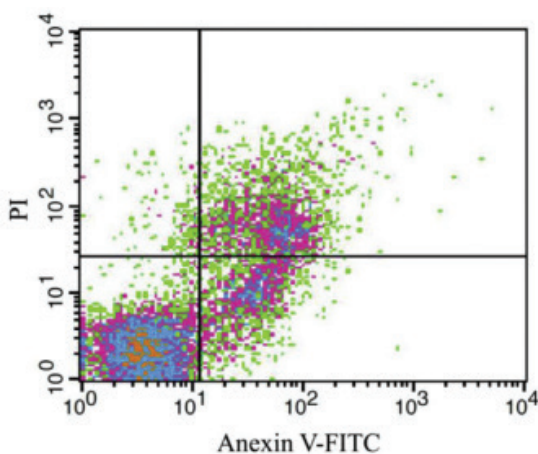
کونژوگه شده با رنگ فلورایزوتیوسیانات (FITC) همراه با رنگ پروپیودیوم آیودید (PI) استفاده می‌شود. با این ترکیب رنگ می‌توان سه جمعیت سلولی زنده، مراحل آغازین آپوپتوز، مرحله نهایی آپوپتوز و نکروز^۱ (مرگ سلول در اثر صدمات شدید) را تشخیص داد (شکل ۵۱).

برای اندازه‌گیری میزان جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین غشا اسپرم، بعد از یخ‌گشایی نمونه منی، قسمت رقیق‌کننده به وسیله سانتریفیوژ حذف می‌شود و نمونه به وسیله بافر کلسیم شستشو داده می‌شود؛ سپس ۱۰ میکرولیتر Annexin V به منی افزوده و در محل تاریک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری می‌شود. پس از آن مقدار ۱۰ میکرولیتر PI به نمونه اضافه نموده و میزان جابه‌جایی فسفاتیدیل سرین غشا اسپرم به وسیله فلوسایتومتر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در نمودار دستگاه فلوسایتومتر نمونه‌های Annexin V منفی و PI منفی (A^{-}/PI^{-}) به عنوان اسپرم زنده تلقی می‌شوند. نمونه‌های Annexin V مثبت و PI منفی (A^{-}/PI^{+}) به عنوان اسپرم مرده و دچار آپوپتوز ثانویه تلقی می‌شوند و Annexin V مثبت و PI مثبت (A^{+}/PI^{+}) به عنوان نمونه‌های Annexin V مثبت و PI مثبت (A^{+}/PI^{+}) به عنوان اسپرم زنده ولی دچار آپوپتوز اولیه هستند. Annexin V مثبت و PI مثبت (A^{+}/PI^{+}) به عنوان اسپرم نکروز شده در نظر گرفته می‌شوند (شرفی و همکاران، ۲۰۱۵) (شکل ۵۲).

1- Necrosis



شکل ۵۱- تصویر میکروسکوپ فلورسنت آزمایش فعالیت میتوکندری با استفاده از رنگ آمیزی Annexin V/PI اسپرم سبز در مرحله آپوتوز اولیه قرار دارد (A^+/PI^-)، اسپرم نارنجی نکروز شده است (A^-/PI^+)



شکل ۵۲- گراف فلوسایتومتری آپوتوز با استفاده از رنگ آمیزی Annexin V/PI

روش‌های تعیین آسیب DNA و کروماتین اسپرم

بررسی وضعیت کروماتین اسپرم یکی از مباحث مهم در تکنولوژی تولید مثل است؛ زیرا اسپرم نه تنها در فعال‌سازی تخمک موثر است، بلکه نیمی از ژنوم نسل آینده توسط اسپرم منتقل می‌شود و سلامت آن جهت تکوین جنین ضروری است. با توجه به اهمیت سلامت DNA اسپرم در باروری، در این قسمت به روش‌های بررسی ساختار کروماتین اسپرم می‌پردازیم. صرف نظر از نحوه ایجاد آسیب در DNA، روش‌های متفاوتی جهت تشخیص میزان این آسیب‌ها وجود دارد. آزمایشات عمومی ارزیابی کروماتین شامل، SCSA^۱، SCD^۲، Comet Assay^۳ (SCGE)، TUNEL^۴، FISH^۵، CMA3^۶ و آکریدین اورانژ^۷ (AO) می‌باشند (نصر اصفهانی و همکاران، ۱۳۹۱).

تکنیک SCSA

این روش به تکنیک اصلی و طلایی بررسی شکست DNA معروف است و نتایج بسیار دقیقی در ارتباط با ناباروری ارائه می‌دهد. اساس این روش وجود حساسیت ساختار کروماتین

1- Sperm chromatin structure assay (SCSA)

2- Sperm chromatin dispersion (SCD)

3- Single cell gel electrophoresis

4- Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

5- Fluorescence in situ hybridization (FISH)

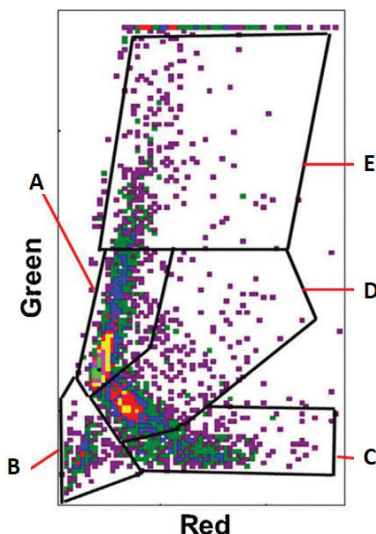
6- Chromomycin A3 (CMA3) staining

7- Acridine orange (AO)

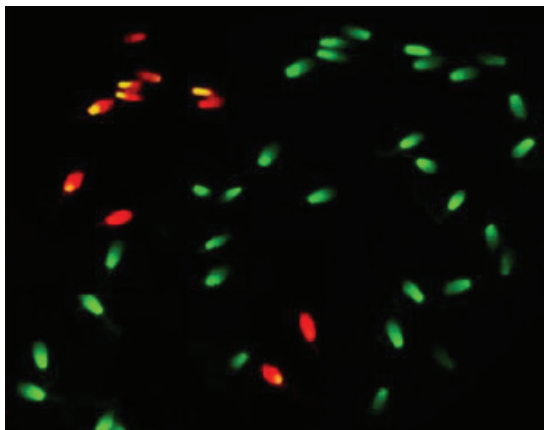
DNA در هنگام مواجه با اسید و ویژگی های متاکروماتیک رنگ آکریدین اورانژ است. رنگ آکریدین اورانژ یک فلوروکروم است که به عنوان یک مونومر بین دو زنجیره DNA قرار می گیرد و زمانی که DNA طبیعی و دورشته ای است، رنگ سبز و زمانی که فلوروکروم با تک رشته DNA ترکیب شود رنگ قرمز نارنجی از خود منعکس می کند. اسپرم های رنگ گرفته توسط میکروسکوپ فلورسنت و دستگاه فلوسایتومتری بررسی می شوند. در این روش ابتدا یک محلول اسیدی شامل اسیدسیتریک، EDTA، Na_2HPO_4 و کلرید سدیم با pH ۱/۲ را تهیه کرده و یک محلول رنگ آمیزی شامل آکریدین اورانژ، اسید سیتریک، EDTA، Na_2HPO_4 و کلرید سدیم با pH ۰/۶ نیز آماده می شود. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول اسیدی را به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه منی شسته شده افزوده و بعد از ۳۰ ثانیه ۹۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ آمیزی را به آن اضافه کرده و بلافاصله با دستگاه فلوسایتومتری تعداد اسپرم های طبیعی و غیرطبیعی بررسی می شود. بدین صورت که بعد از تحریک به وسیله منبع نوری با طول موج ۴۸۸ نانومتر، آکریدین اورانژ به DNA دورشته ای متصل می شود و رنگ فلورسنس سبز (در طول موج ۵۳۰-۵۱۵ نانومتر) منتشر می شود و با اتصال آن به DNA تک رشته ای رنگ قرمز فلورسنس (در طول موج ۶۳۰ نانومتر به بالا) منتشر می شود (اونسون و ویکسون، ۲۰۰۵) (شکل ۵۳).

تکنیک رنگ آمیزی آکریدین اورانژ (AO)

اساس این تکنیک مانند SCSA است. آکریدین اورانژ یک رنگ فلورسنت برای تمایز DNA دورشته‌ای سالم از مولکول DNA تک‌رشته‌ای دناتوره شده می‌باشد. این رنگ در واکنش با مولکول دورشته‌ای DNA رنگ سبز درخشان و با مولکول DNA تک‌رشته‌ای، رنگ قرمز و زرد ایجاد می‌کند (نصر اصفهانی و همکاران، ۱۳۹۱) (شکل ۵۴).



شکل ۵۳- گراف فلوسایتومتری سنجش سلامت DNA اسپرم توسط آزمایش SCSA. A: اسپرم طبیعی، B: اسپرم مرده و آلودگی، C: اسپرم دارای شکست شدید DNA، D: اسپرم با شکست متوسط DNA، E: اسپرم دارای مورفولوژی غیرطبیعی



شکل ۵۴- تصویر میکروسکوپ فلورسنت آزمایش کروماتین اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین اورانژ، اسپرم‌های سبز دارای DNA سالم و اسپرم‌های زرد و قرمز دارای DNA آسیب دیده هستند.

- (۱) تولایی، مرضیه. بهاره ترکی بلداجی. لیلا آزادی و محمدحسین نصر اصفهانی. (۱۳۹۶). تازه‌های فریز اسپرم انسانی در درمان ناباروری. مجله سلول و بافت. جلد ۸. شماره ۴.
- (۲) شرفی، محسن. (۱۳۸۸). تاثیر محیط انجماد اسپرم بر توانایی لقاح و تکوین رویان‌های آزمایشگاهی گوسفند. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه صنعتی اصفهان.
- (۳) صفدریان، مظاهر. (۱۳۸۵). تلقیح مصنوعی گوسفند و بز. موسسه آموزش عالی علمی- کاربردی جهاد کشاورزی.
- (۴) ضمیری، محمدجواد. (۱۳۸۵). فیزیولوژی تولید مثل. انتشارات حق شناس.
- (۵) علوی شوشتری، سیدمرتضی. (۱۳۹۶). مامایی و بیماری‌های تولید مثل گوسفند و بز. انتشارات معتبر.
- (۶) کرمی شبانکاره، حامد. محمدحامد شهبوساری. (۱۳۹۲). فناوری‌های تولید مثلی در نشخوارکنندگان مزرعه‌ای. انتشارات دانشگاه رازی.
- (۷) موحدین، منصوره. ایمان حلویی. فاطمه‌سادات امجدی و زهرا زندیه. (۱۳۹۸). انجماد در روش‌های کمک باروری اسپرم و بافت بیضه. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس.
- (۸) نصر اصفهانی، حسین. مرضیه تولایی. (۱۳۸۹). بررسی مایع منی بر اساس استانداردهای سازمان جهانی بهداشت. انتشارات میرماه.
- (۹) نصر اصفهانی، حسین. مرضیه تولایی. (۱۳۹۱). اسپرم (شناخت و انتخاب اسپرم از دیدگاه بالینی و مولکولی در افراد کاندید ICSI). انتشارات پژوهشگاه رویان.
- 10) Alvarez, M., Tamayo-Canul, J., Anel, E., Boixo, J. C., Mata-Campuzano, M., Martinez-Pastor, F., & de Paz, P. (2012). Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*, 77(6), 1111-1118.
- 11) Collodel, G., Cardinali, R., Moretti, E., Mattioli, S., Ruggeri, S., & Castellini, C. (2012). Role of rabbit prostate granules on sperm viability and acrosome reaction evaluated with different methods. *Theriogenology*, 77(5), 1021-1026.

- 12) Evans, G & Maxwell WC. (1987). Handling and examination of semen. Salamon's artificial insemination of sheep and goats, 93-106.
- 13) Evenson, D. P., & Wixon, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). Toxicology and Applied Pharmacology, 207(2), 532-537.
- 14) Fraczek, M., Piasecka, M., Gaczarzewicz, D., Szumala-Kakol, A., Kazienko, A., Lenart, S., & Kurpisz, M. (2012). Membrane stability and mitochondrial activity of human-ejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Bacteroides ureolyticus*. Andrologia, 44(5), 315-329.
- 15) Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, L., & Nasr-Esfahani, M. H. (2010). In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. Theriogenology, 73(4), 480-487.
- 16) Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, Ü., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. (2005). Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. Theriogenology, 63(8), 2311-2322.
- 17) Langner, M., & Hui, S. W. (1993). Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1149(1), 175-179.
- 18) Lee, T. H., Liu, C. H., Shih, Y. T., Tsao, H. M., Huang, C. C., Chen, H. H., & Lee, M. S. (2010). Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. Human Reproduction, 25(4), 839-846.
- 19) Mahfouz, R., Sharma, R., Lackner, J., Aziz, N., & Agarwal, A. (2009). Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. Fertility and sterility, 92(2), 819-827.
- 20) Perez, L. J., Valcarcel, A., de Las Heras, M. A., Moses, D. F., & Baldassarre, H. (1996). In vitro capacitation and induction of acroso-

mal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. *Theriogenology*, 45(5), 1037-1046.

21) Revell, S. G., & Mrode, R. A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 77-86.

22) Rothe, G., Oser, A., & Valet, G. (1988). Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Die Naturwissenschaften*, 75(7), 354-355.

23) Sharafi, M., Forouzanfar, M., Hosseini, S. M., Hajian, M., Ostad, H. S., Hosseini, L. & Nasreesfahani, M. H. (2009). In vitro comparison of soybean lecithin based-extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation.

24) Sharafi, M., Zhandi, M., & Sharif, A. A. (2015). Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and tissue banking*, 16(2), 261-269.

25) Thys, M., Nauwynck, H., Maes, D., Hoogewijs, M., Vercauteren, D., Rijsselaere, T., & Van Soom, A. (2009). Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin $\alpha 5 \beta 1$) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro. *Reproduction*, 138(3), 471-482.

